

Cellulose 생합성 세균의 분리 및 특성

이승진 · 유주순 · 정수열¹ · 최용락*

동아대학교 생명자원과학대학 농화학과, ¹동주여자전문대학 식품영양과

초록 : 발효시켜서 만드는 감식초에서 시료를 채취하여 배양하고, pellicle을 형성하는 single colony를 cellulose 생합성균으로 분리하였다. 분리된 균주는 형태적 특성, 알콜의 재산화 등의 생리, 생화학적 특성 등에 의하여 *Acetobacter*속으로 분류되었으며, *Acetobacter* CBI-2라고 명명하였다. *Acetobacter* CBI-2는 정치배양 시에 기존의 생합성 균주로 알려진 *Acetobacter xylinum*과 대등한 cellulose 생합성 능력을 나타내었다. *Acetobacter* CBI-2이 생성한 고분자물질의 분해산물을 TLC법으로 확인한 결과 기존 cellulose의 것과 일치하였다. *Acetobacter* CBI-2에서 genomic DNA를 분리 정제하여 *cel A* 영역을 probe로하여 hybridization 시킨 결과, 상동성을 나타내어 분리 균주에는 cellulose 생합성 관련 유전자가 존재함을 나타내었다.(1997년 1월 7일 접수, 1997년 2월 24일 수리)

서 론

Cellulose는 생물학적으로 생산되어지는 가장 풍부한 천연 고분자물질 중의 하나이다. 대부분의 cellulose는 녹색식물에 의해 합성되어지며, 풍부한 재생자원으로서 산업적 활용을 위한 많은 연구가 요망된다. 그러나 이같은 사실에도 불구하고 식물에서의 cellulose 생합성에 대한 메카니즘은 분자적 수준에서 알려진 것이 거의 없는 상태이다.¹⁾ *Acetobacter xylinum*은 cellulose 생합성균으로 잘 알려져있으며 이외에도 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Agrobacterium* 및 *Rhizobium*속 등 다양한 범주의 세균에서도 cellulose 생합성이 확인되고 있다.^{2,5)} 식물에 비하여 비교적 단순한 기작으로 cellulose 합성이 이루어지는 것으로 밝혀졌으며, 분자적 수준에서도 연구가 상당부분 이루어져 있다.²⁾ *A. xylinum*에서 합성되어진 cellulose는 호기성 환경에서 세포를 유지시키며, cellulose pellicle을 형성하여 UV light의 치사작용로 부터 세포를 방어하고, *A. xylinum*의 집락을 형성하게 해주어 영양원으로 같은 기질을 사용하는 경쟁자로 부터 방어효과 및 세포에 습기를 제공하여 건조를 막는다고 한다.⁶⁾

Cellulose 생합성 기구를 밝혀 내하고자하는 연구는 세균에서 최초로 시작되었다. 이는 세균이 식물과 비슷한 구조적 특징을 가진 cellulose를 합성하는 단순한 세포를 가졌기 때문이다. Colvin¹⁾과 몇몇 연구자들에 의하여 Gram 음성 세균인 *A. xylinum*을 하나의 model system으로 cellulose 생합성 경로나 합성 조절기작이 밝혀지게 되었다.^{1,7-14)} 그런데, 세균에서의 cellulose 합성기작 및 기능은 genus에 따라서 약간 상이한 듯 하다. 예를들면 *A. tumefaciens*에서는 *A. xylinum*의 cellulose 생합성 operon에서 중요한 유전자인 *bcs B, C*와 상동성을 나타내는 유전자가 발견되지 않았으며, *A. tumefaciens*의 *cel B, C*는 *A. xylinum*의 유전자와 생

합성에 관여하는 기능도 상이한 것으로 보고되고 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾

식물유래의 cellulose는 세균유래의 것보다 crystallinity가 낮고, 기계적 강도나 흡착성이 떨어진다고 알려져 있다.^{5,19)} 최근에는 산업적인 활용의 예로서 일본에서는 세균유래의 cellulose가 음향기기의 진동판 재료로서 실용화되어 있으며,²⁰⁾ 또한 필름 제조용, 식이섬유 재료, 식품재료용, 종이제품 분야, 경량 및 고강도의 건축용 재료 및 texturing agent로서 산업적으로 응용하기위한 연구가 많이 진행되고 있다.^{19,20)}

