



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

감귤와인 슬러지를 이용한 미생물
셀룰로오스 생산 및 특성 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

白 丞 竣

2014年 2月



감귤와인 슬러지를 이용한 미생물 셀룰로오스 생산 및 특성 연구

指導教授 李 璿 柱

白 丞 竣

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2014年 2月

白丞竣의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2014年 2月

Microbial Cellulose Production and Characterization with Citrus Wine Sludge

Seungjun Baek
(Supervised by Professor Sunjoo Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the Degree of Master of Science

2014. 2.

This thesis has been examined and approved.

Commitee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	ii
List of Figures	iii
List of Abbreviations	v
Abstract	vi
I. 서론	1
1. 대체 배지 탐색의 필요성	4
2. 미생물 셀룰로오스의 상처치료 제품의 연구목적	5
3. 은 나노 입자의 항균능력	6
II. 재료 및 방법	8
1. 시약 및 기기	8
2. Elemental analyzer (EA) 측정	9
3. 총 당량 측정(Phenol-Sulfuric acid method)	10
4. ICP-OES 측정	11
5. EtOH 함량 측정	12
6. 사용 균주의 배양조건	13
7. 와인 슬러지의 희석배수에 따른 BC생산량 확인	13
8. MWS 배지와 YG 및 YGE 배지종류별 셀룰로오스 생산량 비교	14
9. X-ray Diffractometer(XRD) 측정	14
10. Field Emission Scanning Electron Microscope(FESEM) 측정	15
11. 은 나노입자 생성	15
12. 수분 함유능력 측정 및 수분 방출률 측정	15
13. Paper disc diffusion method	16
14. Colony forming unit count method	17
III. 결과 및 고찰	19
1. 와인 슬러지의 배지 적합성	19
1-1. 감귤와인 슬러지의 탄소·질소원 분석	19

1-2. 총 당량 측정 (Phenol-Sulfuric acid method)	20
1-3. 필수 무기물 양 측정	21
1-4. 에탄올 양 분석	21
2. 감귤와인 슬러지 배양액을 이용한 셀룰로오스 생산 및 확인	22
2-1. 와인 슬러지의 희석배수에 따른 셀룰로오스 생산량	22
2-2. 배지별 셀룰로오스 생산속도	24
2-3. 생산된 셀룰로오스의 형태 및 구조	25
3. 생산된 셀룰로오스의 활용	26
3-1. 은 나노입자 생성	26
3-2. 수분 함유능력 및 수분 방출률	30
3-3. Ag-BC의 항균성	31
3-3-1. Paper disc diffusion method	31
3-3-2. Colony forming unit count method	32
IV. 요약 및 결론	34
V. 참고문헌	36

LIST OF TABLES

Table 1. Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL} \pm \text{SD}$) of nano silver showing antimicrobial activities	7
Table 2. Instrumental conditions for EA analysis	9
Table 3. Instrumental detection limit(IDL) and conditions for ICP-OES analysis	12
Table 4. Instrumental conditions for XRD analysis	14
Table 5. The element analysis of YG medium and mandarin wine sludge medium	20
Table 6. The total sugar analysis of YG medium and mandarin wine sludge medium	20
Table 7. The ICP-OES analysis of YG medium and mandarin wine sludge medium	21
Table 8. The concentration of ethanol in the wine sludge medium by refractormeter	22
Table 9. Antimicrobial activity of Ag-BC prepared from $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ molar ratio of 1:100 against (A) <i>S. aureus</i> and (B) <i>E. coli</i>	32
Table 10. Colony forming unit counts (cfu/mL) at 0 hr. and 24 hr. contact time intervals with the Ag-BC prepared from $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ molar ratio of 1:100 against <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	33

LIST OF FIGURES

Figure 1. Structure of cellulose	1
Figure 2. Synthetic pathway of bacterial cellulose from simple sugars. Each synthetic step is controlled by specific enzymes	2
Figure 3. Chemical structure of cellulose	3
Figure 4. Silver Nanoparticles generation process	7
Figure 5. Absorption spectra of color products from hexoses and pentoses	10
Figure 6. Calibration Curve	11
Figure 7. Schematic of determining the antibacterial activities through disc diffusion method	16
Figure 8. Schematic of antibacterial activity measurement through CFU count method	18
Figure 9. Cellulose produced from MWS medium and YG medium	23
Figure 10. Comparing the amount of cellulose produced from MWS medium and YG medium	23
Figure 11. Effect of media on the production of BC	24
Figure 12. Scanning electron micrograph of BC, A : MWS 50% medium, B : YGE medium	25
Figure 13. X-ray diffractogram of BC	26
Figure 14. Silver nanoparticles impregnated into BC prepared from the $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ molar ratio of (A) 1:100, (B) 1:50, (C) 1:10, (D) 1:1, (E) 10:1	27
Figure 15. Scanning electron micrograph of BC	28
Figure 16. Water holding capacity and Water release of pure BC and Ag-BC	30

Figure 17. Antimicrobial activity of Ag-BC prepared from $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$
molar ratio of 1:100 against (A) *S. aureus* and (B) *E. coli*.
.....31

Abstract

Bacterial cellulose was produced by *Acetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans* (ATCC 700178) strains using the mandarin wine sludge broth. It is known that carbon source and nitrogen source plays an important role to produce cellulose. This study was to evaluate that Mandarin wine sludge broth was worthy of a substitute for conventional medium for the producing of BC.

The mandarin wine sludge was an inexpensive carbon and nitrogen source with ethanol. It has been actually discarded once the alcohol fermentation was finished in the winery. When the contents of carbon and nitrogen in the sludge were determined, The sludge had less carbon with sugars than YG medium while it had 3 times more nitrogen. BC by *Acetobacter* in the sludge medium was produced three times more than in YG medium.

Bacterial Cellulose(BC) was identified by its morphology and XRD pattern. FESEM data showed similar three dimensional non-woven structure of nano fibrils. XRD data found to be same pattern, such as same theta value and signal pattern. Both data implicated that BCs produced in the sludge and YG medium were same kind. To confirm that the BC produced can be used for the purpose of wound healing, BCs impregnated silver nanoparticles were prepared, and tested anti bacterial activity and water-holding capacity. Silver nanoparticle-impregnated bacterial cellulose showed an excellent moisture content compared to BC without silver nano particles. The freeze-dried silver nanoparticle-impregnated bacterial cellulose exhibited strong antimicrobial activity against *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive).

In conclusion, mandarin wine sludge was sufficient to produce BC. It can be used as the BC producing medium. BC impregnated silver nanoparticles also can used as wound healing-aid.

I. 서론

Cellulose는 β -D-glucose가 β -1,4 글루코시드결합을 통해 중합체를 이룬 다당류이다(Figure 1). 셀룰로오스 분자는 다수가 모여서 섬유를 이루는데 그 최소단위는 지름 0.05 nm, 길이 0.6 nm 이상의 결정구조를 가진 미셀로 이루어져 있고 미셀과 미셀의 연결 부분은 비결정 영역으로 되어 있다. 셀룰로오스의 미세섬유는 목재에서 1개의 세포에 대응할 만큼 미세하며, 이러한 결정성은 셀룰로오스의 강인성의 근원이 된다^{1,2)}.

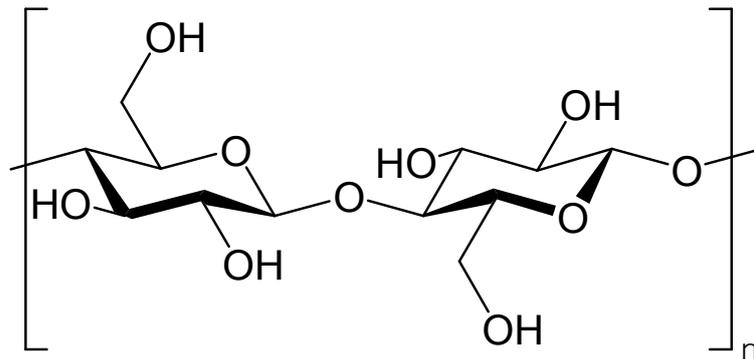


Figure 1. Structure of cellulose

Cellulose는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 목질부의 대부분을 차지하는 천연 고분자 다당류로서 자연계에서는 석탄 다음으로 풍부하게 존재하는 유기화합물이다³⁾. Cellulose는 Jodrell Laboratory에서 Charles F. Cross와 Edward Bevan에 의하여 1885년에 나무에서 최초로 분리되었다. 식물체에서 세포벽은 질기고 망사 형태로서 이루어져 있는데, 이러한 세포벽에서 Cellulose fibril은 주요 구성 요소이다⁴⁾.

Cellulose는 현재 제지, 펄프, 방직산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있을 뿐 아니라 상업적 응용분야가 매우 넓어 그 소비량이 크게 증가되고 있다. 특히 제지산업의 경우 산업기술의 혁신적인 발달로 종이의 소비가 급증하여 제지 원료로 쓰이는 목재에 대한 수요가 갈수록 증가하고 있으며, 원료 수급 문제와 무분별한 벌목, 그리고 식물 cellulose의 정제과정 중 고농도의 화학처리로

인한 환경문제를 야기함에 따라 새로운 제지 대체원료에 대한 연구가 필요한 실정이다⁵⁾. 따라서 미생물에 의해 생산되는 셀룰로오스에 대한 관심이 높아지고 있다.

Cellulose를 생산하는 미생물로는 1886년 A. J. Brown이 초산균이 셀룰로오스를 생산한다는 보고⁶⁾한 이후 *Agrobacterium* 속, *Pseudomonas* 속, *Rhizobium* 속, *Achromobacter* 속 및 *Sarcina* 속 등 다양한 미생물이 보고되었다. 그 중에서 초산균인 *Acetobacter* 속의 셀룰로오스 생산성이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 대표적인 초산균으로는 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. xylinum* 및 *A. methanolicus* 등이 있다^{7,8)}. 다음은 *A. xylinum* 으로부터 셀룰로오스가 생합성되는 대사경로이다(figure 2).

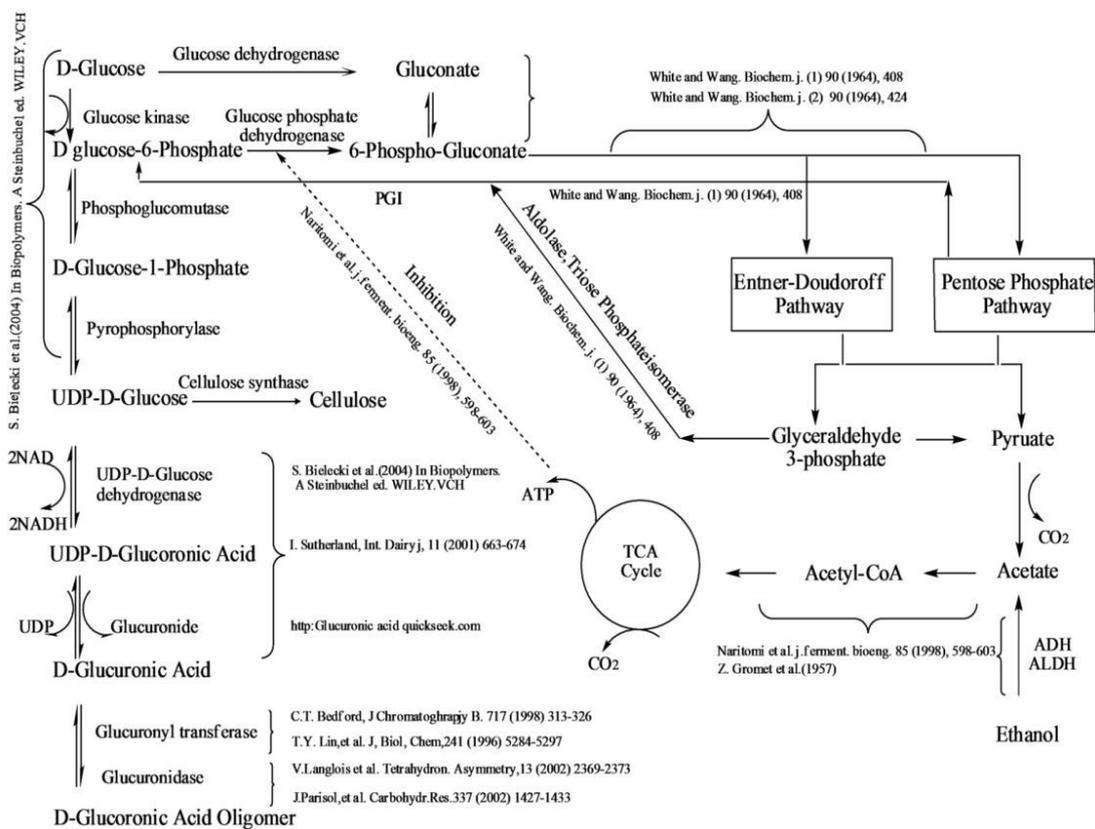


Figure 2. Synthetic pathway of bacterial cellulose from simple sugars. Each synthetic step is controlled by specific enzymes.⁹⁾

이들 초산균을 호기적 조건에서 정치배양 시키면 배양액 표면에 얇은 피막형태의 셀룰로오스를 형성한다. 미생물 유래의 셀룰로오스는 보수성, 흡착성이 우수하며, 원하는 형태로의 성형이 쉽고, 특히 고강도, 고탄력의 특징을 가지고 있다. 이러한 특징은 셀룰로오스에 있는 수많은 -OH기 들이 서로 수소결합을 하고 있기 때문이다(Figure 3).

