

Cellulose 생성 *Acetobacter xylinum* KI 균주의 분리 및 특성

차영주 · 박경진 · 김도경 · 전홍성 · 이병권 · 김근형¹ · 이숙영 · 김성준*

조선대학교 유전공학과, ¹동아전문대학 공업화학과

Isolation and characterization of Cellulose Producing *Acetobacter xylinum* KI Strain

Cha, Young-Ju, Kyung-Jin Park, Do-Kyung Kim, Hong-Sung Chun, Byung-Kwon Lee,
Keun-Hyung Kim¹, Sook-Young Lee and Sung-Jun Kim*

Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwangju, 501-759, Korea

¹Department of Industrial Chemistry, Donga Junior College, Youngam 526-760, Korea

Abstract — One strain of cellulose-producing *Acetobacter* was isolated from the traditionally fermented grape vinegar in Korea. The isolated strain, designated as KI strain was identified as the *Acetobacter xylinum* with respect to physiological and biochemical characteristics. KI produced acetic acid from ethanol, and then decomposed acetate to CO₂ and H₂O. When the isolated strain was cultivated statically in broth culture, a thick cellulose pellicle was formed. KI was tolerance of 8% ethanol and 30% glucose, and the isolate was positive in ketogenesis from glycerol, γ -pyrone from glucose and fructose, and 2-ketogluconic acid from glucose. KI strain possessed straight-chain C_{18:1}, C_{16:0} and C_{14:0} fatty acid, and contained ubiquinone Q₉ and Q₁₀ as isoprenoid quinone. DNA base composition of KI strain was 57.6% G+C.

초산생성 세균은 두 종류의 속 즉, *Gluconobacter*와 *Acetobacter*로 분류되며 당과 알코올을 초산으로 산화시킬 수 있는 능력을 가지고 있는 세균의 집단을 말한다. 초산균은 그람 음성이며 내산성의 편성 호기성 간균 또는 구균으로 포자는 형성하지 않는다(5). *Gluconobacter*와 *Acetobacter*의 차이점은 *Gluconobacter*는 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화시킬 수 있는 능력이 없는 반면 *Acetobacter*는 초산과 젖산을 재산화시킬 수 있다는데 있다(1). 재산화(over-oxidation) 과정이란 에탄올을 이용하여 초산을 생성하고 이어서 초산을 CO₂와 H₂O로 산화시키는 두 가지 과정을 의미한다. *Acetobacter*는 주로 알코올 주스가 존재하는 곳에서 많이 발견되며, 지금까지 알려진 대표적인 종들로는 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. xylinum* 그리고 *A. methanolicus* 등이 있다(5, 13). *Acetobacter* 속은 식초생산을 위해서 산업적으로 매우 중요하기 때문에 새로운 균주의 분리와 함께 초산균의 개량을 위해서 유전자 재조합 기술을 이용한 주요 효소의 클로닝과 spheroplast fu-

sion을 이용한 돌연변이체 획득에 대해서도 연구되고 있다(4). 이러한 *Acetobacter* 속 중에서 *Acetobacter xylinum*은 특이하게도 셀룰로오스(cellulose)를 합성하여 분비하는 세균으로 잘 알려져 있다. 1886년 Brown에 의해 셀룰로오스를 합성하는 *Acetobacter*가 처음 보고된 이후, 지난 30여년간 셀룰로오스 생합성에 대한 연구가 활발하게 진행되었다(3). 셀룰로오스는 지구상에 존재하는 가장 방대한 양의 거대분자 생물자원으로서, 몇 천년동안 다양한 방법으로 인류의 필요에 따라 제공되었다. 그러나, 이러한 셀룰로오스의 중요성에도 불구하고 식물 셀룰로오스의 합성 메카니즘은 아직 이해가 부족한 실정인어서, 순도 높은 셀룰로오스의 대량 생산이 가능하고 조작이 용이한 *A. xylinum*은 셀룰로오스의 생합성 메카니즘을 연구하기 위한 좋은 모델 시스템이 되었다(6, 14). Williams와 Cannon(15)은 *A. xylinum*에 있어서의 셀룰로오스 역할에 대해 보고하였는데 셀룰로오스는 호기성 환경에 세포를 유지시키며, 셀룰로오스 pellicle은 UV light의 치사 효과로부터 세포를 방어하고, *A. xylinum*의 집락을 형성케 해주어 영양원으로 같은 기질을 사용하는 경쟁자로부터 방어효과 및 세포에 습기를 제공하여 건조를 막는다고 하였다.