따라서 본 연구에서는 미생물이 생산하는 천연소재의 생산 및 활용을 위한 과제의 일환으로서 cellulose를 생합성하는 세균 육종을 위한 기초적 연구를 수행하여, cellulose 합성이 우수한 토착 균주를 분리하고, 분리균주의 특성, cellulose 생합성 확인 및 생합성관련 유전자의 존재를 확인하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 발효시켜 만든 감식초에서 분리하여 사용하였으며, 대조균주로는 *A. xylinum*(ATCC 53582) 및 실험실 보관 균주인 대장균 JM 109를 사용하였다. 균주 분리를 위한 배지로는 Carr 배지를 사용하였고,¹²⁾ cellulose 합성 여부 확인을 위한 배지로는 H & S 배지를 사용하였으며,¹²⁾ 균주 동정 및 생리, 생화학적인 특성 조사를 위한 배지로는 YPC(0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% CaCO₃), GYC(5% glucose, 1% yeast extract, 3% CaCO₃) 및 YEG(1% yeast extract, 3% glycerol, 2% agar) 배지를 사용하여 28°C에서 배양하였다.²¹⁾

사용시약 및 재료

제한효소, T4 polynucleotide kinase, LA PCR *in vitro* cloning kit는 Takara사의 제품을, Prime-a-gene-labeling

찾는말 : cellulose, cellulose-producing bacteria, *Acetobacter*, cellulose biosynthesis

*연락처

system과 방사능이 표지된 [α - 32 P] dCTP는 Amersham사의 제품을 구입하여 사용하였으며, TLC aluminium sheets (silica gel 60 F254)는 Merck에서 구입하고, Genomic-tip 100/G와 Genomic DNA buffer set는 Qiagen에서, ampicillin, X-ray film, Tinopal과 기타 여러 시약들은 Sigma 사 혹은 시중에서 구입한 특급품을 사용하였다. API 20E kit는 Bio-Merieux SA사 제품, 단백질 정량을 위하여는 Bio-rad사의 protein assay kit를 사용하였다.

균주의 분리

발효시켜서 만든 감식초를 구입하여 10 ml/ Carr 배지에 접종시켜 28°C 항온기에서 3~4일간 정치 배양하였다. 시험관 배지 표층에 pellicle이 생성된 부분을 동일 조성의 새로운 평판배지에 재접종하는 과정을 2~3회 반복하고 형태 관찰 등을 통하여 단일 콜로니가 형성되는 균주를 분리하였다. 일차적으로 분리한 균주를 0.0022% bromocresol purple이 첨가된 동일 조성의 고체 배지에 접종하여 28°C 항온기에 3~4일간 배양하고 초산발효의 특적인 알콜을 산화시켜 콜로니가 보라색에서 노란색으로, 다시 노란색에서 보라색으로 복귀 되는 특성을 가지면서 pellicle을 형성하는 균주를 최종 분리하였다.

Cellulose 생합성 확인

분리 균주의 cellulose 생합성 여부는 cellulose의 β -1,4-glucan과 형광 물질이 수소 결합하여 형광성을 띠는 것을 합성 능력이 있는 것으로 판정하였다.⁹⁾ 즉, 0.01% Tinopal이 포함된 H & S 고체 배지에 희선 접종하여 28°C 항온기에서 3~4일간 배양한 후 UV를 조사하고 형광성 유무를 판정하여 cellulose 합성 여부를 결정하였다. 형광성을 가진 균주는 Schramm과 Hestrin의 방법¹⁰⁾에 따라 cellulose 합성 배지 H & S에 생육시켜서 3~4일간 정치 배양하여 배지 표층에 형성된 pellicle 층으로 cellulose 생성 정도를 확인하였다.

