

## Acetobacter sp. A9에서 셀룰로오스 생산량이 높은 변이주 선별

이 오 미\* · 손 홍 주<sup>1</sup> · 이 상 준<sup>2</sup>

한국원자력 연구원 방사선과학연구소, <sup>1</sup>부산대학교 생명응용과학부,  
<sup>2</sup>부산대학교 미생물학과

### Selection of a Mutant Strain with High Yield of Cellulose Production Derived from *Acetobacter* sp. A9

O-Mi Lee\*, Hong-Joo Son<sup>1</sup> and Sang Joon Lee<sup>2</sup>

Korea Atomic Energy Reserch Institute, Advanced Radiation Technology Institute,  
Jeongeup 580-185, Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Pusan National University,  
Miryang 627-706, Korea

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Abstract** – The mutant strain M6 derived from *Acetobacter* sp. A9, which produces high levels of the bacterial cellulose derived by random mutagenesis with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or UV treatment, was selected by a Hestrin and Schramm medium (HSB) plate assay. The characterization of the cellulose production was studied in flask culture to improve the productivity of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. A9 and mutant strain M6. The yield of cellulose production was superior to mutant M6 than *Acetobacter* sp. A9. Cellulose was produced 0.12 g L<sup>-1</sup> by *Acetobacter* sp. A9 at HS medium and the mutant M6 produced the cellulose 6.95 g L<sup>-1</sup> at HS medium. Strain M6 produced less amount of gluconic acid than A9, thus showing that cellulose production is negatively related with the gluconic acid production.

**Key words** : *Acetobacter* sp., bacterial cellulose, cellulose negative mutant, gluconic acid

## 서 론

셀룰로오스는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 재생 가능한 천연다당류로서 glucose의 β-1,4 결합에 의하여 이루어진 물질이자 고등식물의 주요 구성성분으로서 현재 제지, 펄프 및 방직산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있다(Dudman 1959). 셀룰로오스의 소비가 급증함에 따라 그 원료로 사용되는 목재에 대한 수요도

갈수록 높아지고 있으나 원료공급과 환경문제로 인하여 제지 대체물질에 대한 연구가 절실한 형편이다(Delmer and Amor 1995; Sutherland 1998). 따라서 미생물에 의하여 생성되는 셀룰로오스(bacterial cellulose; BC)에 대한 관심이 높아지고 있는데, 미생물 셀룰로오스는 식물유래 셀룰로오스에서는 찾아볼 수 없는 독특한 성질로 인하여 새로운 기능성 재료로서 기대를 모으고 있다(Brown 1886).

BC는 *Acetobacter* strains을 호기적 조건에서 정치배양 하면 셀룰로오스가 망상구조의 pellicle 형태로 기-액 계면 속에 형성되며, 리그닌이나 헤미셀룰로오스가 전혀 없는

\*Corresponding author: O Mi Lee, Tel. 063-570-3356,  
Fax. 063-570-3350, E-mail. omilee@naver.com

순수한 상태로 합성되기 때문에 독성 폐기물의 동반 없이 환경친화적으로 정제할 수 있다(Brown 1886; Yamana *et al.* 1989). 정치배양에 의한 BC 생산은 많은 부지 및 노동력을 필요로 하므로 산업적 관점으로 보면 비효율적인 시스템이다(Sieger *et al.* 1995). 따라서 BC의 생산성 향상을 위하여 교반배양을 이용하는 공정이 필요하나 교반배양 시에는 셀룰로오스를 생산하지 않는 돌연변이체(Cel<sup>-</sup>)가 생성되는 단점이 있으므로(Ross *et al.* 1991; Yoshino *et al.* 1996) 이러한 문제를 해결하고 산업적 규모로 셀룰로오스를 대량생산하기 위해서는 교반배양에서도 안정한 균주의 분리과 배양조건의 검토 및 돌연변이를 유발하는 환경조건에 대한 연구가 절실한 형편이다. 한편 셀룰로오스 생합성과정의 초기단계인 glucose의 glucose-6-phosphate로의 전환단계에는 glucose가 gluconate로 대사되는 다른 단계가 존재하여 대부분의 glucose가 gluconate로 먼저 대사되는 양상을 보이고 있다(White and Wang 1964). 이러한 사실은 gluconate가 셀룰로오스 합성 단계에 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 시사한다. 그리고 *A. xylinum*에서 셀룰로오스합성과 관련된 다른 대사과정의 하나는 acetan의 합성인데 알려진 바에 의하면 acetan을 많이 생산하는 균주는 셀룰로오스를 적게 생산하고, 셀룰로오스를 많이 생산하는 경우는 acetan을 적게 생산하는 것으로 알려져 있다(Griffin *et al.* 1994; Morris 1994; Ridout *et al.* 1994).

