

## 廢纖維資源의 醱酵工學的 利用에 關한 研究

(第Ⅳ報) 섬유질 資化細菌의 分離 및 同定

成 洛 癸 · 沈 奇 煥

慶尙大學 食品加工學科

## Studies on the Fermentative Utilization of Cellulosic Wastes.

(Part IV) Isolation and Identification of Cellulose Assimilating Bacteria.

Nack-Kie Sung and Ki-Hwan Shim

Gyeong-Sang National University, Jinju, Korea

(Received November 15, 1976)

### Abstract

In order to produce cellulosic single cell protein from the cellulosic wastes, 252 strains of cellulose assimilating bacteria were isolated from 225 sources of microorganisms such as decomposed wood, compost soils, soils, cotton fabrics and useless paper.

The isolates were investigated for their ability to utilize cellulose as carbon source. One of them was screened by its strong cellulose assimilating ability, and was identified as *Cellulomonas flavigena*.

### 서 론

자연계에 널리 분포되어 있는 纖維性 物質은 자연계 물질 순환의 主因이 되고 있으며 이들이 미생물의 작용에 起因된다는 사실을 알게된 후 부터 섬유소 분해 미생물에 대하여 많은 학자들이 연구를 하여 왔다. (1~5) 관련되는 연구로서는 섬유소 분해 효소를 이용하여 식물성 섬유질 분해산물의 이용, 농산가공에의 이용, 섬유성 물질 분해에 대한 보호에의 이용, 초식동물 소화관내에서 일어나는 섬유소 분해관리등의 분야에 대한 연구(6~8)가 많으며 근대에 와서는 섬유소를 활용하기 위한 적극적인 방법으로써 섬유소를 당화하여 효모배양기질로써 이용하는 방법등이 검토되고 있으며(9~11) 또 섬유소를 유일한 탄소원으로 하여 직접 단세포 단백을 생산하기 위한 연구가 진행되고 있는 실정이다.(12~14) 식물성 섬유소를 직접 자화할수 있는 미생물로서 현재까지 알려져 있는 것으로서는 사상

균이 많으며 세균류로서는 *Cellulomonas* 속, *Pseudomonas* 속, *Cellvibrio* 속, *Cytophage* 속, *Clostridium* 속, 그리고 초식동물 장내 세균등을 들수 있다(15,16). 그러나 이들 사상균이나 세균류들은 섬유질을 분해 자화함에 있어서  $\alpha$ -1.4 glucoside를 분해 자화하는 것 처럼 그렇게 강력하지 못하여 섬유소의 발효기질로서의 이용화에 대한 공업적인 생산이 늦어지는 것으로 추리된다. 저자는 이것을 고려하여 섬유소 자화 세균을 자연계에서 분리하여 그 중에서 비교적 자화 능력이 강한 한 균주를 선정, 동정하여 그 결과를 발표하는 바이다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 菌의 分離法

대학구내, 제지회사, 방직회사 등에서 수집한 Table 1과 같은 225종의 섬유소 자화세균 분리용 시료를 각각 약 1g씩 생리식염수에 현탁시키고 그 상등액 1 ml를 Table 2와 같은 분리용배지 10

**Table 1.** Source of isolated micro

Source	Decomposed wood	Soil	Compost	Cotton fabrics	Paper	The other	Total
Number	45	40	7	40	48	45	225

ml를 넣은 시험관 (18×200 mm)에 접종하여 30 °C의 진탕배양기(진폭 4cm, 왕복회수 120 rpm)에

**Table 2.** Medium for isolation of cellulose assimilating bacteria

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1%
NaCl	0.6%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01%
CaCl <sub>2</sub>	0.01%
Yeast extract	0.1%
Filter paper whatman No. 1	1×6cm <sup>2</sup> /10ml
pH	7.2

서 배양하여 배양 중 여지가 붕괴되는 것을 선정하고 배양액 한白金耳량을 새로운 배지 10ml에 접종하였다. 이러한 조작을 반복하여 섬유소 자화력이 있는 세균을 증식시키고 Table 3과 같은 조성의 보존용배지에 편평배양하여 나타나는 colony를 상법에 의하여 순수분리 하였다.

**2. 纖維素 資化細菌의 同定法**

**1) 形態學의 特徵**

균체의 형태 및 크기는 공시균을 safranin으로 염

**Table 3.** Stock culture medium of cellulose assimilating bacteria

Cellulose powder	10 g
NaNO <sub>3</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
KCl	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 ~
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
Yeast extract	0.2
Agar	18
Potato extract*	1 l
pH	7.2

※Potato extract

Boil 300g of sliced potato with 500ml of H<sub>2</sub>O until thoroughly cooked, filter through cheese cloth, make up the volume to 1000 ml

색<sup>(17)</sup>하여 현미경 (shimazu model SL-T<sub>1</sub>)으로 관찰하였으며 편모에 의한 운동성은 반응동 고층배지에 천자배양하여 검사<sup>(18)</sup>하였고 gliding motility는 Skerman의 방법<sup>(19)</sup>으로 검사하였다. Gram 염색은 Hucker의 변법<sup>(17)</sup>으로 염색하여 관찰하였고 항산성균의 염색과 섬막염색은 상법<sup>(17)</sup>으로 조사하였다.

