

원심 임펠러가 장착된 발효조에서 *G. hansenii*에 의한 미생물셀룰로오스 생산

칸살만 · 쉐자드오머 · 칸타우스* · 하정환 · 박중곤†

경북대학교 화학공학과 생물화학연구실

702-701 대구광역시 북구 산격동 1370

*콤포사츠대학교 약학과

22060 아보타바드 파키스탄

(2009년 6월 1일 접수, 2009년 7월 3일 채택)

Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using a New Bioreactor Equipped with Centrifugal Impellers

Salman Khan, Omer Shehzad, Taous Khan*, Jung Hwan Ha and Joong Kon Park†

Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, 1370 Sangyeok-dong, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea

*Department of Pharmaceutical Science, COMSATS Institute of Information Technology,

University Road, Post Code 22060, Abbottabad, NWFP, Pakistan

(Received 1 June 2009; accepted 3 July 2009)

요 약

미생물셀룰로오스의 생산성을 높이기 위하여 원심(centrifugal) 임펠러와 경사원심(inclined centrifugal) 임펠러가 사용되었다. 발효조 내의 유체흐름 형태와 부피산소전달 계수가 관찰되었으며 원심 임펠러 및 경사원심 임펠러가 장착된 발효조 내에서 *G. hansenii* PJK 균주에 의하여 미생물 셀룰로오스가 생산되었다. 유체는 발효조 하부에서 원심 임펠러의 실린더 내부를 통과하여 발효조 벽면을 향해 순환되었다. 임펠러의 회전속도 100 rpm에서 부피산소전달계수는 터바인 임펠러 계에 비하여 경사원심 임펠러의 경우는 23%, 원심 임펠러의 경우는 15%에 불과하였다. 하지만 미생물셀룰로오스 생산 불능 돌연변이주로의 전환이 방지되어 20 rpm의 경사원심 임펠러의 회전속도에서 미생물셀룰로오스의 생산량이 터바인임펠러의 최적회전속도 300 rpm에서의 미생물셀룰로오스 생산량과 같았다.

Abstract – In order to improve the bacterial cellulose(BC) production yield, centrifugal and inclined centrifugal impellers were developed. A 6 flat-blade turbine impeller was used as a control system. The flow pattern in the fermenter and volumetric oxygen transfer coefficient($k_L a$) of these fermentation systems were studied. Fermentations were carried out for the production of BC by *G. hansenii* PJK in a 2-L jar fermenter equipped with new impellers. Liquid medium was circulated from the bottom, through the cylinder of the impeller and to the wall. The volumetric oxygen transfer coefficients, $k_L a$, of inclined centrifugal and centrifugal impeller systems at 100 rpm were 23 and 15% of the conventional turbine impeller system, respectively. However, the conversion of microbial cells to cellulose non-producing mutant decreased and this results in the increase in BC production at low rotating speed of impellers.

Key words: Bacterial Cellulose, *Gluconacetobacter hansenii* PJK, Water Soluble Oligosaccharides, Turbine Impeller, Inclined Centrifugal Impeller, Centrifugal Impeller, Volumetric Oxygen Transfer Coefficient

1. 서 론

셀룰로오스는 자연계에 다량으로 존재하는 유기물이며 제지, 펄프 및 의류산업 등에 사용되고 있다. 셀룰로오스는 식물뿐만 아니라 초산균, algae, fungi 등에 의해서도 생산된다고 보고되고 있다 [1,2]. 미생물셀룰로오스(BC)는 식물유래 셀룰로오스와 달리 lignin, hemicellulose 등이 함유되어 있지 않으며 microfibril이 수소결합에

의한 망상구조를 이루고 있다. 특히 BC의 직경이 식물유래 셀룰로오스의 100~500분의 1에 불과하여 목화 면보다 water retention value가 17배 이상 높으며 moldability, crytallinity, 인장강도 등이 매우 높은 값을 지닌다[3,4].

BC는 정치배양, 교반배양 그리고 internal-loop airlift 반응기 내에서의 발효 등으로 제조되고 있다. BC 생산을 위한 발효 양식은 BC의 상업적인 용도에 따라서 크게 달라진다. 정치배양에 의한 생산물은 젤라틴과 유사한 형상을 하는 두꺼운 막의 형태로 배양액의 표면에 형성된다. 교반배양의 경우 BC는 fibrous suspension, 불규칙적인 pellet이나 sphere의 형태로 생산된다. 정치배양은 광범위하

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: parkjk@knu.ac.kr

‡이 논문은 KAIST 장호남 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

게 탐색 연구되었으며 Nata de Coco, 진동판, 화상치료물질 등과 같은 상업적으로 성공한 BC의 생산에 적용되어 왔다[5,6]. 교반배양은 달성 가능한 높은 생산속도로 인하여 BC의 상업적 생산에 더 적합할 수 있는 잠재적인 배양 방식으로 간주되고 있다.