자연계에 존재하는 균주의 생장과 대사과정 등 생리적인 특성에 따른 한계 때문에 일정한 정도이상이 생산성 향상을 기대하기 어렵다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 기존의 셀룰로오스 생산균주의 대사과정을 면밀히 검토하고 이들의 대사과정을 유전학적인 방법으로 개조함으로써 셀룰로오스 생산능력이 향상된 새로운 균주를 개발하는 방법이 있을 수 있다. 최근 저자들은 정치 및 교반배양에서 BC를 생산하는 *Acetobacter* sp. A9를 부패한 사과로부터 분리, 동정하여 보고한 바 있다(Anon 1991).

따라서 본 연구에서는 *Acetobacter* sp. A9를 공시균주로 선정하여 자외선 조사와 화학제를 처리하여 교반배양에서도 안정한 돌연변이주를 선별하고자 하였다.

## 재료 및 방법

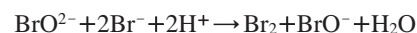
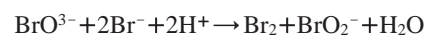
### 1. 사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 손 등(Son *et al.* 2000)에 의하여 부패된 사과로부터 분리 및 동정된 *Acetobacter* sp. A9이었다. 기본배지의 조성은 glucose 2.0%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.675% 및 citric

acid monohydrate 0.115% (pH 6.0)이었으며, 전배양은 50 mL의 기본배지가 함유된 250 mL 용량의 삼각플라스크에 평판한천배지에서 보존중인 균주 한 백금이를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 정치배양 하였다. 돌연변이의 분리 시에는 NaBr-용액(500 μmol)과 NaBrO<sub>3</sub>-용액(100 μmol)을 5:1비율로 첨가하고 pH 지시약인 bromocresol blue (Sigma)을 0.002% (w/v)만큼 첨가한 HSB고체배지를 이용하였다. 셀룰로오스의 합성여부를 확인할 경우에는 셀룰로오스에 특이적으로 결합하는 염색물질인 Calcofluor WT (Sigma)를 첨가한 HSC고체배지를 이용하였다(Table 1).

### 2. 자외선 조사와 NTG처리에 의한 돌연변이의 유발

배양 후 형성된 pellicle을 회수 0.05 M citric acid buffer 50 mL가 들어있는 flask에 옮긴 후 cellulase C-546 (2599 U mL<sup>-1</sup> in 0.05 M citric acid buffer, pH 5.0)를 처리하여 37°C, 200 rpm에서 2시간 동안 반응시킨 후 1200 rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리 하여 0.1 M citrate buffer 용액에 현탁 하였다. 10 mL의 균체 현탁액을 직경 9 cm의 petri dish에 옮긴 후, 254 nm의 자외선을 조사하여 돌연변이주를 무작위로 선별하였다(Valla *et al.* 1982; 박 1997). 균체 현탁액을 4 mL씩 test tube에 분주하여 200 μL의 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG: 10 μg mL<sup>-1</sup>)를 처리하여 30°C에서 일정 반응 시간별로 test tube를 차례로 빼내어 즉시 원심분리하고 0.1 M citrate buffer로 세척한 후 각 균체를 재현탁 하였다. 인위적으로 돌연변이를 유발시키고, HS 액체배지에서 하루밤 배양 후에 적당히 희석하여 HSB 고체배지에 도말하여 48시간 동안 배양하였다. 당기질로부터 산이 생성되어 H<sup>+</sup> 존재 시 bromate와 bromide ion은 서로 반응한다. 생성된 bromite는 다음과 같이 계속 반응한다.