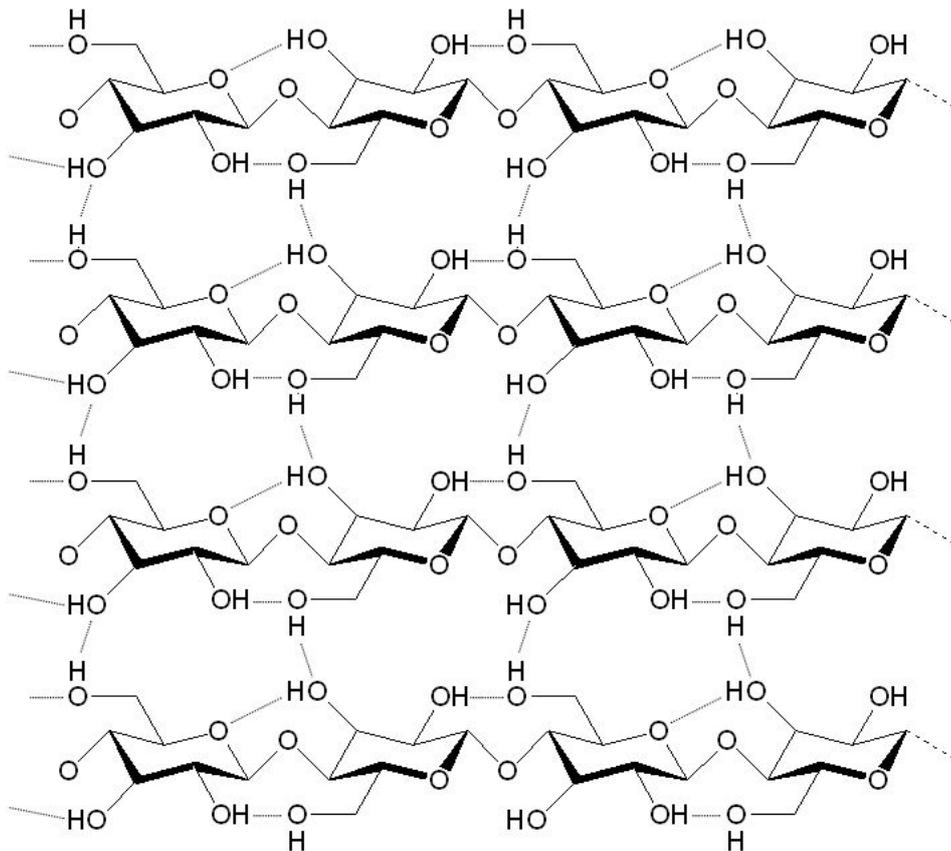


Figure 3. Chemical structure of cellulose

Microbial Cellulose의 이런 우수한 특성으로 인하여 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있다. 고강도 고탄력의 방탄조끼, 방독면의 제조 등과 같은 방위 산업, 의료 제약 분야에서는 화상치료에 사용하는 인공피부, 창상 피복제, 콘택트 렌즈, 인공관절, 인공근육, 인조혈관, 생리활성제, 미세한 섬유구조 및 공극구조를 이용한 반투막 제조 등에 이용될 수 있으며^{10, 11, 12, 13, 14)}, 실제로 인공피부로써 특

허가 인정되어 BioFill[®]로 상업화 된 사례가 있다¹⁵⁾. 음향 산업 분야에서는 피막을 그대로 사용하는 고음질 오디오와 스피커의 diaphragm 제조, 기타 공업제품 분야에서는 종이의 도공액 첨가제, 탄소 섬유, 정보기록용지, 종이의 탄성률, 인장강도, 치수 안정성 등을 향상시킨 고품위, 고부가 가치의 용지제조 등에 활용되고 있다^{16, 17, 18)}. 특히 일본 Sony사에서는 Microbial cellulose를 이용한 스피커 음향 진동판으로 고성능 헤드폰을 제작하여 시판 중에 있다¹⁹⁾. 식품분야에서는 식품의 증량제, 선도 유지제, 조직감 향상, 소포체, 액상식품의 분산성, 유화성, 안정성 개선제로 이용될 수 있으며, 필리핀에서는 nata de coco란 이름으로 이미 생산·수출하고 있다^{19, 20)}.

1. 대체 배지 탐색의 필요성

이렇게 초산균이 생산하는 Microbial cellulose는 다양한 방법으로 활용될 수 있으며, 특히 화학적으로 합성한 것이 아닌 미생물로부터 생합성된 소재라는 점에서 소비자로 하여금 훨씬 친화적 소재라 할 수 있다. 이러한 Microbial cellulose를 대량으로 생산하기 위해서 다양한 연구가 계속 진행되어 왔으나 상업적으로 활용하기에는 고가의 배양액을 사용해야하는 경제적 부담이 있다¹⁶⁾.

Acetobacter strain은 microbial cellulose를 생산하지 않는 세포를 획득하는 자연적인 돌연변이를 하는 경향이 있는데, 이는 microbial cellulose 생합성을 상업적으로 개발하는데 있어서, 주요한 문제점들 중 하나이다. Schramm과 Hestrin은 교반배양에서 *A. Xylinum*의 Cel^- 형태를 분리하여 Type I은 cellulose를 생산(Cel^+)하는 세포들, Type II은 경로를 통하여 복귀 능력이 있는 cellulose 비생산 형태(Cel^-), Type III은 복귀 능력이 없는 cellulose 비생산 형태(Cel^-)로 나눌 수 있다고 기술하였다. Cel^+ 와 Cel^- 의 전환 빈도는 배양 상태에 달려있다. Cellulose를 생산하는 세포들은 정지배양에서 우세하여 배양 배지 표면에 pellicle이라고 불리는 두꺼운 cellulose mat를 생산하는데, 여기에 박테리아 세포가 끼워져서 산소가 풍부한 기체·액체 접촉면에 접하여 있다. 교반배양 조건하에서 액체 배양 배지의 충분하고 균일한 산소공급은 Cel^- 세포를 많이 생성하게 한다. 그러므로 배양 배지의 산소공급은 Cel^+ *A. xylum* 세포를

구분하게 하는 요소라고 믿고 있다. 교반배양 조건 하에서 cellulose 합성 효율에 관한 배양 배지 조성 효과에 관한 연구에서 이러한 생물고분자물질은 에탄올(2%, v/v)을 첨가한 배지에서 획득할 수 있었다. 이러한 현상은 대사에서의 변화 때문이 아니고 Cel^+ 세포에서 Cel^- 로 전환 결핍 때문이라는 것이다. 그러므로 교반배양에서 *A. xylinum* Cel^+ 세포에서 cellulose 비생산 Cel^- 로의 전환은 배양배지의 에탄올을 첨가함으로써 감소한다고 연구 되어있다^{4, 21, 22}).

Microbial cellulose의 상업화는 낮은 생산성과 고가의 배지사용 등과 같은 이유 때문에 저비용, 고효율의 생산을 위해 대체 배지를 개발할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 와인공장에서 발생하는 와인 슬러지를 이용하여 대체 배지로서 사용이 가능한지 성분을 분석하고 이후 Microbial cellulose의 생산을 위한 최적 조건을 찾고자 한다.

2. 미생물 셀룰로오스의 상처치료 제품의 연구목적

피부 상처 치료는 많은 서로 다른 조직, 세포 형태와 주형 성분의 연관성을 요구하는 복잡한 과정이다. 상처 치료 연구가 현재 목표로 하고 있는 세 가지 중요한 방향이 있다

- a) 치료를 가속화하고 흉터를 감소하는 요소에 의한 상처 치료 효과 향상
- b) 자가 이식 피부와 동등한 새로운 인공 피부의 개발
- c) 흉터를 형성하지 않고 재생에 의하여 치료 과정을 조장하는 신호 인식

상처 치료를 위하여 일반적으로 상처를 덮는데 사용하는 재료는 상처 감염과 체액 손실을 방지하는 장벽을 제공하여 표피 재생을 위한 적합한 환경을 조성하여야 한다. 화상은 피부 조직에 광범위한 손상을 입히는 상해이다. 치유 과정은 표피의 재생과 진피의 복구를 포함하는데, 두 가지 경우 모두 흉터를 남긴다. 화상 치료의 주요한 목적 중 하나는 신속하게 상처봉합을 수행하여 치유율을 높이고 즉시 통증을 완화해 주는 것이다. 또한 상처 부위의 감염과 탈수되는 것을 방지하는 것이다. 많은 생물학적 그리고 합성 상처 드레싱이 이미 개발 되었음에도 불구하고 이상적인 상처 드레싱을 찾기 위한 소재 개발이 여전히 진행 중이다. 상처 치료의 분야에서 이상적인 상처 드레싱 시스템은 구조적·기능적으로

자가이식 피부와 유사하여야 한다. *A. xylinum* 에 의하여 합성된 미생물 셀룰로오스는 독특한 나노 구조로부터 얻어지는 높은 수분 함유율 더 나아가 최근에는 은과 같은 항균능력을 가지고 있는 금속을 셀룰로오스 안에 환원시켜 2차적인 감염을 막는 등 새로운 상처 치료 시스템에 상당한 잠재력을 보여준다²³⁾.

3. 은 나노 입자의 항균능력

은의 살균능력은 이미 오래전부터 알려져 있었다. 은은 인체에 해가 없고 독성이 없으며, 미생물 체내의 신진대사 기능을 다방면으로 억제하여 650여 종류의 유해 세균을 죽이는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 은의 미생물 불활성화 능력은 1869년부터 연구되기 시작하여 현재까지도 많은 연구자들이 연구를 진행하고 있으며, 다른 항생제에 비하여 내성을 갖는 미생물의 수가 적기 때문에 은을 이용한 치료 방법이 개발되기도 하였다²⁵⁾. 은 나노 입자의 미생물 불활성에 대한 효과는 나노 기술의 발전과 함께 시작되었고 2000년대에 들어서야 활발한 연구가 진행되었다. 그람 양성, 그람 음성, 그리고 항생제 저항 능력을 지닌 세균에서부터 곰팡이나 바이러스에 이르기까지 다양한 미생물에 대한 결과들이 나왔다(Table 1). 전반적으로 기존의 항생제 보다 더 민감한 반응을 보였으며, 미량의 농도에서도 그람 양성 세균을 억제하는 효과를 보였다^{26, 27, 28, 29)}.