하지만 연속적인 교반이 이루어지고 산소가 격렬히 공급되는 교반배양은 아직도 BC 생산에 많은 문제점을 나타내고 있다. 교반배양 중 발생하는 강한 shear stress는 미생물을 BC 생산이 불가능한 돌연변이주(*Cet* mutants)로 전환시켜 버리며[7-9] 이는 shear stress가 미생물의 유전자에 transposon을 유발하기 때문으로 밝혀져 있다[10]. 교반배양에서 발생하는 적절히 강력한 shear stress는 배양 중 발생하는 *Cet* mutants를 BC 생산균주보다 쉽게 죽일 수 있어 오히려 BC 생산성을 증가시킬 수 있다는 보고도 있다[11]. 실린더형 membrane을 상용적인 turbine impeller 상단에 부착하여 미생물의 고농도 배양을 통하여 BC 생산성을 높이려는 시도도 보고되고 있다[12]. 한편으로 shear stress에 민감한 생물학적 계에 적용하기 위하여 centrifugal impeller를 장착한 반응기 내에 carboxymethyl cellulose (CMC)를 함유한 용액을 채운 후 유체속도 분포, 부피산소 전달 속도, power consumption 등을 조사하여 발표한 바 있다[13,14].

본 연구에서는 배양 중 미생물의 손상을 최소화하기 위하여 앞선 연구[13,14]에서 소개된 바 있는 centrifugal impeller의 하단에 부착되어 있는 원심 blade를 제거하고 개선된 centrifugal impeller를 적용함으로써 BC 생산 중 발생하는 shear rate의 발생을 최소화시키고자 하였다. 또한 유체의 원활한 흐름을 유도하기 위하여 inclined centrifugal impeller도 새로이 디자인하여 사용하였다. 발효조 내의 shear stress 발생 저감이 미생물의 *Cet* mutants로의 전환을 방지함으로써 BC 생산성이 증가될 것을 기대하며 centrifugal impeller와 inclined centrifugal impeller를 발효조 내에 장착하여 BC 생산을 시도하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 균주 및 배양

사용된 균주는 사과에서 분리되고 16S rDNA complete sequencing method로 동정된 *G. hansenii* PJK(KCTC 10505BP)로서[16] 조성이 glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 7 g/L, acetic acid 1.5 mL/L, succinate 0.2 g/L인 기본배지에서 배양되었고 기본배지에 15 g/L의 농도로 agar가 용해된 고체배지에 보관되었다(7). 기본배지에 1%(v/v)의 에탄올을 첨가함으로써 에탄올 함유배지를 준비하였으며 배지의 pH는 NaOH와 HCl을 이용하여 5.0으로 맞추었다. 균주의 콜로니를 배지에 접종하고 200 rpm, 30 °C에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 배양액 80 mL을 1.6 L의 배지에 접종하여 30 °C의 jar fermenter에서 1 vvm의 공기유량 속도 하에서 교반배양하였다.

2-2. 생물 반응기 구성

Fig. 1의 A에서 보이는 바와 같이 2 L jar fermenter(Applikon Co., USA) 내에 centrifugal impeller와 inclined centrifugal impeller를 장착하였다. Centrifugal impeller는 직경 7, 높이 1.5 cm인 두 개의 원판으로 구성된 상층부의 원심력 생성부와 직경 3, 높이 4 cm인 원통으로 구성된 하부의 흡입부로 구성되어 있다. Impeller가 회전하면 상층부에서는 원심력에 의하여 impeller 내부로부터 fermenter 가장자리로 유체가 빠져 나가고 이로 인하여 생기는 impeller 내부의 빈 공간으로 하부의 흡입부를 통하여 fermenter 바닥의 유체가 impeller 내부로 유입됨으로써 fermenter 내의 유체가 순환하게 된다. 직경 2 mm의 acrylamide and acrylic acid copolymer beads를 fermenter 내에 투입하고 유체의 순환형태를 관찰하였으며 고분자 입자의 궤적은 디지털 카메라(Olympus Co., frame rate: 15 frames/sec)로 측정하였다[12]. Impeller 하부의 흡입부로부터 상부의 원심력 생성부로

