

Cellulose를 생산하는 *Acetobacter xylinum* GS11의 분리 · 동정

고정연* · 신공식¹ · 윤병대² · 최우영³

한국과학기술원 생물과학과, ¹충북대학교 첨단원예기술개발연구센터,
²생명공학 연구소 환경미생물RU, ³충남대학교 농화학과

Isolation and Identification of *Acetobacter xylinum* GS11 Producing Cellulose. Ko, Jung-Youn*, Kong-Sik Shin¹, Byung-Dae Yoon², and Woo-Young Choi³. *Departure of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon, 305-701, Korea, ¹Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea, ²Environmental Microbiology R.U., Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-763, Korea, ³Department of Agricultural Chemistry, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea - To produce and utilize microbial cellulose being industrially useful, bacterium possessing a high ability to produce cellulose and the uniform structure of cellulose pellicle was isolated from the traditionally fermented vinegar in Korea. The isolated strain, GS11 was gram-negative, rod ($0.6 \times 2.2 \sim 3.3 \mu\text{m}$) and motile. It also had 58.4% of DNA base composition, possessed straight-chain C_{18:1}, C_{16:0} and C_{14:0} fatty acid, and contained ubiquinone Q₁₀. According to its morphological, physiological and biochemical properties, the isolated strain was identified as *Acetobacter xylinum*. *A. xylinum* GS11 was cultured for the study of cellulose productivity during the static culture. 12 days at 30°C. As this result, the amount of glucose was quickly decreased, and then used as substrate for cellulose production. In this culture, the maximal production of cellulose peaked with 2.8 g/l after 8 days.

Key words: microbial cellulose, cellulose pellicle, *Acetobacter xylinum*, static culture

셀룰로오스는 고분자 다당류로서 고등식물의 주요 구성 성분이며 광합성에 의하여 지속적으로 재생산 되는 biomass로서 목재, 펄프 및 섬유자원 등으로 널리 이용되어 왔다. 셀룰로오스의 생산은 육상식물 뿐만 아니라 이의 선조인 녹조 및 남조 등에서도 셀룰로오스를 만들기도 하며, 1886년 Brown[1]에 의하여 초산균이 셀룰로오스를 생산한다고 밝힌 이후 하등생물인 미생물도 이른바 microbial cellulose를 생산하는 것으로 알려지게 되었다[6,8,18].

이들 셀룰로오스를 생산하는 미생물에는 초산균에 속하는 *Acetobacter*속의 균주, 세포외 짧은 fibril을 내는 *Agrobacterium*속, *Pseudomonas*속, *Rhizobium*속 및 *Achromobacter*속 균주, 무정형의 셀룰로오스를 만드는 Gram양성 비호기성균인 *Sarcina*속 균주 등이 보고 되어있다[2,11,14,15]. 그 중에서도 당으로부터 초산발효를 하여 식초를 만드는 초산균인 *Acetobacter*속이 셀룰로오스 생산능이 우수하며, 대표적인 초산균으로는 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. xylinum* 및 *A. methanolicus* 등이 있다[3,14,21]. 이들 초산균은 호기적 조건에서 정치 배양 시 배양액 표면에 얇은 피막(pellicle) 형태의 셀룰로오스를 형성하며,

지금까지 알려진 미생물 중 특히, *Acetobacter xylinum*은 셀룰로오스 생산력에서 가장 우수한 균주로 미생물 셀룰로오스의 연구 대상으로 관심이 집중되어 왔다[8,20].

일반적으로, 고등식물의 셀룰로오스는 1차 구조가 β -1,4-glucan 결합으로 hemicellulose와 lignin을 포함하는 heteropolysaccharide인 반면에 미생물 셀룰로오스는 99% 이상이 glucose의 β -1,4 결합만의 순수한 셀룰로오스로 20~50 nm의 microfibril이 수소결합에 의한 3차원적 망상구조를 이루고 있으며 결정도가 매우 높은 특징을 가지고 있다. 또한 보수성, 흡착성이 우수하고 원하는 형태로 성형이 가능하며, 특히, 고강도 고탄력의 특징을 가지고 있다[8,16,19]. 이러한 특성 때문에 산업적으로 여러 용도로 연구, 개발 및 이용되어지고 있다. 방위산업 분야로 방탄조끼의 응용 연구, 의료 분야에서는 인공피부, 창상 피복제, 인공관절 및 미세한 섬유구조를 이용한 반투막 제조, 음향산업 분야에서는 고음질의 스피커 진동판(cone paper) 제조, 제지 분야는 종이의 도공액 첨가제, 정보기록용지 및 종이의 탄성율, 인장강도 등이 향상된 고품질의 용지제조에 이용할 수 있다. 또한 셀룰로오스는 난소화성, 고점성의 특성을 가지고 있기 때문에 식품의 증량제, 선도 유지제 및 조직감 향상에 이용할 수 있어, 식이 섬유의 식품소재로 개발되고 있다[13,14,15].

