

Bacterial Cellulose 생산균 KJ-1으로 부터 UV와 NTG mutant들의 cellulose 생산수율의 증가

김혜은 · 손창진 · 정선용 · 김성준

전남대학교 환경공학과

전화 (062) 530-0853 FAX (062) 530-1859

Abstract

This study was performed to improve the yield of bacterial cellulose(BC) by UV and NTG mutagenesis of strain KJ-1 which produced largely BC. some mutants showed high BC productivity with twice elevation compared to that the wild strain KJ-1. A difference was found in production and bioconversion phase of synthesized organic acid, such as gluconic acid, 2-keto gluconic acid, and 5-keto gluconic acid between mutants and strain KJ-1 in the static culture. The organic acid produced in secondary metabolism phase, were more rapidly consumed in the culture with the mutants than that the parent strain after glucose in the broth was conversed to a limiting substrate. Therefore, we suggested the reason for increasing of BC production that the mutant strain consumed more efficiently synthesized acids as substrates than that of the parent strain.

1. 서 론

Cellulose는 유용한 천연고분자 중의 하나로 대부분 식물에 의하여 합성되지만 Brown에 의해 1886년 초산균이 cellulose를 생산함¹⁾ 밝혀진 이후에 bacterial cellulose(BC)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 그 중 가장 잘 연구되어진 균주가 *Acetobacter xylinum*이다. BC를 생산하는 대표적 미생물인 *A. xylinum*은 교반배양에서 전단력에 의해 cellulose를 생산하지 못하는 선천적인 cellulose negative mutant(cel⁻)로 변한다²⁾. 그러므로 교반배양에서는 정지배양과 같은 높은 수율을 기대할 수 없다. 또한 *Acetobacter*와 *Gluconobacter*로 분류되는 Acetic acid bacteria는 당, 알코올, 알데하이드 등을 산화하는 능력이 있어서, cellulose 생산을 증가시키기 위하여 초기에 carbon source인 glucose 주입량을 증가 시켜도 배양 초기에 배지의 pH를 떨어뜨려 세포가 최적으로 성장할 수 있는 조건을 불리하게 하여 cellulose 생산을 억제하는 것으로 알려져 있다³⁾. 초산 균주는 D-glucose dehydrogenase(GDH)에 의하여 D-glucose를 D-gluconic acid로 전환시키고, gluconate dehydrogenase(GADH)에 의하여 다시 2-keto gluconic acid와 5-keto gluconic acid로 전환한다. 그러나 *Gluconobacter*에서 잘 연구되어진 바와 같이 초산균들은 생산한 keto gluconic acid를 다시 keto gluconate reductase(KGR)에 의하여 D-gluconate로 전환시켜서⁴⁾ 기질로 소모하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 본 실험실에서 분리된 BC 생산균주 KJ-1을 분자육종법을 통하여 초기에

주입된 glucose를 효과적으로 이용하여 보다 높은 생산수율을 보이는 균주로 계량하였다. 시간에 따른 cellulose생산량과 D-gluconic acid와 2-keto gluconic acid, 5-keto gluconic acid의 변화를 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험균주 및 배양

실험균주는 본 실험실에서 분리된 BC 생산능력을 지닌 Strain KJ-1을 사용하였고, 균주 배양을 위한 배지로는 Hestrin & Schranm(HS)배지(pH 5.5)를 사용하였으며, 조성은 glucose 2%, bacto pepton 0.5%, yeast extract 0.5%, Na_2HPO_4 0.27%, citric acid 0.115%이다. HS배지(10ml)에 단일 colony를 접종하여 1주일 배양 후 이를 다시 HS배지에 1% 접종하여 3일간 전배양하였다. 이를 접종액으로 500ml flask의 100ml HS배지에 1% 접종하여 본 배양을 하였다. 모든 배양은 30℃에서 정치배양하였다.

2-3. BC 정량 및 Reducing Sugar 정량

Flask 정치배양에서 생성된 BC를 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 얻은 pellicle에 0.1N NaOH 용액을 첨가하여 80℃에서 20분간 가열하여 cellulose에 포함된 cell을 녹인 다음 filter paper에 여과하여 건조중량을 측정하였다. 배양액내에 탄소원으로 공급한 glucose의 잔존량을 측정하기 위해 DNS법을 사용하였다.