분리 균주의 생리 생화학적 특성 조사 및 동정

분리 균주의 동정은 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'에 준하였다.²³⁾ D-glucose의 농도에 따른 내성 시험은 yeast extract 0.5%에 20%와 30%의 glucose가 첨가된 배지에서의 생육 정도를 조사하고, 갈색색소의 생성은 GYC 배지를 이용하여 조사하였다. Glycerol로 부터 ketogenesis 확인 시험 및 기타 생리·생화학적인 실험은 API 20E kit를 사용하여 특성을 조사하였다. 분리 균주의 형태적 특성을 관찰하기 위하여 H & S 배지에서 2일간 배양된 단일 콜로니를 희석하여 전자 현미경 사진을 촬영하였다.

생성된 cellulose의 구성당 확인

분리 균주가 생성한 cellulose에 6N HCl을 가하여 121°C에서 24시간 동안 가수분해 시켰다.⁹⁾ 산분해물을 다른 표준당들과 함께 TLC(thin layer chromatography) plate에 점적하고, isopropanol과 H₂O가 3대 1로 섞인 혼합액에서 전개하였다. 전개가 끝난 TLC plate에 anilin-di-

phenylamine 용액을 분무하여 80°C 진공 건조기 속에서 발색시켰다.²⁴⁾

Cellulose 생합성 능력 측정

분리된 균주에서 생성된 cellulose의 합성량을 측정하기 위하여 Romanovic와 Brown의 방법²²⁾에 따라 분리균주를 생합성에 적합한 H & S 배지에 3일간 진탕 및 정치 배양시킨 후, 원심분리(5000×g, 10분)하여 집균하였다. 집균된 세포의 불순물 제거를 위하여 0.15N NaCl로 세척하여 원심분리한 후, 0.1M NaOH를 가하여 60°C에서 1시간 동안 부드럽게 교반시켰다. 그리고 원심분리하여 생긴 침전물을 진공 건조기 속에서 감압건조시켜 얻은 건물량을 세균이 생성한 cellulose 양으로 계산하였다. 세포의 생육량은 단백질이 세포의 중량 65%를 함유하는 것으로 보고 단백질을 정량하여 환산하였다.¹⁶⁾

생합성 관련 유전자의 존재확인

분리된 균주의 배양액을 원심분리하여 TE 완충액(50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 현탁하고, Qiagen의 genomic DNA 분리 kit를 사용하여 염색체 DNA를 분리 정제하였다. 분리 정제된 염색체 DNA를 수종의 6염기 인식 제한효소를 사용하여 분해하였다. 분해된 DNA를 0.7% agarose gel 전기영동으로 분리한 뒤에 변성과 중화 과정을 거친 뒤에 nylon membrane에 하룻밤 동안 Southern transfer하였다.²⁵⁾ 지금까지 클로닝 되어져 있는 cellulose 합성 관련 유전자 중 *bcs A*, *acs A* 및 *cel A* 유전자 사이에는 상동성이 매우 높은 영역이 존재한다.¹⁵⁾ 이들 중 *A. xylinum*의 *bcs A* 유전자의 구조영역에서 상동성이 높은 영역을 선택하여⁹⁾ 2종의 probe 합성용 primer(P1: 5'-CATGCAAAGGCCGTAATCTTAAC-3', P2: 5'-CAGGTTCCGCTGGAACGGGTCGGGGGAA-TAGAAGTGATGAGGGTCTG-3')를 합성하여 polymerase chain reaction(PCR)법으로 약 200bp의 DNA를 증폭시켜 probe DNA로 사용하였다.²⁶⁾

결과 및 고찰

Cellulose 생합성 우수 균주의 분리

발효시켜 만든 감식초를 Carr 배지에 접종시켜 수일간 배양한 후에 형성된 pellicle을 다시 동일 조성의 새로운 배지에 재접종하는 과정을 2~3회 반복하여 단일 콜로니 25종을 분리하였다. 분리한 균주중에서 pellicle 형성 능력이 가장 우수한 균주를 CBI-2라고 명명하였으며, 지속적인 실험을 하였다.