이 반응에서 Br<sub>2</sub>와 BrO<sup>-</sup>는 acid를 생성하는 세포에는

**Table 1.** Composition of HSB and HSC media

HSB medium (%)		HSC medium (%)	
Glucose	2	Glucose	2
Yeast extract	0.5	Yeast extract	0.5
Polypeptone	0.5	Polypeptone	0.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.27	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.27
Citric acid	0.115	Citric acid	0.115
BCG <sup>a</sup>	0.1	Calcofluor WT	0.01
pH	6.5	pH	6.5

<sup>a</sup>BCG (bromocresol green, Sigma). 0.22 g of BCG was dissolved in 10 mL ethanol

독성을 나타낸다(Winkelman and Clark 1984; Vandamm *et al.* 1996). 따라서 산을 생산하는 세포는 이 배지 상에서 자랄 수 없으므로 일차적으로 상기 배지에서 자라는 세포를 gluconic acid를 생산치 않는 돌연변이주로 선별하였다. 그리고 선별된 세포들을 HSB 고체배지에 다시 옮겨서 배양한 후, 배지의 색이 변하지 않는 콜로니를 최종적으로 선별하였다.

**3. 셀룰로오스 생성능 검사**

돌연변이체의 단일균락을 HSC 고체배지에 streak하여 48시간 배양한 후, 254 nm의 자외선을 조사하여 형광색을 띠는지의 여부를 확인하였다.

**4. 미생물 셀룰로오스 정량**

플라스크 배양에서 생성된 pellicle (정체배양) 또는 BC mass (진탕배양)을 회수하여 물로 세척한 다음 0.5N NaOH 용액에 담구어 90°C에서 2시간 동안 처리함으로써 세포를 용해시켰다. 이들을 중성이 될 때까지 증류수로 세척한 후, 90°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 건조중량을 측정하였다.

**5. Acetan 정량**

배양액을 8000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액 1 mL를 취하여 2% KCl 용액 1 mL와 99.9% 에탄올이 4 mL가 들어있는 vial에 첨가하여 반응시킨 후, 다시 4°C, 8000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻은 후 100°C에서 24시간 건조하여 건조중량을 측정하였다(Somogyi 1952).

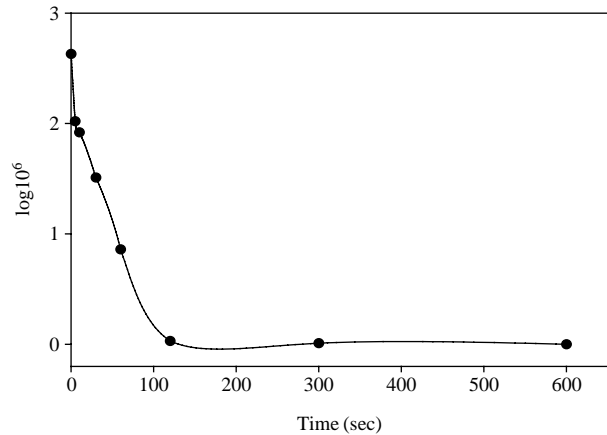
**6. Gluconic acid 정량**

배양액에 잔존하는 gluconic acid의 측정은 배양 상등액을 0.2 μm syringe filter로 여과한 후, HPLC로 분석하였다. Column은 Nova-PakC18 (3.9 × 150 mm, Waters)을 사용하였고, 이때 0.1% H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 이동상을 0.1 mL min<sup>-1</sup>의 유속으로 용출하였고, UV detector 2487 (Waters)를 사용하여 210 nm에서 측정하였다(Cha *et al.* 1994).

**결과 및 고찰**

**1. 자외선 조사와 NTG 처리에 의한 돌연변이의 유발 및 생존율**

자외선 조사에 의하여 돌연변이를 유발할 때 돌연변이가 선택될 확률은 자외선 조사의 치사율과 밀접한 연관



**Fig. 1.** Survival curve of *Acetobacter* sp. A9 by UV treatment. Cells of *Acetobacter* sp. A9 grown to mid-log phase were exposed to UV at 254 nm for the indicated times as described in materials and methods. The number of cells survived after UV irradiation was determined by counting colonies formed on solid plates of HS medium.