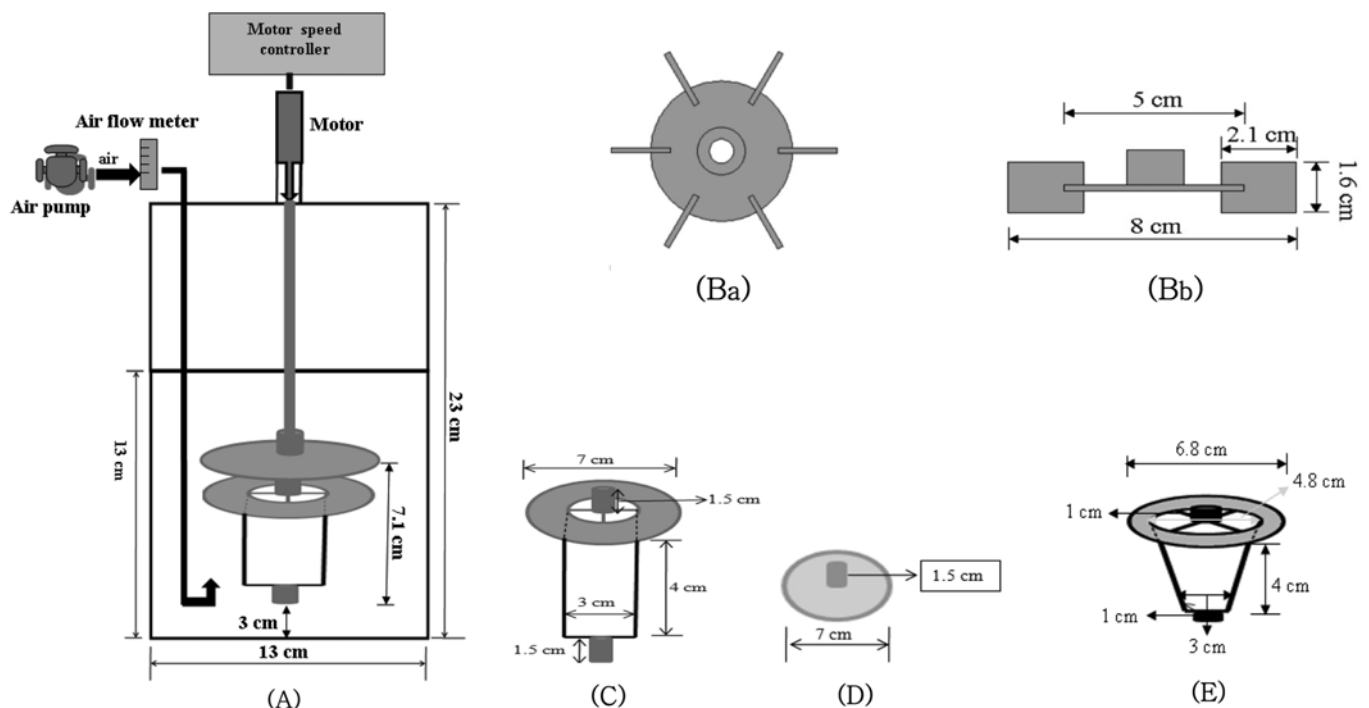


Fig. 1. A schematic diagram of (A) bioreactor equipped with a centrifugal impeller in 2 L Jar fermenter and (B) a top and side view of 6 flat-blade turbine impeller; (C) lower part of centrifugal impeller; (D) upper part of a centrifugal impeller and inclined centrifugal impeller; (E) lower part of inclined centrifugal impeller.

의 유체 흐름을 원활히 하기 위하여 흡입부 원통이 Fig. 1의 E와 같이 수직축으로부터 20도 경사진 inclined centrifugal impeller를 제작하여 부착하였다.

2-3. 균체량 및 BC의 정량

배양액을 3,580×g로 20분간 원심분리하고 증류수로 세척하는 과정을 2회 반복하여 미생물셀룰로오스를 수확하였다. -50 °C에서 냉동 건조하여 미생물이 내포된 미생물셀룰로오스의 건조중량을 측정하였다. 미생물이 함유된 미생물 셀룰로오스를 100 °C에서 5분간 0.3 M NaOH 20 mL로 처리하여 미생물을 녹여 낸 후 필터(pore size: 8 μm)로 여과하였다. 여과액의 pH가 증류수의 pH와 같아질 때까지 증류수로 세척 여과한 후 걸러진 미생물 셀룰로오스를 회수하여 냉동건조하여 건조중량을 측정하고 이를 미생물이 함유되지 않은 순수 미생물 셀룰로오스의 건조중량으로 하였다. 미생물 건조중량은 이 두 건조중량의 차로 계산하였다[11-16].

2-4. *Cel⁻* Mutants의 측정

배양 중 셀룰로오스 생산 균주가(*Cel⁺* cells) 셀룰로오스 생산 불

능 변이 균주(*Cel⁻* mutants)로 전환되므로 colony-forming unit(CFU)를 측정하여 전환율을 계산하였다[17,18]. 배양액을 생리 식염수로 희석하여 agar 고형 배지 위에 펴 바른 후 30 °C에서 colony가 형성될 때까지 배양하였다. *Cel⁻* mutants는 고형 배지 위에 smooth-type으로 형성되고 *Cel⁺* 균주는 mucous and rough-type으로 형성되었다[11,12].

2-5. 부피 산소 전달계수 측정(k_La)

용존 산소농도는 DO 전극(Mettler Toledo electrode GmbH, Process, 3/98)으로 측정하였으며 부피 산소 전달계수(k_La)는 “gassing-in” 방법으로 측정되었다[19,20]. 용존 산소 농도와 k_La 는 증류수와 제한 배지 내에서 측정되었으며 발효조 내의 배지는 1.6 L이었고 impeller의 속도는 각각 100, 300, 500 rpm이었으며 공기 유량 속도는 1 vvm 이었다.