은 나노입자의 합성은 다양한 방법들이 알려져 있다. 그중 가장 보편적으로 사용되는 방법은 AgNO_3 와 NaBH_4 를 사용하여 은 입자를 환원시키는 방법이다. NaBH_4 는 유기합성 등에서 자주 사용하는 강력한 환원제로 AgNO_3 수용액에 NaBH_4 수용액을 첨가하면 은 이온(Ag^+)이 환원되어 은(Ag^0)으로 되고 Ag 콜로이드 용액에서 여분의 BH_4^- 들이 은 나노 입자를 둘러싸게 되면 정전기적 반발에 의해 나노 입자의 형태가 되는 방법이다(Figure 4).

Table 1. Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL} \pm \text{SD}$) of nano silver showing antimicrobial activities^{28, 32)}.

	Bacterial*	($\mu\text{g}/\text{mL}$) Silver Nanoparticle	($\mu\text{g}/\text{mL}$) Positive control**
Gram positive	BS	1.5 – 1.9	32(G)
	MB	1.1	0.5(R)
	MS	0.2 – 0.8	0.85(R)
	MRSA	0.3 – 0.7	64(G)
	SA	0.5 – 0.9	1(G)
Gram negative	AB	0.3 – 0.5	0.06(AK)
	EC	0.3 – 0.7	0.5(AK)
	PA	0.3 – 0.5	1(AK)
Fungi	AN	25	2(A)
	CA	5.6 – 6.4	0.2(A)
	CN	3	2(A)
	TB	2	2.5 – 5(A)

* Abbreviation of Bacterial strains

BS, *B. subtilis*; MB, *M. bovis*; MS, *M. smegmatis*;

MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; SA, *S. aureus*;

AB, *A. baumannii*; EC, *E. coli*; PA, *P. aeruginosa*;

AN, *A. niger*; CA, *C. albicans*; CN, *C. neoformans*; TB, *T. beigeli*;

** Abbreviation of Positive control

R, rifampicin; G, gentamicin; AK, amikacin; A, amphotericin.

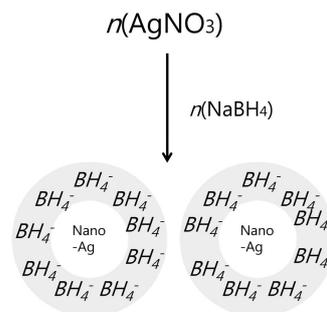


Figure 4. Silver Nanoparticles generation process²⁶⁾.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

실험에 사용한 와인 슬러지는 농업회사법인 1950으로부터 제공 받았다.

셀룰로오스 생산을 위해 사용 된 균주는 Toyosaki, H. 등³⁰⁾이 블랙 체리로 부터 분리한 *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* Toyosaki *et al.*(ATCC 700178)를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양 받아서 보존해온 균주를 사용하였고, 배양기로는 다솔과학의 Shaking Incubator (DS-310F)를 사용하였다. 미생물 배양을 위해 사용한 배지성분으로는 Glucose(Sigma-Aldrich, USA), Bacto Yeast Extract(BD, USA), Ethanol (Fisher Scientific, Korea), CaCO₃(OCI, Korea), Bacto Agar(BD, USA)을 사용하였다.

감귤 와인 슬러지에 들어있는 다양한 성분을 분석하였는데, C, H, N, S 을 분석하기 위해 LECO사의 Elemental Analyzer(TruSpec Micro), 검정곡선 작성에 사용된 표준물질은 Cystine(LECO, USA)을 사용, C, N 이 외에도 미생물 생장에 필요한 미량 원소 분석을 위해 Perkin Elmer사의 ICP-OES(OPTIMA 7300 DV), 시료의 전처리를 하기위해 HNO₃(Dae Jung, Korea), MILESTONE사의 Microwave Sample Digestion System(START D) 검정곡선 작성에 사용된 표준물질은 ICP-MS 68 Element Standard I(48 Elements)(QCD Analysts, USA)를 사용, EtOH 함량을 확인 하기위해 ATAGO(Japan)사의 Pocket Refractometer 사용, 총 당함유량 측정을 위해 Phenol-Sulfuric acid법을 사용하였고, Phenol, H₂SO₄(Dae Jung, Korea)를 사용하여 반응 후 흡광도 측정은 TECAN(Switzerland)사의 Microplate reader(Sunrise™)를 사용하였다.

생성된 Cellulose의 구조 및 물성 확인을 위해 Rigaku Instruments 사의 XRD(D/MAX2200H, Bede200, Nonius CAD MACH3), JEOL사의 SEM (JSM-6700F), CRESSINGTON(UK)사의 SPUTTER COATER 108auto 를 사용하였다.

Cellulose에 은 나노입자를 생성시키기 위해 AgNO_3 (JUNSEI, Japan), NaBH_4 (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

은 나노입자가 입혀진 Cellulose의 항균활성능력을 평가하기 위해 사용된 균주로는 Gram 음성균인 *Escherichia coli* (KCTC 12181), Gram 양성균인 *Staphylococcus aureus* (KCTC 11335)를 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받아서 보존해온 균주를 사용하였고, 배양에 사용한 배지성분으로 TSB broth (BD, USA), Beef extract (BD, USA), Peptone (DIFCO, USA)를 사용하였다.

2. Elemental analyzer (EA) 측정

시료를 5000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 감압여과한 뒤 여과액을 동결건조하여 용질만을 얻어 균일하게 분쇄 후 원소분석을 실시하였다. 시료의 C, H, N, S 를 정량하기 위해 0.5 mg ~ 2.0 mg 까지 Cystine으로 검정곡선을 작성하였다. 이 때 4종의 원소성분을 분석하기 위한 EA의 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Instrumental conditions for EA analysis.

Instrument : LECO, Model TruSpec Micro CHNS
Furnace Temp. : 1075℃
Afterburner Temp. : 850℃
Standard : Cystine (N : 11.660, C : 29.990, H : 5.0300, S : 26.690)

3. 총 당량 측정 (Phenol-Sulfuric acid method)

와인 슬러지 배양액 내 탄소 원으로 공급된 당의 잔존량을 확인하기 위해 Phenol-Sulfuric acid 법³¹⁾을 사용하였다. 이 방법은 강산과 열의 존재하에 탄수화물을 Furanaldehyde와 hydroxymethyl furaldehyde와 같은 퓨란 유도체를 형성하는 일련의 반응을 한다. 이렇게 형성된 퓨란 유도체는 페놀과 축합반응을 하여 비색정량이 가능한 화합물을 만든다. 이렇게 생성된 각 화합물들의 최대 흡광도는 육탄당(Hexose)의 경우 490 nm, 오탄당(Pentose)의 경우 480 nm에서 최대흡광도를 갖는다(Figure 5).

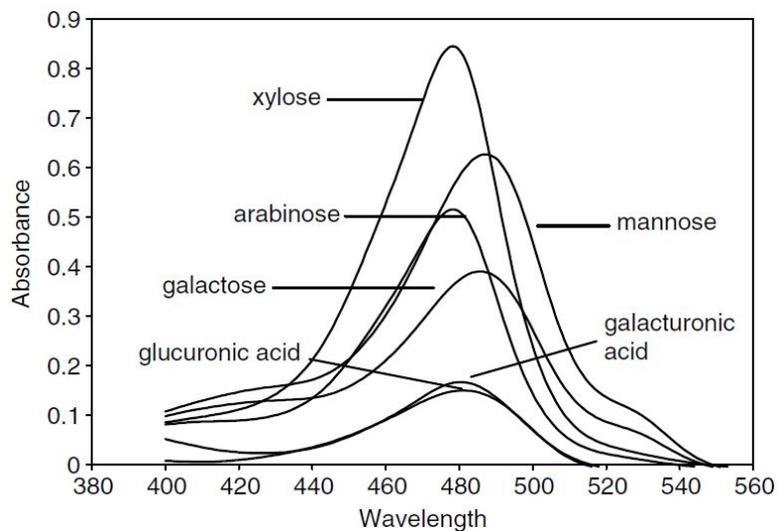


Figure 5. Absorption spectra of color products from hexoses and pentoses.³¹⁾

분석 할 시료는 증류수로 10^{-2} 으로 희석하여 사용하였다. 시험관에 시료를 $300 \mu\text{L}$ 와 5% Phenol 수용액 $300 \mu\text{L}$ 를 첨가하여 혼합한 후 다시 H_2SO_4 수용액을 $900 \mu\text{L}$ 첨가하고 약 10초간 Vortexing 한다. 이후 상온에서 20분간 방치한 뒤, 96 well plate에 $200 \mu\text{L}$ 씩 취하여 Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준 곡선은 Glucose를 1 mg/mL 농도부터 1/2씩 총 8단계까지 계단식 희석

하여 사용하였다(Figure 6).

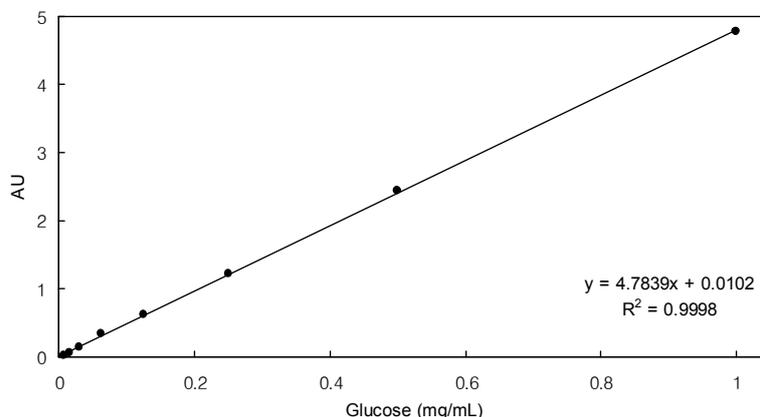


Figure 6. Calibration Curve

4. ICP-OES 측정

미량원소를 측정하기 위해 ICP-OES를 사용하였다. 시료를 5000 rpm으로 10분간 원심 분리한 상등액을 감압여과한 뒤 여과액을 동결건조하여 용질만을 얻어 균일하게 분쇄한다. 이후 무게를 측정하여 테프론(PFA) 용기에 넣고, 70% HNO₃ 10 mL를 가한 후 마이크로파를 조사(1000 W)하였다. 이 때 온도는 10분 동안 180℃로 상승시키고, 이 온도에서 5분간 유지시킨 후 서서히 상온으로 냉각하였다. 마이크로파 분해를 거친 용액을 주사기 필터(0.45 μm)로 불용성 입자를 거른 후 초순수를 사용하여 용량플라스크에서 25 mL가 되도록 희석하였다. 분석 시 사용한 표준용액은 QCD Analysts사의 ICP-MS 68 Element Standard I(48 Elements: Al, As³⁺, Ba, Be, Bi, B,Cd, Ca, Ce, Cs, Cr³⁺, Co, Cu, Dy, Er,Eu, Gd, Ga, Ho, In, Fe, La, Pb, Li, Lu,Mg, Mn, Nd, Ni, P, K, Pr, Re, Rb, Sm,Sc, Se, Na, Sr, Tb, Tl, Th, Tm, U, V,Yb, Y, Zn)를 사용하였고 시료의 농도에 따라 고농도 성분들은 0.1 ~ 20.0 mg/L, 저농도 성분들은 0.01 ~ 1.0 mg/L 범위로 조제하였다. 이 때 8종의 원소성분을 분석하기 위한 ICP-OES의 조건 및 검출한계는 Table 3와 같다.

Table 3. Instrumental detection limit(IDL) and conditions for ICP–OES analysis.