이 있으므로 일정한 조건에서 자외선의 조사시간을 변화시켜가면서 각 시간에서 치사율을 결정하였다. 자외선 조사시간이 2분일 때, 치사율이 99.9%가 됨을 확인하였고(Fig. 1), 이를 통하여 돌연변이체를 효과적으로 분리할 수 있는 조건은 254 nm의 자외선을 2분간 조사하는 것을 결정하였다.

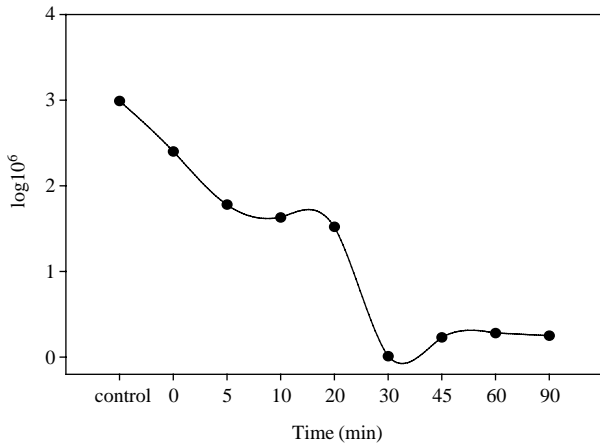
NTG 처리에 의한 돌연변이 유발은 일정한 양의 처리 조건에서 반응시간을 변화시켜가면서 각 반응시간에서 치사율을 결정하였다. 반응시간이 30분일 때 치사율이 99.9%가 됨을 확인하였고(Fig. 2), 돌연변이를 효과적으로 분리할 수 있는 조건은 NTG 용액을 10 μg mL<sup>-1</sup> 농도로 처리하여 30분간 반응시키는 것으로 결정하였다.

**2. 돌연변이주의 선별**

자외선 조사와 NTG를 처리한 균액을 bromate와 bromide ion-용액이 들어있는 HSB 고체배지에 도말한 후, 나타난 콜로니를 다시 HSB 고체배지에 옮겨 배양한 후 과란색에서 노란색으로 변하지 않는 콜로니를 선별하였다. 자외선 조사에 의해 선별된 변이주는 124개였고, NTG에 의해 선별된 변이주는 29개를 얻었다.

**3. 선별된 돌연변이체의 셀룰로오스 생성능 확인**

야생주와 돌연변이체를 각각 HSC 고체배지에 streak하여 48시간 동안 배양하여 각각의 셀룰로오스 생산을 확인한 결과, 야생주에서 254 nm의 자외선 아래에서 푸른 빛의 형광을 나타내는 것처럼 돌연변이체에서도 형광빛



**Fig. 2.** Survival curve of *Acetobacter* sp. A9. by NTG treatment. Cells of *Acetobacter* sp. A9 grown to mid-log phase were treated NTG at concentration of  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  solution for the indicated times as described in materials and methods. The number of cells survived after NTG exposure was determined by counting colonies formed on solid plates of HS medium.

을 확인할 수 있었고, 형광을 나타내지 않는 것도 있었다.

돌연변이체 중에서 M6의 경우, 자외선을 조사한 결과 야생주 처럼 형광빛을 나타내는 것으로 보아 셀룰로오스가 생성된다는 것을 확인할 수 있었고, 변이주 M28의 경우는 형광빛을 나타내지 않았다. 따라서 변이주 M28은 셀룰로오스의 생성능이 결여된 것이라고 사료 된다.

#### 4. 야생주와 돌연변이체의 셀룰로오스 생산량 비교

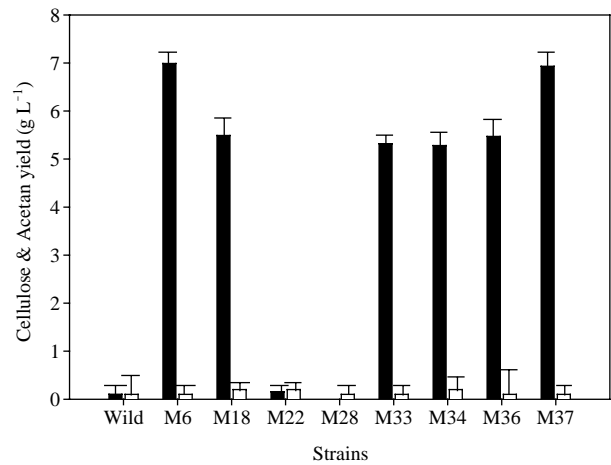
선별된 변이주 44개를 각각 최적배지 50mL가 들어있는 플라스크에 접종하여 30°C에서 200rpm으로 7일간 배양한 후, 셀룰로오스 생산량을 측정하였다. 그 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 변이주 M6번과 M18번, M33번, M34번, M37번이 셀룰로오스 생산량이 많은 것을 볼 수 있었다. 변이주 M22번과 M28번은 셀룰로오스를 생성하지 않았고, 비교실험을 하기 위해서 이 두 가지 변이주도 같이 선별하였다.