분리균주 CBI-2는 지시약으로 0.0022% bromocresol purple을 사용하여 알코올이 첨가된 동일 조성의 고체 배지에서 배양하였을 때 배지의 색깔이 보라색에서 노란색으로 되었고, 다시 계속해서 배양하면 생성된 산이 CO₂로 재산화(overoxidation)되어 노란색에서 다시 보라색으로 복귀됨을 확인하였다. 이 결과로 보아 이미 알려져 있는 것과

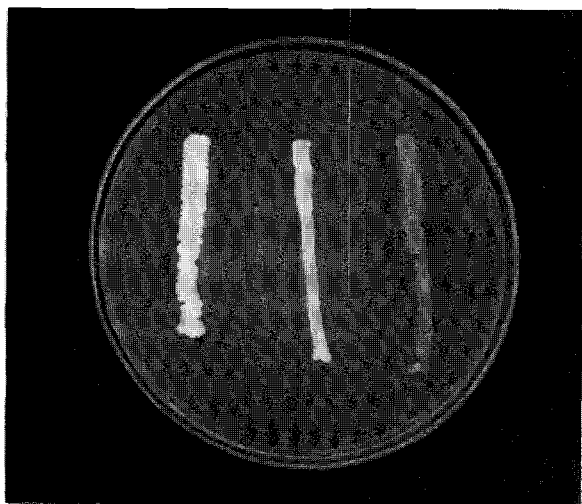


Fig. 1. Fluorescence of *Acetobacter* CBI-2(A), *Acetobacter xylinum* 53582(B), and *E. coli* JM 109(C) under UV light. All strains were cultivated on plates containing solid H & S medium supplemented with 0.01% final concentration of Tinopal.

같이 분리한 균주는 알코올을 이용하여 초산 발효를 하는 균주임을 알 수 있었다. Cellulose 합성 여부를 확인하기 위하여 William과 Cannon의 방법에¹⁶⁾ 따라 형광 물질(0.01% Tinopal)을 첨가하여 H & S 고체 배지에 분리 균주를 배양시켜 관찰해 본 결과 생성된 cellulose의 β -1 \rightarrow 4 glucan과 형광물질이 수소결합을 하여 UV하에서 집락 주위에 형광을 나타내었다(Fig. 1). 이 결과로서 분리 균주가 cellulose 합성 능력이 있음을 확인하였다. 대조균으로 사용한 대장균에서도 약한 형광을 나타내었는데 이는 대장균 세포벽 성분의 다당류때문인지, 또는 미량의 cellulose를 생성하는지의 여부는 계속적인 실험으로 확인되어야 할 것이다. 또한 동일 조성의 액체 배지에서 분리균주의 cellulose 형성 여부를 확인하기 위하여 Schramm과 Hestrin의 방법¹²⁾에 의해 3일 정도 정지배양시킨 결과 표층 부위에서 뚜꺼운 cellulose pellicle이 형성됨을 관찰하였다.

분리균주의 생리 생화학적 특성 및 동정

분리균주를 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과(Fig. 2), 운동성을 가진 간균으로 나타났다. 특히 CBI-2는 *A. xylinum*과 같이³⁰⁾ 세포 밖으로 분비되어진 cellulose의 fibril로 보여지는 선형가닥의 물질을 생성하는 것이 관찰되었다.

분리균주의 생리 생화학적 특성 조사 및 동정 실험의 결과를 대조 균주인 *A. xylinum*과 함께 비교하여 Table 1에 나타 내었다. 에탄올을 초산으로 산화하는 세균에는 *Acetobacter*, *Frateruria* 및 *Gluconobacter*속이 있다. 분리균주는 Gram 음성균으로 관찰되었으며, 균주 분리시에 나타난 특성인 에탄올의 overoxidation이나 초산과 젖산을 CO₂와 H₂O로 산화시키는 특성 및 GYC 배지에서 갈색 색소를 형성하지않는 특성 및 YEG 배지에 분리 균주를 접종시켜 배양한 후 Fehling's 용액을 배지 위에 몇 방울 떨어뜨렸을 때 색깔의 변화가 없는 음성 반응으로 보아 glycerol로부터 dihydroxyacetone을 생성할 수 없는 특성 등으로 보아 분리