Key words: *Acetobacter xylinum*, cellulose-producing bacteria, characterization

*Corresponding author

본인 등은 한국의 여러 지방에서 전통적인 발효 방법으로 제조한 식초들로부터 초산생성균의 분리 및 특성화 연구를 수행하여 온 바(2, 9), 본 연구에서는 포도식초로부터 분리한 셀룰로오스를 합성하는 *Acetobacter*의 생리생화학적 특성을 밝히므로서 유전자 보존과 셀룰로오스의 생합성 기작 연구등 분자 생물학 소재 개발에 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 광주지역 포도식초로부터 분리한 후 KI로 명명하여 사용하였으며, 대조 균주로는 *Acetobacter aceti*(ATCC 23746), *A. pasteurianus*(ATCC 9428), *A. methanolicus*(ATCC 43581), *A. xylinum*(ATCC 23769)를 사용하였다.

균주의 분리 배지로는 Carr 배지를, 셀룰로오스 합성여부를 확인하기 위한 배지로는 H and S 배지(10)를 사용하였으며 그 조성은 Table 1에 정리하였다. 균주의 동정 및 보관용 배지로는 GYC 배지(5% glucose, 1% yeast extract, 3% CaCO₃, 2.5% agar)를 사용하였다.

균주의 분리

광주지역에서 30개월 이상 발효 숙성시킨 포도식초로부터 초산세균을 분리, 본 실험에 사용하였다. 포도식초 1 ml을 Carr 배지 50 ml에 접종하여 28°C에서 3~4일 동안 진탕 배양한 후 혼탁도가 증가한 배지를 동일 조성의 새로운 배지에 접종하는 과정을 수차 반복하였다. 그 후 지시약으로 bromocresol-purple이 첨가된 고체배지에 streaking 하여 28°C에서 3~4일간 배양하고 보라색에서 노란색으로 그리고 다시 보라색으로 환원되는 지를 관찰한 다음 여기에서

나타난 집락을 동일 조성의 고체배지에 계대배양하는 방법으로 단일 집락을 순수 분리하여 GYC agar slant에 접종하여 보관하였다.

생리생화학적 특성 조사

Glycerol로부터 ketogenesis가 일어나는 지를 알아보기 위해 YEG 고체배지(1% yeast extract, 3% glycerol, 2% agar)에 균을 접종한 후 3~5일간 28°C에서 배양시킨 다음 Fehling's 용액을 배지 위에 몇방울 떨어뜨린 후 오렌지색으로의 변색 유무로 glycerol이 dihydroxyacetone으로 전환되는 가를 결정하였다. 에탄올과 NaCl에 대한 내성 실험은 SM 배지(0.5% yeast extract, 5% glucose)에 NaCl 0.5~2.0%와 에탄올 5~15%를 각각 첨가한 배지에 분리 균주를 접종하여 5일간 배양시킨 후 관찰하였다. GYC 고체배지에 균을 접종하여 5~7일간 배양시킨 후 brown pigment 형성 유무를 확인하였으며, D-glucose의 농도에 따른 내성 실험은 yeast extract 0.5%에 20~30%의 D-glucose를 각각 첨가한 배지에 균을 접종하여 관찰하였다. Glucose 3%와 fructose 5%를 각각 함유한 YPC 배지(0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% CaCO₃)에 균을 접종한 후 5일간 배양한 다음 Ferric chloride 5% 용액을 떨어뜨려 보라색으로 변하면 glucose와 fructose를 이용하여 γ -pyrone을 생성하는 양성반응으로 결정하였다. Gluconate peptone broth (0.15% peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% dipotassium phosphate, 4% potassium gluconate, pH 7.0)을 이용하여 2-ketogluconic acid 형성여부를 판별하였으며 실험은 Mac Faddin의 방법(7)을 참고하였다. 초산 저항성 실험은 초산 농도를 1~4%로 조절한 GYP 배지(3% glucose, 0.5% yeast extract, 0.2% peptone, 1.5% agar)에 균을 접종한 다음 5일간 배양한 후 조사하였으며 Frateur's Modified Hoyer Vitamine 배지에서의 성장 여부는 Swings과 De ley(11)의 방법에 준하여 실험하였으며, 배지는 ethanol과 mannitol 각각에 다음과 같은 비타민을 첨가하여 사용하였다(Yeast extract 10 g, ethanol 30 ml, salt solution 50 μ l, folic acid 2 μ g, biotin 2 μ g, Ca-pantothenate 400 μ g, inositol 2 mg, niacin 400 μ g, P-aminobenzoic acid 200 μ g, pyridoxin HCl 400 μ g, riboflavin 200 μ g, thiamine HCl 400 μ g, D/W 1 l). H and S 평판배지에 항생제 disc(BBL Sensi-Disc)를 올려놓은 다음 5일간 배양하여 항생제 내성 실험을 하였으며, 기타 생리학적 실험은 API 20E Kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 catalase, oxidase, citrate utilization, hydrolysis of urea and lactose, arginine dehydrolase, H₂

