부패된 사과로부터 분리된 미생물의 bacterial cellulose 생산특성 (Production of bacterial cellulose by a microbial strain isolated from rotten apples)

정재용, 박연희, 박중곤
경북대학교 화학공학과 생물화공연구실
전화 (053) 950-5621 FAX (053) 950-6615

Abstract

부패한 사과로부터 bacterial cellulose (BC)를 생산할 수 있는 균주를 분리한 후 배양조건에 따른 BC의 생산량을 조사한 결과 BC의 생산량은 진탕배양한 경우가 정치배양한 경우보다 약 1.5배 높았다. BC의 생산량을 높이고자 mutagen으로 UV와 cylcloheximide를 사용함으로써 BC 생산량을 약 3배 증가시킬 수 있었다.. 미생물에 의해 생성된 BC는 종이나 펄프와는 달리 pectin, 납, 유지, 단백질, 무기질 등의 불순물을 함유하지 않는 filter paper와 성질이 유사한 것으로 나타났다.

서론

1886년 Brown에 의해서 최초 보고된 *Acetobacter* strain이 생산하는 BC는 hemicellulose, pectin, lignin 그리고 biogenetic product를 전혀 함유하지 않아 식물유래 cellulose처럼 펄프화 과정에서 대량의 에너지와 화학약품이 소비되는 문제점이 없다. 또한 BC fibril의 크기는 wood fibril보다 300배 적은 0.1 μm 정도이므로, 이 같은 그물모양의 BC fibril 구조는 아주 큰 표면적을 가지며 높은 보수성과 moldability 그리고 강한 인장 강도를 가지게 된다 [1]. Jayme 와 Rothamal에 의하면 BC는 cotton linter 보다 약 17배 높은 water retention value를 가진다고 보고하였다 [2]. BC의 이러한 우수한 물리학적 특성으로 인하여 스피커 진동판, 지혈대, 식이섬유 등의 실용화 소재로의 연구가 진행되고 있으며, BC막이 겔상태에서 피부에 촉감이 좋고 신체표면에 쉽게 융화되고 게다가 의약품이나 화장재료 성분의 보수능력이 높으며, 피부표면을 일정의 보습상태로 유지할 수 있기 때문에 의료용 패드나 화장패드, 인공피부 등에 사용되고 있다 [3]. BC막은 효소의 고정화 담체 소재로 이용할 경우 유효면적이 크고, 다른 소재보다 수십 배의 효소 고정이 가능할 뿐만 아니라 내구성도 우수하다는 것이 발견되었으며 BC를 형성하고 있는 섬유를 각각 분해하여 20%의 펄프와 혼합하여 종이를 만들면 종이의 강도나 탄성률이 대조군에 비하여 2.5배 증가되는 특성도 밝혀졌다 [4]. 이상과 같이 *Acetobacter* strain이 생성하는 BC는 산업용 소재, 식품 소재 등에 다양하게 활용될 수 있으며, 특히 환경 친화적 소재라는 점은 무한한 개발

가능성과 다양성을 가지고 있다. 그러나 *Acetobacter* strain은 배양 중 shear rate를 가하게 되면 cellulose를 생산하지 않는 Cel^- mutation이 발생하고, Cel^- mutant는 BC 생산균주보다 증식속도가 빠르기 때문에 연속적인 통기 교반 배양에서는 생산주가 도태되어 비생산주가 배양의 주체로 되는 특성[5]으로 인하여 종래에는 생산성이 매우 낮지만 긴 배양시간과 많은 노동력을 필요로 하는 정치배양을 이용하여 BC를 생산하였다. BC의 생산성을 향상시키기 위한 시도로 교반배양 조건에서도 효과적으로 BC를 생산할 수 있는 균주를 선별하고 BC의 생산에 영향을 미치는 영양인자에 대한 연구가 계속되고 있지만 여전히 산업화하기에는 그 생산성이 매우 낮다. 따라서 이러한 문제를 해결하고 다량의 BC를 생산하기 위해서는 교반배양 하에서도 Cel^- mutant가 생기지 않는 유전적으로 안정한 미생물의 분리와 배양조건의 검토 및 mutation을 유발하는 환경조건에 대한 연구가 절실한 형편이다. 일반적으로 *Acetobacter* strain에 의해 생성된 cellulose는 다른 bacteria의 오염을 막아주고 수분을 유지시켜줄 뿐만 아니라 UV-light로부터 cell을 보호하는 역할을 한다고 알려져 왔다.
따라서 본 연구에서는 자연계로부터 분리하여 보관하고 있는 균주를 대상으로 먼저 배양조건에 따른 cell의 성장과 BC의 생산특성을 파악하고 수분이 부족한 조건에서 UV mutagen을 이용하여 교반배양 조건에서도 효과적으로 BC를 생산할 수 있는 mutant를 유도함으로서 BC의 생산량을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 부패한 사과로부터 cellulose를 생산할 수 있는 cell을 분리하여 사용하였으며, 균주배양을 위한 기본 배지의 조성은 glucose 10g/L, yeast extract 10g/L, peptone 7g/L, acetic acid 1.5ml/L, succinic acid 0.2g/L이며 배지의 pH는 5.0으로 보정하였다. 균주보관을 위한 고형배지는 기본배지 조성에 agar를 첨가하였다.

