

Cellulomonas sp. KL-6의 증식에 미치는 열처리 및 항생물질의 효과

권오진* · 정영건

영남대학교 식품가공학과

초록: 농산폐섬유소 자원을 이용하여 세균 단세포단백질(single cell protein)을 생산하기 위한 연구로서 부엽토에서 분리된 *Cellulomonas* sp. KL-6의 증식에 미치는 열처리 및 항생물질의 효과에 대해 조사하였다. KL-6 균주는 65°C 에서 5분, 75°C 에서 1분 및 85°C 에서 15초까지 열처리시에는 증식하였고 그 이상의 온도에서는 처리시간에 관계없이 자라지 못하였다. 48°C 에서 10분간의 예비 열처리는 본 균주의 열저항성을 증가시키지 못하였다. 기질 중 casamino acid(1%), yeast extract(1%), xylose(5%)는 KL-6 균주의 열저항성을 증가시켰으나 cysteine (0.03 M), sodium citrate(1%), casein(1%)은 반대로 열저항성을 감소시켰다. KL-6 균주는 penicillin-G(1.536 µg/ml)와 ampicillin(3.125 µg/ml)에 감수성인 반면, kanamycin에 대해서는 200 µg/ml 이상에서도 강한 내성을 보였다. SDS 처리에 의해 kanamycin의 내성이 제거되었고 제거율은 9.2~31.2%로 각각 나타났다(1994년 5월 23일 접수, 1994년 8월 12일 수리).

서 론

단백사료 부족으로 인한 새로운 대체자원을 개발해야 할 필요성이 절실히 요청되고 있으며, 특히 단백질 자원의 고갈에 대비하기 위하여 각종 발효기질을 이용한 미생물의 단세포단백질(single cell protein, SCP) 생산이 주목을 끌게 되었다.¹⁻¹²⁾ 그러나 섬유소는 화학적인 분해반응이나 미생물에 의한 분해가 어려우며 효소의 작용을 거의 받지 않은 lignin이 결합되어 있어 미생물 cellulase로 분해시켜 직접 이용하거나 기타 발효기질로 이용하는데는 검토, 개발할 난제가 많은 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁸⁾

본 연구는 농산폐섬유소 자원을 발효기질로 사용하여 SCP를 생산하고 이를 가축의 단백질사료로 이용하기 위한 연구로서 저자들이 섬유소 분해력이 우수한 세균인 *Cellulomonas* sp. KL-6를 부엽토에서 분리한 바 있다. 그러나 자연계에서 분리한 *Cellulomonas* sp. KL-6가 실험실에서의 섬유소 분해력이 자연에서보다 훨씬 떨어지고, SCP의 생산수율도 적어 산업화 할 수 있을만한 균체량을 얻는 것이 필요하다 하겠다. 이는 KL-6 균주가 생산하는 섬유소 분해효소 중 세포외로 분비가 미약한 β-glucosidase를 세포외로 강력히 분비할 수 있는 균자체의 육종,

개발 등이나 섬유소 기질을 전처리하여 생산성을 향상 시킨다면 해결될 수 있을것으로 생각된다. 이에 본 연구자는 SCP의 생산성을 높이기 위한 일련의 방법에 적용시키기 위해 열 및 항생물질이 KL-6 균주의 증식에 미치는 영향과 항생물질 내성인자의 R-plasmid 유래 가능성에 대한 기초연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주

부엽토에서 분리하여 본 연구실에서 보관 중인 섬유소 분해세균인 *Cellulomonas* sp. KL-6를 사용하였다.

열처리 효과

Fedio와 Jackson¹⁹⁾의 방법에 따라 KL-6 균주를 CMC 배지(carboxymethyl cellulose sodium salt 10 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl₂ 0.1 g, Yeast extract 1.0 g, NaCl 6.0 g, distilled water 1 l, pH 7.2)에 접종하여 30°C 에서 50시간 진탕배양한 후 배양액을 10,000×g에서 원심분리하여 균체를 모아 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)에 2회 수세한 다음, 10 ml의 상기 완충액에 현탁하였다. 현탁액

Key words : *Cellulomonas* sp. KL-6, single cell protein, heat, antibiotic

*Corresponding author : O.-J. Kwon.