Table 1. Media and Composition

Carr's Medium for identification	
3%	Yeast extract
2%	Ethanol
0.0022%	Bromocresol purple
2%	Agar pH 5.5~6.0
H and S Medium for cellulose formation	
2%	Glucose
0.5%	Yeast extract
0.5%	Peptone
0.27%	Sodium phosphate
0.115%	Sodium citrate

S와 indole의 형성, sodium lactate에서 acetyl-methyl carbinol의 형성, nitrate 환원, gelatin liquefaction 등을 실험하였다. 실험 균주의 셀룰로오스 합성 여부를 형광성으로 확인하기 위해서 Williams와 Cannon(15)의 방법에 따라 0.01% Tinopal이 포함된 H and S 고체배지에 획선 접종하여 배양한 후 UV를 조사하여 형광성 유무를 판정, 그에 따라 셀룰로오스 합성여부를 결정하였다.

Ubiquinone system

Ubiquinone system은 Yamada 등(16)의 방법에 준하여 실시하였다. 분리균주 KI를 세척한 후 동결 건조시켜 냉동실에 보관하고, 이중 200 mg을 chloroform-methanol의 혼합물(2 : 1)에 녹여 여과시킨 다음 이 단계를 세번 반복하였다. 최종 여과액을 건조시킨 후 소량의 acetone에 현탁시켜 질소가스하에서 농축시킨 후, 추출물을 TLC plate(HPTLC-Fertigplatten, Merck Art No. 13724, RP-18, F254S, 10×10 cm)에 점적하고 acetonitrile-acetone(20 : 80) 혼합 용액에 넣어 전개한 후 자외선을 조사하여 chromatogram을 관찰하였다.

DNA 염기 조성

DNA는 Marmur(8)의 방법에 따라 분리하였으며 염기조성은 Tamaoka와 Komagata(12)의 방법에 준하여 실시하였다. DNA 용액을 100°C 에서 5분간 가열시킨 후 얼음에서 재빨리 식힌 다음 변성된 DNA 용액을 10 µl의 nuclease P1 용액(0.1 mg dissolved in 1 ml of 40 mM sodium acetate, 2 mM ZnSO₄ buffer)과 혼합한 후 50°C 에서 한시간 동안 배양하였다. Bacterial alkaline phosphatase로 37°C 에서 한시간 배양 후 가수분해물을 high-performance liquid chromatography(Shimadzu HPLC system, Japan)으로 분석하였다. Nucleoside는 0.6 M NH₄H₂PO₄(pH 4.0)과 acetonitrile의 혼합물(20 : 1, v/v)로 실온에서 1 ml/min의 flow rate로 추출하였으며 각각의 nucleoside를 HPLC의 UV absorbance 270 nm에서 검출하였다.

세포내 지방산 조성

세포내 지방산 조성은 Yamada(17)의 방법을 이용하였다. 동결 건조한 균체 20 mg을 100°C 에서 3시간 동안 methanolysis 한 후 세포내 지방산의 methyl ester를 hydrogen flame ionization detector를 갖춘 Shimadzu GC 14A gas-chromatography로 분석하였다. 주입과 검출 온도는 205°C 를, column 온도는 185°C 로 유지하였다.

