

Microbial Cellulose 생산세균의 분리 및 동정

손홍주* · 이오미 · 김용균 · 이상준¹
밀양대학교 생물공학과, ¹부산대학교 미생물학과

Isolation and Identification of Cellulose-Producing Bacteria. Son, Hong-Joo*, O-Mi Lee, Yong-Gyun Kim, and Sang-Joon Lee¹. Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea, ¹Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea - Extensive screening for cellulose-producing bacteria was done using differential media. Fifty seven strains were isolated totally from the fruits and the vinegar, respectively; the isolate A9 strain from apples was selected and examined to determine its taxonomical characteristics. The bacterium was identified as the genus *Acetobacter* sp. based on morphological, cultural and biochemical properties. A9 strain produced acetic acid from ethanol and decomposed acetic acid to CO₂ and H₂O. They produced dihydroxyacetone from glycerol but did not produce γ -pyrone from glucose and fructose. When A9 strain was cultivated statically in Hestrin and Schramm liquid medium(HS medium), thick cellulose pellicle was formed. Higher cellulose production was obtained in the shaken culture using HS medium at 100 rpm.

Key words: *Acetobacter* sp., microbial cellulose, identification, isolation

셀룰로오스는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 천연 고분자이자 고등식물의 주요 구성성분으로서, 현재 제지 및 방직산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있으며, 산업이 발전함에 따라 셀룰로오스의 소비량이 크게 증가하고 있다[6,13]. 이렇게 셀룰로오스의 소비가 급증함에 따라 그 원료로 사용되는 목재에 대한 수요도 갈수록 높아지고 있으나 원료공급과 환경문제로 인하여 제지 대체물질에 대한 연구가 절실한 형편이다[7,17]. 따라서 미생물에 의하여 생성되는 셀룰로오스에 대한 관심이 높아지고 있으며, 식물유래 셀룰로오스에서는 찾아볼 수 없는 새로운 기능성 재료로서 기대를 모으고 있다.

1886년 다양한 세균가운데 초산균(*Acetobacter* spp.)에 속하는 균주가 식물유래의 셀룰로오스와는 미세구조 및 특성이 다른 셀룰로오스(microbial cellulose)를 생산한다는 것이 밝혀졌다[3]. 이러한 세균유래 셀룰로오스는 식물유래와는 달리 lignin이나 hemicellulose가 전혀 없는 순수한 상태로 생산된다[6]. 식물유래 셀룰로오스는 펄프화 과정에서 lignin 등을 가혹한 조건에서 약품 처리로 제거해야 하며, 이때 대량의 에너지와 약품이 소비된다는 측면에서 다소 비경제적인 과정이다. 미생물 셀룰로오스는 이러한 과정을 거치지 않고도 고순도의 셀룰로오스를 생산할 수 있으며, 동시에 결정화도, 흡습성 등이 높아 스피커 진동판 등의 산업

적 응용 가능성이 높으며 지혈대, 피부치환제, 식이섬유 등의 용도로서도 개발가능성이 높다[17].

미생물 셀룰로오스 생산균주로 현재 연구가 많이 되어 있는 것은 *Acetobacter xylinum*으로서, 호기적 조건에서 정지 배양하면 셀룰로오스가 pellicle 형태로 기체(배양액 상부의 공기)-액체(배양액) 경계면에 형성되나[4] 교반배양하면 셀룰로오스를 생산하지 않는 돌연변이체(cellulose negative mutant; Cel⁻)가 생성됨으로써 셀룰로오스 생산량이 대폭 감소하는 현상이 일어난다[13]. 그러므로 이러한 문제를 해결하고 산업적 규모로 셀룰로오스를 대량생산하기 위해서는 교반배양에서도 안정한 균주의 분리와 배양조건의 검토 및 돌연변이를 유발하는 환경조건에 대한 연구가 절실한 형편이다. 그러나 미생물 셀룰로오스에 대한 연구는 최근까지 다소 미진하였으며, 보고된 내용도 기존의 알려진 표준균주를 대상으로 한 셀룰로오스 생산에 대한 내용이 대부분이다. 즉, 교반배양에서도 유전적으로 안정한 균주의 분리와 이 균주에 의한 셀룰로오스 생산특성을 검토한 보고는 극소수[18]에 불과하고, 또한 셀룰로오스 생산용 합성배지의 설계에 대한 연구도 극히 미진한 실정이다[9].