0.1 ml를 0.9 ml의 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 혼합하여 35~95°C(온도간격: 5°C)에서 1/4, 1/2, 1, 5, 10, 15, 30분 동안 열처리한 후, CMC 평판배지에 0.1 ml를 도말하여 균주의 생존유무로 열처리 효과를 확인하였고, 48°C에서 10분간 예비 열처리 효과도 살펴보았다. 접종 균수는 $10^7 \sim 10^8$ cells/ml였고 온도 대조군은 1 ml의 phosphate buffer가 각각의 처리온도까지 도달할 때로 하였다.

기질이 열저항성에 미치는 효과

Moats 등²⁰⁾의 방법에 준하여 10 ml의 시험관에 5.4 ml의 기질용액과 0.6 ml의 균 현탁액을 혼합하여 파라핀으로 완전히 밀봉하고 55°C의 수욕조에서 30분간 열처리하였다. 열처리한 접종관을 얼음물로 5°C까지 재빨리 냉각한 다음 0.85%의 saline 용액으로 희석하여 CMC 평판배지에서 30°C에서 50시간 배양하여 생성된 집락의 수로 기질이 열저항성에 미치는 효과를 조사하였다. 기질용액은 기질을 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)에 완전히 용해시켜 0.1 N NaOH로 pH 6.8~7.0으로 조절한 다음 0.2 µm filter로 여과하여 사용하였고 대조군은 기질용액 대신 균체증식 최적 배지(sucrose 5.0 g, (NH₄)₂HPO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl₂ 0.1 g, yeast extract 1.0 g, NaCl 6.0 g, distilled water 1 l, pH 7.0)와 phosphate buffer를 각각 사용하였다.

항생물질 내성검사

KL-6 균주의 항생물질 내성검사는 細菌學 實習提要²¹⁾에 준하여 실시하였다. 여러 농도의 항생물질이 포함된 균체증식 최적 평판배지에 균 현탁액 0.1 ml를 도말 후 30°C에서 50시간 배양하여 육안으로 증식을 관찰할 수 없는 최저농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 감수성치로 판정하였다. 항생물질은 시판되는 단백질생합성 저해작용을 가진 oxytetracycline, streptomycin, kanamycin, lincomycin, chloramphenicol, neomycin, gentamicin과 세포벽합성 저해작용을 가진 penicillin-G와 ampicillin을 사용하였으며, 농도는 ml 당 0, 0.195, 0.39, 0.781, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg로 하였다.

Sodium dodecyl sulfate(SDS)에 의한 R-factor 제거 효과

Hansen과 Olsen²²⁾의 방법에 따라 항생물질 내성인자를 R-plasmid 유래 가능성을 찾기 위해 KL-6 균주를 CMC 배지에 접종하여 30°C에서 50시간 진탕배양하였다. 배양액 0.1 ml를 SDS가 0~30 µg/ml 첨가된 curing medium에 접종하여 120 rpm에서 30°C, 3일간 curing 시킨 후, kanamycin (200 µg/ml)이 함유된 drug susceptibility test medium에 정량적으로 접종하여 kanamycin 무침 가구와의 집락수 차이를 계측하여 조사하였다. Curing

Table 1. Effect of heat treatments on the survival of *Cellulomonas* sp. KL-6

Heating temperature (°C)	Heating time (min)						
	1/4	1/2	1	5	10	15	30
Without preheating							
45	nt	nt	nt	+	+	+	+
55	nt	nt	nt	+	+	+	+
65	+	+	+	+	-	-	-
75	+	+	+	-	-	-	-
85	+	-	-	-	nt	nt	nt
95	-	-	-	-	nt	nt	nt
With preheating							
45	nt	nt	+	+	+	+	+
55	nt	nt	+	+	+	+	-
65	+	+	-	-	-	-	-
75	+	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	nt	nt
95	-	-	-	-	-	nt	nt

+, growth; -, no growth; nt, not test.

Preheating was carried out at 48°C for 10 min.