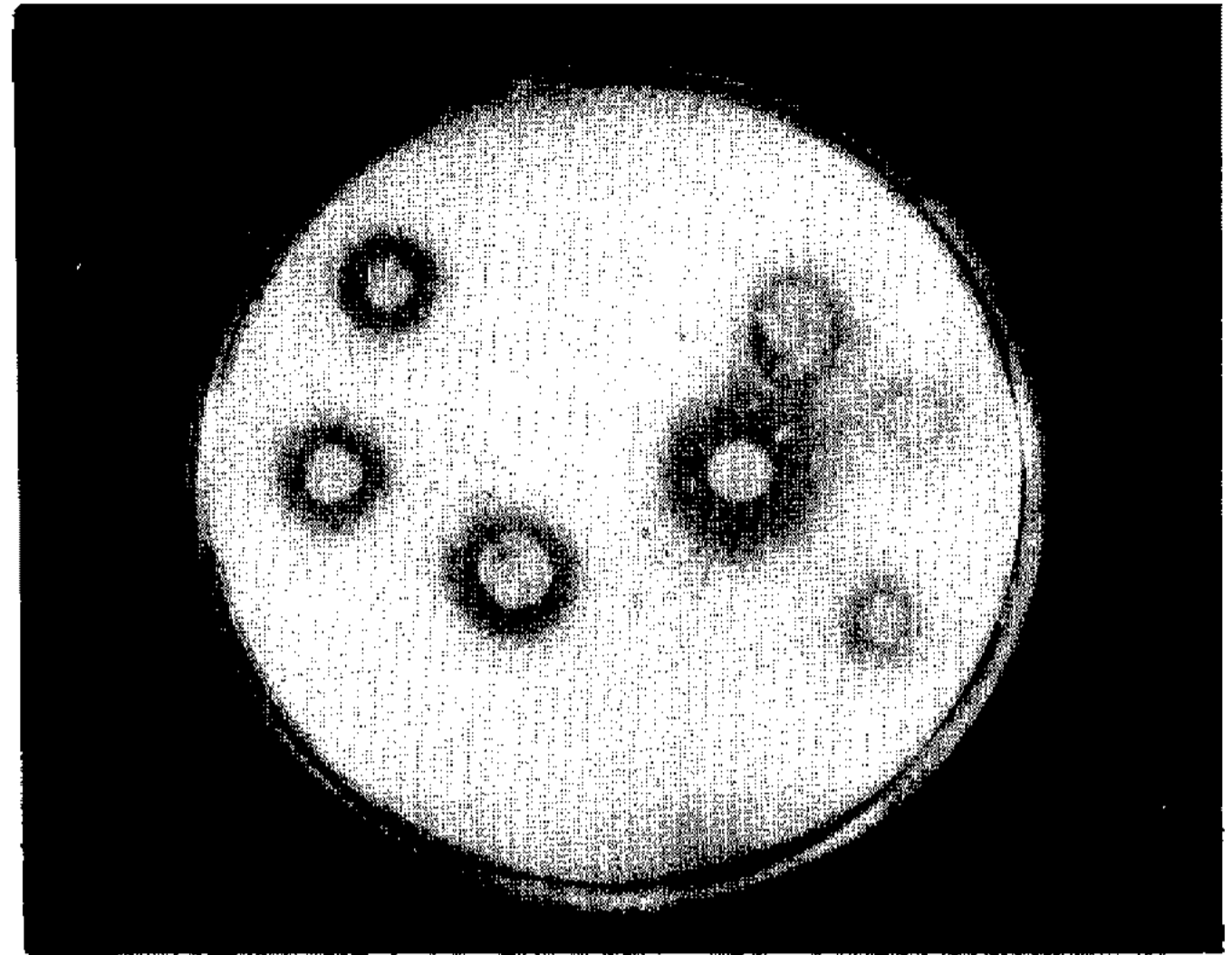


Fig. 1. Colonies that formed halo to be shown acid producing activity.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