3. 연구결과

3-1. 유체 흐름

Fermenter와 impeller의 크기 및 형태는 발효조 내의 유체흐름에

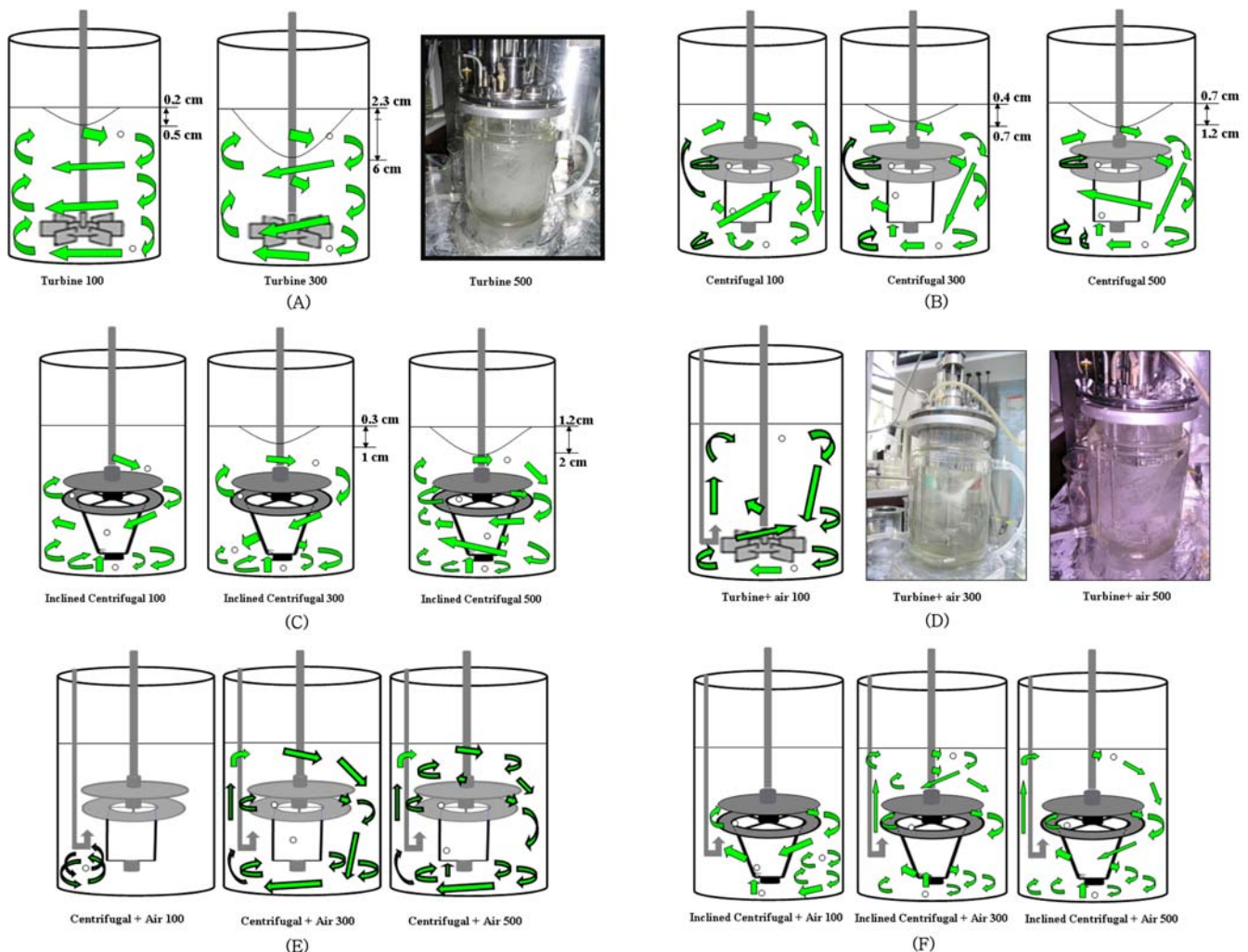


Fig. 2. The trace of co-polymer beads in a 2 L Jar fermenter according to the rotating speed of impeller. (A) turbine impeller at 100, 300 and 500 rpm (B) centrifugal impeller at 100, 300 and 500 rpm (C) inclined centrifugal impeller at 100, 300 and 500 rpm (D) turbine impeller at 100, 300 and 500 rpm with air supply (E) centrifugal impeller at 100, 300 and 500 rpm with air supply (F) inclined centrifugal impeller at 100, 300 and 500 rpm with air supply.