본 연구는 미생물 유래 셀룰로오스의 생산 수율을 높이

*Corresponding author
Tel. 042-869-2662, Fax. 042-869-2610
E-mail: 9460114ko@hanmail.net

고, 산업적으로 이용가능한 생산체계의 검토 및 유전자 조작에 의한 셀룰로오스 고 생산 균주의 개발을 위하여 전국 각지에서 전통적인 방법으로 발효시켜 제조한 양조식초로부터 셀룰로오스 생합성능이 우수한 균주, GS11을 선발하고, 동정하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주의 분리원 및 사용배지

전국 각지에서 채취한 자가 양조 식초의 덧 표면에 형성된 균체층을 균원 시료로 하였다. 이때 균주의 분리 및 보존을 위한 배지로는 Hestrin & Schramm(HS)[5]배지(glucose 20 g, yeast extract 5 g, peptone 5 g, Na₂HPO₄ 2.7 g, citric acid 1.15 g, DW 1L, pH 5.0)를 기본배지로 사용하였으며, 필요에 따라 acetic acid를 첨가하여 initial pH를 조정하였다. 또한 고형배지는 agar의 농도를 16 g/l로 하여 사용하였다.

균주의 분리 및 선발

250 mL 삼각 플라스크에 배지 50 mL를 넣고 살균한 다음 균원 시료 0.5 g을 접종하여 30°C에서 7일간 정치 배양하고 pellicle을 형성하는 플라스크로부터 동일 조성의 한천 평판 배지 상에 도말 이식하여 자라는 콜로니를 분리하였다. 이 콜로니를 2, 3차 계대하여 순수 분리한 후, 다시 순수 분리된 균주를 같은 조건으로 플라스크에서 정치 배양하면서 형성된 pellicle의 무게와 조질의 균일성을 비교하여 우수 균주를 선발하였다. 분리 균주는 한천 사면배지에 접종한 후 30°C에서 5일간 배양하여 균체의 증식정도를 확인하고 4°C에서 보관하면서 1개월마다 계대 배양하여 사용하였다. 또한 장기보존을 위하여 균체를 25% glycerol을 함유한 배지에 현탁하고 snap freezing 하여 -20°C에서 보관하였다.

선발 균주의 동정

최종 분리된 균주는 형태적, 생리 및 생화학적 특성을 조사한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [7], Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 12th edition[9] 및 Manual for the Identification of Medical Bacteria[4]에 준하여 동정하였다.

형태학적 특성. 분리 균주의 크기와 Gram염색 및 고체 배지에서 배양한 콜로니의 크기, 모양, 색깔 등은 관찰하였고 운동성을 조사하였다. 전자현미경 관찰은 HS agar 배지에서 48시간 배양한 균체를 탄소를 입힌 gride에 고정하여 2% uranylacetate로 negative staining한 다음 투과형 전자현미경(TEM, Hitachi model H-600)으로 검정하였다. 또한 정밀한 외형의 관찰을 위해 균체를 2.5% glutaraldehyde로 고정하고, 다시 1% osmium tetroxide로 후기 고정하였으며 alcohol로 순차적으로 탈수하여 n-amylacetate로 20분간

2회 처리하고 진공 건조한 다음 gold coating 하여 주사현미경(SEM, Hitachi-S2300)으로 관찰하였다.

생리학적 특성. 균주의 생리적 특성을 위하여 API 20 NE kit (Bio-Merieux, France)를 사용하였으며, glycerol로부터 ketogenesis가 일어나 dihydroxyacetone으로 전환되는지의 확인하였고, colony의 수용성 brown pigment의 생성 실험은 3%의 CaCO₃가 함유된 GYC배지(glucose 50 g, yeast extract 10 g, CaCO₃ 30 g, agar 15 g)에서 수행하였으며, γ -pyrone의 생성은 glucose 또는 fructose을 함유한 YPC배지(yeast extract 5 g, bacto-peptone 5 g, CaCO₃ 5 g)에서 각각 조사하였다. 기타 gelatin 액화력, Indole 생성능, H₂S 생산력, Voges-Proskauer시험, catalase의 생성여부를 관찰하였다.