본 실험에 사용한 균주는 광주지역에서 한국 고유의 방법으로 발효시킨 포도식초에서 에탄올을 재산화시키는 균주를 분리하여 이를 KI로 명명하였다. KI 균주는 그 분리원이 독특하여 한국 고유의 초산 생성 균으로 사료될 뿐만 아니라 셀룰로오스를 합성하는 특성을 보여주어 이에 대한 여러 가지 특성을 조사하였다. 분리 균주는 모두 그람 음성균으로 색소를 형성하지도 않았고, Carr 배지에서 짙은 갈색 집락을 형성하였다. Ethanol이 첨가된 배지에 지시약으로 bromocresol purple을 첨가하여 균을 배양시켰을 때 산이 생성되면 pH의 변화로 보라색이 노란색으로 변하게 되고 산이 CO₂로 재산화되는 경우 노란색이 다시 보라색으로 환원되는 것으로 알려져 있다(1). 분리 균주 KI는 이러한 색깔의 변화를 나타내었고 또한 CaCO₃이 첨가된 Frateur's 배지에 배양시킨 결과 투명대가 형성되었고 2~3일 후에는 CaCO₃가 다시 침전됨을 Fig.1에서 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 분리균주 KI는 초산 세균중에서도 *Acetobacter xylinum* 속에 속하는 초산 발효 균주임을 확인하였다.

*A. xylinum*에 의해 생성된 셀룰로오스는 호기성 조건하에서 세포를 유지하고, 셀룰로오스 pellicle은 UV light의 조사 효과로부터 세포를 방어하며, 기질에서 세포의 집락 형성을 향상시키며, 세포의 건조를 막아 습기를 제공해 준다는 것이 Williams(15)에 의해 밝혀졌다. 분리 균주의 셀룰로오스 형성 여부를 확인하기 위해 Schramm과 Hestrin(10)의 방법에 의해

3일 정도 정치 배양시킨 결과, 배지 표면에서 두꺼운 셀룰로오스 pellicle이 형성됨을 관찰하였으며, 동일 조성의 배지에서 진탕 배양시켰을 때도 하얀 둥근 공모양의(rounded-ball) 셀룰로오스 particle을 형성하였다. 또한 Williams와 Cannon(15)의 방법에 따라 형광물질(0.01% Tinopal)을 첨가한 고체배지에 실험균주를 배양시킨 후 UV 하에서 관찰한 결과, 셀룰로오스의 β -1-4-glucan과 형광물질이 수소 결합함으로써 형광성을 띠는 것으로 보아 *A. xylinum* 과 같은 셀룰로오스 합성능력이 있음을 확인하였다 (Fig. 2).

생리생화학특성

분리 균주와 *Gluconobacter*, *Acetobacter* 속의 여러 특성을 비교하여 Table 2에 나타내었다.

분리 균주는 에탄올 및 초산과 젖산을 CO₂와 H₂O로 재산화 하였으며 glycerol로부터 dihydroxyacetone을 생성하였으나, GYC 배지에서 수용성 brown