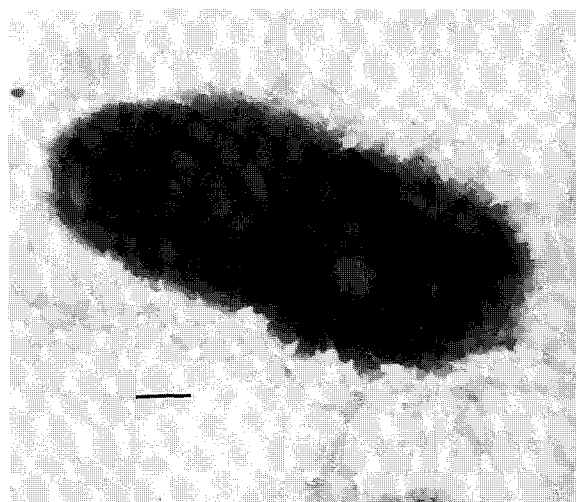


Fig. 2. Electron micrograph of *Acetobacter* sp. CBI-2. Bar represents 0.4 μ m.

Table 1. Comparison of physiological and biochemical characteristics between the isolated strain and *Acetobacter xylinum*.

Characteristics	CB I-2	<i>Acetobacter xylinum</i>
Gram stain	-	-
Cell shape	rod	rod
Motility of liquid media	+	+
Brown pigments on GYC	-	-
Catalase	+	+
Overoxidation of ethanol	+	+
Oxidation of lactate to CO ₂ and H ₂ O	+	+
Oxidation of acetate to CO ₂ and H ₂ O	+	+
Ketogenesis	+	+
Cellulose production	+	+
Growth in present of		
glucose 20%	+	+
glucose 30%	+	+
Halo formation from CaCO ₃	W	W
MR-VP test	W	W
Acid produced from		
Glucose	+	+
Mannose	+	+
Inositol	+	-
Sorbitol	+	-
Rhamnose	+	-
Saccharose	+	+
Melibiose	+	-
Amygdalin	+	-
Arabinose	+	-
Arginine dihydrolase	-	+
Citrate utilization	-	-
H ₂ S production	-	-
Urea test	-	+
Tryptophane desaminase	-	+
Indole production	-	+

* +, Positive; -, Negative; W, Weak.

균주는 *Acetobacter*속으로 분류될 것으로 보아졌다. 다른 특성으로는 glucose와 fructose를 탄소원으로 이용하여 γ -pyrone을 생성하는 것으로 나타났다. 또한 다음의 여러 가지 특성으로 cellulose 생성 초산세균인 *A. xylinum*과 비교하였

으나, 같은 분류에 속하는지는 단정할 수 없었다. MR-VP test에서 *A. xylinum*과 분리 균주는 약하게 양성으로 판독되었다. 또한 분리균주 CBI-2과 *A. xylinum*은 arginine dihydrolase와 urease test, tryptophane desaminase, indole production 반응에서 동일하게 음성으로 나타났다. 대조 균주인 *A. xylinum*은 glucose, mannose, inositol 등을 이용하여 산을 생성할 수 있었으나, sucrose, melibiose, amygdalin을 이용해서는 산을 생성하지 못하였다. 그러나 분리균주는 사용된 모든 당을 이용해 산을 생성하였다. 최근, Toyosaki 등²⁸⁾은 진탕배양시에도 cellulose 생합성이 우수한 균주를 분리하여 동정한 결과, 기존의 *A. xylinum*과는 생리, 생화학적인 특성이 약간 상이하고, DNA의 상동성도 낮아서 새로운 분류체계의 *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* 라는 이름을 가진 분류의 결과를 발표한 바 있다. 따라서 본 실험에서 분리한 cellulose 생성균은 *A. xylinum*과는 약간 다른 특성을 보였으며 *Acetobacter* CBI-2라고 명명하였다.

