

환경일반-P3 Cellulose 생산세균 *Acetobacter* sp. A9로부터 gluconic acid가 생성되지 않는 변이주의 선별

이오미¹, 이희정¹, 이근희, 김기한, 손홍주², 이상준

부산대학교 미생물학과

¹부산대학교 환경시스템협동과정, ²밀양대학교 생물공학과,

1. 서론

Cellulose는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 천연고분자이자 고등식물의 주요구성성분으로서 현재 제지, 펄프 및 방직산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있다. cellulose의 소비가 급증함에 따라 그 원료로 사용되는 목재에 대한 수요도 갈수록 높아지고 있으나 원료공급과 환경문제로 인하여 제지 대체물질에 대한 연구가 절실한 형편이다. 따라서 미생물에 의하여 생성되는 cellulose에 대한 관심이 높아지고 있으며, 식물유래 cellulose에서는 찾아 볼 수 없는 새로운 기능성 재료로서 기대를 모으고 있다.

1886년 다양한 세균 가운데 *Acetobater* spp.(초산균)가 식물유래의 cellulose와는 미세구조 및 특성이 다른 microbial cellulose를 생산한다는 것이 밝혀졌다. 미생물 cellulose 생산균주로 현재 연구가 많이 되어 있는 것은 *Acetobater xylinum*으로서, 호기적 조건에서 정치 배양하면 cellulose가 pellicle 형태로 기체(배양액 상부의 공기)-액체(배양액)경계면에 형성되나 교반배양하면 cellulose를 생산하지 않는 돌연변이체(cellulose negative mutant; Cel⁻)가 생성됨으로써 cellulose 생산량이 대폭감소하는 현상이 일어난다. 그러므로 이러한 문제를 해결하고 교반배양에서도 안정한 균주의 분리와 배양조건외의 점토 및 돌연변이를 유발하는 환경조건에 대한 연구가 절실한 형편이다.

따라서 본 연구에서는 부패한 사과로부터 분리 및 동정된 *Acetobater* sp. A9를 돌연변이처리하여 교반배양에서도 안정한 돌연변이주를 선별 하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 *Acetobater* sp. A9이었다. 배양을 위한 배지로는 Hestrin & Schranm(HS)배지를 사용하였고, 조성은 glucose 2%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.675%, citric acid monohydrate 0.115%(pH 6.5)이다. HS배지 50ml의 기본배지가 함유된 250ml 용량의 conical flask에 균주 한 백금이를 접종하여 30°C에서 48 시간동안 정치 배양하였다.

2-2. UV mutagenesis & NTG mutagenesis

전 배양한 것을 cellulase(2500U/ml in 0.05M citric acid buffer, pH 5.0)를 처리하여 원심분리 후 0.1M citric acid buffer로 세척한 것을 UV와 NTG mutagenesis에 사용하

였다.

균액 10ml를 직경 9cm petri dish에 부어 UV(Ultra violet, france, 254nm)를 조사하고 4ml HS배지에 접종하여 하루 배양한 것을 회석하여 HS 배지에 bromocresol green가 들어있는 HSB plate에 도말하여 30 °C에서 배양하여 진한 푸른색을 띠는 단일 균락을 선별하여 HSB plate에 다시 옮겨 배지의 색을 그대로 유지한 균락을 돌연변이 균주로 분리하였다.

NTG(N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)는 균액 4ml에 NTG(10 μ g/ml)를 넣고 30°C에 30분간 배양하였다. 이를 UV mutant와 같은 방법으로 변이주를 선별하였다.

2-3. Cellulose 생성능 확인

선별된 colony를 calcofluor WT가 들어있는 HS plate에 streak하여 48시간 배양 후 생성 colony에 UV를 비취서 cellulose생성능을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

NTG 및 UV mutagenesis 처리를 통하여 NTG처리에서는 2종, UV처리에서는 4종을 얻었으며, 그 중에서 cellulose생성능이 확인된 것은 NTG에서 1종, UV에서는 2종이었다. 이 mutant type과 wild type을 최적배지에 접종하여 7일간 30°C에서 배양하여 생산된 cellulose를 건조하여 무게를 비교하였다. 그 결과 mutant type이 wild type보다 cellulose의 생산 수율이 높았다.

4. 요약

본 연구에서는 cellulose생산균인 *Acetobacter sp.* A9를 UV와 NTG mutagenesis를 통하여 선별된 변이주들을 HS 배지에 bromocresol green이 들어있는 HSB plate에 도말하여 gluconic acid를 생산하지 않는 것을 확인하였다. 그리고 calcofluor WT로 cellulose 생성능을 확인하였다.

참 고 문 헌

- Son, H. J., O. M. Lee, Y. G. Kim, and S. J. Lee, 2000, Isolation and identification of cellulose-producing bacteria, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 134-138.
- Hong-Joo Son, O-Mi Lee, Yong-Kyu Park, and Sang-Joon Lee, 2000, Characteristics of Cellulose Production by *Acetobacter sp.* A9 in Staic Culture, Kor. J. Biotech. Bioeng. Vol. 15, No. 6, 573-577.
- Park, S, T, T Song, and Y M Lim, 1999, Effect of Gluconic Acid on the Production of Cellulose in *Acetobacter xylinum* BRC5, J. Microbial, Bictch, Vol, 9, No. 5, 683-686.