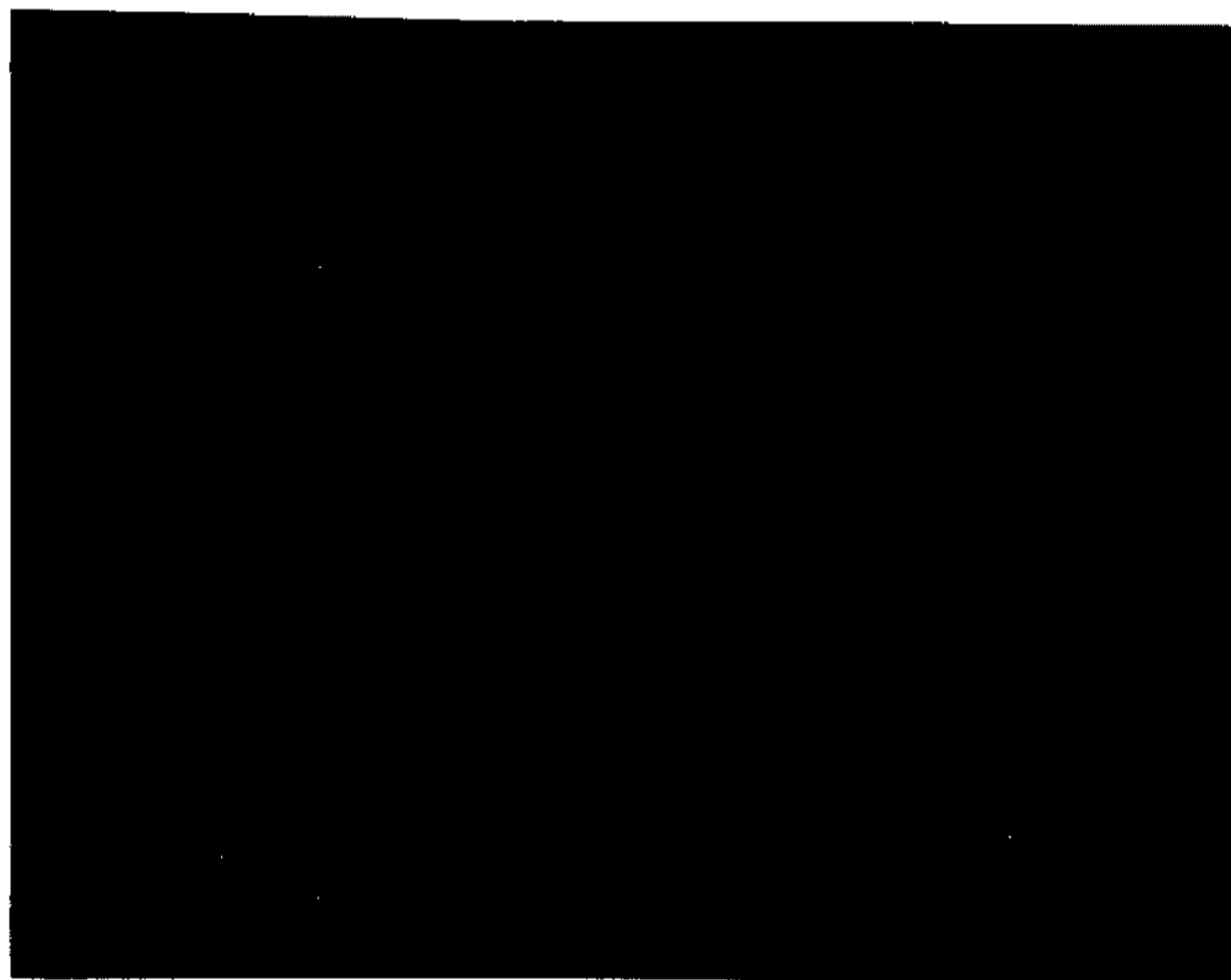


Fig. 2. Screening of fluorescent cellulose in *A. xylinum* KI(KI) and *A. xylinum*(A.X).

pigment 형성에 대해서는 음성반응을 보여주었다. 또한 세포내 지방산 조성에 있어서 KI 균주는 major component로 unsaturated octadecanoic acid C_{18:1} 직쇄 단일불포화 지방산과 saturated hexadecanoic acid C_{16:0} 직쇄 포화 지방산을 minor component로 saturated tetradecanoic acid C_{14:0} 직쇄 포화 지방산을 가지고 있었다. 이는 *Gluconobacter*와 *Acetobacter*가 축쇄 지방산을 가지고 있지 않으며, *Gluconobacter*와 *Acetobacter*의 주요한 차이점은 C_{14:0} 직쇄 지방산의 유무에 따라 구별된다는 Yamada 등(17)의 보고에 따라 KI를 *Acetobacter* 속으로 동정하였다. 지금까지 밝혀져 있는 *Acetobacter* 중에서 ubiquinone system으로 Q-9 system을 가지고 있는 종들은 *A. aceti*와 *A. pasteurianus*이며 *A. xylinum*, *A. methanolicus*, *A. diazotrophicus* 등은 Q-10 system을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(13). 분리 균주 KI는 major ubiquinone system으로 Q-10을 minor system으로 Q-9이 모두 존재하였다. 이상과 같은 결과와 함께 셀룰로오스 형성 능력을 고려하였을 때, 분리 균주 KI는 전형적인 *Acetobacter xylinum*인 것으로 확인되었기에 분리 균주 KI와 대조 균주인 *A. xylinum* (ATCC 23769)를 대상으로 여러가지 생리 생화학적인 실험을 수행하였으며 그 결과를 Table 3에 정리하였다.