#### 5. 야생주와 돌연변이체의 acetan 생산량 비교

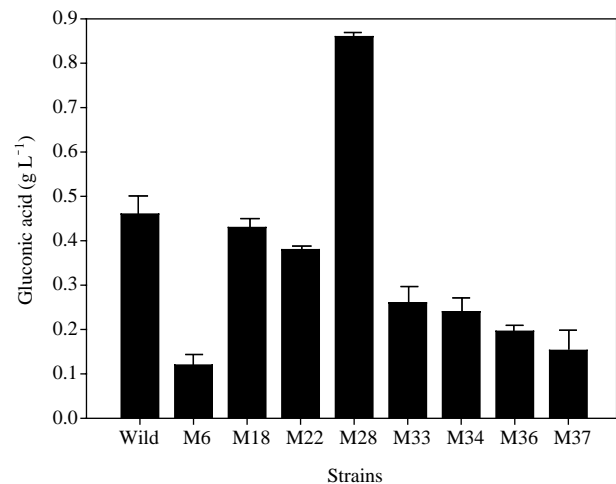
야생주와 8종의 돌연변이체를 각각 최적 배지 50mL가 들어있는 플라스크에 접종하여 30°C, 200rpm에서 7일간 배양한 후, 배양액에서 acetan의 양을 확인한 결과, 야생주와 돌연변이체에서 거의 비슷한 양의 acetan이 생성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

#### 6. 야생주와 돌연변이체의 gluconic acid 생산량 비교

야생주와 8종의 돌연변이체를 각각 최적배지에서 배양



**Fig. 3.** Quantitation of cellulose and acetan production in optimum medium by wild type and mutant strains. (■); cellulose, (□); acetan. M6, M18, M22, M28 : *Acetobacter* sp. A9 mutant treated with NTG mutagen. M33, M34, M36, M37 : *Acetobacter* sp. A9 mutant treated with UV mutagen.



**Fig. 4.** Quantitation of gluconic acid in optimum medium by wild type and mutant strains.

하여 얻은 배양액에서 gluconic acid 양을 확인한 결과, 야생주보다 돌연변이체에서 더 적게 생산되는 것을 확인하였고, 셀룰로오스를 생성하지 않는 변이주 M28번의 경우는 gluconic acid가 다른 변이주보다 많이 생산되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

## 적 요

셀룰로오스는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 재생 가능한 천연 다당류로서 glucose의  $\beta$ -1,4 결합에 의하