본 연구는 고품질 미생물 셀룰로오스의 대량생산을 최종 목표로 설정되었으며, 이에 따라 먼저 자연계에 다양하게 존재하는 세균중 셀룰로오스 생산성이 우수하고 교반배양에서도 셀룰로오스 생산력을 잃지 않는 유전적으로 안정한 토착 *Acetobacter* 균주를 분리 및 동정함으로써 새로운 생물자원을 확보하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel 82-0527-350-5484, Fax. 82-0527-350-5484
E-mail: shjoo@arang.miryang.ac.kr

재료 및 방법

배지 및 배양조건

셀룰로오스 생산균주를 분리하기 위한 배지는 yeast extract 3.0%, ethanol 2.0%, bromocresol green 0.0022%, agar 2.0% 및 pH 6.0인 Carr medium[14]을 사용하였으며, 셀룰로오스 합성배지는 glucose 2.0%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.675%, citric acid monohydrate 0.115% 및 pH 6.0인 Hestrin과 Schramm medium(HS medium)[14]을 사용하였다. 콜로니 관찰을 위한 배지는 glucose 5.0%, yeast extract 1.0%, CaCO₃ 3.0% 및 agar 2.5%인 GYC medium[11]이었다. 그리고 ethanol 3.0%, yeast extract 1.0%, polypeptone 1.0%, CaCO₃ 1.0% 및 agar 2.0%의 조성을 갖는 Frateur medium[11]을 이용하여 ethanol의 산화능을 검토하였다. 이때 모든 배양은 30°C에서 실시하였다. 정치배양은 배지 50 ml이 담긴 250-ml Erlenmeyer flask를 이용하여 30°C, 7일간 배양하였으며, 교반배양은 동일한 조건에서 100 rpm으로 배양하였다.

셀룰로오스 생산세균의 분리

균주분리를 위한 시료로서 사과, 포도, 양조식초, Kombucha(tea fungus) 및 토양을 이용하였다. 각 시료 적당량을 HS medium에 접종하여 30°C에서 정치배양하였으며, 탁도 또는 pellicle이 나타난 배양액만을 선정하여 생리 식염수를 이용하여 단계적으로 희석하였다. 각 희석액 100 µl를 Carr medium에 접종하여 배양하면서 배지의 색상을 green→yellow→green으로 변화시키는 콜로니를 셀룰로오스 생산균주로 선정하였다[16,18].

공시균주의 동정

공시균주를 동정하기 위하여 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 Identification methods for microbiologists[16] 및 Biochemical tests for identification of medical bacteria[12]에 준하여 검토하였으며, 도출된 결과를 Bergey's manual of determinative bacteriology[10], Bergey's manual of systematic bacteriology[11], The prokaryotes[1] 및 De Ley 등[5]의 연구를 참조하여 동정하였다.

셀룰로오스 생산량 측정

배양액내에 형성된 pellicle(정치배양) 및 셀룰로오스 mass(교반배양)를 cheese cloth로 여과하여 회수한 후, tap water로 세척하여 배양액 성분을 제거하였다. 세척된 pellicle 및 셀룰로오스 mass를 100 ml의 0.5 N NaOH 용액에 넣어 100°C에서 1시간동안 가열함으로써 세포를 용균시킨 후, 다시 300 ml의 증류수에 넣고 24 시간동안 세척하였다. 최종적으로 회수한 pellicle 및 셀룰로오스 mass를 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하였다. 건조된

pellicle 및 셀룰로오스 mass를 데시케이터에서 방냉한 후, 건조중량을 측정함으로써 셀룰로오스의 생산량을 나타내었다[2,8].

결과 및 고찰

공시균주의 선정

총 57주의 셀룰로오스 생산균주가 분리되었는데 출현빈도는 Kombucha, 사과, 식초, 포도의 순서로 낮았으며, 토양에서는 분리되지 않았다. 그중 사과에서 분리된 A3, A9, 식초에서 분리된 V6 및 Kombucha에서 분리된 K2, K12의 셀룰로오스 생산능이 대체적으로 우수하였으며, 교반배양에서도 셀룰로오스를 생산할 수 있었다. 본 실험에서는 사과에서 분리된 A9 균주를 공시균으로 선정하여 이후의 실험을 진행하였다.

형태학적 및 배양적 특성

공시균주를 육즙한천평판 배지에서 30°C, 일정시간별로 배양한 후, 관찰한 형태학적 특성은 Table 1에서 보는 바와 같다. 즉 본 공시균은 그람음성의 단간균으로 운동성이 없었으며, 포자를 형성하지 않았다. 또한 세포는 single 또는 pair로 배열하며 존재하였다.