Instrument : Perkin Elmer, Model OPTIMA 7300DV		
RF power : 1450 Watts		
Plasma gas flows : 15 L/min		
Auxiliary gas flows : 0.2 L/min		
Nebulizer gas flows : 0.65 L/min		
Sample uptake rate : 1.5 mL/min		
Element	Wavelength(nm)	Detection Limit ($\mu\text{g/L}$)
P	214.914	~ 298
K	766.490	~ 53.4
Na	589.592	~ 15.4
Ca	422.673	~ 100
Mg	285.213	~ 5.34
Fe	259.939	~ 3.14
Mn	259.372	~ 0.314
Zn	213.857	~ 1.26

5. EtOH 함량 측정

EtOH의 함량을 확인하기 위해 ATAGO사의 Pocket Refractometer를 사용하였다. 시료를 5000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 감압여과한 뒤 여과액을 주사기 필터(0.45 μm)로 불용성 입자를 거른 후 사용하였다.

6. 사용 균주의 배양조건

셀룰로오스를 생산하는 균주는 ATCC로부터 분양받아 보관중인 *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans*(ATCC 700178) 균주를 실험에 사용하였다. 이 균주는 다른 초산균에 비해 많은 양의 셀룰로오스를 생산하는 것으로 알려져 있다. 미생물 배양을 위한 기본배지로는 ATCC에서 권장하는 YGC 배지를 사용하였으며 배지의 조성은 Glucose 50 g/L, Yeast extract 5 g/L, CaCO₃ 12.5 g/L, Agar 15.0 g/L 이며, 액체배지로 사용 할 때는 CaCO₃와 Agar를 제외하고 제조하였고, EtOH이 1% 첨가된 배지는 편의상 YGE 배지라 정하고 사용하였다.

감귤와인 슬러지 배양액(MWS medium)은 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 감압 여과하여 얻은 여과액을 증류수로 희석하여 사용하였으며 희석비는 % 단위로 구분지어 사용하였다.

동결보관중인 균주를 250 mL 삼각플라스크 150 mL 배양액에 접종하여 26℃에서 24시간 동안 180 rpm으로 진탕배양 하였다. 생성된 Cellulose를 제거하고 순수하게 배양액만을 얻기 위해 멸균된 거즈를 이용하여 세포 현탁액과 셀룰로오스를 분리하였다. 이렇게 얻은 세포 현탁액을 배양액에 5%씩 접종하여 동일한 조건에서 배양하여 사용하였다.

7. 와인 슬러지의 희석배수에 따른 BC생산량 확인

와인 슬러지의 희석배수에 따른 BC생산량을 확인하기 위해 다양한 농도의 와인 슬러지 배양액을 만들어 생성된 셀룰로오스의 양을 비교하였다. 최초 20%, 40%, 60%, 80%, 100%의 농도에서 실험하여 대략적인 셀룰로오스 최대 생성점을 찾아내고, 이들 중 가장 셀룰로오스 생산량이 많았던 40%를 중심으로 20%, 30%, 40%, 50%의 농도에서 반복 실험을 하였다. 각 농도별로 150 mL 배양액에서 생성된 셀룰로오스를 수확하여 과량의 증류수로 세척하고 0.5 M NaOH 수용액에 넣어 2시간 동안 80℃ 조건에서 세포를 용해하였다. NaOH를 제거한 후 과량의 증류수를 사용하여 중성이 될 때까지 세척한 후 동결 건조하

여 순수한 셀룰로오스의 건조중량을 측정하였다.

8. MWS 배지와 YG 및 YGE 배지종류별 셀룰로오스 생산량 비교

40 mL 배양액에서 생성된 셀룰로오스를 수확하여 과량의 증류수로 세척하고 0.5 M NaOH 수용액에 넣어 2시간 동안 80°C 조건에서 세포를 용해하였다. NaOH를 제거한 후 과량의 증류수를 사용하여 중성이 될 때까지 세척한 후 동결 건조하여 순수한 셀룰로오스의 건조중량을 24시간 단위로 15일간 측정하였다.

9. X-ray Diffractometer(XRD) 측정

생성된 셀룰로오스가 동일 물질인지 확인하기 위하여 XRD를 측정하였다. 셀룰로오스를 수확하여 과량의 증류수로 세척하고 0.5 M NaOH 수용액에 넣어 2시간 동안 80°C 조건에서 세포를 용해하였다. NaOH를 제거한 후 과량의 증류수를 사용하여 중성이 될 때까지 세척한 후 동결 건조하여 Film 형태로 제작하여 5° ~ 90° 2θ 범위에서 Cu-target을 이용하여 측정하였다. 이 때 시료를 분석하기 위한 XRD의 조건은 Table 4와 같다.

Table 4. Instrumental conditions for XRD analysis.

Instrument : Rigaku Instruments, Model D/MAX2200H
X-ray source : CuK- α / 40 kV / 30 mA
Goniometer : RINT2000 Wide angle goniometer
Filter K- β filter
Scan mode : continuous
Scan speed 10° /min
Scan Step ; 0.02°
Scan axis : 2 θ / θ
Scan range : 5° → 90°

10. Field Emission Scanning Electron Microscope(FESEM) 측정

생성된 셀룰로오스의 형태를 확인하기 위해 FESEM을 사용하여 표면을 관찰하였다. 셀룰로오스를 수확하여 과량의 증류수로 세척하고 0.5 M NaOH 수용액에 넣어 2시간 동안 80℃ 조건에서 세포를 용해하였다. NaOH를 제거한 후 과량의 증류수를 사용하여 중성이 될 때까지 세척한 후 동결 건조하였다. 완벽히 건조된 시료를 SPUTTER COATER 108auto를 사용하여 10 mA로 60초간 Pt으로 코팅하여 시편을 제작하였다. 이후 FESEM을 사용하여 시료의 표면을 관찰하였다. 이 때 시료를 분석하기 위한 FESEM의 조건은 다음과 같다.

11. 은 나노입자 생성

NaBH₄와 AgNO₃ 수용액의 몰농도를 조절하여 셀룰로오스 내 은 나노입자를 형성시켰다. 수확한 셀룰로오스를 0.001 M AgNO₃ 수용액에 1시간 넣어두고 꺼내어 EtOH을 사용하여 30초간 세척한다. 이후 농도별(0.001 M, 0.01 M, 0.1 M)로 제조한 NaBH₄ 수용액에 10분간 넣어 반응시켜 셀룰로오스 내에 은을 환원시키고 과량의 증류수로 10분간 세척하고 보관한다.

12. 수분 함유능력 측정 및 수분 방출률 측정

40 mL 배양액에서 생성된 셀룰로오스를 수확하여 과량의 증류수로 세척하고 0.5 M NaOH 수용액에 넣어 2시간 동안 80℃ 조건에서 세포를 용해하였다. NaOH를 제거한 후 과량의 증류수를 사용하여 중성이 될 때까지 세척한다. 이후 핀셋으로 BC를 꺼내어 체로 옮긴 후 2회 털어 걸 표면의 물기를 제거하고 37℃에서 대기시켜 2시간마다 무게를 측정하여 수분 방출률을 측정하였다. 무게의 변화가 거의 없어지면 동결 건조하여 건조 중량을 측정하고 다음과 같은 식으로 수분 함유능력 및 수분 방출률을 결정하였다⁹⁾ (Equation 1).

Equation 1. Water holding capacity

$$\text{Water holding capacity (\%)} = \frac{\text{Mass of water removed during drying (g)}}{\text{Dry weight of BC sample (g)}}$$

13. Paper disc diffusion method

은 나노입자를 함유한 셀룰로오스의 항균활성을 측정하기 위해 *E. coli* 와 *S. aureus*에 대하여 Paper disc diffusion 법으로 생육 억제율을 측정하였다. *E. coli*와 *S. aureus*는 0.8% Agar 함유한 배지에 1.5×10^7 CFU/mL 의 양으로 접종하여 1.5% Agar 배지위에 붓는다. 배지가 굳으면 직경 1.2 mm pure BC 와 은 나노입자를 함유한 microbial cellulose를 올려 37°C에서 배양하여 24시간 단위로 2회 발육 저지환을 측정하였다(Figure 7).

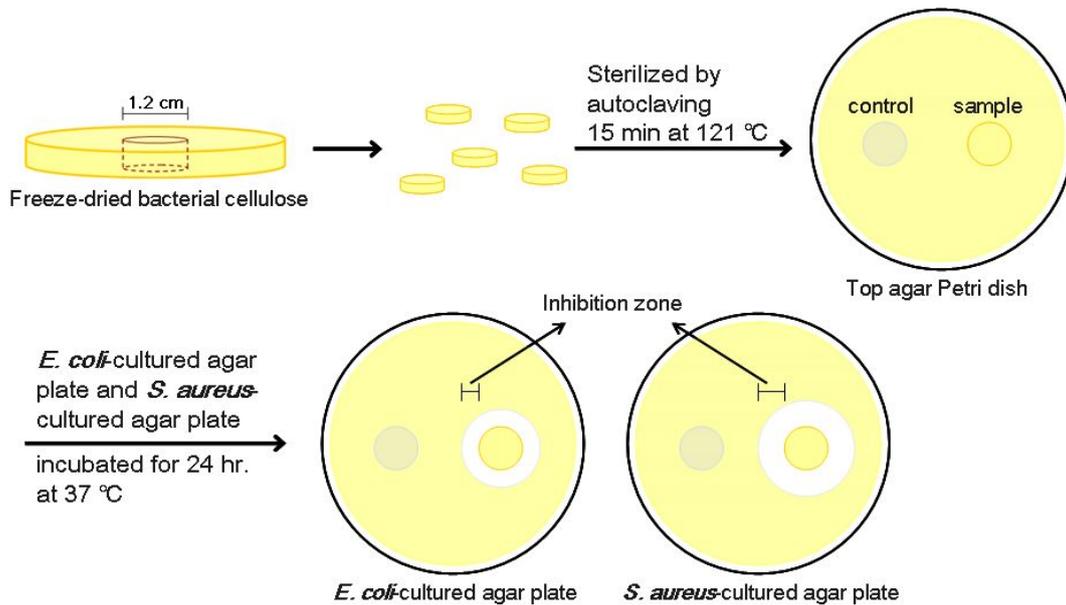


Figure 7. Schematic of determining the antibacterial activities through disc diffusion method.

14. Colony forming unit count method

10 mL 배지에 *E. coli*와 *S. aureus*를 각각 1.5×10^7 CFU/mL 로 접종하고, 각 균주별로 3개의 시험관을 사용하여 첫 번째 시험관은 균주만 접종, 두 번째 시험관은 pure-BC를 추가, 마지막 시험관은 Ag-BC를 넣어 24시간 배양 한다. 이후 각 시험관에 50 mL 생리식염수를 추가하여 희석 후 배양액 일정량 취하여 Agar plate에 도말하고 동일한 조건으로 24시간 배양한다. 이 때 형성된 콜로니의 개수를 측정하여 배양전과 후의 콜로니 형성 개수를 비교하였다³³⁾ (Figure 8).

항균능력은 다음과 같은 계산식에 의해 결정하였다(Equation 2).