배양조건

50mL의 배지가 함유된 250mL 용량의 삼각 플라스크에 고형배지에서 보존중인 균주를 백금이로 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치 및 20rpm으로 진탕배양 하였다. 배양액은 멸균된 mesh (400, 38㎛)로 여과하여 균일한 세포 현탁액을 얻은 후 세포 현탁액 5%를 본 배양액 50mL가 함유된 250mL 용량의 삼각 플라스크에 접종하여 30℃에서 5일간 정치 및 200rpm으로 진탕배양 하였다.

Mutation 유도

Agar plate에 형성된 colony에 clean bench 내부에 설치되어 있는 UV램프(30W)를 이용하여 미생물의 움직임이 관찰되지 않을 때까지 UV-light를 조사하였다.

Cycloheximide에 의한 mutation의 유도는 agar plate에 형성된 colony에 0.2%의 농도의 cycloheximide 0.5ml의 양을 투여하여 30℃에서 24시간 처리한 후 기본배지에서 진탕배양함으로써 이루어졌다.

균체량 및 BC 생산량 측정

배양액 50mL를 5000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 2회에 걸친 증류수 세척 및 원심분리 과정을 거치고 동결건조(-30℃) 시켜 균이 포함된 BC의 건조중량을 먼저 구하였다. 그 후 균이 포함된 BC에 20mL의 0.3N NaOH를 첨가하여 5분간 끓임으로써 세포를 모두 용해시켰으며 세포가 제거된 순수 BC는 중성이 될 때까지 충분히 세척한 후 동결 건조하여 건조중량을 측정하였다. 균체의 건조중량은 균이 포함된 BC의 건조중량과 순수 BC의 건조중량과의 차이를 이용하였다.

결과 및 고찰

배양조건에 따른 BC 생산 특성

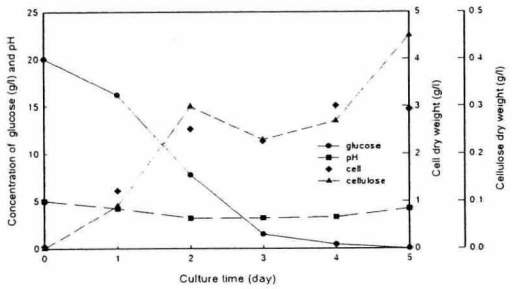

Figure 1. Time course of cellulose production by a static culture.

사과로부터 분리한 미생물과 이들의 mutant와의 BC 생산능 비교

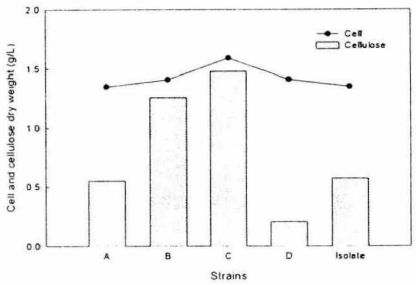

Figure 2. Bacterial cellulose production in a shaking culture by an isolated

strain and its mutants. A: Strain treated by 5 times UV-mutation, B: 6hr UV-mutation following A condition, C: Strain treated with cycloheximide after 4 times UV-mutation, D: 6hr UV-mutation following C condition.

사과분리 균으로부터 생산된 cellulose와 그 외 cellulose와의 XRD 비교

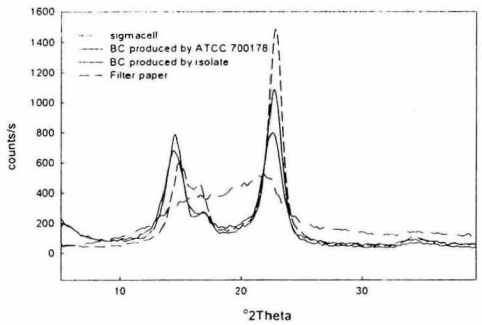

Figure 3. The diffractogram of sigmacell, bacterial cellulose, filter paper.

참고문헌

1) Tomoyuki Yoshino, Tomoko Asakura, Kiyoshi Toda, "Cellulose Production by *Acetobacter pasteurianus* on Silicone Membrane"(1996), *J. Ferment. Bioeng.*, 81(1), 32-36

2) Jayme G, Rothamal G, "Development of a Standard Centrifugal Method for Determing the swelling values of Pulps"(1948), *Papier* (Darmstadt), 2, 7-18

3) Dieter Klemn, Dieter Schumann, Ulrike Udhardt,Silvia Marsch, "Bacterial Synthesized Cellulose-Artficial Blood Vessels for Microsurgery"(2001), *Prog. Polym. Sci.*, 26, 1561-1603

4) E. J. Vandamme, S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, P. De Wulf, "Improved Production of Bacterial Cellulose and Its Application Potential"(1998), *Polym. Degrad. Stabil.*, 59, 93-99

5) Svein Valla and Johs Kjosbakken, 1981, "Cellulose-negative Mutants of *Acetobacter xylinum*"(1981), *J. General Microb.*, 128, 1401-1408