Acetobacter CBI-2가 생성하는 cellulose 확인

Acetobacter CBI-2가 생성한 cellulose를 정제하여 산 분해시켜 TLC 방법으로 구성당을 분석하였다. 산분해된 시료를 다른 표준 당들과 TLC plate에 전개하여 발색시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 분리균주의 cellulose 분해물은 glucose 및 식물의 cellulose로서 시판되고 있는 것(Serva 제)을 분해시킨 분해산물과 동일 위치에 이동되었다. 따라서 *Acetobacter* CBI-2가 생성하는 고분자 물질은 glucose를 구성당으로 하는 cellulose임을 확인할 수 있었다.

Acetobacter CBI-2의 cellulose 생합성 능력 측정

Acetobacter CBI-2를 cellulose 생합성에 적합한 것으로 알려진 H & S 배지에 정치배양하여 생합성되어진 cellulose 생합성 능력을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 *Acetobacter* CBI-2는 기존의 우수한 cellulose 생합성 균주로 알려진 *A. xylinum*의 생합성 능력과 비교하여 볼 때 H & S 배지에서 거의 비슷한 수준을 보였으며, 또한 세포 생성량에 따른 cellulose의 생성량은 *A. xylinum*과 대등한 수치를 나타내었다. *Acetobacter* CBI-2의 경우는 동일 배양시간에 H & S배지에서 *A. xylinum*보다 균체 증식량이 약간 떨어졌으므로 앞으로 더욱더 많은양의 cellulose 생성을 위하여 배지 조성 등의 증식 조건을 최적화하여야 할 것으로 보여진다. 진탕배양할 경우에는 기존의 *A. xylinum*의 경우 cellulose pellicle의 생성량이 감소하는 것으로 보고된 바 있는데,²⁹⁾ *Acetobacter* CBI-2에서도 같은 경향을 나타내었다(data not shown).

Acetobacter CBI-2에서 cellulose 생합성 관련 유전자 확인

Acetobacter CBI-2에서 염색체 DNA를 분리 정제하여 몇 종류의 제한효소로 절단한 DNA를 전기영동하여 나일론 membrane에 transfer 시켰다. 기존의 알려진 cellulose 합

1 2 3 4

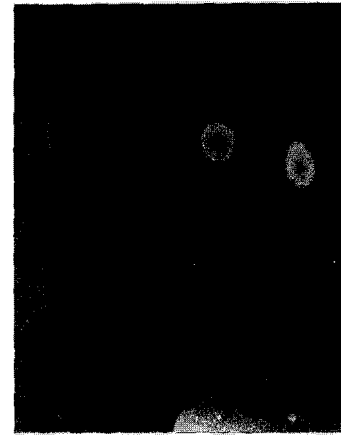


Fig. 3. Separation of sugars on a buffered silica gel G layer. Visualization with anilin-diphenylamine reagent. 1, digested cellulose from CBI-2; 2, digested cellulose; 3, glucose; 4, maltose.

Table 2. Comparison of cell growth and cellulose production between *Acetobacter* CBI-2 and *A. xylinum*.

Strain	Cellulose production(g/l)	Cell mass(g/l)	Cellulose/Cell
<i>Acetobacter</i> CBI-2	0.566 ^a	0.923 ^b	0.637
<i>A. xylinum</i>	0.606	0.940	0.645

^aCells were grown for three days in 100 ml H & S media and were harvested by centrifugation, washed with saline, and resuspended in 15 ml of 0.1 M NaOH and incubation at 60°C with mild agitation for 60 min. The dry weight of the precipitate represents the amount of cellulose in the sample. ^bThe content of protein in the supernatants was determined and the cell concentration was calculated in the culture assuming a cell with 65% protein content.