2-4. Gluconic acid, 2-Keto gluconic acid, 5-Keto gluconic acid의 정량

균주가 생산한 gluconic acid와 2-Keto gluconic acid, 5-Keto gluconic acid를 정량하기 위하여 0.45 μm filter paper에 배양액 시료를 여과하여 High Pressure Liquid Chromatography(Young-Lin M903, Korea)로 측정하였다. Column은 Shodex DE-613을 사용하였고 이동상은 2mM perchloric acid(pH 2.8), 유속은 1.0ml/min, acid의 농도는 UV 검출기(Young-Lin M720, Korea)을 이용하여 220nm에서 정량하였다.

2-5. UV mutagenesis & NTG mutagenesis

전배양한 KJ-1을 HS agar plate에 100 μl 씩 도말한 다음 plate의 뚜껑을 열고 UV(GERMICIDAL Ultra violet, Japan, 254nm, 30watt 60sec)를 쬐어 주어 치사율을 99.9% 이상으로 하였다. 이 plate를 30℃에서 3일 배양하여 각각의 colony를 하나씩 분리하여 HS 배지에 7일간 배양후에 수율이 우수한 균주를 선별하였다.

NTG(1-Methy-3-nitro-1-nitrosoguanidine) mutation은 KJ-1을 24시간 전배양하여 10,000×g에서 원심분리하여 균체를 회수한 후, 50mM phosphate buffer로 수차례 수세한 다음 NTG 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 30℃에서 1시간동안 배양하였다. 이를 다시 원심분리하여 균체만 회수한 후에, buffer로 수세하여 HS 10ml가 첨가된 test tube에 접종하여 1시간동안 배양한다. UV mutnat와 같이 수율이 우수한 균주를 선별하였다. 치사율은 99%이상으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

Parent strain인 KJ-1의 수율을 100%로 보았을 때 NTG와 UV 처리 통하여 얻은 mutant들의 분포를 %별로 나누어 보면 fig. 1과 같다. NTG mutation 보다 UV를 통하여 얻은

mutant중에서 수율이 향상된 균주가 많음을 알 수 있었다. 150%이상의 수율을 보이는 균주는 UV처리에서 26종, NTG처리에서 5종을 얻었으며, 그 중에서 200%정도 증가된 균주는 각각 3종, 1종을 얻었다. 7일 배양을 기준으로 하였을 때 cellulose 수율을 g-cellulose per g-glucose로 나타내면 KJ-1은 0.3 정도임에 비하여, UV mutant중의 하나인 H1의 경우에는 0.6 정도의 수율을 보인다. 이들을 각각 7일간 30°C에서 HS 배지 100ml에 정치배양 하였을 때, 최종 수율과 pH, gluconic acid, 2-Keto gluconic acid, 5-Keto gluconic acid 생산량의 비교는 fig. 2에서 나타내었다. H1을 포함한 수율이 200%정도에 가까운 4종의 strain은 parent strain보다 최종 pH는 더 높았고, gluconic acid, 2-Keto gluconic acid, 5-Keto gluconic acid의 양은 더 낮음을 알 수 있었다. 이런 결과에 의하여 cellulose 생산수율에 영향을 주는 원인은 acid생산 패턴과 관계가 있음을 추정할 수 있었다. Fig. 3과 Fig. 4는 KJ-1과 H1의 시간에 따른 대사물질들의 변화량을 보여준다. 두 균주는 glucose가 현저하게 감소하는 시간에서 생산한 acid을 다시 기질로 소모한다. 일반적으로 *Acetobacter xlinum*은 cellulose를 생산하는데 glucose를 이용하고 gluconic acid의 영향을 받지 않는다는⁵⁾ 보고와는 다른 결과였다. H1 균주의 경우는 parent strain보다 acid를 소모하는 시점이 100시간 정도 빠르며, Cellulose 생산수율은 같은 시간에서 상당히 높았다. 이런 결과는 Keto gluconic acid가 KGR에 의하여 gluconic acid로 전환되고, gluconic acid는 gluconate-6-phosphate로 전환되어 pentose phosphate cycle에 사용되어지므로, 세포활성을 증대시켜⁶⁾ cellulose 생산수율을 증가시키는 것으로 보인다.

4. 요약

본 연구에서는 BC 생산균주인 KJ-1을 UV와 NTG mutagenesis를 통하여 초기에 주입된 glucose를 효과적으로 이용하여 cellulose 수율이 향상된 균주로 계량하였다. Mutant들 중 수율이 2배정도 향상한 균주에서는 cellulose를 비롯한 gluconic acid, 2-keto gluconic acid, 5-keto gluconic acid의 비율이 parent strain과 차이를 보였고, 시간에 따른 acid 농도 분포를 살펴보면 수율이 증가한 원인 중에 mutant가 parent strain보다 합성한 acid를 효율적으로 이용하고 있다고 추론 할 수 있었다.