Equation 2. Antimicrobial efficiency

$$\text{Antimicrobial efficiency (\%)} = \frac{\text{CFU at 0 hr.} - \text{CFU at 24 hr.}}{\text{CFU at 0 hr.}} \times 100$$

1. Bacterial suspension broth 10 mL(Blank)
2. Bacterial suspension broth 10 mL + pure BC
3. Bacterial suspension broth 10 mL + Ag-BC

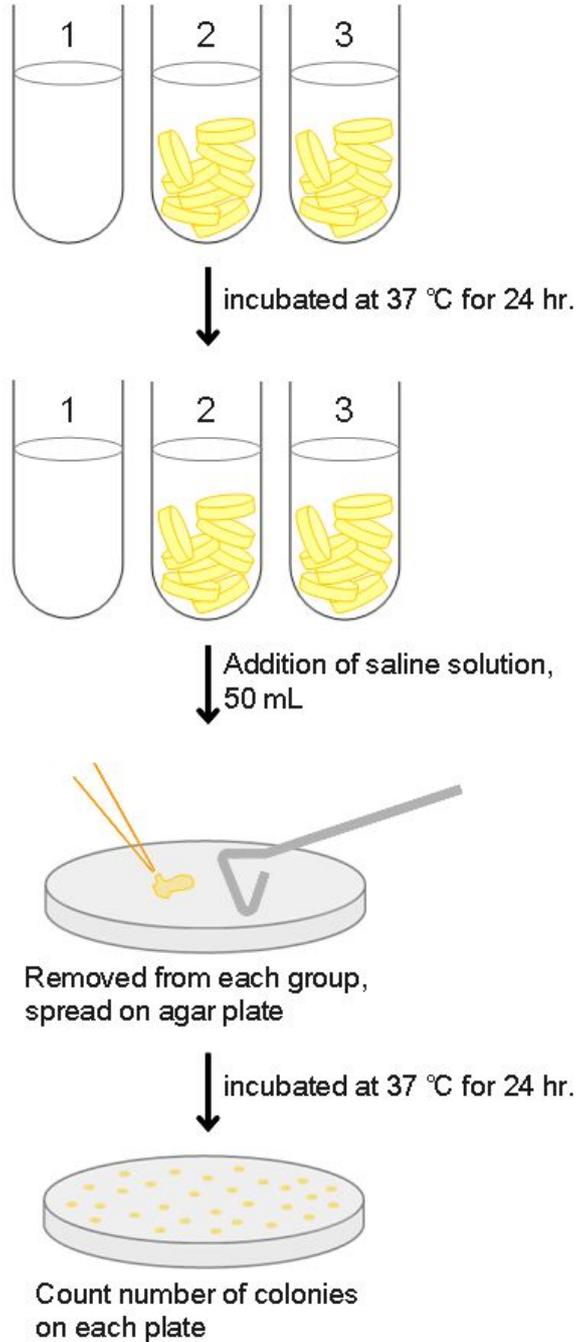


Figure 8. Schematic of antibacterial activity measurement through CFU count method.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 와인 슬러지의 배지 적합성

셀룰로오스를 생산하는 미생물은 다른 미생물들과 달리 고가의 배지를 사용하게 된다. 때문에 셀룰로오스 생산의 경제성을 높이기 위해서는 저가의 대체 배지를 찾을 필요성이 있다. 셀룰로오스를 생산함에 있어 배양액의 성분 중 중요하게 보아야 할 성분은 풍부한 탄소원, 질소원 그리고 균체성장에 도움을 주는 EtOH이다. 따라서 본 논문에서는 감귤와인 슬러지를 재활용하여 배양액으로 사용가능 여부를 확인해 보았다.

와인은 효모를 사용한 발효주이다. 와인과 같은 발효주를 생산하는 공장에서 주류를 생산할 때 효모의 상태를 보면서 여러 공정을 통해 얻은 주류 이외의 효모와 슬러지들은 그냥 버려지는 것이 아니라 몇 회 재사용 후 폐기한다. 본 연구에 사용한 와인 슬러지는 앞서 말한 대로 3회 사용 후 버려진 와인 슬러지를 수거하여 셀룰로오스 생산 대체 배지로 활용가능 여부를 확인하기 위해 먼저 슬러지의 조성을 조사할 필요가 있었다.

1-1. 감귤와인 슬러지의 탄소·질소원 분석

셀룰로오스 생산량은 배양액 안의 다양한 성분이 관여하는데 그 중 가장 중요한 요소는 배양액에서 제공되는 탄소원과 질소원이다.

와인 슬러지의 조성을 알아보기 위해 YG 배지와 비교하여 Elemental analyzer로 C, H, N, S 성분을 분석하였다(Table 6).

Table 6. The element analysis of YG medium and mandarin wine sludge medium.

	Element (%)			
	C	H	N	S
YG medium	39.534	6.5319	0.8926	3.3347
MWS medium	38.7	6.1149	1.8360	2.8155

Table 6에서 보는 바와 같이 대조군인 YG 배지와 와인 슬러지 배지의 성분에 탄소원은 약 40% 정도로 비슷한 값을 나타냈으나, 질소원의 경우 와인 슬러지 배지가 YG 배지에 비해 약 2.06배 정도 많은 것을 알 수 있다. 기본배지와 비교해 와인슬러지는 더 많은 질소원을 가지고 있어 대체배지로 활용 가능할 것임을 확인하였다.

1-2. 총 당량 측정(Phenol-Sulfuric acid method)

앞서 실시한 원소분석에서 탄소원의 경우 거의 동일한 값이 나타났으나 탄소원이 어떠한 형태로 존재하는지 알 수 없기 때문에 셀룰로오스 생산에 직접적으로 관여하는 당의 함유량을 확인하기 위해 총 당 측정을 실시하였다(Table 7). YG배지는 50 mg/mL의 Glucose가 들어가기 때문에 따로 측정하지 않았다.

Table 7. The total sugar analysis of YG medium and mandarin wine sludge medium.

	Total Sugar(mg/mL)
YG medium*	50
HS medium*	20
MWS medium	5.02

* : Not analyzed

측정 결과 와인슬러지 배지 안에 들어 있는 총 당의 양은 5.02 mg/mL로 YG 배지의 약 10% 정도의 상당히 적은 양이 들어있음을 확인했다. 예상과 다르게

매우 적은 양의 당이 포함된 것으로 측정값이 나왔지만 본 연구 이외의 연구에서 사용된 다른 초산균주의 기본배지로 사용한 Hestrin-Schramm medium의 조성 중 Glucose의 양이 20 mg/mL 인 것을 감안하면 와인슬러지 배지도 충분히 활용가능성이 있을 것으로 판단된다.

1-3. 필수 무기물 양 측정

미생물의 생장에 필요한 필수영양소에는 탄소원, 질소원 이 외에도 여러 가지 원소성분들을 필요로 한다. 그 필요량은 미생물의 종류에 따라 다르지만 어느 정도 배양액 안에 존재해야하기 때문에 ICP-OES를 사용하여 미량원소를 측정하였다(Table 8).

Table 8. The ICP-OES analysis of YG medium and mandarin wine sludge medium.

	Element (mg/L)							
	P	K	Na	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn
YG medium	79.30	278.7	19.25	4.053	3.808	0.2552	0.0102	0.6533
MWS medium	78.92	478.7	591.8	43.68	38.56	37.29	13.06	12.43

Na은 다른 성분들과 달리 유독 더 많은 양이 측정되었는데, 이는 와인슬러지 배양액의 pH를 맞춰주기 위해 사용한 NaOH 때문일 것이다. 전체적으로 와인슬러지 배양액 내 영양성분들이 대조군배지보다 많이 들어있었음을 확인할 수 있었다. 대조군배지와 비교했을 때 Ca, Mg, Fe, Mn, Zn 은 10배 이상 많은 양을 확인할 수 있는데 이는 와인 발효를 위해 사용한 대량의 배양액을 제조할 때 초순수 또는 증류수를 사용하지 않았기 때문일 것이다.

1-4. 에탄올 양 분석

EtOH은 세포 생육을 위한 ATP의 농도를 증가시키고, pentose phosphate

경로에 관여하는 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성을 저해함으로써 미생물 셀룰로오스의 생산수율을 높일 수 있다고 보고된 바 있다³⁴⁾. 와인슬러지의 경우 EtOH이 들어 있기 때문에 따로 첨가하지 않아도 된다는 장점이 있다.

Table 9. The concentration of ethanol in the wine sludge medium by refractometer.

	Composition(V/V%)
	Ethanol
YG medium*	0
YGE medium*	1
MWS medium	11.5

* : Not analyzed

YG 배지는 EtOH을 사용하지 않고, YGE 배지는 EtOH을 총 부피의 1% 첨가하기 때문에 따로 측정하지 않았다. MWS 배지 원액의 EtOH 함량은 11.5%로 예상대로 제공받은 감귤 와인슬러지의 원 제품인 감귤 와인과의 비슷한 값을 얻을 수 있었다. 보조 탄소원인 EtOH의 함량이 배양액 내에 너무 많이 포함되어 있으면 오히려 생장에 방해가 되기 때문에 위의 데이터를 바탕으로 MWS 배지를 어느 정도 희석해서 사용해야 할 것인지 판단해야 할 것이다.

2. 감귤와인 슬러지 배양액을 이용한 셀룰로오스 생산 및 확인

앞서 얻은 결과로부터 와인 슬러지를 대체 배지로 사용 가능성을 확인하였다. 이를 상업적인 목적으로 사용을 하려면 와인 슬러지를 사용하여 셀룰로오스 생산량 최적화 과정이 필요하다.

2-1. 와인 슬러지의 희석배수에 따른 셀룰로오스 생산량

본 연구 데이터에는 포함되어있지 않지만 최초 20% · 40% · 60% · 80% 농도로 와인슬러지를 희석하여 배양했을 때 80%로 희석한 배지에서는 셀룰로오스의 생성량이 매우 적었고 40%와 60%를 비교하였을 때 60% 희석농도에서 40%에 비교하여 더 적은 셀룰로오스 생성량이 확인되었다. 이는 와인 슬러지 안에 포함되어 있는 에탄올의 농도가 높아 미생물의 성장을 방해했기 때문일 것이다. 좀 더 정확한 최적화점을 찾기 위해 20%부터 50%까지 10%씩 희석배지를 만들어 실험한 결과 다음과 같이 BC를 수확할 수 있었다(Figure 9).

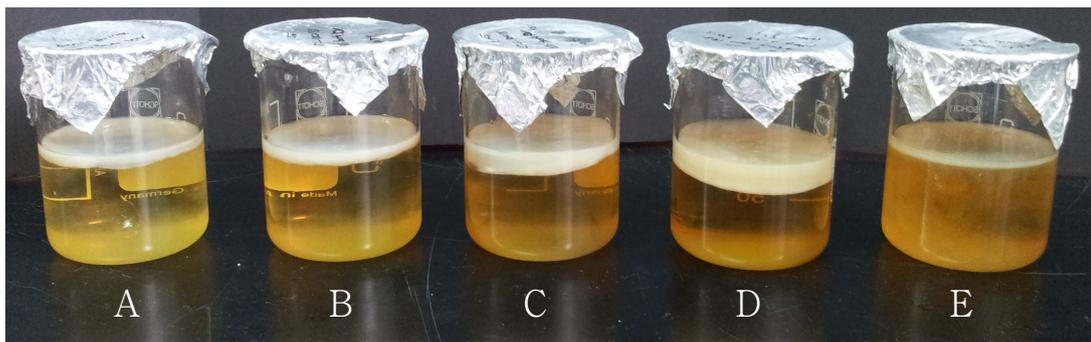


Figure 9. Cellulose produced from MWS medium and YG medium.

다음은 수확한 BC의 건조중량을 나타낸 그래프이다(Figure 10).

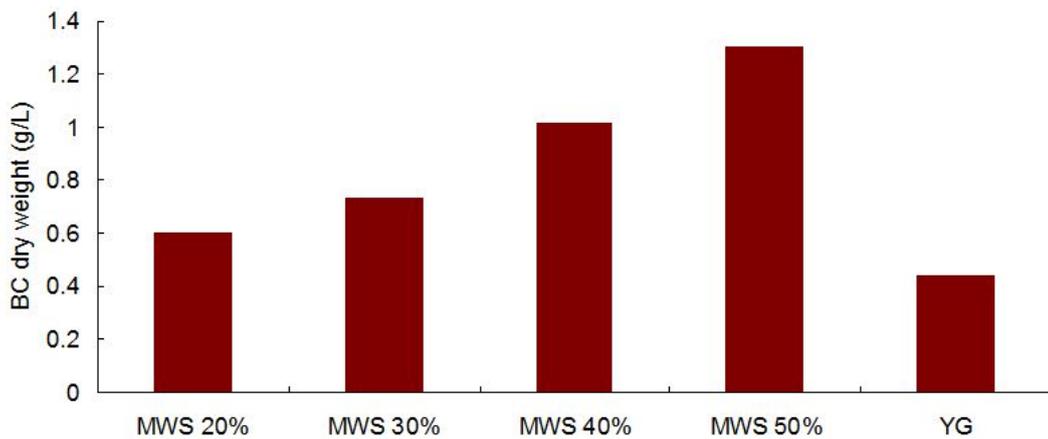


Figure 10. Comparing the amount of cellulose produced from MWS medium and YG medium.