분리균주를 *A. xylinum*(ATCC 23769)과 비교하였을 때 *Acetobacter*는 보통 D-glucose 이용도에서 20% 이상에서는 거의 성장하지 못하지만 KI 균주는 30% 까지 높은 이용도를 나타내었고, 염 농도에 따른 성장과 생화학적 특성 등은 *A. xylinum*(ATCC 23769)과 동일한 양상들을 보여주었다. Ferric chloride 반응에서 D-glucose와 D-fructose를 이용하여 γ -pyrone을 생성하였으며, gluconic acid 형성 실험에서는 양성 반응을 나타내는 것으로 보아 glucose dehydrogenase (GDH)가 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 염에

Table 2. Comparison of characteristics of KI strain with those of *Gluconobacter* and *Acetobacter*

Characteristics	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	KI strain
Overoxidation of ethanol	-	+	+
Ketogenesis (DHA from Glycerol)	+	±	+
Oxidation of acetate to CO ₂ and H ₂ O	-	+	+
Formation of brown water soluble pigments on GYC agar	-	±	-
Ubiquinone system	Q ₁₀	Q ₉ or Q ₁₀	Q ₉ and Q ₁₀
Cellular fatty acid	18 : 1	18 : 1, 14 : 0	18 : 1, 14 : 0
Cellulose formation	-	±	+

+; positive, -; negative

Table 3. Comparison of physiological and biochemical characteristics of KI strains with *Acetobacter xylinum* type strain ATCC 23769

Characteristics	KI	<i>A. xylinum</i>	Characteristics	KI	<i>A. xylinum</i>
Gram stain	-	-	VP test	-	-
Over-oxidation	+	+	Gelatin liquefaction	-	-
DHA from glycerol	+	+	Catalase	+	+
Brown pigments on GYC	-	-	Arginine dehydrolase	-	-
Growth on:			Lysine decarboxylase	-	-
SM medium			Sodium citrate utilization	-	-
+0.5% NaCl	+	+	H ₂ S production	-	-
+1.0% NaCl	w	+	Urea test	-	-
+2.0% NaCl	-	-	Tryptophane deaminase	-	-
+5.0% Ethanol	+	+	Indole production	-	-
+10.0% Ethanol	w	w	Acid produced from		
+15.0% Ethanol	-	-	Glucose	+	+
0.5% Yeast extract			Mannose	+	+
+20% D-Glucose	+	+	Inositol	+	+
+25% D-Glucose	+	+	Sorbitol	+	+
+30% D-Glucose	+	+	Rhamnose	+	+
Frater's medium			Saccharose	-	-
+Ethanol	+	+	Melibiose	-	-
+Mannitol	+	+	Amygdalin	-	-
Ferric Chloride reaction on:			Arabinose	+	+
Glucose	+	+	Resistance to antibiotics		
Fructose	+	+	30 µg Kanamycin	R	R
Type of ubiquinone	Q ₉ and Q ₁₀	Q ₁₀	30 µg Tetracyclin	S	S
Cellular fatty acid type	18 : 1, 14 : 0	18 : 1, 14 : 0	10 µg Ampicillin	S	S
G+C content of DNA (mol %)	57.6	58.1~62.6	10 µg Streptomycin	R	S
Cellulose formation	+	+	5 µg Rifampicin	S	S
			30 µg Nalidixic acid	S	S
			15 µg Erythromycin	R	R
			30 µg Chloramphenicol	S	R

+, positive, -, negative, w; weak, R; resistance, S; sensitive

대한 내성에서는 NaCl 1%에 내성을 보여주었고, 에탄올 1~15%의 농도에서 성장 실험을 한 결과 *A. acetii*, *A. pasteurianus* 등은 10% 농도에서도 성장하는데 비해 KI 균주와 *A. xylinum*은 에탄올 농도 8% 이내에서만 성장을 나타내는 것으로 보아 일반적인 *Acetobacter*보다 조금 낮은 에탄올 분해능을 가졌다고 사료된다. 한편 항생제 내성은 KI와 대조 균주 모두 ampicillin, nalidixic acid, rifampicin, tetracycline에 민감하였고 erythromycin과 kanamycin에는 내성을 나타내었다. 그러나 분리균주 KI는 대조 균주와는 달리 chloramphenicol에 민감하였고 streptomycin에 내성을 보여 이러한 결과는 앞으로 두 균주를 이용한 유전자 클로닝에 응용될 수 있을 것으로 생각된다. 분리균주의 DNA 염기조성을 분석한 결과 KI 균주는