생화학적 특성. 생화학적 특성으로 DNA염기조성(G+C mol%), quinone type, cellular fatty acid profile 등을 조사하였다. 먼저 DNA의 염기조성은 Tamaoka의 방법[17]으로 정량하였다. 즉, 100°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 DNA용액(1 mg/ml) 10 μ l를 nuclease P1 (0.1 mg/ml of 40 mM sodium acetate + 2 mM ZnSO₄) 10 μ l와 혼합하여 50°C에서 1시간 반응시켰다. 다음 calf intestinal alkaline phosphatase(2.4 units/ml of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.1) 10 μ l를 추가하여 37°C에서 1시간 동안 가수분해시켰고 분해물로서 얻은 nucleoside 혼액 5 μ l를 Nova-Pack C₁₈ column (3.9 \times 300 mm, WATO11695, Waters Co.)이 장착된 HPLC (Waters 600S controller, Waters 626 pump, waters Co., USA)로 분석하였다. 이때 용출 용매는 0.6 M NH₄H₂PO₄(pH 4.0)과 acetonitrile의 20:1(v/v)혼합액을 1 ml/min의 유속으로 용출시켰으며 UV detector(Waters 486)로 270 nm에서 함량을 측정하였다. 세포내 지방산 분포는 Yamada 등[22]의 방법에 따라 추출한 지방산을 methyl ester화 한 후 GC로 분석하였다. 즉, 냉동 건조한 균체 20 mg을 15 ml teflon screw-cap 시험관에 5% methanolic HCl 2.5 ml와 함께 100°C 수조에서 3시간 가열한 후 실온으로 냉각하고 여기에 증류수 1 ml와 petroleum ether 3 ml를 가하여 혼합 후 5분 동안 원심분리(8000 \times g)하여 재 추출 하였으며, 상층액을 질소가스로 ether를 휘발시키고 300 μ l 정도로 농축하여 시료로 사용하였다. 분석은 SPTM-2308 fused silica capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.2 μ m film thickness, Supelco, USA)을 부착한 Gas Chromatography (HP5890, Hewlett Packard Co., USA)를 사용하여 컬럼 온도 180°C, injector 및 detector(FID)의 온도는 250°C에서 시료를 1 μ l를 주입하였으며, N₂를 운반 가스로 하여 30 ml/min의 속도로 용출시켜 검출하였다.

균주의 배양

분리 균주의 배양 특성을 조사하기 위하여 본 배양전에 사면한천배지에 보관중인 균주를 1백금이 취하여 HS 액체

배지에서 48시간동안 전배양한 후 250 ml삼각 플라스크의 50 ml HS 액체 배지에 전 배양액을 0.1%가 되도록 접종하고 30°C에서 12일간 정지 배양(static culture)시켰다.

균체량 및 셀룰로오스 생산량 측정

균의 생육도는 생산된 셀룰로오스 pellicle 안에 존재하는 균체를 분리하기 위하여 배양액과 함께 homogenizer로 잘게 마쇄하고 Whatman No. 2지로 여과하여 여액을 분광광도계 (Shimadzu UV-120-02)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

균주가 생산한 셀룰로오스 함량은 Yamanaka 등[23]의 방법을 변형하여 실시하였다. 셀룰로오스 pellicle의 표면을 증류수로 2~3차례 세척하고, 10배량의 2% NaOH를 가하여 1시간 동안 수조에서 끓인 후 증류수로 세척하였으며, 중화시키기 위해 acetic acid 용액 처리를 하고 증류수로 다시 세척하였다. 이렇게 얻어진 셀룰로오스는 105°C의 dry oven에서 완전히 건조하여 그 무게를 측정하였다.

당 및 gluconic acid 측정

배양액 중의 잔존 glucose 및 gluconic acid의 측정은 배양 상등액을 0.2 µm syringe filter(Sartorius Co., Germany)를 사용하여 여과한 후 HPLC(Waters 600S controller, Waters 626 pump, waters Co., USA)로 분석하였다. 먼저 glucose의 분석은 carbohydrate column(4.6×250 mm, WATO 44355, Waters Co.)을 사용하여 이동상은 80% acetonitrile을 1 ml/min의 유속으로 용출하였으며, 검출은 RI detector (Refractometer Differential, Waters 410)로 분석하였다. gluconic acid는 Nova-Pack C18 column (3.9×300 mm, WATO11695, Waters Co.)을 사용하였으며, 이때 0.1% H₃PO₄의 이동상을 0.5 ml/min의 유속으로 용출하고 UV detector (Waters 486)를 사용하여 210 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

셀룰로오스의 생산 균주의 분리 및 동정

전국 각지에서 채취한 균원 시료를 셀룰로오스 생산 균주의 분리용 액체배지에 0.5 g을 접종하여 30°C에서 7일간 정지 배양하여 pellicle을 형성하는 플라스크로부터 균주를 분리하고, 이들 균주를 2, 3차 계대하여, 강원도 원주 및 평창의 시료 14주(WP1~14), 충청남도 논산·양춘의 시료 6주(NY1~6), 경상남도 진양 및 산청의 시료 11주(GS1~11) 및 전라남도 장흥 및 보성의 시료 8주(JB1~8) 등으로부터 모두 39주의 균주를 순수 분리하였다. 이들 균체들 중 생산된 셀룰로오스 pellicle의 무게와 조직을 비교하였으며, 그중 셀룰로오스의 생성량이 비교적 많고 균일한 조직성을 나타내는 18 균주를 선별하여 Table 1에 나타내었다. 균일한 조직의 pellicle을 형성하는 분리 균주의 셀룰로오스 생산성을 비교한 결과, 생성량이 높은 것은 배양액의 최종

pH가 3.2~3.4로 비교적 낮게 나타났으며, 이는 당으로부터 산화된 gluconic acid 및 초산발효에 의해 생성된 초산에 의한 것으로 알려져 있다[10]. 셀룰로오스 pellicle의 생산량을 비교하여 보았을 때 낮은 생산량은 19.4~21.8 g/l의 수준이었으며 높은 경우는 30 g/l이상의 셀룰로오스를 생산하는 우수한 균주를 얻을 수 있었다. 그 중에서 NY5 및 GS11이 이들 중 특히 셀룰로오스 생산능력이 우수한 균주로 나타났으나 pellicle의 조직의 균일성 및 강도에 있어서 GS11이 NY5보다 더욱 우수하여 셀룰로오스 생산 능력이 우수한 균주를 최종 선별하였다.