성 관련 유전자인 *cel A* 영역에서 상동성이 매우 높은 영역의 부분을 primer(p1, p2)로 합성하여 PCR법으로 증폭된 200 bp 크기의 DNA를 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *Acetobacter* CBI-2에서 분리한 염색체 DNA와 여러 종류의 제한효소에서 다양한 크기의 양성 band를 보여주었다. 따라서 이러한 결과는 *Acetobacter* CBI-2에서도 cellulose 생합성 관련유전자의 하나인 *cel A* 유전자를 포함하는 전체영역이 존재할 것으로 추정된다. *A. xylinum*과 *Agrobacterium tumefaciens* 등의 세균에서 cellulose 생합성 관련 유전자들이 operon 구조를 이루고 있다는 것이 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 이들 cellulose 생합성 관련 유전자를 클로닝하고자 양성 band를 나타낸 *EcoRI*과 *PstI* 제한효소를 선택하여 염색체 DNA를 제한효소로 절단시키고, pUC119를 vector로 사용하여 같은 절단부위에 삽입시켜 genomic library를 작성하였다. 작성된 genomic library에서 도출된 colony를 colony hybridization으로 cellulose 합성 관련 유전자를 선별하고자 하였다. 그러나, 실험도중에 vector만을 도입시킨 대장균을 colony hybridization시킨 결과 probe DNA와 hybridization하는 것으로 나타나 cellulose 합성 관련 유전자를 함유한 클론의 선별이 불가능하였다. 이러한 결과는 대

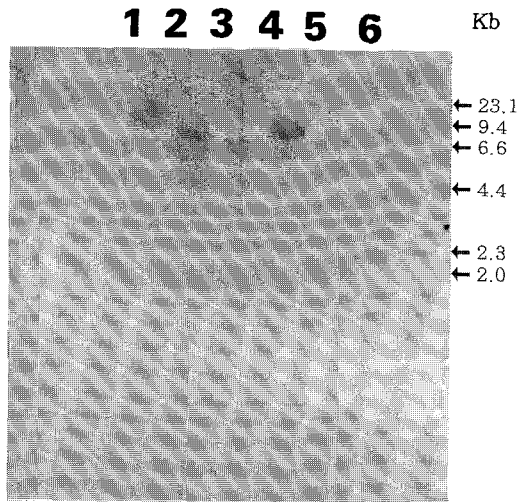


Fig. 4. Southern blot hybridization of enzyme-digested total DNA from *Acetobacter* CBI-2. Lane 1, chromosomal DNA; lane 2, digested by *Eco*RI; lane 3, digested by *Hind*III; lane 4, digested by *Sal*I; lane 5, *Hind*III-digested λ DNA; lane 6, digested by *Pst*I.

장균 염색체 상에서 *A. xylinum*의 cellulose 합성관련 유전자(*bcs A*)와 염기배열이 67%의 높은 상동성(아미노산 배열 47%)을 나타내는 기능 미확인의 ORF가 존재한다는 결과보고²⁹⁾와 일치하였다. 따라서 성공적인 클로닝을 위하여는 새로운 숙주의 선택 및 대장균을 변이시켜 Tinopal이 첨가된 배지에서 형광을 나타내지 않는 변이주를 작성하고, 이것을 숙주균으로 사용하여 계속적인 클로닝 실험연구를 수행하여야 할 것이다.