큰 영향을 미친다. 일반적으로 발효조 내에서 impeller의 회전속도가 증가함에 따라 발효액 상부에 vortex가 형성된다[12]. 본 연구에서도 공기의 공급없이 발효조 내에 turbine impeller를 사용하는 경우 상층부에 vortex가 형성되었으며 vortex의 깊이는 impeller의 회전속도에 비례하였으며 100 rpm에서 0.5 cm, 300 rpm에서 6 cm로 증가하였다. 하지만 centrifugal impeller나 inclined centrifugal impeller를 사용하는 경우 발효액 상층부에 vortex가 생기는 것이 억제되었다. Centrifugal impeller와 inclined centrifugal impeller의 경우 100 rpm에서 vortex가 형성되지 않았고 centrifugal impeller의 경우 300 rpm에서 vortex의 높이가 0.7 cm, 500 rpm에서 1.2 cm로 증가하였고 inclined centrifugal impeller의 경우 300 rpm에서 1 cm, 500 rpm에서 2 cm로 증가하였다.

전술된 바와 같이[12] 직경 2 mm의 acrylamide and acrylic acid copolymer bead는 발효조 내로 공기의 유입이 있는 경우나 유입이 없는 경우 모두 발효조 내의 유체의 흐름을 육안으로 관찰하는 데 훌륭한 tracer 역할을 하였다. Turbine impeller의 회전으로 유체가 방사상(radial) 방향으로 뿌려지며 발효조의 벽을 타고 위쪽으로 이동하며 Fig. 2(A)에서 보이듯이 100 rpm에서 3개의 영역으로 나누어지며 Taylor vortex와 유사한 흐름 형태를 보였으며 300 rpm에서도 유사한 흐름 형태를 관찰할 수 있었다. 하지만 500 rpm에서는 극심한 난류형성으로 bead의 이동 형태를 추적하기 어려웠다. 그러

나 1 vvm의 속도로 공기가 발효조 내에 유입되면 Fig. 2(D)에서 보여지는 바와 같이 유체흐름이 더 이상 3개의 영역으로 나누어짐이 없이 원심력에 의하여 방사방향으로 뿌려지는 유체는 벽면을 따라 위쪽으로 표면까지 이동한 후 아래쪽으로 다시 이동함을 보여주고 있었다. Centrifugal impeller나 inclined centrifugal impeller의 경우 impeller 상부의 원판 내부로부터 유체가 방사방향으로 배출되고 impeller 하부의 cylinder 밑면으로부터 유체가 유입되는 주 흐름과 함께 유체가 발효조의 상하로 이동하며 흐르는 형태가 Fig. 2(B,C)와 같이 관찰되었다. Impeller의 회전속도가 빠를수록 impeller 하부로부터 유입되어 impeller 상부 원판을 거쳐 방사방향으로 배출되는 주 흐름의 크기가 더욱 뚜렷하게 관찰되었다. 그러나 1 vvm의 속도로 공기가 발효조에 유입되면 공기의 상향 흐름에 영향을 받아 centrifugal impeller의 경우 Fig. 2(E)와 같이 100 rpm에서 주 흐름의 형성을 관찰하기 힘들고 300 내지 500 rpm에서 주 흐름을 관찰할 수 있었다. 하지만 inclined centrifugal impeller의 경우 Fig. 2(F)와 같이 100 rpm에서도 주 흐름이 형성되었다.

3-2. 용존 산소와 부피산소전달계수($K_L a$)

일반적으로 turbine impeller는 산소전달과 효율적인 혼합을 위하여 빠른 속도로 회전된다. 공기가 1 vvm으로 공급되는 발효조 내에서 impeller의 회전속도가 증가함에 따른 용존산소의 증가양태를