균주의 동정

형태학적 및 배양적 특징 선별 균주 GS11의 형태학적 특징을 관찰하여 그 결과를 Table 2와 Fig. 1에 나타내었다. 분리 균주는 gram 음성이고, 간균(0.6×2.2~3.3 µm)의 형태를 하고 있으며, 편모는 peritrichous 형을 하고있어 운동성을 나타내었다. 또한 colony의 형태는 round form이었으며, 색깔은 우유빛의 흰색을 띄고, 불투명하였다.

생리·생화학적 특성 균주 GS11의 생리·생화학적 특성은 Table 3과 Fig. 2와 같다. 본 균주는 D-glucose로부터 γ-pyrone과 glycerol로부터 dihydroxyacetone의 생성 및 catalase의 양성반응을 보였으며, cytochrome oxidase, urease, β-

Table 1. Comparison of the isolates for the productivity of cellulose pellicle

| Isolates | Wet weight* of pellicles (g/L) | Final pH of the culture | Source of isolation |
|----------|--------------------------------|-------------------------|---------------------|
| WP2 | 22.8 | 4.3 | Kangwon province |
| 3 | 30.5 | 3.2 | Wonju, Pyungchang |
| 5 | 26.5 | 3.5 | " |
| 9 | 29.1 | 3.6 | " |
| 10 | 27.6 | 3.6 | " |
| 13 | 27.4 | 3.7 | " |
| NY4 | 27.0 | 4.1 | Chungnam province |
| 5 | 35.8 | 3.4 | Nonsan, Yangchon |
| 6 | 23.3 | 4.5 | " |
| GS3 | 19.4 | 4.3 | Kyungnam province |
| 6 | 22.9 | 4.4 | Jinyang, Sanchung |
| 7 | 28.7 | 3.8 | " |
| 9 | 28.2 | 3.7 | " |
| 11 | 33.2 | 3.3 | " |
| JB1 | 27.1 | 3.7 | Chynnam province |
| 2 | 21.8 | 4.5 | Jangheung, |
| 4 | 29.3 | 3.5 | Bosung(Wonbong) |
| 7 | 27.6 | 3.9 | " |

The cultures were statically grown for 7 days at 30°C in 250 mL conical flasks containing 50 mL Hestrin's broth (initial pH 5.0), after inoculation of 1 loopful cell mass from agar plate. Then the pellicles were washed, set on filter papers for 1hr and weighed. The wet weights* were presented per litre of the culture broth.

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the strain GS11

| Characteristics | Strain GS11 |
|---|---------------------------------------|
| Gram reaction | - |
| Cell shape | rod |
| Motility | - |
| Flagella | peritrichous |
| Colony | round form |
| Size | $0.6 \times 2.2 \sim 3.2 \mu\text{m}$ |
| Color | milky white |
| Opacity | opaque |
| Chromogenesis* | - |
| Growth on carbon sources: | |
| Ethanol | - |
| Dulcitol | - |
| Sodium acetate | +/- |
| Methanol | - |
| Growth in the presence of 10% ethanol | - |
| Growth in the presence of 30% D-glucose | - |

The colonies were on Hestrin's agar except for the chromogenesis* experiments which tested on GYC plate(5% D-glucose, 1% yeast extract, 3% CaCO₃, 1.6% agar). +: positive, -: negative.

A

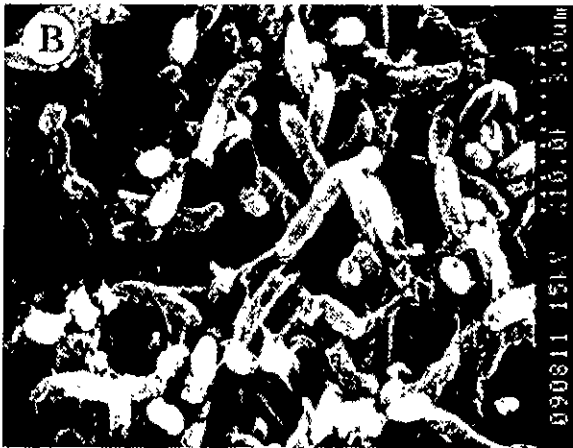


Fig. 1. Electron micrograph($\times 27,000$, A) and scanning electron micrograph(SEM, $\times 10,000$, B) of the isolated strain GS11.