와인슬러지에 포함되어 있는 당의 양이 대조군배지보다 적어 셀룰로오스 생성량이 더 낮을 것으로 예상했지만, 대조군배지에서 생성된 셀룰로오스의 양은 0.4 g/L로 다른 연구에서와 같은 값을 얻을 수 있었고³⁶⁾, 대조군배지와 MWS 배지에서 최대 생산량과 비교하였을 때 약 3배정도가 더 많이 생성되었음을 확인할 수 있었다. 탄소원이 부족했음에도 불구하고 이와 같은 결과가 나온 이유는 와인슬러지의 풍부한 질소원, 보조 탄소원으로 사용된 EtOH이 포함되어 있기 때문일 것으로 추측된다. 사용한 희석배지는 공장에서 발생하는 산업 폐기물임을 감안한다면 미생물 셀룰로오스를 생산하는 상업용 대체 배지로서 충분한 활용 가치가 있다고 판단된다.

2-2. 배지별 셀룰로오스 생산속도

YG medium, YGE medium 그리고 MWS 50%에서 생산되는 셀룰로오스의 양을 확인했다(Figure 11).

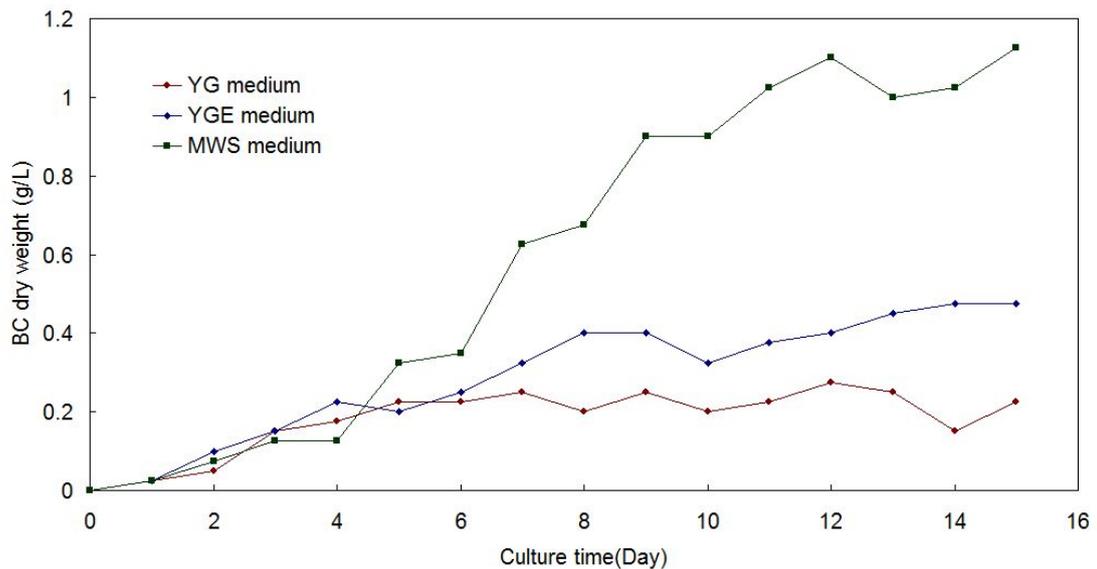


Figure 11. Effect of media on the production of BC.

YG와 YGE 배지에서는 약 7일 이후부터는 셀룰로오스의 생산량이 각각 0.2

g/L, 0.4 g/L 이상으로 증가하지 않았음을 확인할 수 있었다. MWS 50% 배지는 배양 시작 후 4일 동안은 셀룰로오스 생성량이 적었지만 5일째부터 생성량이 눈에 띄게 증가함을 확인 했고 마찬가지로 12일 이후부터는 셀룰로오스 생성량이 더 이상 증가하지 않음을 확인할 수 있었다. 생산량이 점점 감소하는 이유는 초산이 계속 생성되어 배지의 pH가 낮아지고 주 탄소원인 당의 농도가 점점 낮아졌기 때문일 것으로 추측된다.

2-3. 생산된 셀룰로오스의 형태 및 구조

YGE 배지와 MWS 50% 배지에서 생산된 셀룰로오스가 동일 물질인지 확인하기 위하여 SEM과 XRD를 측정하였다. 먼저 SEM을 사용하여 셀룰로오스의 겉 표면의 망상구조를 확인하였다(Figure 12).

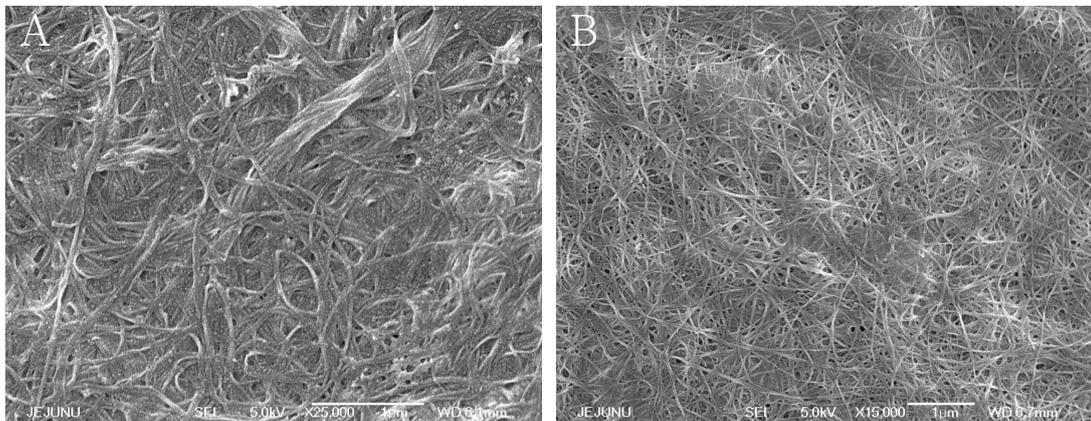


Figure 12. Scanning electron micrograph of BC, A : MWS 50% medium, B : YGE medium.

A는 MWS 배지로부터 생산한 BC이고 B는 YGE배지에서 생산한 BC이다. 양쪽 모두 다공성 망상구조를 하고 있음을 확인 하였다.

다음은 실제 생산된 셀룰로오스가 동일한 물질인지 확인하기 위해 XRD를 측정하였다(Figure 13).

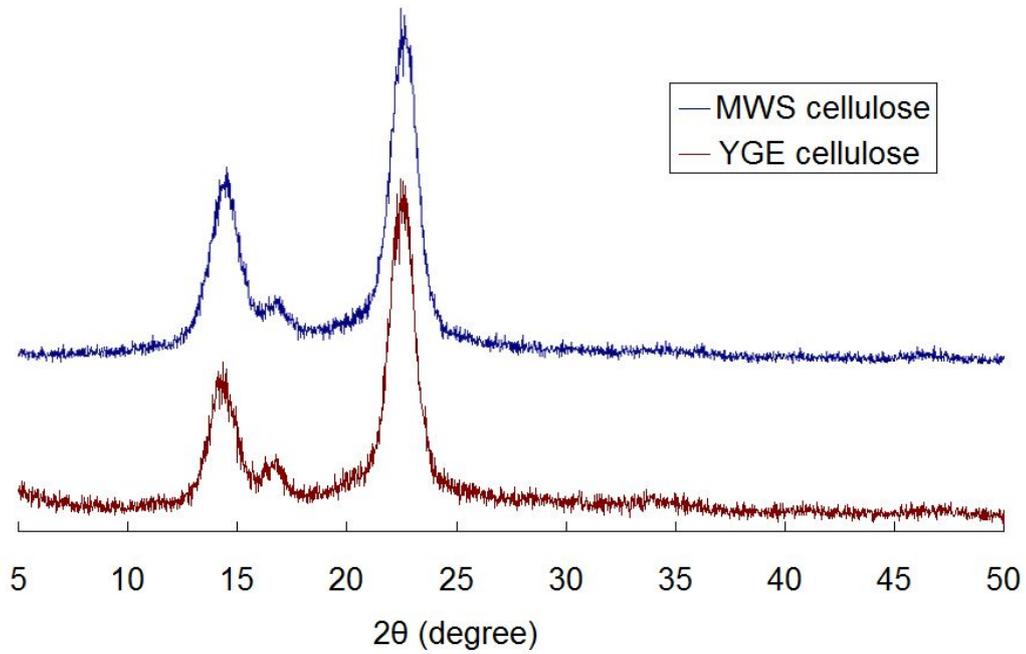


Figure 13. X-ray diffractogram of BC.

얻어진 데이터에서 Intensity가 조금 차이는 나지만 메인 피크가 같은 위치에서 확인이 되었기 때문에 YGE 배지와 MWS 배지에서 생성된 BC는 동일하다고 할 수 있다.

3. 생산된 셀룰로오스의 활용

3-1. 은 나노입자 생성

AgNO₃ 수용액과 NaBH₄ 수용액을 사용하여 BC안에 은 나노입자를 생성 시켰다. 이때 NaBH₄ 수용액의 몰 비율을 서로 다르게 은 입자를 환원시켰다 (Figure 14).

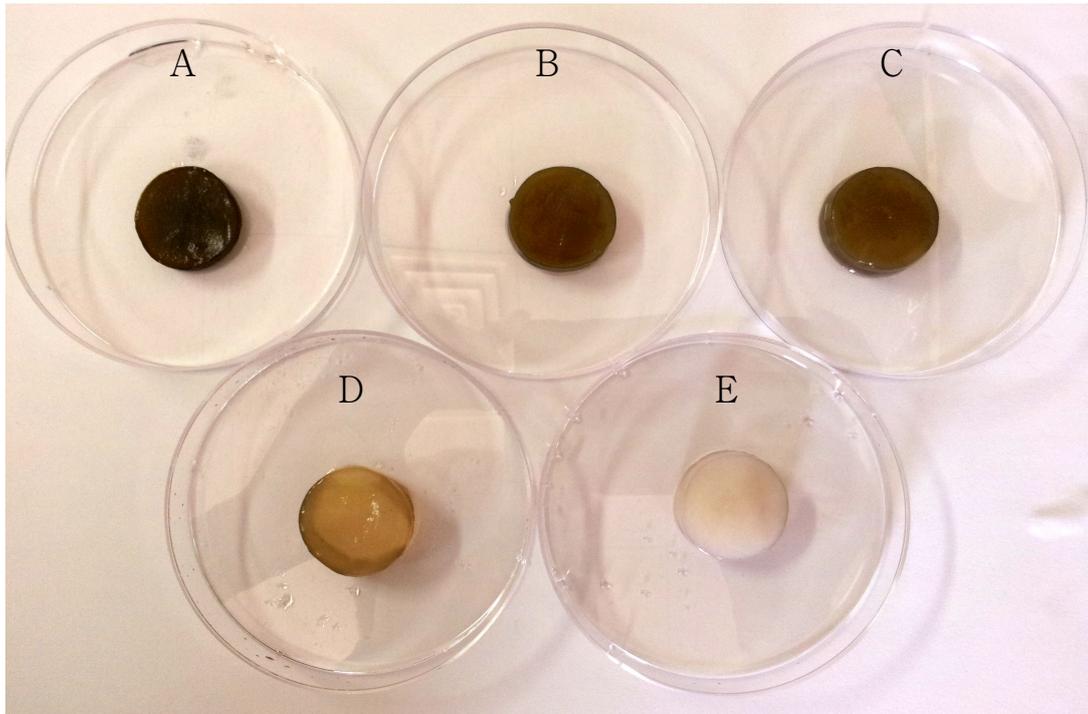


Figure 14. Silver nanoparticles impregnated into BC prepared from the $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ molar ratio of (A) 1:100, (B) 1:50, (C) 1:10, (D) 1:1, (E) 10:1.