감사의 글

본연구는 교육부의 학술조성연구비(유전공학)의 일부 및 동아대학교 교내 연구비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Colvin, J. R. (1980) The biosynthesis of cellulose. *Plant Biochemistry*, **3**, 543-540.
- Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Rev.* **55**, 35-38.
- Matthysse, A. G., K. V. Holmes, and R. H. G. Gurlitz (1981) Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cell. *J. Bacteriol.* **145**, 583-595.
- Smith, G., J. W. Kijne, and B. J. Lugtenbeng (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{2+} -dependent adhesion in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tip. *J. Bacteriol.* **169**, 4294-4301.
- Reuber, T. L. and G. C. Walker (1993) Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important polysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**, 269-280.
- Williams, S., and R. E. Cannon (1989) Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2448-2452.
- Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohara, R. Mayer, S. Braun, E. Vroom, G. A. de van der Marel, J. H. Boom, and M. Benziman (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279-281.
- Bureau T. E. and R. M. Brown Jr. (1987) *In vitro* synthesis of cellulose II from a cytoplasmic membrane fraction of *A. xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6985-6989.
- Saxena, I. M., F. C. Lin, and R. M. Brown Jr. (1990) Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol. Biol.* **15**, 673-683.
- Saxena, I. M., F. C. Lin and R. M. Brown Jr. (1991) Identification of a new gene in an operon for cellulose biosynthesis in *A. xylinum*. *Plant Mol. Biol.* **16**, 947-954.
- Lin, F. C. and R. M. Brown Jr. (1989) Purification of cellulose synthase from *A. xylinum*, p.493-492. in C. Schuerch(ed), *Cellulose and wood chemistry and technology*. John Wiley and Sons, NY.
- 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.
- Aloni, Y., D. P. Delmer, M. Benziman (1982) Achievement of high rates of *in vitro* synthesis of 1,4- β -D-glucan: Activation by cooperative interaction of *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, polyethylene glycol, and a protein factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 6448-6452.
- Saxena, I. M., K. Kudlika, K. Okuda, and R. M. Brown Jr. (1994) Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon(*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: Implication for cellulose crystallization. *J. Bacteriol.* **176**, 5735-5752.
- Matthysse, A. G., W. Sally, and R. Lightfoot (1995) Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **177**(4), 1069-1075.
- Coucherm, D. H. (1991) An *Acetobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production. *J. Bacteriol.* **173**, 5723-5731.
- Wong, H. C., A. L. Fear, R. D. Calhoun, G. H. Eichiger, R. Mayer, D. Amikam, M. Benziman, D. H. Gelfand, J. H. Meade, A. W. Emerick, R. Bruner, A. Ben-Bassat, and R. Tal (1990) Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8130-8134.
- Matthysse, A. G., D. L. Thomas, and A. R. White (1995) Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **177**(4), 1076-1081.
- Benziman, M., C. H. Haigler, R. M. Brown Jr., A. R. White, and K. M. Cooper (1980) Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6678-6682.

20. Yoshinaga, F. (1996) Development of production process and application of biocellulose, a new material. *Bioscience and Industry* **54**, 22-25.
21. 차영준, 박경진, 김도경, 전홍성, 이병권, 김근형, 이숙영, 김성준 (1994) Cellulose 생성 *Acetobacter xylinum* KI 균주의 분리 및 특성. *한국산업미생물학회지*. **22**, 571-576.
22. Romanovicz, D. K., and R. M. Brown, Jr. (1976) Biogenesis and structure of golgi-derived cellulosic scales in pleurochysis. II. Scale composition and supramolecular structure. *Appl. Polym. Sym.* **28**, 587-610.
23. Peter, H. A. S., S. M. Nicholas, M. E. Sharpe and J. G. Holt (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 10, pp. 140-211, Williams & Wilkins, U.S.A.
24. Doner, L. W. (1988) High performance thin-layer chromatography of starch, cellulose, xylan and chitin hydrolysates. *Methods in Enzymol.* **160**, 176-180.
25. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-507.
26. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning, A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
27. Kunihiro W., and Y. Shigeru (1995) Effect of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture condition. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 65-68.
28. Toyosaki, H., Y. Kojima, T. Tsuchida, K. I. Hoshino, Y. Yamada, and F. Yoshinaga (1995) The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation culture: The proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* subsp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **41**, 307-314.
29. Sofia, H. J., V. Burland, D. L. Daniels, G. Plunkett and F. R. Blattner (1994) Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2576-2586.

Characterization and Isolation of Bacteria Producing Cellulose.

Seung-Jin Lee, Ju-Soon Yoo, Soo-Yeol Chung¹ and Yong-Lark Choi* (Department of Agricultural Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea; ¹Department of Food Science & Nutrition, Dongju Women's Junior College, Pusan 604-715, Korea)

Abstract : A screening was performed to isolate the cellulose-producing microorganisms from vinegar in Korea. The isolated strain was identified as *Acetobacter* sp. with respect to physiological and biochemical characteristics and designated as *Acetobacter* CBI-2. Cellulose production of *Acetobacter* CBI-2 was equal with the well known cellulose-producing bacteria, *A. xylinum*. The result of separation on thin layer chromatography(TLC) was consistent with the degradation product of native cellulose. The presence of genes required for the cellulose biosynthesis in *Acetobacter* CBI-2 was confirmed by Southern hybridization.

Key words : cellulose, cellulose-producing bacteria, *Acetobacter*, cellulose biosynthesis

*Corresponding author