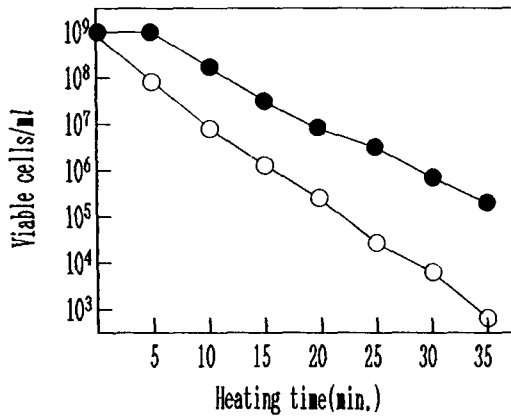


Fig. 1. Survivor curves of *Cellulomonas* sp. KL-6 after heating at 55°C. Cells were sealed in 5 ml ampoules and immersed in a water bath for designation times. ●-●, Optimum medium of the cell growth; ○-○, Phosphate buffer.

medium과 drug susceptibility test medium은 균체증식 최적 평판배지를 사용하였다.

결과 및 고찰

열처리 효과

KL-6 균주의 증식에 미치는 열처리 효과는 Table 1과 같이 KL-6 균주는 65°C에서 10분 이상, 75°C에서 5분 이상, 85°C에서 30초 이상에서 각각 처리했을 때 자라지 못하였고 95°C에서는 처리시간에 관계없이 증식이 저해되었다. 48°C에서 10분간의 예비 열처리는 본 균주의 열저항성을 증가시키지 못하였으며 오히려 저항성을 감소시켰다. Fedio와 Jackson¹⁹⁾은 고온 열처리전에 예비 열처리를 하면 균주의 열저항성이 다소 증가한다고 보고하였으나 본 실험의 결과는 상이하였다.

기질이 열저항성에 미치는 효과

Fig. 1은 55°C에서 35분 동안 KL-6 균주를 균체증식 최적 배지와 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)에 접종하여 균체수 변화를 본 것으로 열처리 시간이 경과할수록 균체수는 현저히 감소하였고 균체증식 최적 배지에서 보다 phosphate buffer에서 더 감소하였다. 이와 같은 결과는 KL-6균주가 열에 약한 단백질분자가 배지성분과의 복합작용으로 열에 대한 안정성이 증가하기 때문으로 생각된다.²⁰⁾ 기질이 KL-6 균주의 열저항성에 미치는 영향은 Fig. 1에서 비교적 열처리 효과가 인정된 55°C에서 30분 동안 열처리를 하여 조사하였다(Table 2). KL-

Table 2. Effect of substrates on the survival of *Cellulomonas* sp. KL-6 during heating at 55°C for 30 min

Substrate	Counts/ml	Survival rate ^{a)}
Unheated control		
KCM ^{b)}	1.3×10 ⁹	
Phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0)	1.5×10 ⁹	
Heated control		
KCM	1.0×10 ⁶	149.2
Phosphate buffer	6.7×10 ³	1.0
L-Amino acids (0.1 M)		
Arginine	3.5×10 ⁴	5.22
Cysteine (0.03 M)	5.1×10 ³	0.76
Glycine	5.8×10 ⁴	8.65
Lysine	3.0×10 ⁴	4.47
Phenylalanine	8.2×10 ³	1.22
Organic acids and NaCl		
Sodium citrate (1%)	5.4×10 ³	0.80
Sodium acetate (1%)	6.9×10 ³	1.03
Lactic acid (1%)	1.4×10 ⁴	2.09
NaCl (5%)	1.2×10 ⁴	1.79
NaCl (10%)	9.3×10 ⁴	1.39
Proteins and peptides (1%)		
Peptone	2.4×10 ⁴	3.58
Tryptone	4.5×10 ⁴	6.72
Casein	1.5×10 ²	0.02
Casamino acid	7.2×10 ⁴	10.74
Yeast extract	8.5×10 ⁴	12.69
Carbohydrates (5%)		
Glucose	5.4×10 ⁴	8.10
Sucrose	1.8×10 ⁴	2.96
Lactose	3.9×10 ⁴	5.82
Rhamnose	6.6×10 ⁴	9.85
Xylose	7.7×10 ⁴	11.49
Mannitol	1.1×10 ⁴	1.64
Fructose	9.7×10 ⁴	1.45

^{a)} Survival rate: Survivors in indicated substrate/survivors in phosphate buffer.

^{b)} KCM: Optimum medium of the cell growth.

