

특집 : 미생물 자원을 이용한 신소재 개발 및 응용

Bacterial Cellulose의 생합성과 산업적 응용

이오석 · 정용진[†]

계명대학교 식품가공학과

Industrial Application and Biosynthesis of Bacterial Cellulose

Oh-Seuk Lee and Yong-Jin Jeong[†]

Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

서 론

Cellulose는 자연계에서 가장 풍부한 biomass로 glucose가 β -1,4 결합에 의해 이뤄진 고분자 물질이며, 식물체뿐만 아니라 *Acetobacter*, *Rhizobium* 과 *Sarcina* 등의 세균에 의해서 생산되는 것으로 알려져 있다(1). 미생물이 생산하는 cellulose를 특히 bacterial cellulose라고 하며, 식물성 cellulose가 결정질과 비결정질 두 가지 상태로 존재하면서 hemicellulose나 lignin 등을 함유하는 heteropolysaccharide인 반면에 bacterial cellulose는 순수한 상태로 존재하는 homopolysaccharide이다.

Cellulose를 생산하는 세균은 양조과정이나 식초발효과정에서 오염균으로 발효액의 표면에 피막을 형성하거나 불쾌한 냄새를 발생시키는 균으로 인식되어 왔으나, 1886년 Brown이 피막의 성분이 cellulose임을 규명한 이래 그 생합성 과정 및 특성에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다. Bacterial cellulose를 생합성할 수 있는 미생물 중에서 *Acetobacter xylium*은 특이하게 cellulose를 합성하여 분비하는 세균으로 잘 알려져 있다. 최근에는 *A. xylium*에서 처음으로 cellulose 합성에 관여하는 유전자가 동정된 후 cellulose 생합성 메카니즘을 연구하는 모델시스템으로 많이 사용되고 있다. 또한 생산된 bacterial cellulose는 고강도, 보수성, 유화 현탁 안정성 그리고 결합성 등이 뛰어나 21세기 첨단 소재로서 이용될 전망이 큰 것으로 알려져 있다(2). 따라서 현재까지 보고되어 있는 연구결과를 중심으로 bacterial cellulose 생합성 경로와 산업적인 응용 가능성을 살펴보고자 한다.

이 산화되는 오탄당 인산화로(pentose phosphate pathway)와 유기산 및 그 유도체의 산화가 일어나는 Krebs cycle을 이용하여 탄수화물을 이용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 해당과정의 key enzyme인 phosphofructokinase는 없거나 매우 미약하게 존재하여 해당과정이 없거나 미약하게 일어남으로써 glucose의 혐기적인 대사는 거의 일어나지 않는 것으로 알려져 있다(3). Tonouchi 등(4)은 agitated culture에 적합한 균주를 screening하여 선발한 균주인 *A. xylium* subsp. *sucrofermentans* BPR2001의 연구에서 phosphofructokinase 활성을 측정된 결과를 보고한 바 있다. *A. xylium*의 carbon metabolism과 관련된 대사는 그림 1과 같이 요약할 수 있다(5).

*A. xylium*의 cellulose 생합성 경로

Bacterial cellulose 생합성에 관한 효소학적 경로에 대해서는 *A. xylium*에 대해서 비교적 광범위하게 연구되었

Bacterial Cellulose의 생합성

*A. xylium*의 carbon metabolism 경로

일반적으로 *A. xylium*은 두가지 주된 경로 즉 탄수화물

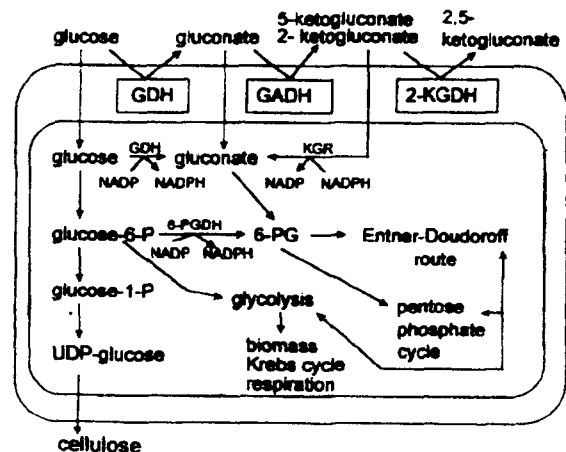


그림 1. *A. xylium*의 carbon metabolism 경로.