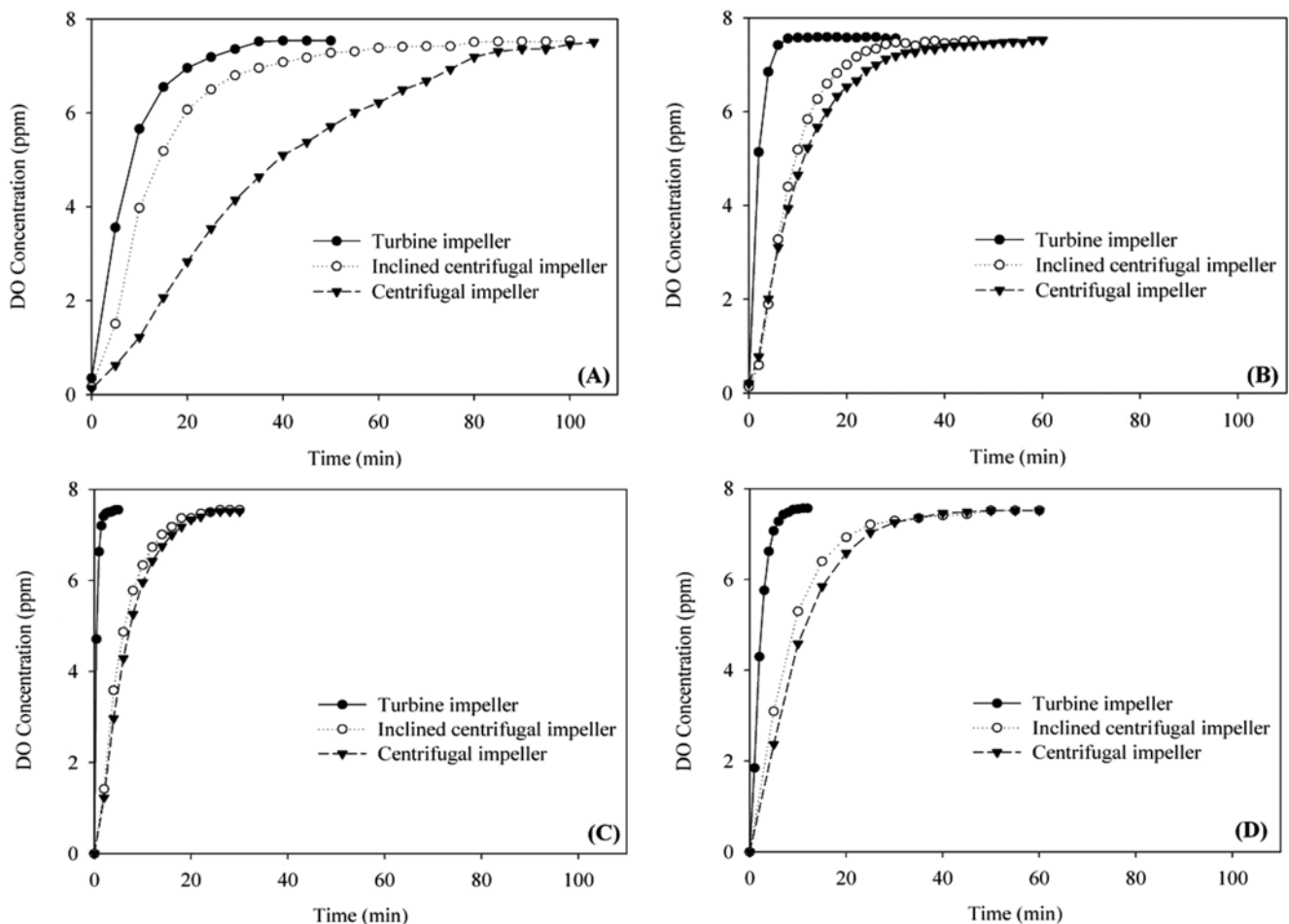


Fig. 3. Dissolve oxygen concentration in the fermenter equipped with turbine impeller, centrifugal and inclined centrifugal impeller, respectively. (A) distilled water at 100 rpm, (B) distilled water at 300 rpm, (C) distilled water at 500 rpm, (D) chemically defined medium at 300 rpm.

Table 1. Volumetric oxygen transfer coefficient, K_La in the fermenter filled with the distilled water or chemically defined medium and equipped with 6 flat-blade turbine, centrifugal, and inclined centrifugal impellers, respectively

	K_La (min^{-1})			
	Impeller speed (rpm)	Turbine	Inclined Centrifugal	Centrifugal
Distilled water	100	0.12	0.08	0.03
	300	0.71	0.16	0.10
	500	1.89	0.20	0.18
Defined medium	300	0.62	0.13	0.11

Fig. 3(A,B,C)에서 볼 수 있다. Impeller의 회전속도가 100 rpm에서는 35분, 300 rpm에서는 7분, 500 rpm에서는 3분 후에 용존산소가 포화됨을 알 수 있다. 이에 반하여 centrifugal impeller를 사용하는 경우 impeller 내부에서의 유체 체류시간이 길어 impeller 외부에서 공기방울과 접촉하는 시간이 줄어들게 되므로 용존산소가 포화되는 시간이 상대적으로 길다. Inclined centrifugal impeller를 사용하는 경우 impeller 내부에 유체가 체류하는 시간이 상대적으로 짧아 용존산소가 포화되는 시간이 centrifugal impeller보다는 약간 짧다. 증류수가 아닌 배양액에서의 용존산소의 포화시간은 일반적으로 알려진 바와 같이 약간 길지만[19] impeller의 종류별로 용존산소가 포화되는 데 걸리는 시간의 비는 Fig. 3(D)에서 보는 바와 같이 증류수에서의 경우와 같은 경향을 나타내고 있다.