$\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ 의 반응 비율을 A는 1:100, B는 1:50, C는 1:10, D는 1:1, E는 10:1로 반응 시켰다. 은 나노입자가 생성되어 갈색과 노란색이 나타나는 이유는 SPR(Surface Plasmon Resonance) 현상 때문이다. 이 색상들은 은 나노입자에서 SPR 현상으로 인해 나타나는 전형적인 색상이다³⁷⁾. NaBH_4 수용액의 몰비율이 AgNO_3 수용액의 몰 비율과 비슷할수록 은 나노입자는 BC 안쪽까지 은 나노입자를 잘 생성하는 것을 알 수 있었다. 이는 BC 내부에 존재하는 AgNO_3 분자의 농도와 BC외부에 존재하는 NaBH_4 분자의 농도 차이에 의해 생긴 결과 일 것이다³³⁾. AgNO_3 농도는 일정하지만 외부의 NaBH_4 농도가 상대적으로 높다면 외부의 용질은 BC막 안쪽으로 신속하게 침투할 것이다. 반대로 NaBH_4 의 농도가 낮다면 BC막 내부의 용질이 빠르게 막 밖으로 빠져 나갈 것이다³³⁾. 이는 실제 결과에서도 나타났는데, 반응시킨 셀룰로오스의 안쪽과 겉표면을 살펴본 결과 C와 D와 E를 비교해보면 C는 BC막에 전체적으로 은 나노입

자가 생성됐고, D는 은 나노 입자가 생성 됐지만 BC막 겉 부분만 주로 생성되었다. E의 경우에는 은 나노 입자가 생성 된 것을 거의 확인 할 수 없었고, 본 논문에는 없지만 실제 반응 후 BC 막 밖의 NaBH_4 수용액에서 은 나노 입자가 생성 된 것을 확인 할 수 있었다.

실제 은 나노 입자의 생성을 확인하기 위해 Ag-BC와 pure BC의 겉 표면에 생성된 은 나노 입자를 SEM으로 촬영하여 관찰하였다(Figure 14).

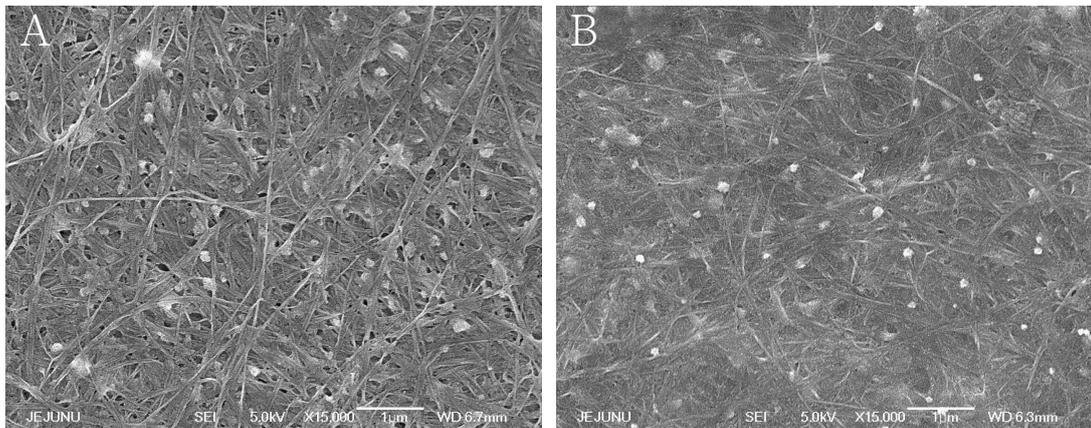


Figure 15. Scanning electron micrograph of BC.

$\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ 의 반응 비율을 A는 1:1, B는 1:10 이다. 예상대로 $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ 의 몰 비율을 1:1 로 하였을 때 BC 겉 표면에서 더 많은 은 나노 입자를 관찰 할 수 있었다. 이 외에도 생성된 은 나노 입자의 크기를 비교해보면 A는 다양한 크기로 생성되었고, B는 A와 비교했을 때 입자의 크기는 더 작고 대부분의 입자 크기가 비슷함을 알 수 있다. 하지만 은 나노입자의 크기가 작을수록 어두운 색상보다는 밝은 노란색이 나타나야 하는데, 본 연구에서는 $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ 몰 비율이 1:100 이었을 때 은 나노입자의 크기는 작았지만 Ag-BC의 색상은 매우 어두운 갈색이 나왔다. 이것은 실험에 사용한 BC의 크기가 작고 얇아서 은 나노입자들의 분포가 밀집되어 어두운 색상이 나타난 것으로 추측된다.

3-2. 수분 함유능력 및 수분 방출률

습윤 드레싱으로 사용하기 위해서는 더욱 많은 수분을 함유하고 이를 유지할 필요가 있다. 때문에 WS 배지로부터 생성된 BC의 수분 함유능력을 측정하고 이후 얼마나 수분을 함유하고 있는지를 확인하기 위해 수분 함유율 및 수분 방출률을 측정하였다(Figure 16).

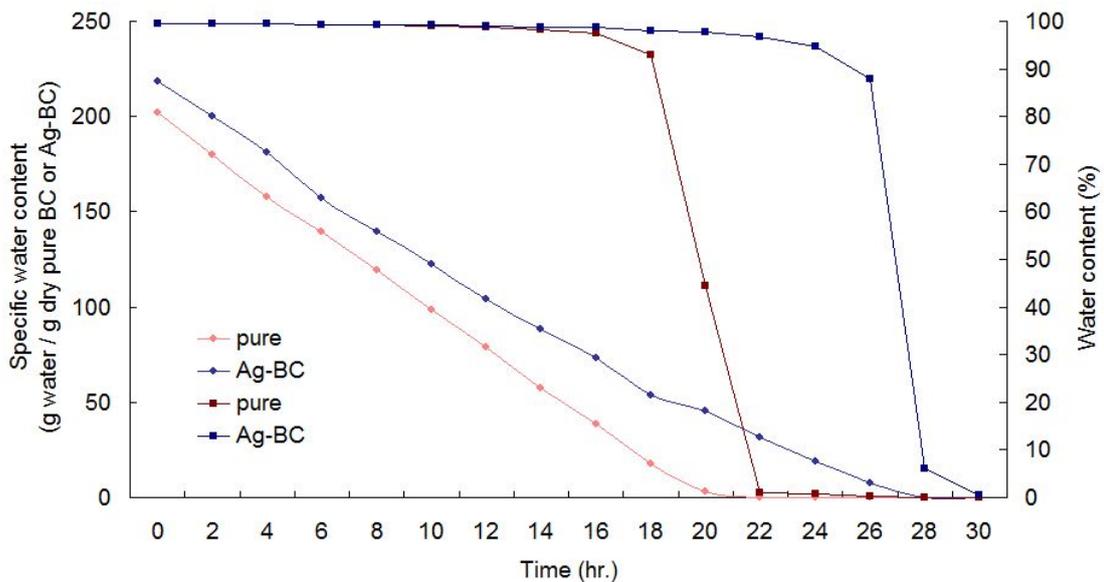


Figure 16. Water holding capacity and Water release of pure BC (●, ■) and Ag-BC (●, ■) at 37°C.

Ag-BC와 pure BC는 각각 99.53%, 99.50%의 수분함유율을 보였다. BC의 이러한 높은 수분함유능력은 BC의 화학구조 및 물리구조로부터 온다. BC는 -OH기가 매우 많이 있기 때문에 물 분자와 수소결합을 많이 할 수 있다. 그리고 매우 치밀한 3차원적 망상구조를 갖고 있기 때문에 높은 수분함유능력을 보여준다³⁵⁾. Figure 16 에서 Ag-BC의 수분 함유율이 더욱 많았고 수분을 방출하는 속도는 pure BC와 비슷했다. BC의 사이즈에 따라 차이는 있었지만 대부분이 체온과 같은 37°C에서 15시간 동안은 90% 이상의 수분함유율을 보여줬다.

3-3. Ag-BC의 항균성

상처 치료제 목적으로 사용함에 있어 2차적인 세균 감염을 예방할 필요가 있다. 때문에 대표적인 그람양성균과 그람음성균인 *S. aureus* 와 *E. coli* 를 사용하여 Ag-BC의 항균능력을 평가하였다.

3-3-1. Paper disc diffusion method

Ag-BC의 항균능력을 확인하기 위해 건조된 $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ 수용액 1:100 비율로 처리된 Ag-BC와 pure BC로 디스크 확산법을 실행하여 측정하였다 (Figure 17).

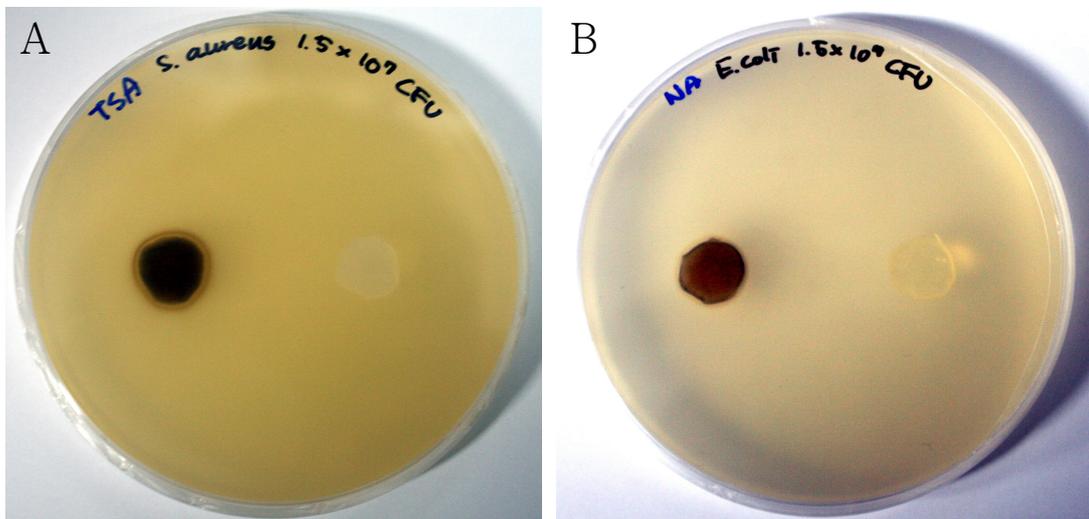


Figure 17. Antimicrobial activity of Ag-BC prepared from $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ molar ratio of 1:100 against (A) *S. aureus* and (B) *E. coli*.

측정한 결과 Ag-BC에는 *S. aureus*, *E. coli* 모두 clear zone을 확인 할 수 있었고, 대조군으로 사용한 pure BC에서는 clear zone을 확인 할 수 없었다. Ag-BC의 항균능력은 다음표로 확인할 수 있다(Table 10).

Table 10. Antimicrobial activity of Ag-BC prepared from AgNO₃:NaBH₄ molar ratio of 1:100 against (A) *S. aureus* and (B) *E. coli*.

	Zone of inhibition (mm)	
	pure BC	Ag-BC
<i>S. aureus</i>		
KCCM 11335	0	2.1
<i>E. coli</i>		
KCCM 12181	0	1.6

Ag-BC는 *E. coli*보다 *S. aureus*에서 좀 더 좋은 항균능력을 확인 할 수 있었다.