[†]Corresponding author. E-mail: yjjeong@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5557, Fax: 82-53-580-5164

으며, 생합성에는 4개의 필수적인 효소작용이 있는 것으로 알려졌다. 배지중의 glucose는 bacterial membrane을 통과하여 세포내로 이송된 후 glucokinase에 의해서 glucose-6-phosphate로 전환되고, 이 glucose-6-phosphate는 phosphoglucomutase에 의해서 glucose-1-phosphate로 이성화된다. Glucose-1-phosphate는 UDPG pyrophosphorylase에 의해서 uridine 5'-diphosphate glucose(UDPG)로 전환되고 cellulose synthase에 의해서 최종적으로 cellulose로 중합된다. Cellulose 생합성은 에너지를 소비하는 과정으로서 비가역 반응이다. 이 반응의 key enzyme인 cellulose synthase는 cellulose 생합성에 유일한 효소로 알려져 있다. 따라서 이 효소의 작용은 엄격히 조절되는 통제하에 있을 것으로 추정되며, 이 효소의 활성을 촉진하는 물질로는 cyclic diguanylic acid(c-di-GMP)만이 알려져 있다(6). UDPG는 UDPG pyrophosphorylase의 작용으로 glucose-1-phosphate로부터 만들어지며 β -1,4-glucan 중합 반응에 사용되는 원료물질이다. 이 효소의 활성은 *Acetobacter*의 배양에 있어서 cellulose 생산력의 차이가 100배 이상있는 cellulose 생산균과 비생산균을 비교할 때 배지중의 glucose나 fructose의 존재여부 및 양에 의해서 큰 영향을 받지 않았다(4). 생합성 과정에 있어서 cellulose 생산에 오직 c-di-GMP만이 영향을 미치는 key regulatory element로 작용하며, 막에 결합한 형태로 존재하는 cellulose synthase(UDP-glucose: 1,4- β -D-glucosyltransferase)의 allosteric activator로 작용한다. Cellulose synthase는 c-di-GMP가 존재하지 않으면 불활성화된 상태로 존재하며 catalytic site나 substrate-binding site와는 다른 regulatory site에 activator가 가역적으로 결합하면 활성화된다(6).

Cellulose 생합성의 activator인 c-di-GMP는 두 분자의 GTP가 diguanylate cyclase의 작용으로 pppGpG의 선형 모양의 중간체를 거쳐서 생성된다. c-di-GMP의 생체내의 농도는 두 효소 즉 생성에 관여하는 효소인 diguanylate cyclase의 작용과 분해에 관여하는 c-di-GMP phosphodiesterase A와 B(PDE-A와 PDE-B)의 작용으로 유지하게 된다. c-di-GMP분해에 있어서 PDE-A는 c-di-GMP를 pGpGg 형태로 분해하는데 관여하며 이때 생성된 pGpGg는 빠른 속도로 두 분자의 5'-GMP로 분해된다. Cellulose 생합성의 조절은 그림 2와 같이 Ross 등의 제안한 모델로서 잘 설명이 된다.

Cellulose synthase (bcs) operon의 구조

Cellulose 생합성에 있어서 생합성의 rate-limiting factor인 cellulose synthase에 대한 연구는 처음으로 Lin과 Brown(7,8)이 효소를 정제하였고 catalytic subunit를 동정하여

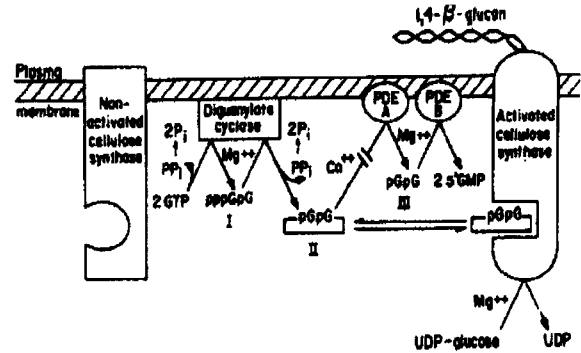


그림 2. *A. xylium*에 있어서 cellulose 생합성의 조절모델.