시간에 따른 용존산소 농도를 gassing-in method[20]에 의하여 측정한 부피산소전달계수(K_La)는 Table 1에 나타난 바와 같다. Turbine impeller의 경우 회전속도가 100에서 500 rpm으로 증가하였을 때 K_La 는 0.11에서 1.89 min^{-1} 로 15배 이상 증가하였으나 inclined centrifugal impeller는 0.08에서 0.20 min^{-1} 로 2.5배 centrifugal impeller는 0.03에서 0.18 min^{-1} 로 6배 증가하였다. 그러나 부피산소 전달계수는 임의의 impeller 회전속도에서 항상 turbine impeller, inclined centrifugal impeller, centrifugal impeller의 순으로 그 크기가 작아진다. Turbine impeller를 사용할 때의 K_La 는 inclined centrifugal impeller를 사용할 때보다 100 rpm에서 1.4배 정도 크지만 500 rpm에서는 10배 정도 더 크다. 이는 앞에서 유체흐름 형태를 살펴본 바와 같이 inclined centrifugal impeller를 도입함으로써 난류형성을 크게 감소시킨 결과로서 rpm이 큰 경우 난류형성이 크게 억제되었던 바와 부합되는 결과라고 할 수 있다.

3-3. BC 생산

Fermenter 내에 centrifugal impeller를 장착함으로써 난류의 발생을 억제할 수 있었으나 부피산소전달계수의 감소를 불러일으켰다.

Centrifugal impeller의 설치로 인한 난류 발생 억제로 인하여 미생물이 BC 생산이 불가능한 돌연변이주(*Cel⁻ mutants*)로 전환되는 것을 감소시키는 효과를 조사할 필요가 있다. 이는 돌연변이주 전환율을 감소시킴으로써 BC 생산을 증가시킬 수 있기 때문이다. 그러나 centrifugal impeller의 도입으로 인한 부피산소전달 계수의 감소는 BC 생산의 감소에 직결되므로 이를 정량적으로 조사할 필요가 있으며 이를 Table 2에 나타내었다. Turbine impeller를 사용하는 경우 impeller의 회전 속도가 증가할수록 미생물의 양과 viable cell의 양도 늘어남을 알 수 있다. 이는 회전속도의 증가에 따라 산소전달 속도가 원활하고 영양분의 전달도 수월해 지기 때문이다[15]. 배양 3일째의 돌연변이주(*Cel⁻ mutants*)로 전환되는 율의 차이는 미약하지만 교반속도의 증가에 따라 전환율이 증가하는 것으로 나타나 있다. 하지만 앞선 연구에서 turbine impeller를 사용하는 경우[11,21] 배양 1,2일 째에는 교반속도가 100에서 300 rpm으로 증가함에 따라 돌연변이주로의 전환율이 낮아지므로 교반속도의 증가에 따라 BC의 생산량과 glucuronic acid oligomer의 생산량이 증가하는 것으로 나타나 있다. 이에 반하여 본 연구에서는 Table 2에서 보이는 바와 같이 inclined centrifugal impeller를 사용하는 경우 turbine impeller를 사용하는 경우와 달리 20에서 100 rpm에서의 구간에서 viable cell의 수(CFU)가 크게 변하지 않는 것으로 나타났지만 교반속도가 100에서 20 rpm으로 감소함에 따라 돌연변이주(*Cel⁻ mutants*)로의 전환율이 50에서 11%로 감소하는 효과가 나타났다. 이는 상용적인 turbine impeller에서와 상반되는 전환율의 급격한 감소이다. 이에 따라 BC의 생산량과 WSOS의 생산량은 impeller의 회전속도가 100에서 20 rpm으로 감소함에 따라 0.58과 0.92 g/L로 늘어났다. 이때의 BC의 생산량은 turbine impeller의 최적교반 속도인 300 rpm에서의 BC 생산량과 거의 동일하며 WSOS의 생산량은 300 rpm에서 turbine impeller로 생산되는 양보다 약 4배 정도 많다.

4. 결 론

발효조를 이용한 미생물 셀룰로오스의 생산성 향상을 위해서는 발효조 내의 산소전달 속도를 증가시키는 방법과 발효조 내에서의 난류 발생으로 인한 미생물의 돌연변이주(*Cel⁻ mutants*)로의 전환율을 감소시키는 방법이 부각되고 있다. 그러나 대부분의 산소전달계수의 증가를 위한 개선 기술은 돌연변이주로의 전환율을 증가시키고, 돌연변이주로의 전환율 감소의 시도는 산소전달 감소와 영양분 전달속도의 저하를 유발하고 있다. 발효조 내에서 상용적인 turbine impeller 대신 본 연구에서 도입된 centrifugal 및 inclined centrifugal impeller를 부착함으로써 낮은 impeller 회전속도에 따른 느린 산소 전달 속도에도 불구하고 원심력에 의한 유체흐름을 유발하여 영양

Table 2. Production of BC, WSOS and populations of *Cel⁻ mutants*, total cells and CFU from the medium in the fermenter equipped with centrifugal impeller, inclined centrifugal impeller, and conventional turbine impellers after 3 days cultivation

	Impeller speed (rpm)	CFU/ml	<i>Cel⁻ mutants</i> /total cells	WSOS(g/L)	BC(g/L)
Inclined Centrifugal	20	8.0×10^5	0.11	0.92	0.58
	50	4.1×10^5	0.35	0.90	0.32
	100	3.0×10^5	0.50	1.12	0.26
Centrifugal	100	4.2×10^5	0.45	1.04	0.23
Conventional Turbine	80	6.0×10^5	0.83	0.20	0.15
	100	4.7×10^7	0.91	0.09	0.45
	300	4.7×10^7	0.97	0.22	0.58

소의 전달을 양호하게 하고 돌연변이주로의 전환율을 감소시켜 미생물 셀룰로오스의 생산성뿐만 아니라 WSOS의 생산성을 높일 수 있었다. 본 연구결과는 높은 shear stress를 피해야 하는 발효시스템에 적용될 수 있을 것이다.