3-3-2. Colony forming unit count method

Paper disc diffusion method와 더불어 좀 더 정확한 항균능력 평가를 위하여 Colony forming unit count method를 실행하여 실제 어느 정도의 항균능력을 가지고 있는지 그 능력을 수치화 하였다. 실험 방법은 T. Maneerung *et al.* (2008)³³⁾ 의 논문을 참고하였다. 실험에 사용한 BC는 이전실험과 동일하게 AgNO₃:NaBH₄ 수용액 1:100 비율로 처리한 Ag-BC와 pure BC를 사용하였다. *S. aureus* 와 *E. coli* 에 대한 항균능력 결과는 다음과 같다(Table 11).

Table 11. Colony forming unit counts (CFU/mL) at 0 hr. and 24 hr. contact time intervals with the Ag-BC prepared from AgNO₃:NaBH₄ molar ratio of 1:100 against *S. aureus* and *E. coli*.

	<i>S. aureus</i> KCCM 11335		<i>E. coli</i> KCCM 12181	
	pure BC	Ag-BC	pure BC	Ag-BC
CFU/mL at 0 hr.	1.5×10^7	1.5×10^7	1.5×10^7	1.5×10^7
CFU/mL at 24 hr.	6.5×10^8	7.2×10^3	2.2×10^8	1.1×10^4
Antimicrobial efficiency (%)	—	99.952	—	99.927

배양 24시간 이후 CFU/mL 을 계산해본 결과 pure BC는 미생물이 더 증가했음을 확인하였고, AgNO₃:NaBH₄ 수용액 1:100 비율로 처리된 Ag-BC에서는 실험에 사용한 두 균주 모두에게 99.9% 이상의 항균능력을 보여줬다. *E. coli* 에서 항균능력보다 *S. aureus* 에서 항균능력이 좀 더 좋았다. 차이는 크지 않지만 Paper disc diffusion method 에서 나온 결과와 비슷한 결과가 나왔다.

IV. 요약 및 결론

다양한 방면에서 사용이 되고 있는 BC는 고가의 배지사용으로 인한 높은 생산 단가가 매우 큰 문제이다. 그렇기 때문에 저가의 배지를 사용하고 동시에 높은 생산효율을 얻을 수 있는 다양한 연구가 진행되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 BC생산을 위한 대체배지로 풍부한 질소원과 2차 탄소원인 에탄올을 포함하고 있는 와인 공장에서 사용하고 폐기되는 감귤와인 슬러지를 이용하여 *Acetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans*(ATCC 700178)로부터 BC생산의 최적화를 위한 연구를 진행 했다. EA(Elemental analyzer), Refractometer, ICP-OES를 이용하여 본 연구에 사용된 감귤와인 슬러지를 분석한 결과 기존배지와 비슷한 양의 탄소원(C : 38.7%)과 좀 더 많은양의 질소원(N : 1.8360%)을 확인할 수 있었고, 황(S : 2.8155%)도 포함되어 있었다. Cel⁻ mutants 발생을 억제 시키는 보조 탄소원 에탄올은 11.5% 정도로 와인회사에서 판매되고 있는 감귤와인과 비슷한 수치가 측정되었다. BC 생산균주가 주로 사용하는 탄소원인 당은 감귤와인을 만들기 위해 사용되는 효모에 의해 대부분이 에탄올과 CO₂ 로 분해되어 기대한 값보다 많이 낮은 5.02 mg/mL 정도밖에 없었지만, 부족한 주 탄소원으로 인해 BC 생산량이 낮을 것으로 예상했지만 예상과 달리 YG 배지에서 0.4 g/L 정도의 BC 생산수율보다 약 3배가 뛰어난 생산수율을 확인할 수 있었다. 감귤와인 슬러지가 산업적으로 사용되고 폐기물로써 버려지는 물질인 점을 생각하면 BC를 생산하는 대체 배지로써 활용가치가 높다고 판단된다.

상처치료제 목적으로 BC를 활용하기 위해서는 상처부위를 덮어 사용할 때 수분의 오래 동안 남아 있어야하고 2차적인 세균감염을 막기 위해 인체에 해가 무해한 항균물질이 필요하다. 때문에 본 연구에서는 감귤와인 슬러지로부터 생산된 BC에 은 나노입자를 함침시켜 Ag-BC의 수분함유율과 방출률 그리고 항균능력을 평가하였다. AgNO₃ 와 NaBH₄ 수용액을 사용하여 BC 내부에 은 나노입자를 생성 시킬 수 있었고, AgNO₃ 와 NaBH₄ 수용액의 몰 농도를 조절함으로써 어느 정도 은 나노입자의 크기를 조절 할 수 있었다. Ag-BC와 pure BC의 수분 함유율을 평가한 결과 Ag-BC는 99.53%, pure BC는 99.50%로 매우 높은 수분

함유율을 보였고, 이후 30시간동안 체온과 같은 37℃에서 2시간마다 수분이 빠져나가는 양을 측정하여 방출률을 계산한 결과 약 15시간 까지는 수분을 거의 방출하지 않았다. 상처 치료목적으로 사용되기 위해 좋은 수분함유율과 방출률을 결과로 얻을 수 있었다. AgNO₃ 와 NaBH₄ 수용액의 몰 농도를 1:100으로 하여 은 나노입자를 함침시킨 셀룰로오스의 항균능력을 평가한 결과 *S. aureus*, *E. coli* 두 균주를 대상으로 모두 99.9% 이상의 매우 높은 항균능력을 보였다. 높은 수분 함유율과 높은 항균능력으로 보아 감귤와인 슬러지로부터 생산된 BC를 상처치료제 목적으로 충분히 활용할 수 있음을 확인했고, 더 나아가 높은 수분함유율을 이용한 미용소재 연구도 충분히 가능할 것으로 판단된다.

V. 참고문헌

- 1) Shigenori kuga, **1992**, Bacterial Cellulose, *Mokchae konghak*, Vol. 20, No. 7, p2-8.
- 2) Fessenden R. J., **1998**, Organic chemistry, 6th ed., Publishing company, p952.
- 3) Byrom D., **1991**, Microbiol cellulose, *In D. Byrom(ed) Biomaterials*, Stockton Press, New York, p263-284.
- 4) 강태진 · 차재영, **2007**, Cellulose의 특징과 이용, *BioWave*, Vol. 9, No. 7, p1-11.
- 5) Embuscado, M. E., J. N. BeMiller, and J. S. Marks , **1996**, Isolation and partial characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*, *Food Hydrocoll.* Vol. 10, p75-82.
- 6) Brown, A. J., **1886**, An acetic ferment which forms cellulose, *J. chem. Soc*, Vol. 49, p432-439.
- 7) Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman, **1991**, Cellulose biosynthesis and function in bacteria, *Microbiol. Rev.* Vol, 55, p35-58.
- 8) Matthyse, A. G., **1983**, Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection, *J. Bacteriol.* Vol. 154, p906-915.
- 9) Mazhar-ul-Islam, **2012**, Synthesis, characterization and applications of bacterial cellulose nanocomposites with organic polymers and

inorganic nanomaterials, Kyungpook National University, Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy

10) Chanliud E. and M. J. Gidley, **1999**, *In vitro* Synthesis and properties of pectin/*Acetobacter xylinus* cellulose composites, *Plant J.* Vol. 20, p25–35.

11) Bettocchi C., D. Delneri, S. Signore, Z. Weng and C. V. Bruschi, **1997**, Characterization of microbial cellulose from a high-producing mutagenized *Acetobacter pasteuranus* strain, *BioChim. Biophys. Acta.* 1336, p211–217.

12) Park S. H., Y. K. yang, J. W. Hwang, C. S. Lee and Y. R. Pyun, **1997**, Microbial cellulose fermentation by *Acetobacter xylinum* BRC5, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 25, p598–605.

13) Ponyi T., L. Szabo, T. Nagy, L. Orosz, P. J. Simpson, M. P. Williamson and H. J. Gilbert, **2000**, Trp22, Trp24 and Tyr8 play a pivotal role in the binding of the family 10 cellulose-binding module from *Pseudomonas xylanase* A to insoluble ligands. *J. Biochem.* Vol. 39, p985–991.

14) Shibazaki, H., S. Kuga, F. Onabe, and M. Usuda, **1993**, Bacterial cellulose membrane as separation medium, *J. Appl. Polym. Sci.* Vol. 50, p965–969.

15) 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.* Vol. 59, p93–99.

- 16) Raghothama S., P. J. Simpson, L. Szabo, T. Nagy, H. J. Gilbert, and M. P. Williamson, **2000**, Solution structure of the CBM10 cellulose binding module from *Pseudomonas Xylanase A*, *J. Biochem*, Vol 39, p978–984.
- 17) Sieger C. H. N., A. G. M. Kroon, J. G. Batelaan and C. G. Van ginkel, **1995**, Biodegradation of carboxymethyl celluloses by *Agrobacterium CM-1*, *Carbohydrate polymers*, Vol 27, p137–143.
- 18) Yu X. C. and R. H. Atalla, **1996**, Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile, *J. Biological Macromolecules*, Vol 19, p145–146.
- 19) Jeong, Y. J. and I. S. Lee, **2000**, A view of utilizing cellulose produced by *Acetobacter* bacteria, *Food Industry and Nutrition*, Vol 5, p25–29.
- 20) Yosinaga, 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.*, Vol 61, p219–224.
- 21) Son HJ. Heo MS, Kim YG, Lee SJ, **2001**, Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol Appl Biochem*. Vol. 33, p1–5.
- 22) Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jeziarska A, Concalves-

Miś kiewicz M, Turkiewicz M, Bielecki S, **2002**, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 29, p189–195.

23) 강태진, 이승재, 최다혜, **2009**, 미생물 셀룰로오스의 의료 제품 이용, *Biowave*, Vol. 11, No. 1, p1–12.

24) Kim, J. Y., T. Y. Kim, and J. Y. Yoon. **2009**, Antimicrobial Activity and Mechanism of Silver, *J. Korean Ind. End. Chem.*, Vol 20, p251–257.

25) Ravelin, J., **1869**, Chemistry of vegetation, *Sci. Nat.* Vol. 11, p93–102.

26) 황인석, 조재용, 황지홍, 황보미, 최혜민, 이준영, 이동건, **2011**, 은나노 입자의 항균작용과 작용기작, *Korean J. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 39, No. 1, p1–8.

27) Fayaz, A. M., K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P. T. Kalaichelvan, and R. Venketesan, **2010**, Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram–positive and gram–negative bacteria. *Nanomedicine*, Vol. 6, p103–109.

28) Gutierrez, F. M., P. L. Olive, A. Banuelos, E. Orrantia, N. Nino, E. M. Sanchez, F. Ruiz, H. Bach, and Y. A., Gay. **2010**, Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine*, Vol. 6, p681–688.

29) Nanda, A. and M. Saravanan. **2009**, Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity

against MRSA and MRSE. *Nanomedicine*, Vol. 5, p452–456.

30) Toyosaki H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F., **1995**, Screening of Bacterial Cellulose–producing *Acetobacter* Strains Suitable for Agitated Culture, *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 59, No. 8, p1498–1502.

31) Cui, Steve W., Ph.D., **2005**, Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications, Taylor & Francis Group, LLC, p67–103.

32) Kim, K. J., W. S. Sung, B. K. Suh, S. K. Moon, J. S. Choi, J. G. Kim, and D. G. Lee., **2009**, Antifungal activity and mode of action of silver nano–particles on *Candida albicans*. *Biometals*. Vol. 22, p235–242.

33) T. Maneerung, S. Tokura, and R. Rujiravanit, **2008**, Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing, *Carbohydr Polym.*, Vol. 72, No. 1, p43–51.

34) 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.* Vol. 85, p598–603.

35) Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S., **2001**, Bacterial synthesized cellulose–artificial blood vessels for microsurgery, *Progress in Polymer Science*, Vol. 26, No. 9, p1561–1603.

36) Jae Yong Jung, **2004**, High–density production of bacterial cellulose using a microorganism isolated from a rotten apple, 경북대학교 공학 박사

학위 논문.