보고하였다. Catalytic subunit의 sequence한 결과는 Saxena 등(9)에 의해서 보고되었는데 anchored membrane protein이었다. Cellulose synthase는 cellulose synthase operon에 의해서 생성되는 최소 4개의 단백질 복합체로 구성되어 있다. Cellulose synthase의 유전자는 그림 3과 같이 *bcsA*, *bcsB*, *bcsC*와 *bcsD*로 구성되어 있으며, *bcsA*는 cellulose synthesis 활성과 관련있는 것으로 밝혀졌다. 또한 *bcsA*, *bcsB*, *bcsC*는 이 효소의 활성에 필수적인 것으로 알려졌다으며 이들 유전자중 어느 하나가 결손되어도 활성을 잃는 반면에 *bcsD*가 결손되었을 때는 단지 40%정도의 활성이 소실되었다. 한편 동일한 균주에서 이들 cellulose synthase operon과 다른 2차 *bcs* operon이 발견되어 두 개의 *bcs* operon이 존재함이 알려졌다으나 그 기능에 대해서는 아직 불분명하다(9). Cellulose synthase의 활성에는 진술한 바와 같이 c-di-GMP가 필수적인 cofactor인 것으로 작용하는 것으로 알려졌다으며, 이 물질의 세포내의 농도는 두 분자의 GTP로부터 합성을 촉매하는 diguanylate cyclase(DGC)와 분해반응을 촉매하는 phosphoesterase A 및 B의 작용에 의해서 유지된다.

Cellulose 생합성에 있어서 glycosylation reaction의 모델

Cellulose 생합성에 관련된 효소작용의 메카니즘은 그림 4와 같은 모델이 Han과 John에 의해서 제안되었다(10). 즉 cellulose 사슬의 신장은 Saxena 등에 의해서 환원성 말단부터 일어날 것으로 추정된 후, Han 등에 의해서 이루어진 *A. xylium*의 세포와 막을 사용한 cellulose 합성의 연구결과에 의하면 신장되는 cellulose 사슬의 환원성 말단에 새로운 D-glucose가 부가됨이 증명되었다. Han

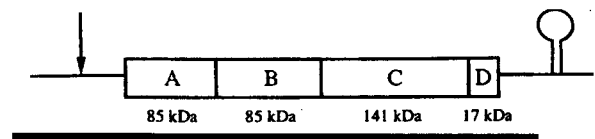


그림 3. Cellulose synthase (bcs) operon의 구조.

등은 이 결과를 토대로 cellulose합성에 관련된 효소의 작용 메카니즘을 그림 4와 같은 모델로 설명하였다.