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of the strain GS11

| Characteristics | Strain GS11 |
|---|---|
| Growth in anaerobic condition (at 25, pH 7) | - |
| Formation of: | |
| Water-soluble brown pigments on GYC | - |
| Gamma-pyrone from D-glycerol | + |
| Gamma-pyrone from D-fructose | - |
| Ketogenesis from glycerol | + |
| Cytochrome oxidase | - |
| Nitrate to nitrite | - |
| Acetyl methyl carbonol production | +(trace) |
| Indole pyruvic acid production | - |
| ONPG (β -galactosidase) | - |
| Methyl red test | - |
| G+C mol% | 58.4% |
| Cellular fatty acid | C _{18:1} , C _{16:0} , C _{14:0} |
| Ubiquinone | Q ₁₀ |
| VP test | - |
| Gelatin liquefaction | - |
| Catalase | + |
| Arginine dehydrolase | - |
| Lysine decarboxylase | - |
| Tryptophane deaminase | - |
| Sodium citrate utilization | - |
| H ₂ S production | - |
| Indole production | - |
| Urease | - |
| Acid produced from: | |
| glucose | + |
| mannose | + |
| inositol | - |
| sorbitol | - |
| rhamnose | - |
| saccharose | - |
| melibiose | - |
| arabinose | + |
| xylose | + |

+: positive, -: negative.

galactosidase(ONPG) 및 indole 생성은 음성을 나타냈다. 그리고 nitrate의 환원성, H₂S의 생성, citrate의 이용성 및 gelatine의 액화력은 음성을 보였으며, 당의 발효성 시험에서 glucose, mannose, arabinose 및 xylose 등으로부터 산을 생성하였다. 또한 생화학적 특성으로 DNA 염기조성 함량은 58.4%이었으며, 이는 Park 등[12]이 전통발효 식초에서 분리한 *Acetobacter* sp. KN과 BPV의 각각 53.8 mol%, 56.6 mol%의 함량과 유사하여 *Acetobacter*의 일반적인 특징으로 생각된다. ubiquinone type은 Q₁₀ system을 가지고 있었다. Q₉ system을 갖는 종은 *A. aceti*와 *A. pasteurianus*이고, Q₁₀ system은 *A. xylinum*, *A. methanolicus*, *A. diazotrophicus* 등의 종들이 가지고 있는 것으로 알려져