감 사

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government(MOHERD)(KRF-2007-521-D00105).

참고문헌

1. Delmer, D. P., "Cellulose Biosynthesis: Exciting Times for a Difficult Field of Study," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 245-276(1999).
2. Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M., "Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria," *Microbiol. Rev.*, **55**, 35-58(1991).
3. Yoshino, T., Asakura, T. and Toda, K., "Cellulose Production by *Acetobacter pasteurianus* on Silicone Membrane," *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 32-36(1996).
4. Klemm, D., Schumann, D., Udhard, U. and Marsch, S., "Bacterial Synthesized Cellulose - Artificial Blood Vessels for Microsurgery," *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1561-1603(2001).
5. Ponyi, T., Szabo, L., Nagy, T., Orosz, L., Simpson, P. J., Williamson, M. P. and Gilbert, H. J., "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.*, **39**, 985-991(2000).
6. Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P., "Improved Production of Bacterial Cellulose and Its Application Potential," *Polym. Degrad. Stabil.*, **59**, 93-99(1998).
7. Park, J. K., Park, Y. H. and Jung, J. Y., "Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK Isolated from Rotten Apple," *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **8**, 83-88(2003).
8. Valla, S. and Kjosbakken, J., "Cellulose-Negative Mutants of *Acetobacter xylinum*," *J. General Microb.*, **128**, 1401-1408(1981).
9. Park, J. K., Jung, J. Y. and Park, Y. H., "Cellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* in a Medium Containing Ethanol," *Biotechnol. Lett.*, **25**, 2055-2059(2003).
10. Coucheron, D. H., "An *Acetobacter xylinum* Insertion Sequence Element Associated with Inactivation of Cellulose Production," *J. Bacteriol.*, **173**, 5723-5731(1991).
11. Jung, J. Y., Park, J. K. and Chang, H. N., "Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* in an Agitated Culture without living non-Cellulose Producing Cells," *Enzyme Microb. Technol.*, **37**, 347-354(2005).
12. Jung, J. Y., Khan, T., Park, J. K. and Chang, H. N., "Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* Using a Novel Bioreactor Equipped with a Spin Filter," *Korean J. Chem. Eng.*, **24**, 265-271(2007).
13. Wang, S. J. and Zhong, J. J., "A Novel Centrifugal Impeller Bioreactor. I. Fluid Circulation, Mixing, and Liquid Velocity Profile," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **51**, 511-519(1996).
14. Wang, S. J. and Zhong, J. J., "A Novel Centrifugal Impeller Bioreactor. II. Oxygen Transfer and Power Consumption," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **51**, 520-527(1996).
15. Choi, S. B. and Park, J. K., "Metal Recovery by Aged Beads Prepared by Cell-Suspension from the Waste of Beer Fermentation Broth," *Korean J. Chem. Eng.*, **26**(2), 457-461(2009).
16. Khan, T. and Park, J. K., "The Structure and Physical Properties of Glucuronic Acid Oligomers Produced by a *Gluconacetobacter hansenii* Strain Using the Waste from Beer Fermentation Broth," *Carbohydr. Polym.*, **73**(3), 438-445(2008).
17. Ha, J. H., Shehzad, O., Khan, S., Lee, S. and Park, J. K., "Production of Bacterial Cellulose by a Static Cultivation Using the Waste from Beer Culture Broth," *Korean J. Chem. Eng.*, **25**(4), 812-815(2008).
18. Park, J. K., Hyun, S. H. and Jung, J. Y., "Conversion of *G. hansenii* PJK into non-Cellulose-Producing Mutants According to the Culture Condition," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **9**(5), 383-388(2004).
19. Jung, G. S. and Park, J. K., "An Effect of Capsule Circulation Velocity on Production of L-lysine from Encapsulated *Corynebacterium glutamicum* in an Air Lift Reactor," *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 81-84(2001).
20. Seo, K. S., Chang, H. N., Park, J. K. and Choo, K. H., "Effects of Dilution on Dissolved Oxygen Depletion and Microbial Populations in the Biochemical Oxygen Demand Determination," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**(4), 951-956(2007).
21. Park, J. K., Khan, T. and Jung, J. Y., "Structural Studies of the Glucuronic Acid Oligomers Produced by *Gluconacetobacter hansenii* Strain," *Carbohydr. Polym.*, **63**(4), 482-486(2006).