Cellulose합성의 첫 반응은 *lipid pyrophosphate : UDP-Glc phosphotransferase(LP : UDPGlc-PT)*에 의해서 촉매된다. 그림 4의 A, B의 반응 1과 같이 막의 지질분자에 결합하고 있는 phosphate가 UDPG의 glucose와 α 결합을 하고 있는 인산기를 공격함으로써 UMP가 생성되면서 glucose분자는 지질과 결합된 형태인 lipopyrophosphoryl glucose가 된다. 두 번째 반응은 cellulose synthase(CS)가 작용하여 그림 4의 B (2)반응과 같이 하나의 lipopyrophosphoryl glucose의 4-hydroxy group이 다른 lipopyrophosphoryl glucose의 C-1을 공격함으로써 β -1,4-glycoside 결합이 생성되면서 glucose의 전이가 일어난다 (cellobiose의 형성). 세 번째 반응은 *lipid pyrophosphate phosphohydrolase(LPP)*작용으로 glucose를 전이한 지질분자에 결합하고 있던 phosphate가 해리되는 과정이다. 인산기 하나가 해리되어 생성된 *lipid pyrophosphate*는 *LP : UDPGlc-PT*의 작용으로 UDPG로부터 glucose를 전이받아 lipopyrophosphoryl glucose가 되는 첫 반응을 다시금 하게 된다(그림4B(4) 반응). 이때 생성된 lipopyrophosphoryl glucose는 4-hydroxy group이 lipid phosphate에 결합하고 있는 이당류(cellobiose)의 C-1 탄소를 공격하여 3당류(celotriose)가 된다. 이와 같은 방법으로 cellulose의 생성은 연속적으로 일어나며 환원성 말단에 새로운 glucose 분자가 중합된다.

Cellulose 생합성은 상기의 설명과 같은 효소의 작용으로 polymeration이 일어나는 것으로 생각되며 생성된 cellulose의 crystallization 및 extrusion은 세포의 어떤 조직에서 어떠한 경로를 통해서 일어나는지에 고찰할 필요

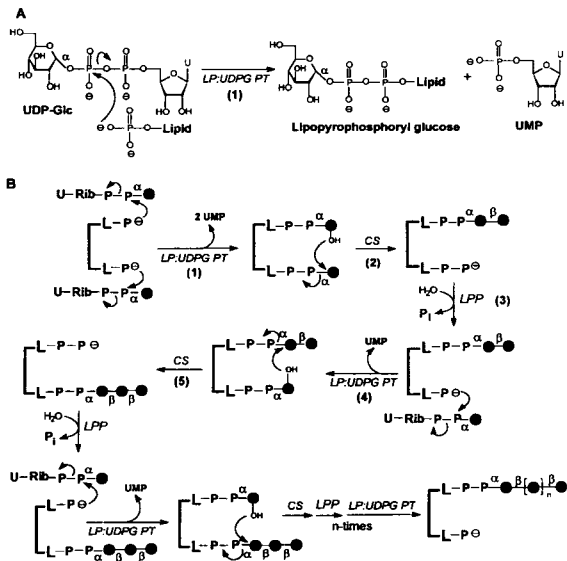


그림 4. Cellulose 생합성 효소의 작용 메카니즘.

가 있다. 여기에 대해서는 Brown과 Saxena가 제안한 모델(그림 5)이 어느 정도 타당성이 있는 것 같다(11). 그림 5의 A의 모델은 cytoplasmic site에 cellulose synthase의 catalytic subunit가 존재하여 cellulose를 합성한 후 extrusion하는 것으로 cytoplasm에 catalytic siter가 존재하고, cytoplasm에서 중합반응이 일어나는 것은 잘 설명이 되지만 고분자물질인 cellulose의 extrusion에 관여하는 단백질의 존재에 대한 보고가 아직 이뤄져 있지 않아서 부적합한 모델이다. B의 모델은 catalytic subunit가 extracellular space에 존재하는 것으로 extrusion의 문제는 해결이 되지만 cellulose 생합성에 사용되는 UDP-glucose의 plasma membrane 투과문제가 발생한다. 또한 cellulose synthase는 cytoplasm에 존재하는 것으로 알려져 있어 생합성에 문제가 있다. C의 모델은 glycosyl reaction이 cytoplasm 내에서 지질분자의 관여하에 일어나는 것으로 설명되지만 extrusion의 문제는 여전히 남아 있다. 결국 그림 5의 D와 같은 모델로서 cellulose 생합성 및 extrusion을 설명할 수 있다. 즉 catalytic site가 cytoplasm과 extracellular space에 동시에 존재하여 cytoplasm에서 1차적으로 형성된 짧은 사슬의 glucose 중합체가 plasma membrane의 지질분자 flippases를 통해서 extracellular space으로 나간 후 catalytic site에 의해서 재차 중합되는 것으로 이는 extrusion이 필요없는 과정이다. 하지만 polymerization, crystallization과 extrusion에 대한 정확한 메카니즘을 알기 위해서는 보다 많은 연구가 진행되어야만 가능할 것