6 균주는 아미노산 기질 중 cysteine이 첨가된 배지에서 glycine이나 arginine이 첨가된 배지에서 보다 열에 대한 저항성이약하였는데, 이는-S-S-결합이해리된cys-

teine이 열에 대해서 좀더 불안정하여 균주가 열에 대한 저항성을 가지지 못하게 하기 때문으로 사료된다. Sodium citrate를 첨가한 배지에서는 sodium citrate가 Mg²⁺

와 Ca^{2+} 이온을 유리시켜 열에 대해 안정하지 않았고 단백질과 펩티드기질에서는 일반적으로 열저항성이 강하게 나타났으나 casein이 첨가된 배지에서의 열저항성은 cysteine의 경우와 마찬가지로 약하였다. 당을 첨가한 배지에서는 비교적 열저항성이 강하게 나타났다. 본 실험의 전반적인 결과는 Moats 등²⁰⁾의 보고와 유사하였다.

항생물질 내성검사

각종 항생물질에 대한 내성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. KL-6 균주의 MIC는 penicillinase의 주된 기질로 사용되는 penicillin-G에서 1.563 $\mu\text{g/ml}$, β -lactamase에 안정한 penicillin-G의 유도체인 ampicillin에서 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 로 각각 나타나 감수성인 반면, aminoglycoside계 항생물질인 kanamycin에서는 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 나타나 본 균은 이 항생제에 강한 내성을 보였다. 이러한 결과는 본 균주를 직접 벗짚등 농산폐기물에 적용시킬때 그 분해를 지연시키는 kanamycin 감수성 미생물들의 증식억제에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

SDS에 의한 R-factor 제거효과

Table 3. Minimal inhibitory concentration of antibiotics on the growth of *Cellulomonas* sp. KL-6

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Oxytetracycline	50
Streptomycin	50
Kanamycin	>200
Lincomycin	6.25
Chloramphenicol	50
Neomycin	200
Penicillin-G	1.563
Ampicillin	3.125
Gentamicin	100

KL-6 균주가 강한 내성을 나타낸 kanamycin(>200 $\mu\text{g/ml}$)의 약제 내성인자를 R-plasmid 유래 가능성과 이 R-plasmid를 제거하기 위해 curing agent로 사용되는 SDS를 여러 농도별로 처리시켜 본 결과는 Table 4와 같다. SDS를 10~30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하였을 때 9.2~31.2%까지의 R-plasmid 제거율을 보여 SDS 처리에 의해 kanamycin 내성이 제거되었음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 김과 도²³⁾의 SDS(10~30 $\mu\text{g/ml}$) 처리에 의한 R-plasmid 제거율 18~48%보다는 다소 낮았지만 본 균주의 kanamycin 내성인자는 R-plasmid에 유래된다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Hitchner, E. V., and J. M. Leatherwood (1980) Use of a cellulase-derepressed mutant of *Cellulomonas* in the production of a single-cell protein product from cellulose, Appl. Environ. Microbiol., 39 (2), 382-386
- Han, Y. W., C. E. Dunlap, and C. D. Callihan (1971) Single cell protein from cellulosic wastes, Food Technol., 25(130), 32-35
- Peitersen, N. (1975) Production of cellulase and protein from barley straw by *Trichoderma viride*, Biotech. Bioeng., 17, 361-374
- 배부, 고영희 (1977) 농산폐차원의 미생물학적 이용에 관한 연구(제6보) 섬유소단세포단백 생산에서의 천연기질의 이용성, 산업미생물학회 지회지, 5(1), 18-23
- 산업연구원 (1984) 바이오매스의 에너지 전환기술, 산업정보시리즈 제18호, 1-34
- 이계호, 하진홍 (1973) Ethanol 이용 미생물에 의한 단세포단백질 생산에 관한 연구, 한국농화학회지, 16 (1), 1-11
- 변유량, 권태완, 지규만, 김춘수 (1972) 석유탄화수

Table 4. Effect of sodium dodecyl sulfate on the elimination of R-plasmid in *Cellulomonas* sp. KL-6

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	No. of colonies tested	No. of colonies cured	Ratio of cured colonies (%)
0	150	0	0
10	119	27	22.7
20	109	34	31.2
30	87	8	9.2

Means of duplicate determinations.

R-plasmid was eliminated by curing the cell with SDS at 30°C for 72 hrs. The number of cured cell was assayed by using the optimum medium of the cell growth dissolved Kanamycin (200 $\mu\text{g/ml}$).