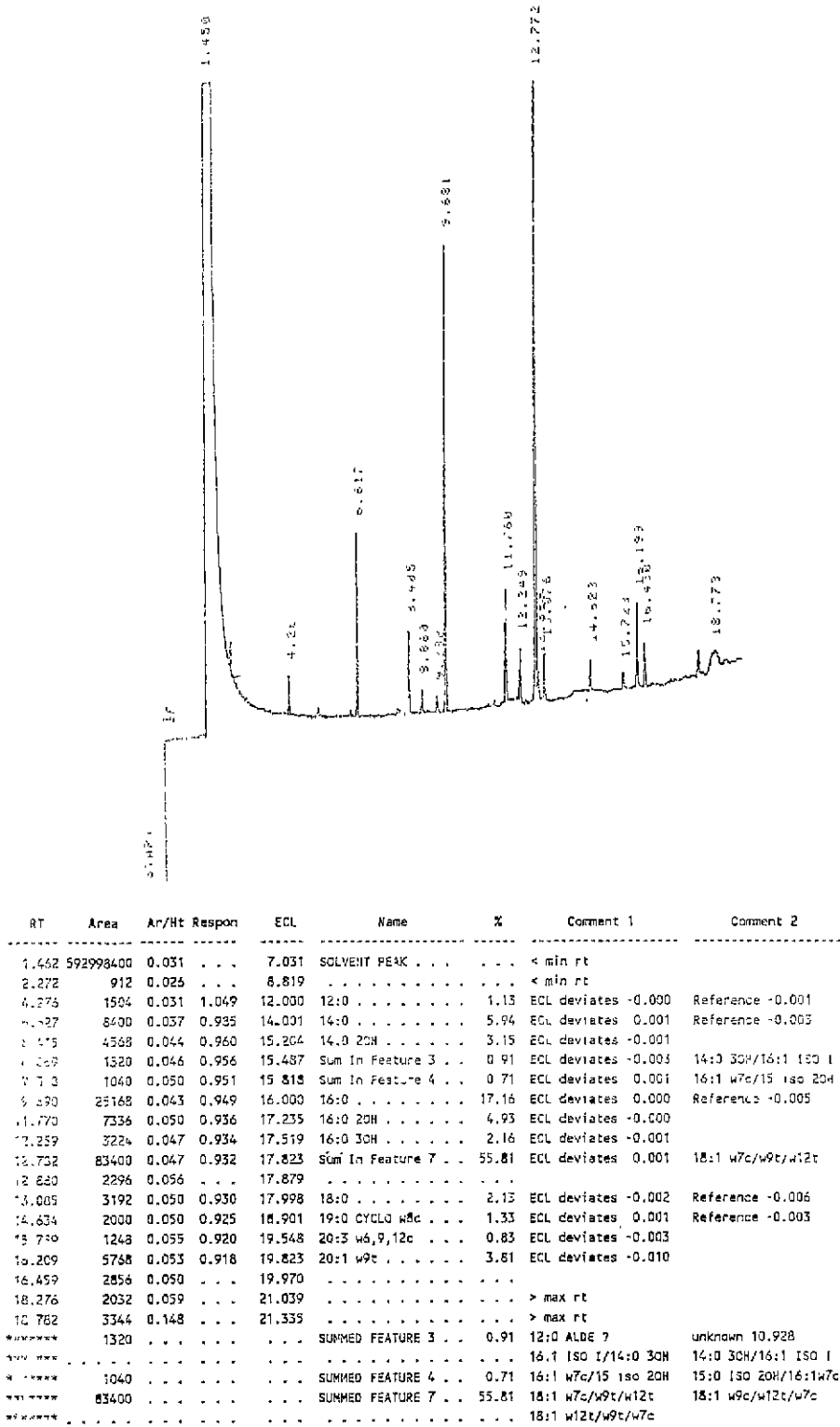


Fig. 2. Gas chromatogram and profile of cellular fatty acid from the isolated strain GS11.

있다.[3] 세포내 구성 지방산 함량은 C_{18:1} straight-chain monounsaturated fatty acid가 55.81%, C_{16:0} straight-chain saturated fatty acid는 17.16%로 전 지방산의 대부분이었으

며, *Acetobacter*의 특이적 지방산인 C_{14:0} straight-chain saturated fatty acid는 5.94%를 차지하였다.

이상과 같이 형태학적, 생리 및 생화학적 특성을 검토하

여 본 결과, 높은 셀룰로오스 생산성을 갖는 GS11 균주는 *Acetobacter xylinum*의 유연균으로 분류되었으며, 최종 *Acetobacter xylinum* GS11으로 동정하였다. *Acetobacter xylinum*은 Glycerol로부터 dihydroxyacetone를 생산함으로써 *A. pasteurianus*와는 생리학적 성질에서 구별되는 점이 있으나 ethanol에서 생육하는 점은 *A. aceti*와 혼동되는 성질을 갖고 있다.

초기 pH 및 배양 온도의 영향

pH의 영향에 대한 검토는 배지를 pH 2에서 pH 10까지 각각 조절한 후 균주를 접종하고 30°C에서 9일간 배양하였으며, 배양 온도의 영향은 10°C에서 40°C까지 각각의 온도에서 9일간 정치배양한 후 셀룰로오스의 생성량을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 먼저 초기 pH의 영향으로 배지의 pH가 9.0 이상과 pH 3.0 이하에서는 단지 리터당 1g 미만의 적은 양의 셀룰로오스가 생성되었을 뿐이었으며, 셀룰로오스 생산을 위한 초기 pH로 5.0으로 하였을 때 가장 높은 생산성을 나타냈다. pH 6.0~8.0 사이에서도 리터당 1.5 g 정도의 비교적 높은 셀룰로오스 생산량을 얻을 수 있

었는데, Masaoka 등[9]은 초기 pH 3.5~7.0 사이에서 셀룰로오스 생산량이 높았으며 pH 5.0에서 가장 좋은 생산성을 나타냈다고 하였다. 그러나 Robert[15]는 *A. xylinum*의 최적 pH를 6.0이라 하였다.

배양온도에 따른 셀룰로오스의 생산은 25°C보다 30°C에서 셀룰로오스 생산성이 더욱 좋았으며, Park 등[13]도 이와 같이 30°C에서 생산성이 높게 나타났으며, 대부분의 *Acetobacter*속 균주는 25~30°C에서 가장 세포의 생육이 좋으며, 최적 온도는 30°C라고 보고되고 있다[15]. 한편 15°C의 낮은 온도에서도 균체가 성장하여 극히 적은 양이나 셀룰로오스를 생산할 수 있었으며 40°C이상과 10°C이하에서는 균체가 생육할 수 없었다.

균주의 생육과 셀룰로오스의 생산

일반적인 배양방법으로 *Acetobacter*속 균주들은 진탕 배양에서 전단력에 의하여 셀룰로오스의 생산성이 정지 배양시 보다 낮게 나타나기 때문에 본 배양 실험은 삼각 flask에서 12일 동안 정지 배양(static culture)하면서 배양시간에 따른 셀룰로오스의 생산과 pH의 변화, 균체의 생육, 셀룰로오스 생산을 위한 탄소원으로 glucose의 변화 및 glucose로부터 전환된 gluconic acid의 변화 등을 조사하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 균주는 48시간까지 glucose의 농도를 급격히 감소시켰으며, 이후 완만하였고, 균체의 성장은 점차 증가하여 7일~8일에 세포는 정지기에 도달하였다. 셀룰로오스의 생산량도 또한 이와 같은 경향으로 증가하여 8~9일 경과했을 때 2.7~2.8 g/토 배양 기간 중 최대 셀룰로오스 생산량을 나타냈다. Toda[18]는 정지배양 초기에 셀룰로오스의 생산량이 낮게 나타나는 것은 glucose가 gluconic acid로 산화하기 때문이라 하였고, 이때 셀룰로오스의 생산량은 10일 경과했을 때 glucose g당