**2) 培養學의 特徵**

상법<sup>(18)</sup>으로 gelatin액화, 여지붕괴력, 최적온도, 최적 pH 및 colony의 형태등을 관찰하였다.

**3) 生理學의 特徵**

상법<sup>(17)</sup>에 의하여 전분분해성, 질산염환원, 당에 대한 대사작용등을 관찰하였으며 당의 산화적 혹은 발효적 분해에 관한 실험은 Skerman의 방법으로 하였다.

**실험결과 및 고찰**

**1. 纖維素 資化細菌의 分離**

225종의 썩은 나무, 토양, 공장폐기물등의 시료에서 여지를 유일한 탄소원으로 한 배지에서 진탕배양하여 252주의 섬유소 자화세균을 분리하였다. 이 가운데 섬유소 자화력이 강한 균주는 Table 4

**Table 4.** Abilities of isolated cellulose assimilating bacteria

Strain of isolates	F. D. as days*	Strain of isolates	F. D. as days*
GFB 24	4	GFB 75-8	4
GFB 24-1	2	GFB 75-8-1	6
GFB 24-2	6	GFB 75-8-2	7
GFB 4-2	8	GFB 9-5	7
GFB 27-3	6	GFB 4-2-1	7
GFB 2-0	6	GFB 4-2-5	4
GFB 2-10-1	5	GFB 2k-1	7
GFB 2-10-3	7	GFB 5F-1	8
GFB 2J-1	8	GFB 5F-2	8
GFB 2J-7	8	GFB 5P-3	8
GFB 5S-1	7	GFB 5P-4	6

※F. D. as days Days required to degrade filter paper thoroughly

에서 보는 바와 같이 GFB 24-1 이더 2 일만에 여지가 붕괴되어 섬유소 자화력이 강한 균으로 인정되었다.

## 2. 纖維素 資化細菌의 同定

분리한 세균 중에서 섬유소 자화력이 강한 세균 1 균주 (GFB 24-1)를 선별하고 균학적 제성질을 조사하였다.

### 1) 形態學的 特徵

썩은 벚질더미에서 분리한 GFB 24-1의 형태학적 특징은 Table 5와 같다.

**Table 5.** Morphological characteristics of cellulose assimilating bacteria

Strain	<i>Cellulomonas uda</i>	
Characteristic	(by Bergey's manual)	Isolate
Form	Rods	Rods, short
Size	0.5 × 1.0 - 1.5 μ	0.5 - 0.6 × 1.2 - 1.5 μ
Motility	Nonmotile	Nonmotile
Gram stain	Negative	Negative
Acid-fast bacteria stain	Negative	Negative
Capsule stain		Negative

반유동 고층배지에서 운동성을 나타내지 않았으며 gram 염색<sup>(12)</sup>도 되지 않았고 황산성 염색과 설파 염색도 되지 않았다.

### 2) 培養學的 特徵

Table 6에서 보는 바와 같이 사면배양에서 회백

**Table 6.** Cultural characteristics of cellulose assimilating bacteria

Strain	<i>Cellulomonas uda</i>	
Characteristic	(by Bergeys manual)	Isolate
Agar slant	Moderate, flat grayish white	Moderate, flat grayish white
Broth	Uniformly turbid	Uniformly turbid
Gelatin stab	Slow liquefaction	Slow liquefaction
Filter paper in peptone broth	Fibers separate on slight agitation	Fibers separate on slight agitation
Optimal temperature	28°~33°C	28~33°C
Optimal pH		7.0~7.2
Colony		
Form		Circular
Elevation		Convex
Margin		Entire

색을 나타냈으며 nutrient gelatin 법에 의한 gelatin 액화는 15일만에 완전히 gelatin을 crateriform으로 액화하였으며 배양 최적온도는 28~33°C, 최적 pH는 7.0~7.2였다.

### 3) 生理學的 特徵

분리, 선별된 섬유소 자화세균의 생리학적 특징은 Table 7과 같으며 당자화성 (Table 8)은 16종의 당중 mannitol을 제외한 모든 당을 자화하였고 또 gas 발생없이 산을 생성하였다.