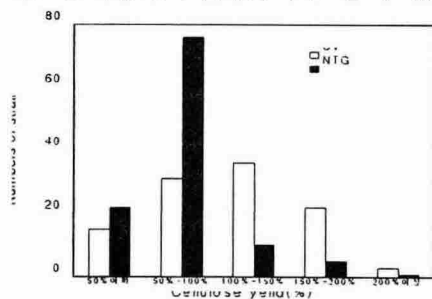


Fig 1. Relation of UV and NTG mutants number and BC yeild. yeild of 100% in value earned from the parent strain KJ-1

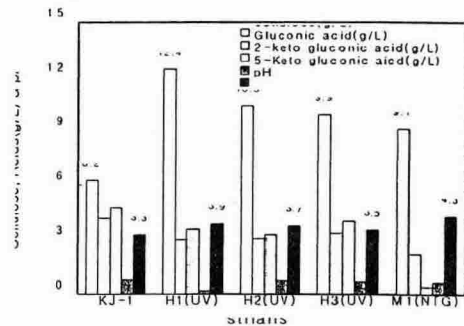


Fig. 2 comparison of cellulose, gluconic acid, 2-Keto gluconic acid, 5-Keto gluconic acid and final pH between parent strain KJ-1 and mutants.

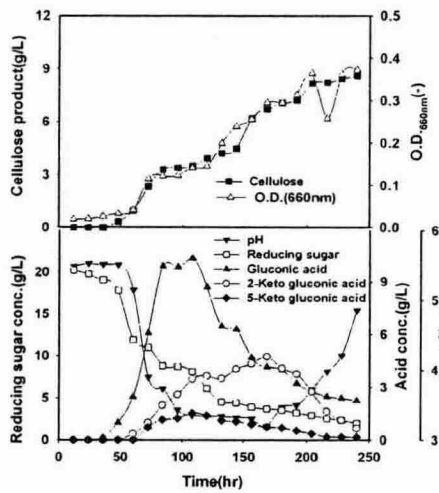


Fig 3. change of organic acid, cellulose, reducing sugar, pH, O.D., in the static culture of strain KJ-1

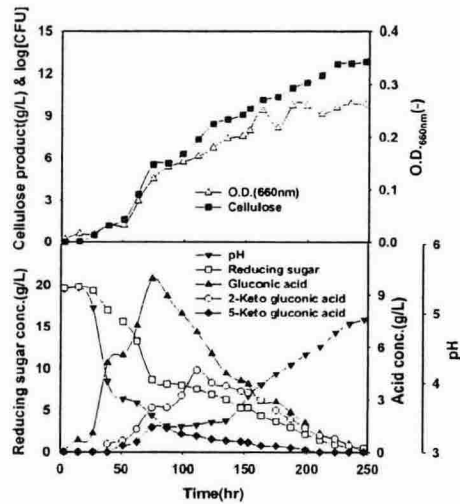


Fig 4. change of organic acid, cellulose, reducing sugar, pH, O.D., in the static culture of UV mutant H1

감 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-2-30900-006-3) 지원으로 수행되었음.

5. 참고문헌

1. Brown, A. J. "An acetic ferment which forms cellulose"(1886), J. Chem. Soc. 49, 432-439.
2. Valla, S. and Kjosbakken, J., "Cellulose- negative mutants of *Acetobacter. xylinum*" (1982), J. Gen. Microbiol., 128, 1401-1408
3. J. De Ley, J. Swing, and F. Gossele, in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," ed. by N.R.Krieg and J.G.Holt(1984), Williams & wilkins Co., Baltimore, pp. 268-278
4. Yum, D.-Y., B.-Y. Lee, and J.-G. Pan. "Identification of the *yqhE* and *yafB* Genes Encoding Two 2,5-Diketo-D-Gluconate Reductase in *Escherichia coli*"(1999) Appl. Environ. Microbiol. 65, 3341-3346
5. S. masaoka, T. Ohe, and N. Sakoya, "Production of Cellulose from Glucose by *Acetobacter xylinum*"(1993), J. Ferment. bioeng. 75, 18-22
6. Olijve, W., and J. J. Kok. "Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose-containing media"(1979), Arch. Microbiol. 121, 283-290