공시균주를 GYC 한천 평판배지에서 30°C로 배양한 후, 형성된 콜로니의 배양적 특성을 관찰한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. GYC 한천 평판배지상에서의 생육속도는 육즙 한천평판배지보다 느렸으며, 배양 7-10일 후 전형적인 콜로니가 관찰되었다. 형성된 콜로니는 가장자리가 둥글고, 중앙부가 볼록한 convex형이었다. 콜로니의 표면은 배양시간이 경과함에 따라 smooth에서 rough type으로 변화되었으며, 또한 콜로니의 중앙부 역시 flat form으로 변하였다. 이것은 본 균주가 셀룰로오스를 세포외로 분비한 결과에 기인하는 것으로 판단되었다. Sowden과 Colvin[15]은 세포외로 분비된 셀룰로오스 microfibrile로부터 세포가 반

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the A9 strain

Characteristics	A9 strain
<i>Morphological characteristics</i>	
Gram stain	negative
Cell shape	short rod
Cell size(µm)	0.3-0.4 × 0.7-0.8
Motility	negative
Spore formation	negative
<i>Cultural characteristics</i>	
Colony shape	entire, circular convex to flat
Colony color	pale white
Colony surface	smooth to rough
Colony opacity	opaque

복해서 떨어져 나가고, 떨어져 나간 세포로부터 새로운 microfibrile이 재생되면서 이러한 독특한 형태변화가 일어난다고 하였다.

생리생화학적 특성

A9 균주를 Frateur medium에 접종하여 배양한 결과, 배지속의 CaCO₃가 중화되어 투명환이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 배양 8일 후, CaCO₃가 재침전됨을 확인할

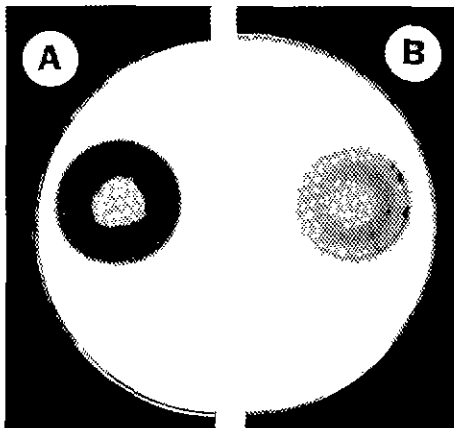


Fig. 1. CaCO₃-ethanol test for ethanol oxidation.
A, four day's incubation; B, eight day's incubation-note irisation around colony.

수 있었다(Fig. 1). 따라서 A9 균주는 ethanol→acetic acid→CO₂+H₂O의 산화경로를 가지고 있는 것으로 판단되었다. 또한 pH 지시제로서 bromocresol green이 첨가된 Carr medium에서 A9 균주의 콜로니 주변부는 배양시간 경과에 따라 green→yellow→green의 색깔변화를 나타내어 상기의 결과를 다시 한 번 확인할 수 있었으며, 이에 따라 본 공시균주는 *Acetobacter* 속에 속하는 것으로 추정되었다. Acetobacteriaceae에는 *Acetobacter* 속과 *Gluconobacter* 속이 포함되어 있다[1]. 따라서 문헌에 기재되어있는

Table 2. Comparison of characteristics of A9 strain with those of *Acetobacter* and *Gluconobacter*

Characteristics	A9 strain	<i>Aceto-bacter</i> *	<i>Glucono-bacter</i> *
Overoxidation of ethanol	+	+	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	+
Oxidation of acetate to CO ₂ and H ₂ O	+	+	-
Oxidation of lactate to CO ₂ and H ₂ O	+	+	-
Cellulose formation	+	±	-
H ₂ S formation	-	-	-
Brown pigmentation on GYC agar	-	±	-
γ-Pyrone from 3% glucose	-	D	D
γ-Pyrone from 5% fructose	-	-	+

*: Data taken from reference 1 and 11.
D: Different reaction in different taxa(species of a genus).

Table 3. Characteristics that differentiate several species of the genus *Acetobacter* and the A9 strain