- 소를 이용한 단세포 단백질의 생산에 관한 연구 V. 균체의 회수, 정제 및 예비 동물사육 시험, 한국식품과학회지 4(4), 252-258
8. 강신권, 성낙계 (1989) 감귤과피 압착액을 기질로 한 SCP 생산, 산업미생물학회지, 17(6), 556-562
 9. 이남석, 경규향 (1991) 배추를 이용한 단세포단백질의 생산, 산업미생물학회지, 23(5), 646-648
 10. 김병홍, 배무 (1977) 농산폐자원의 이용에 관한 연구 (제9보) 섬유소 단세포단백질의 아미노산 조성 및 그의 영양학적 가치, 산업미생물학회지, 5(4), 167-169
 11. 고영희, 이계조, 배무 (1977) 농산폐자원의 미생물학적 이용에 관한 연구 (제7보) 섬유소단세포단백질 생산의 scale up 방법의 검토, 산업미생물학회지, 5(2), 47-52
 12. 고영희, 이계조, 배무 (1977) 농산폐자원의 미생물학적 이용에 관한 연구(제8보) 섬유소단세포단백질 생산의 시험공장조업, 산업미생물학회지, 5(3), 119-125
 13. 이계호, 고정삼, 박성호 (1976) 농산폐기물에서 발효사료의 생산에 관한 연구(제3보) *Aspergillus niger*와 *Trichoderma viride* 에 의한 cellulase의 생산성에 관하여, 한국농화학회지, 19(3), 130-138
 14. 정기철 (1987) 섬유소분해효소 생산증진을 위한 *Penicillium verruculosum*의 균주개량, 산업미생물학회지, 15(6), 388-395
 15. 배무, 김병홍 (1973) 농산폐자원의 발효기질화 또는 직접 이용에 관하여, 한국영양식량학회지, 2(1), 61-66
 16. 이계준, 고영희, 배무 (1976) 농산폐자원의 미생물학적 이용에 관한 연구(제4보) 기질처리시의 알칼리·산중화 조건에 대하여, 산업미생물학회지, 4(3), 99-104
 17. Han, Y. W., and V. R. Srinivasan (1969) Purification and characterization of β -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*, J. Bacteriol., 100(3), 1355-1363
 18. Reese, E. T., M. Mandels (1980) Stability of the cellulase of *Trichoderma reesei* under use conditions, Biotech. Bioeng., 22, 323-335
 19. Fedio, W. M., and H. Jackson (1989) Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*, Letters in Appl. Microbiol., 9, 157-160
 20. Moats, W. A., R. Dabbah, and V. M. Edwards (1971) Survival of *Salmonella anatum* heated in various media, Appl. Microbiol., 21(3), 476-481
 21. 東京大學 醫學研究所篇 (1958) 細菌學 實習提要, p. 469, 東京, 日本
 22. Hansen, J. B., and R. H. Olsen (1978) Isolation of large bacterial plasmid and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG 5, J. Bacterol., 135(1), 227-238
 23. 김상달, 도재호 (1982) Ethidium bromide에 의한 *Streptomyces bobili* (YS-40)의 R-plasmid 제거, 산업미생물학회지, 10(4), 289-295

Effect of Heat Treatment and Antibiotics on the Growth of *Cellulomonas* sp. KL-6

Oh-Jin Kwon* and Yung-Gun Chung (Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea)

Abstract: For producing single cell protein from the agricultural waste, heat treatment and antibiotics on the growth of *Cellulomonas* sp. KL-6, isolated in rotting leaf and the adjacent soil mixture, were examined. The organism was able to grow until 5 min. at 65°C, 1 min. at 75°C and 1/4 min. at 85°C in gradually rising temperatures. It can be seen that preheating the suspension at 48°C results in a marked decrease in heat resistance. On heating at temperature of 55°C for 30 min., strain KL-6 was more resisted in the 0.1 M phosphate buffer when such substrates as casamino acid (1%), yeast extract (1%) or xylose (5%) were added to it whereas this organism was appeared weaker resistances in 0.1 M phosphate buffer when cysteine (0.03 M), sodium citrate (1%) or casein (1%) were in fused into it. Test strain was susceptible to penicillin-G (1.563 μ g/ml) and ampicillin (3.125 μ g/ml), but the organism was resisted to kanamycin (>200 μ g/ml). The treatment of strain KL-6 with sodium dodecyl sulfate (SDS) resulted in the elimination of R-plasmid from the host strain and the elimination rate with SDS (10~30 μ g/ml) was about 9.2~31.2%, respectively.