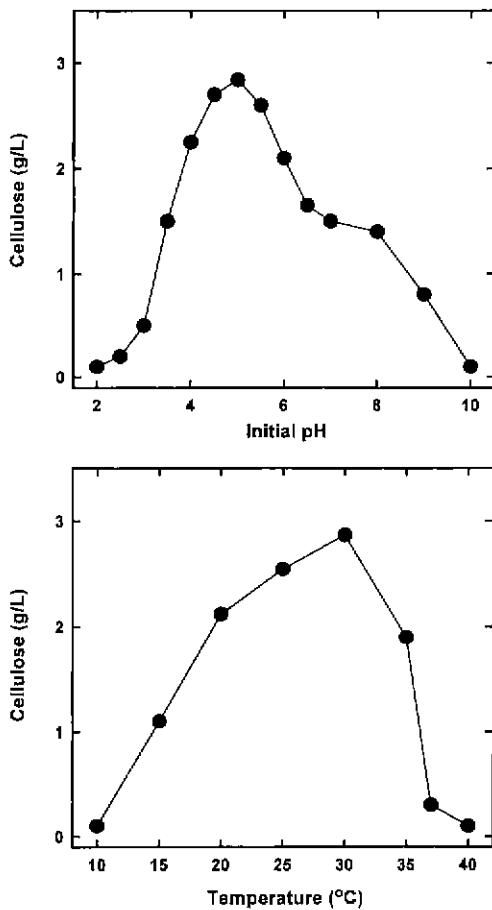


Fig. 3. Effect of initial pH and temperature on the production of cellulose by *Acetobacter xylinum* GS11.

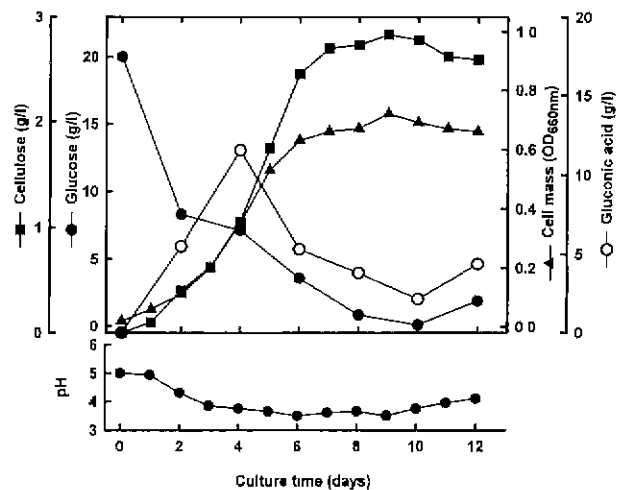


Fig. 4. Time courses of cell growth, pH, glucose, gluconic acid and cellulose production by *Acetobacter xylinum* GS11. Cultivation was carried out at 30°C and pH 5.0 on a static condition.

0.15 g의 셀룰로오스를 생산했는데 이의 양은 본 균주와 같은 생산량이었다. 그러나 Masaoka[10]는 배지 120 mL 용량에서 glucose 농도를 각각 달리했을 때 glucose 1.2 g/flask의 경우 8일 경에 셀룰로오스 생산이 정점에 도달하여 10일 배양 시 flask 당 약 1.6 g으로 최대량을 보였다. 이의 셀룰로오스 생산 경향은 본 실험과 같았으나 셀룰로오스 생산량에 있어 다소 높은 수치였다. 이들 생산량의 차이는 배양용량 및 배양 방법, 그리고 탄소원의 농도 등의 조건에서 차이가 있기 때문으로 생각된다. 배지의 pH는 배양 1일 이후 3일까지 가장 변화가 컸으며, 특히 균체의 유도기 및 셀룰로오스 생산량이 증가되는 시기에 pH가 비교적 빠르게 내려갔으며, 이후 pH 3.3~3.5의 범위를 계속 유지하다 10일 경과 후 다소 상승하는 경향을 나타냈다. 이와 같은 경향으로 Toda 등[14]의 정치배양에서도 셀룰로오스의 생산과 더불어 pH가 3.2~3.5 사이를 유지하다 배양 7일에서 10일 사이에 상승하였다. 또한 셀룰로오스의 생산성이 높을수록 pH가 낮아진다고 하였다[10]. 이는 glucose의 산화에 의해 생성된 gluconic acid와 초산발효에 의한 acetic acid의 생성에 의한 것이다[8,12]. 배지의 Gluconic acid의 생성량은 접종 후 4일까지 glucose의 소비와 비례적으로 계속 증가하다가 4일을 정점으로 하여 그 이후는 다시 감소되었으며, 10일 이후 glucose의 방출과 함께 다소 상승하였다. 한편 Park 등[13]은 발효조를 이용하여 glucose를 기질로 발효 양상을 조사한 결과 *Acetobacter*속 균주가 배양초기와 증식기에 glucose를 gluconic acid로 전환시켜 glucose가 거의 감소된 시점부터는 전환된 gluconic acid를 소비하면서 셀룰로오스를 생산한다고 보고한 바 있다. 이와 같은 보고는 본 실험에서 나타난 결과와 같은 경향이며, glucose를 산화시켜 gluconic acid로 전환하여 이용하는 것은 *Acetobacter*속 균주의 일반적인 성향이다[18]. 또한 배양말기에 glucose와 gluconic acid의 배지내 함량이 상승하고 셀룰로오스의 감소가 일어나는 현상은 배양말기 탄소영양원인 glucose의 고갈로 인하여 균주의 생육이 억제되어 탄소원을 얻기 위하여 생성된 셀룰로오스를 분해 시키면서 일어나는 현상이라 생각된다.