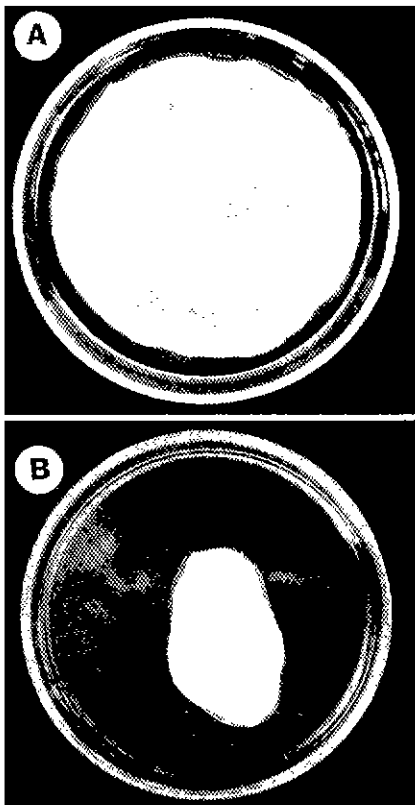
Characteristics	A9 strain	<i>A. aceti</i> *	<i>A. diazotrophicus</i> *	<i>A. hansenii</i> *	<i>A. liquefaciens</i> *	<i>A. methanolicus</i> *	<i>A. pasteurianus</i> *	<i>A. xylinum</i> *
Formation of:								
Water-soluble brown pigments on GYC	-	-	-	-	+	-	-	-
γ-Pyrone from glucose	-	-	+	-	d	-	-	-
γ-pyrone from fructose	-	-	+	-	+	-	-	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	d	+	+	weak	-	+
Growth on carbon source :								
ethanol	-	+	+	-	+	weak	d	-
methanol	-	-	-	-	-	+	-	-
dulcitol	-	-	-	d	-	-	-	-
xylylitol	-	-	ND	-	-	ND	-	ND
raffinose	-	-	ND	-	-	ND	-	ND
Acid from carbon source :								
fructose	+	-	ND	-	-	ND	-	ND
glucose	+	+	ND	+	+	ND	+	ND
inositol	-	-	ND	-	-	ND	-	ND
manitol	-	-	ND	-	-	ND	-	ND
sorbitol	-	-	ND	-	-	ND	-	ND
N ₂ fixation	-	-	+	-	-	-	-	-
Growth on 10% ethanol	-	-	-	-	-	-	d	-

*: Data from reference 1, 5, 10 and 11.
d · 16~84% strains positive.
ND · Not determined.

Table 4. Physiological and biochemical characteristics of *Acetobacter xylinum* and the A9 strain

Characteristics	A9 strain	<i>Acetobacter xylinum</i>
Gelatin liquefaction	-	-
Catalase	+	+
Cytochrome oxidase	-	ND
Oxidation/fermentation	oxidation	ND
Indole production	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
H ₂ S production	-	-
Urease production	+	-
Nitrate reduction	-	ND
Voges-Proskauer reaction	-	-
Methyl red reaction	-	ND
Citrate utilization	-	-

ND : Not determined.

**Fig. 2. Shape of the bacterial cellulose produced by *Acetobacter* sp. A9 from (A) static culture and (B) shaking culture.**

Acetobacter 속과 *Gluconobacter* 속의 key가 되는 대표적인 생리학적 특성을 조사하여 A9 균주와 비교한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 본 균주는 ethanol,

acetate 및 lactate를 과산화(overoxidation)할 수 있었으며, glucose와 fructose로부터 γ -pyrone을 생성할 수 없었고, glycerol로부터 dihydroxyacetone을 생성하는 ketogenesis 반응에서는 양성을 나타내었다. 이상과 같은 실험결과를 통하여 공시균 A9 균주는 *Acetobacter* 속에 포함됨을 알 수 있었다.

공시균 A9 균주와 *Acetobacter* 속의 여러 종간의 특성을 비교, 검토한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 조사된 대조균주들과 여러 특성면에서 약간의 차이를 나타내었으나 *Acetobacter hansenii*와는 fructose로부터의 산(acid) 생성을 제외한 모든 특성들이, *A. xylinum*과는 미분석 항목을 제외한 모든 특성들이 동일하였다. 주된 셀룰로오스 생산균주로 기보고된 *Acetobacter xylinum*과의 기타 생화학적 특성을 비교, 검토한 결과 본 공시균 A9 균주는 미분석된 항목을 제외하고는 urease 생산능 외의 다른 특성은 동일하였다. (Table 4).

비록 본 공시균이 *A. hansenii* 및 *A. xylinum*과 여러 가지 특성이 대단히 유사하였으나 아직까지 *Acetobacter* 속의 동정의 key가 되는 여러 가지 형질에 대한 데이터가 거의 없는 실정이므로 상기의 결과를 가지고 종(species) 수준까지 해명하는 것은 불가능하였다. 그러나 공시균 A9 균주는 *Gluconobacter* 속과는 뚜렷하게 구별되며, 전형적인 *Acetobacter* 속의 특성을 가지고 있었으므로 편의상 *Acetobacter* sp. A9으로 동정하였다.