여 이루어진 물질이자 고등식물의 주요 구성성분으로서 현재 제지, 펄프 및 방직산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있다. 셀룰로오스의 소비가 급증함에 따라 그 원료로 사용되는 목재에 대한 수요도 갈수록 높아지고 있으나 원료공급과 환경문제로 인하여 제지 대체물질에 대한 연구가 절실한 형편이다 (Sutherland 1998). 따라서 본 연구에서는 정치 및 교반배양에서도 생산할 수 있는 능력이 있음이 확인된 *Acetobacter* sp. A9를 사용하여 교반배양 할 때 셀룰로오스를 생산하지 않는 돌연변이체 (Cel<sup>-</sup>)가 생성됨으로써 셀룰로오스 생산량이 대폭 감소하는 현상이 일어나는 문제점을 해결 할 수 있는 돌연변이주를 선별하여 대량생산의 가능성을 검토하였고, 교반배양에서도 안정한 변이주의 선별을 위해 자외선 조사와 화학제를 처리하여 변이주 8개를 선별하여 여러 가지 특성을 조사하였다. 이 변이주들의 셀룰로오스 생산량과 acetan, gluconic acid 생산량을 야생주인 *Acetobacter* sp. A9과 비교한 결과, Couso (1982, 1987)와 Iannion (1988), Ridout (1994)가 설명한 acetan 생산이 셀룰로오스 합성과 밀접한 관계를 갖고 있는 결과와는 달리 본 연구에서는 acetan 생산과 셀룰로오스 합성과는 관계가 없었고, 셀룰로오스 생산량이 많은 변이주 M6의 경우, 셀룰로오스를 생성하지 않는 변이주 M28보다 gluconic acid 생산량이 훨씬 작은 것으로 보아 셀룰로오스 합성에 gluconic acid가 셀룰로오스 생산에 영향을 미치는 것이라고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 박상태. 1997. *Acetobacter xylinum* BRC5의 cellulose 합성에 미치는 gluconate의 영향. 석사학위논문. 연세대학교 생물학과. 16pp.
- Anon. Functional Ingredients. 1991. Present situation of research and development. Food and Development. 26:14-40.
- Brown AJ. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. J. Chem. Soc. 49:432-439.
- Cha YJ, KJ Park, DK Kim, HS Chun, BK Lee, KH Kim, SY Lee and SJ Kim. 1994. Characteris and Isolation of cellulose-producing *Acetobacter xylinum* KI. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:571-576.
- Couso RO, L Ielpi, RC Garcia and MA Dankert. 1982. Biosynthesis of polysaccharides in *Acetobacter xylinum*: Sequential synthesis of a heptasaccharide diphosphate prenol. Eur. J. Biochem. 123:617-627.
- Couso R, L Ielpi and MA Dankert. 1987. A xanthan-gum-like polysaccharide from *Acetobacter xylinum*. J. Gen. Microbiol. 133:2123-2135.
- Delmer DP and Y Amor 1995. Cellulose biosynthesis, The Plant Cell 7:987-1000.
- Dudman WF. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. J. Gen. Microbiol. 21:312-326.
- Griffin AM, VJ Morris and MJ Gasson. 1994. Genetic analysis of the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*. Intl. J. Biol. Macromol. 16:287-289.
- Iannino N, R Couso and M. Dankert. 1988. Lipid-linked intermediates and the synthesis of acetan in *Acetobacter xylinum*. J. Gen. Microbiol. 134:1731-1736.
- Morris VJ. 1994. Acetan -A new bacterial polysaccharide. Biotech. Bioactive Polymers. 9-16.
- Ridout MJ, GJ Brownsey, VJ Morris and P Cairns. 1994. Physicochemical characterization of an acetan variant secreted by *Acetobacter xylinum* strain CR1/4. Intl. J. Biol. Macromol. 16:324-330.
- Ross P, R Mayer and M Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol. Rev. 55:35-58.
- Sieger CHN, AGM Kroon, JG Batelaan and CG Van. 1995. Biodegradation of carboxymethyl celluloses by *Agrobacterium* CM-1. Carbohydrate Polymers. 27:137-143.
- Somogyi MJ. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 19:19-23.
- Son HJ, OM Lee, YG Kim and SJ Lee. 2000. Isolation and identification of cellulose-producing bacteria. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:134-138.
- Sutherland IW. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. TIBTECH 16:41-46.
- Vandamme EJ, K Joris and P De Wulf. 1996. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (Keto)gluconate synthesis. J. Chem. Tech. Biotechnol. 67:376-380.
- Valla S and KJ. 1982. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. J. Gen. Microbiol. 128:1401-1408.
- White GA and CH Wang. 1964. The dissimilation of glucose and gluconate by *Acetobacter xylinum*. Biochem. J. 90:408-433.
- Winkelman JW and DP Clark. 1984. Proton suicide:general method for direct selection of sugar transport-and fermentation-defective mutants. J. Bacteriol. 160:687-690.
- Yamanaka S, K Watanabe, N Kitamura, M Iguchi, S Mitsunashi, Y Nishi and M Uryu. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. J. Mater. Sci. 24:3141.
- Yoshino T, T Asakura and K Toda 1996. Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane, J. Ferment. Bioeng. 81:32-36.