이와 같이 본 균주는 기본적인 정치배양으로 2.8 g/l으로 높은 셀룰로오스 생산성을 보였다. 그러므로 본 균주를 이용하여 셀룰로오스 생산성을 높이기 위해 배양조건 및 방법을 검토하고, 발효조를 이용한 대량배양 system의 생산체계의 구축 및 recombinant DNA techniques의 방법으로 셀룰로오스 고생산 균주를 개발한다면 산업적 측면에서 효과적인 생산성을 얻을 것으로 사료된다.

요 약

산업적으로 유용한 미생물 유래 셀룰로오스를 생산, 이용하기 위해 전국 각지 양조식초의 덩이로부터 셀룰로오스의

생산성이 높고, 조질의 균일성을 나타내는 균주를 분리하였다. 분리균 GS11은 gram 음성이고, 간균(0.6×2.2~3.2 μm)의 형태를 하고 있으며, 편모를 가지고 있어 운동성을 보였다. 또한 세포내 지방산 조성은 다량의 불포화 지방산 C_{18:1}과 포화지방산 C_{16:0}, C_{14:0}이 대부분을 차지하였고, DNA 염기조성(G+C) 함량은 58.4% 이었으며, ubiquinone은 Q₁₀을 갖는 것으로 나타났다. 이러한 형태학적, 생리·생화학적 특성의 결과에 따라 본 균주는 *Acetobacter xylinum* GS11으로 동정되었다. *A. xylinum* GS11의 배양기간 동안 셀룰로오스 생산성을 검토하고자 250 mL 삼각플라스크에 균주를 접종하여 30°C에서 12일간 정지 배양하였다. 그 결과 기질인 glucose의 소비는 접종 후 급속하게 감소하여 셀룰로오스 생산에 이용되었으며, 셀룰로오스의 생산은 배양 9일 경에 2.8 g/l로 최대의 생산량을 나타냈다.

REFERENCES

- Brown, A. J. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. *J. Chem. Soc.* **49**: 432-439.
- Canale-Parola, E., and R. S. Wolfe, 1964. Synthesis of cellulose by *sarcina ventriculi*. *Biochem. Biophys. Acta.* **82**: 403.
- Cha, Y. J., K. J. Park, D. K. Kim, H. S. Chun, B. K. Lee, K. H. Kim, S. Y. Lee, and S. J. Kim, 1994. Isolation and characterization of cellulose producing *Acetobacter xylinum* KI strain. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 571-576.
- Cowan and Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacteria, 2nd Ed., Cambridge University Press, UK.
- Hestrin, S. and M. Schramm. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: 1. Micromethod for the determination of cellulose. *Biochem. J.* **56**: 163-166.
- Hwang, J. W., C. S. Lee, S. h. Park, and Y. R. Pyun. 1999. Production of high concentration cellulose by *Acetobacter xylinum* BRC5 in fed-batch culture. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 284-290.
- Krieg, N. R., and J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The William & Willkins Co., Baltimore.
- Kugá, S. 1992. Bacterial cellulose. -The possibility of raw material for paper making fiber-. *Mokchae Konghak.* **20**: 3-8.
- Mac Faddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed. The williams & Willkins Co., Baltimore.
- Masaoka, S., R. Ohe, and N. Sakota. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioengin.* **75**: 18-22.
- Matthysse, A. G. 1983. Role of cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.* **154**: 906.
- 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. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **8**: 397-404.

13. Park, S. H., Y. K. Yang, J. W. Hwang, C. S. Lee, and R. Pyun. 1997. Microbial cellulose fermentation by *Acetobacter xylinum* BRC5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 598–605.
14. Premjet, S., Y. Ohtani, and K. Sameshima. 1993. High bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 in a new culture medium with a sulfite pulping waste fraction. *Transaction.* **50**: 124–128.
15. Robert, E. C., and M. A. Steven. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. *Microbiol.* **17**: 435–447.
16. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Reviews.* pp. 35–58.
17. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 125–128.
18. Toda, K. T. Asakura, M. Fukaya, E. Entani, and Y. Kawamura. 1997. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 228–231.
19. Tonouchi, N., N. Tahara, T. Tsuchida, F. Yoshinaga, T. Beppu, and S. Horinouchi. Addition of a small amount of an endoglucanase enhances cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 805–808.
20. 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.
21. Uhlig, H., K. Karbaum, and A. Steudel. 1986. *Acetobacter methanolicus* sp. Nov., and acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 317–322.
22. 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.
23. Yamanaka, S., K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsuhashi, Y. Nishi, and M. Uryu. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J. Mat. Sci.* **24**: 3141–3145.

(Received May 17, 2000)