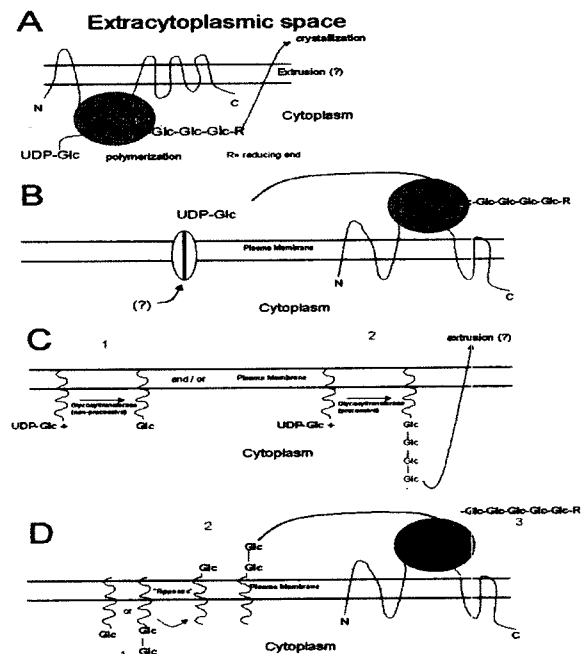


그림 5. Cellulose 생합성에 있어서 glycosylation reaction의 모델.

같다.

일반적으로 알려진 바에 의하면 *A. xylium*에 있어서 cellulose 생합성은 outer membrane과 cytoplasm membrane 사이에 존재하는 생합성 복합체에 의해서 일어나며 bacterium의 표면에 존재하는 pore와 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(12). Bacterial cellulose의 생성과 분출과정을 그림 6에 나타내었으며, 이러한 과정은 균체 전면이 아닌 공기와 접촉하는 장축면에서 일어나는 것으로 알려져 있다.

산업적 이용가능성

Bacterial cellulose의 구조적인 특성

Bacterial cellulose는 천연의 cellulose와 비교할 때 그림 7, 그림 8과 같이 매우 미세한 cellulose 섬유상의 망상 구조(network structure)로 구성되어 있다. Bacterial cellulose의 섬유폭은 침엽수펄프가 32~43 μm , 활엽수펄프 20~40 μm , 비목재 linter 20 μm 인 것에 비해 0.1 μm 정도로 아주 미세한 섬유로 되어 있다. 또한 세장비(두께에 대

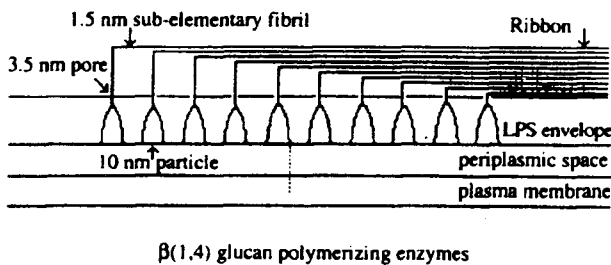


그림 6. Bacterial cellulose의 생성.

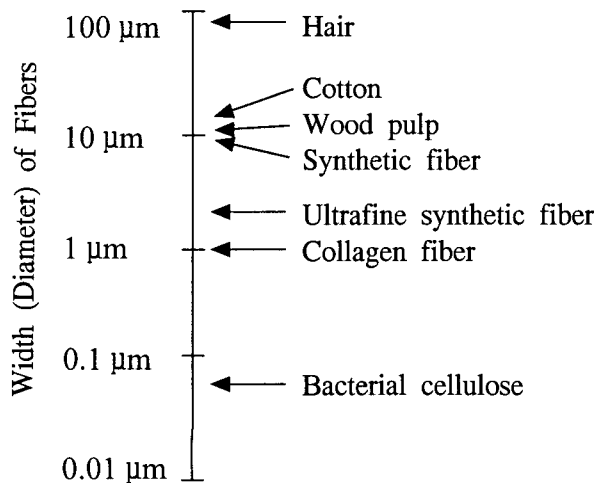


그림 7. 천연 및 합성섬유와 bacterial cellulose 섬유의 직경 비교.