**Table 7.** Biochemical Characteristics of cellulose assimilating bacteria

Strain	<i>Cellulomonas uda</i>	
Characteristic	(by Bergey's manual)	Isolate
Starch	Hydrolyzed	Hydrolyzed
Nitrate	Reduce to NO <sub>2</sub>	Reduce to NO <sub>2</sub>
Fermentative or oxidative break down of sugars	Fermented	Fermented
Methyl red test		+
Voges-Proskauer test	-	-
Indole production		+
Ammonia production		+
H <sub>2</sub> S		-
Catalase	+	+
Urease		+
Glucose	Acid	Acid
Fructose	Acid	Acid
Arabinose	Aci±	Acid
Xylose	Aci±	Acid
Maltose	Acid	Acid
Sucrose	Acid	Acid
Lactose	Acid	Acid
Raffinose		Acid
Cellobiose		Acid
Dextrin		Acid
Starch	Acid	Acid
Glycerol		Acid
Inulin		±
Mannitol		-

**Table 8.** Carbohydrate assimilation by the isolated cellulose assimilating bacteria

Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Galactose	+

Dextrin	+
Glycogen	+
Arabinose	+
Xylose	+
Maltose	+
Sucrose	-
Lactose	+
Cellobiose	+
Raffinose	+
Starch	+
Inulin	+
Mannitol	-

이상의 결과를 종전의 분류법<sup>(19-21)</sup>과 비교하면 *Cellulomonas uda* 와 거의 일치되나 8집의 Bergey's manual<sup>(22)</sup>에 의하면 종전까지는 10개의 species로 분류하였으나 *C. biazotea*, *C. cellasea*, *C. flavigena*, *C. gelida*, *C. uda*를 같은 Species로 강조함에 따라 本菌株는 *Cellulomonas flavigena*라고 생각된다. Han<sup>(12)</sup>이 분리한 *Cellulomonas*는 methyl red test 결과 negative였으며 peptone 水에서는 indole을 생성하지 않았는데 반하여 본 공시 균주의 methyl red test에서는 positive였으며 indole을 생성하였다. 그리고 Bae 등<sup>(15)</sup>이 분리한 *Cellulomonas*와는 agar slant, gram 염색등의 형태학적 특징과 생리학적 특징에서 다소의 차이점이 있었다.

#### 요 약

폐섬유자원을 기질로 하여 단세포단백을 생산할 목적으로 225종의 균원시료에서 252주의 섬유소자화세균을 분리하였고 이들 중 섬유소 소화력이 가장 강한 균 1주를 동정한 결과 *Cellulomonas flavigena*와 일치하였다.

#### 참고문헌

- (1) Whitaker, D.R. : *Canadian J. Biochem. Physiol.*, **34**, 488(1956).
- (2) Reese, E. T. and Gilligan, W. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **45**, 74(1953).
- (3) King, K. W. : *J. Ferment. Technol.*, **43**(2), 79(1965).
- (4) Nisizawa, K. and Hashimoto, Y. : *Arch.*

*Biochem. Biophys.*, **81**, 211(1959).

- (5) Sung, N.K. : *Res. Bull. Jinju. Nat. Agri. Coll.*, **10**, 1(1971).
- (6) Toyama, N. : *J. Ferment. Technol.*, **21**(10), 415(1963).
- (7) Toyama, N. : *J. Ferment. Technol.*, **21**(11), 459(1963).
- (8) Toyama, N. : *J. Ferment. Technol.*, **43**(9), 683(1965).
- (9) Bae, M., Kim, B.H. and Yoon, A.S. : *Korean J. Appl. Micro. Bioeng.*, **1**(1), 31(1973).
- (10) Sung, N.K. and Kim, J.K. : *Kore. J. Appl. Micro. Bioeng.*, **4**(1), 1(1976).
- (11) Sung, N.K., Kim, M.C. and Shim, K.H. : *Korea. J. Appl. Micro. Bioeng.*, **4**(2), 51(1976).
- (12) Han, Y.W. and Srinivasan, V.R. : *Appl. Microbial* **16**, 1140(1968).
- (13) Han, Y.W., Dunlap, C.E. and Calliban, C.D. : *Food Technol.*, **25**, 130(1971).
- (14) Updegraff, D.M. : *Biotech. Bioeng.*, **XIII**, 77(1971).
- (15) Bae, M. and Kim, B.H. : *Korea. J. Appl. Micro. Bioeng.*, **2**(1), 1(1974).
- (16) Ayers, W.A. : *J. Bacteriol.*, **76**, 504(1958).
- (17) Society of American Bacteriologists: *Manual of Microbiological methods*, McGraw-Hill, New York (1957).
- (18) Shibata, Y. and Nisizawa, K. : *J. Ferment. Technol.* **47**(9), 573(1969).
- (19) Skerman, V.B.D. : *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, 2nd ed. the Williams and Wilkins, Baltimore (1967).
- (20) Gibbs, B.M. and Shadton, D.A. : *Identification methods for microbiologists*, part B Academic Press, New York (1968).
- (21) Breed, R.S., Murry, E.G.D. and Smith, N.R. : *Bergey's Manual of Determination Bacteriology* 7th ed. the Williams and Wilkins, Baltimore (1957).
- (22) Breed, R.S., Murry, E.G.D. and Smith, N.R. : *Bergey's manual of Determination Bacteriology* 8th ed. the Williams and Wilkins, Baltimore (1974).