56.7%의 G+C 함량을 나타내었는데 이는 일반적인 *A. xylinum* 균주들이 58.1~62.6%의 G+C mol%를 보이는 것과는 약간의 차이를 보여주었다. 분리균주와 대조 균주 모두 brown pigment를 생성하지 못하였고, catalase 반응에 대해서는 양성인데 반해 oxidase, Voges-Proskauer(VP) test, indole production, H₂S production, gelatin liquefaction, urea test 등의 반응에서는 음성으로 나타났다. 또한 대조 균주 *A. xylinum*과 KI 균주는 glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose와 arabinose를 이용해 산을 생성할 수 있었으나 saccharose와 amygdalin으로부터는 산을 생성하지 못하였다. 이와 같은 결과를 종합하여 KI 균주는 셀룰로오스를 생성하는 *A. xylinum* 균주에 속하는 것으로 확인하였으며 *Acetobacter xyli-*

num KI 균주로 명명하였다.

요 약

최근 셀룰로오스의 생합성 기작 및 셀룰로오스 형성능력에 관여하는 유전자를 분리하여 그 조절기작을 규명하는데 이용되는 셀룰로오스 합성 *Acetobacter xylinum*의 한 균주(KI)를 포도식초로부터 분리, 선별하였다. 분리된 KI 균주는 그람 음성균으로 액체배지에 정치배양시킨 결과 셀룰로오스 pellicle을 형성하였으며, 에탄올로부터 초산을 생성하여 이를 재산화시켰다. KI 균주는 초산 2%, 에탄올 9% 이상에서는 성장이 불가능하였으나, 1~30% glucoses 농도에서는 성장할 수 있었다. Ferric chloride 반응에서는 D-glucose와 D-fructose를 이용하여 γ -pyrone을 생성하였고, glycerol로부터 dihydroxyacetone을 형성하였다. 분리 균주의 세포내 지방산 조성은 다량의 불포화 지방산 C_{18:1}과 포화 지방산 C_{16:0}을, 그리고 *Acetobacter*의 특이적 지방산인 소량의 포화 지방산 C_{14:0}이 존재하였으며, ubiquinone system은 Q-10이 major form으로 Q-9가 minor form으로 존재하였다. KI 균주의 DNA G+C 함량은 57.6%이었다. 여러 생리생화학적 특성을 비교해 볼 때 분리 균주는 *Acetobacter xylinum*과 그 특성이 같다는 것을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 조선대학교 교내 학술연구비 지원(CRF-93-050)과 교육부 기초과학 연구지원(BSRI-93-424)에 의하여 이루어진 것이며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Asai, T. 1964. *Acetic Acid Bacteria*. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Chun, H.S. and S.J. Kim. 1993. Characterization of a new acidophilic *Acetobacter* sp. strain HA isolated from Korean traditional fermented vinegar. *J. Microbiol. Biotech.* 3: 108-114.
- Dudman, W.F. 1959. Cellulose producing by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. *J. Gen. Microbiol.* 21: 312-326.
- Inoue, R., M. Sunakawa, A. Mori, and M. Fukuda. 1989. Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* 171: 3115-3122.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Lin, F.C. and R.M. Brown. 1990. Identification of the uridine 5'-Diphospho-glucose(UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photo affinity probe 5-azido-UDP-Glc. *J. Biol. Chem.* 265: 4782-4784.
- Mac Faddin, J.F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, Pp. 137-140. 2nd ed The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- Park, J.P., S.J. Kim, J.C. Ryu, B.S. Pyo, and S.W. Kim. 1993. Some properties of *Acetobacter* sp. isolated from traditional fermented vinegar. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 8: 397-404.
- Schramm, M. and S. Hestrin, 1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *A. xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* 11: 123-129.
- Swings, J. and J. De Ley. 1981. The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. In *The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Pp. 771-778. Springer-Verlag, Berlin.
- Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 125-128.
- Uhlig, H., K. Karbaum, and A. Steudel. 1986. *Acetobacter methanolicus* sp. nov., and acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 317-322.
- Valla, S. and J. Kjosbakken. 1982. Cellulose-negative mutant of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1401-1408.
- Williams, S. and R.E. Cannon. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 55: 2448-2452.
- Yamada, Y., E. Nakazawa, and A. Nozaki. 1976. Characterization of *Acetobacter xylinum* by ubiquinone system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22: 285-292.
- Yamada, Y., M. Nunoda, T. Ishikawa, and Y. Tahara. 1981. The cellular fatty acid composition in acetic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27: 405-417.

(Received August 31, 1994)