정지 및 교반배양에서 셀룰로오스 생산

HS medium에 공시균 *Acetobacter* sp. A9을 접종한 후, 30°C에서 7일간 정지배양 및 회전교반배양(100 rpm)한 결과 생성된 셀룰로오스의 형태는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 즉 정지배양에서 형성된 셀룰로오스는 pellicle의 형태로 기체-액체 경계면에 형성되었으며, 교반배양에서는 배양 3일 경부터 직경이 작은 수많은 ball의 형태로 셀룰로오스가 합성되었으나 배양 5일경부터 이것들이 서로 뭉쳐 두꺼운 하나의 mass를 형성하였다. 초산균이 pellicle의 형태로 셀룰로오스를 형성하는 원인으로 산소가 공급되는 기체-액체 경계면으로 이동하기 위한 수단, 자외선, 건조 및 포식자로부터의 보호 등이 알려져 있다[9,20]. 일반적으로 교반배양에서 형성되는 셀룰로오스는 ball의 형태인 것으로 알려져 있는데[4], 본 균주는 다소 상이한 형태변화를 나타내었다. 또한 정지배양이 교반배양보다 셀룰로오스 생산량이 훨씬 적은 것[19]으로 알려져 있으나 본 공시균주의 경우 생산된 셀룰로오스의 건조중량이 정지배양(0.86 g/50ml) 및 진탕배양(0.73 g/50 ml)에서 비슷하였으므로 Cel의 출현빈도가 낮을 것으로 추정되었다. 현재 본 실험실에서는 아직까지 셀룰로오스 합성배지가 복합배지만이 보고되고 있는데 착안하여 defined medium 개발을 위한 연구를 수행중에 있다.

요 약

자연계에 다양하게 존재하는 세균중 셀룰로오스 생산성이 우수한 균주를 분리 및 동정함으로써 새로운 생물자원을 확보하고자 하였다. 사과, 포도, 식초 등의 시료로부터 총 57주의 셀룰로오스 생산균주를 분리하였다. 그중 사과에서 분리된 A9 균주를 공시균으로 선정하여 형태학적, 배양적 및 생리생화학적 특성을 검토한 결과 *Acetobacter* 속으로 동정되어 편의상 *Acetobacter* sp. A9로 명명하였다. 본 균주는 ethanol을 acetic acid로 산화시킨 후, 다시 CO₂와 H₂O로 재산화시키는 특성을 가지고 있었다. 또한 glycerol로부터 dihydroxyacetone을 생성할 수 있었으나 glucose 및 fructose로부터 γ -pyrone은 생성할 수 없었다. 본 균주를 HS 액체배지에서 정치배양했을 때 두꺼운 셀룰로오스 pellicle을 합성하였으며, 교반배양에서 mass 형태의 셀룰로오스를 합성할 수 있었다.

감사의 말

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원(KRF-99-003-G00027)되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer. 1992. *The Prokaryotes* Vol. 3. Springer-Verlag, U.S.A.
- Borzani, W. and S. J. de Souza. 1995. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1271-1272.
- Brown, A. J. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. *J. Chem. Soc.* **49**: 432-439.
- Byrom, D. 1989. Process for the production of microbial cellulose. *European Patent* EP 323717.
- De Ley, J. and J. Frateur. 1970. The status of the generic name *Gluconobacter*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **20**: 83-95.
- Delmer, D. P. and Y. Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 987-1000.
- Dudman, W. F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. *J. Gen. Microbiol.* **21**: 312-326.
- Embuscado, M. E., J. N. BeMiller, and J. S. Marks. 1996. Isolation and partial characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocol.* **10**: 75-82.
- Fornig, E. R., S. M. Anderson, and R. E. Cannon. 1989. Synthetic medium for *Acetobacter xylinum* that can be used for isolation of auxotrophic mutants and study of cellulose biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1317-1319.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 71-126. 9th ed. The Williams and Wilkins Co. U.S.A.
- Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1. pp. 267-277. The William and Wilkins Co. U.S.A.
- Macfaddin, J. F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. The Williams and Wilkins Co. U.S.A.
- Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 35-58.
- Schramm, M. and S. Hestrin. 1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* **11**: 123-129.
- Siwden, L. C. and J. R. Colvin. 1978. Morphology, microstructure and development of colonies of *Acetobacter xylinum*. *Can. J. Microbiol.* **24**: 772-779.
- Skinner, F. A. and D. W. Lovelock. 1979. *Identification methods for microbiologists*. Academic Press. U.S.A.
- Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH* **16**: 41-46.
- Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, T. Tsuchida, and F. Yoshinaga. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Biosci Biotech. Biochem.* **59**: 1498-1502.
- Valla, S. and J. Kjosbakken. 1982. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1401-1408.
- Williams, W. S. and R. E. Cannon. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2448-2452.

(Received April 27, 2000)