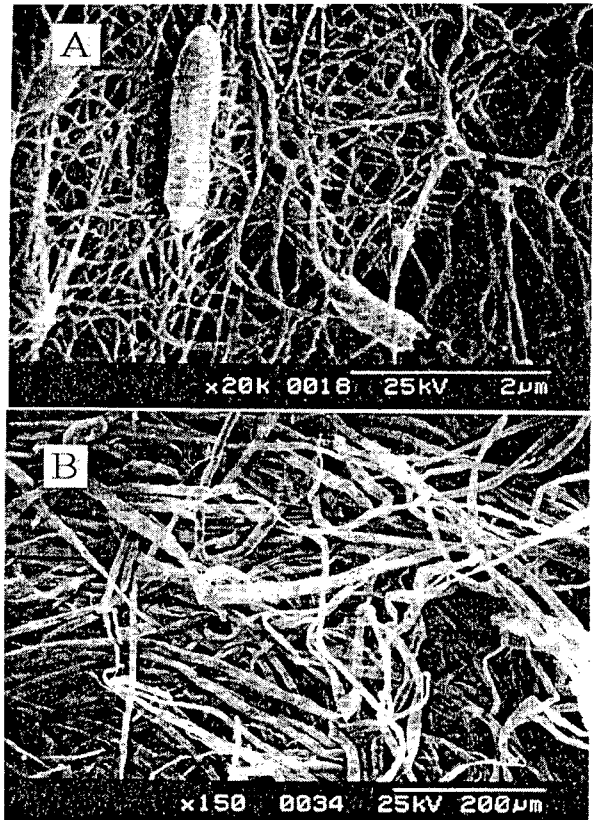


그림 8. Bacterial cellulose와 wood pulp의 전자현미경사진 (SEM) 비교. A, bacterial cellulose ; B, wood pulp.

한 길이의 비율, slenderness ratio)가 아주 큰 특징을 가지고 있으며 표면적이 침엽수 섬유의 약 300배 정도 큰 것으로 알려져 있다.

건조한 bacterial cellulose의 인장강도(young's modulus)는 최고 15 GPa이다. 이러한 강도는 산업적으로 매우 다양한 응용가능성을 제공하게 되며 밀도에 대한 인장강도면에서 비교하면 알루미늄과 비슷하다. 교반배양에서 얻어진 bacterial cellulose를 건조하여 제조한 sheet는 인장강도면에서 정지배양한 sheet보다 약하다. 이는 중합도의 차이와 결합길이 등에서 많은 차이를 나타내기 때문인 것 같다.

공업재료로서 활용

Bacterial cellulose는 상기에서 살펴본 바와 같이 그 인장강도가 크기 때문에 고강도 재료로 사용이 가능할 것으로 생각되며 음향진동판이나 분피막 효소고정화 담체, 크로마토그래피용 담체 및 biosensor용 막 등으로 활용이 가능하다. 실제로 산업화된 경우는 일본의 Sony사를 예로 들 수 있다. 이들은 bacterial cellulose를 사용하여 스피커 음향 진동판에 사용하여 고성능 헤드폰을 만들어 판매하고 있다. 이외에도 고기능 종이 등 bacterial cellulose의

물리적인 특성을 이용한 다양한 제품을 개발할 수 있을 것이라 기대된다.

의료용 재료로서 활용

현재 bacterial cellulose는 창상보호재, 피부대용제, 동물세포배양기, 인공혈관, 화장용 패드 등에 응용할 수 있는 첨단 소재로서 Biofill[®], Bioproess[®]와 Gengifles[®] 등은 실제로 의료용 재료로서 활용하고 있다. 특히 Biofill[®]은 bacterial cellulose를 이용한 성공적인 사례를 수백건을 보고하고 있다. 특히 2도, 3도 화상에 bacterial cellulose를 이용한 치료는 아주 효과적인 것으로 Biofill[®]과 Bioprocess[®]에서는 보고하고 있다.

다이어트 소재로서 활용

식품에서는 bacterial cellulose의 섬유의 겔 형성능과 보수성 및 유화성을 이용하여 다양하게 사용할 수 있다. 특히 bacterial cellulose는 기능성 식품소재로서 다이어트에 활용될 수 있다. 이를 첨가하면 식감이나 보형성이 우수하며 뛰어난 보수성을 이용하여 특정한 맛 성분을 첨가하거나 향을 첨가하면 특유의 제품을 생산할 수 있다. 특히 단 기간에 생산할 수 있는 장점이 있으며 사과, 포도 등의 과일 주스를 활용하여 대량 생산할 수 있다. 이는 잉여 농산물을 활용하여 고부가가치의 소재를 생산함으로써 국내산 과일의 새로운 소요 창출이라는 면에서도 큰 장점이 있다.

결 론

산업적으로 다양한 응용가능성을 지니고 있는 bacterial cellulose를 대량 생산하기 위해서는 앞에서 살펴본 것과 같은 이론적인 배경 및 연구결과를 토대로 gluconic acid의 생성이 적은 균주, 교반배양에 적합한 균주의 screening, 생산수율이 월등이 뛰어난 균주의 screening 등 우수한 균주의 확보와 이들 균주로부터 관련효소를 정제하여 효소학적 특성에 대한 보다 체계적 연구가 요구된다. 또한 bacterial cellulose 생합성에 관여하는 효소의 작용기작에 대한 보다 정확한 자료를 확보하고, 관련 유전자를 검색하여 이에 맞는 발현기구를 제작하여 고발현 재조합 균주를 만드는 일 또한 중요하다고 하겠다.

국내에서는 bacterial cellulose에 대한 연구가 진행되고 있으나 대부분 균주를 screening하는 단계거나 최적 발효 조건을 설정하는 단계이다. 향후 bacterial cellulose 생성력이

우수한 균주의 발굴, 다양한 소재개발 및 scale-up 조건에 따른 체계적인 연구가 요구되며 특히 경제성 있는 대량 생산 산업화를 위한 연속생산 공정 개발이 요구될 것으로 생각된다.

문 헌

1. Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O. and Yoshinaga, F. : A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 575-579 (1996)
2. Jeong, Y.J. and Lee, I.S. : A view of utilizing cellulose produced by *Acetobacter* Bacteria. *Food Industry and Nutrition*, **5**, 25-29 (2000)
3. Vandamme, E.J., Baets, S.D., Vanbaelen, A., Joris, K. and Wulf, P.D. : Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 93-99 (1998)
4. Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. and Beppu, T. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1377 (1996)
5. De Wulf, P., Joris, K. and Vandamme, E.J. : *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **67**, 376 (1996)
6. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H. and Benziman, M. : Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, **325**, 279-281 (1987)
7. Lin, F.C. and Brown, R.M. Jr. : Cellulose synthesis subunits of *Acetobacter xylinum*. In *Cellulose and Wood-Chemistry and Technology*, Schuerch, C. (ed.), John Wiley and Sons, New York, p.474-492 (1989)
8. Lin, F.C., Brown, R.M. Jr., Drake, R.R. and Haley, B.E. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 4782-4784 (1990)
9. Saxena, I.M., Lin, F.C. and Brown, Jr. R.M. : Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol. Biol.*, **15**, 673-683 (1990)
10. Han, N.S. and John, E.R. : The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis, Direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. *Carbohydrate Research*, **131**, 125-133 (1998)
11. Brown, Jr. R.M. and Saxena : Cellulose biosynthesis, A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 57-67 (2000)
12. Jonas, R. and Farah, L.F. : Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 101-106 (1998)