

생체발광균주 *Photobacterium phosphoreum*의 배양배지 및 최적 저장조건에 관한 연구

조동욱 · 전억한¹ · 김병용¹ · 김은기² · 함영태*

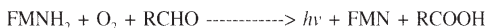
중앙대학교 생명공학과, ¹경희대학교 식품가공학과, ²인하대학교 생물공학과

본 연구에서는 *Photobacterium phosphoreum*의 배양 및 생체발광을 위한 최적 배지의 개발과 장기저장 후 생체 발광능의 회복을 위한 최적의 저장 조건을 확립하고자 하였다. *P. phosphoreum*을 배양하기 위한 배지로 Luria broth(LB) 배지를 변형한 modified LB(mLB) 배지를 개발하였다. mLB 배지는 Luria broth에 1.5%의 NaCl과 3%의 글리세롤을 보정, 첨가한 배지로, 미생물 생장 및 생체 발광량이 Nutrient broth 배지보다 약 25% 가량 높은 수치를 보여주었으며, 생장 대수기에서 생장 휴지기로 넘어갈 때 생체 발광량이 최고치에 달하였다. 30% 글리세롤을 첨가하여 -20°C, -70°C 및 액체질소에 3개월간 보관한 후, 배양하여 생장 및 생체 발광량을 조사한 결과에서는 -20°C 보관한 시료가 가장 좋은 결과를 보였다. 항 동결제로 5% adonitol을 첨가하여 동결 건조한 시료는 재 배양 시 adonitol을 첨가하지 않은 시료보다 16시간 이상 짧은 생장 유도기를 보여 주었고, 생체 발광량이 최고조에 달하는 시간도 빠르게 나타났다.

Key words □ adonitol, bioluminescence, *Photobacterium phosphoreum*,

Vibrio, *Photobacterium*, *Alteromonas*와 *Xenorhabdus* 속 등은 대표적인 생체발광 미생물로(1-3), 해양에서 분리된 미생물은 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas* 속이 포함되며, 담수와 토양에서 분리된 균에는 *Vibrio cholerae*(4)와 *Xenorhabdus luminescens*(5)가 있다. 이들 발광미생물 중에는 숙주생물과 공생생활을 하는 것도 있다(6). 미생물에서의 생체발광반응은 luciferase에 의하여 환원 상태의 flavin mononucleotide(FMNH₂)와 dodecanal과 같은 긴 사슬의 aliphatic aldehyde가 산소에 의하여 산화되는 과정에서 빛을 발한다. 따라서 미생물의 생체발광 반응은 산소와 에너지원, luciferase 그리고 긴 사슬의 fatty aldehyde를 필요로 한다. 이러한 반응은 다음과 같다(7).

luciferase



이러한 생체발광미생물은 많은 분야에서 그 활용성이 대단히 높다. 환경분야를 살펴보면, 일반적으로 오염의 분석을 분석 화학적 방법이나 동물실험에 의존하고 있으나, 분석 화학적 방법은 밝혀진 독성화학물질만을 측정할 수 있고, 동물 실험에서는 반응성이 민감하지 않아 극소량의 독성을 측정하기가 어렵고, 결과를 얻는데 장시간이 소요되는 단점이 있다. 따라서 생체발광미생물을 이용한 biosensor의 활용은 분석 화학적 방법이나 동물실험에 의한 분석의 문제점을 보완할 수 있으며, 실시간 분석이 가능하다(8). 이러한 생체발광을 이용한 기술의 응용은

1960년대 NASA 과학자들에 의하여 다른 행성에서의 생명체의 존재 여부 확인 및 의학적 활용을 위하여 처음으로 소개되었다(9). 최근에는 수질 검사나 의료진단 분야에서 생체발광시스템의 활용 연구가 활발하게 진행되고 있으며(10), 식품분야에서도 식품의 질과 저장성을 분석하는데 활용하고 있다(11,12). 따라서 본 연구에서는 생체발광미생물 중의 하나인 *P. phosphoreum*을 이용한 환경오염 측정 biosensor의 개발이 산업화될 시, 균주의 수급에 영향을 미치는 균주의 배양배지 및 장기저장의 최적 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양배지

균주는 생체발광현상을 나타내는 해양미생물인 *Photobacterium phosphoreum* (KCTC 2852)를 사용하였다.

*P. phosphoreum*을 배양하기 위한 배지로는 Nutrient Broth (NB) 배지와 modified LB(mLB) 배지를 사용하였다. NB 배지 조성은 liter 당 12.5 g Nutrient broth No.2, 5 g Yeast nitrogen base without amino acids, 3 ml 글리세롤, 25 g NaCl, pH 7.0이며, mLB 배지는 LB 배지에 글리세롤 0.3%, NaCl을 2.5%로 보정, 첨가하여 liter 당 20 g LB base, 3 ml 글리세롤, 15 g NaCl, pH 7.0이다. 장기저장 실험은 mLB 배지를 사용하였다.

균체량 및 생체 발광량의 측정

균체량의 측정은 분광 광도계(DU 650, Beckman, U.S.A)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배지 비교실험에서 균체량의 측정은 5 ml의 배지에 -70°C에 보관 중인 *P. pho-*

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 0334-675-04064
E-mail : ythahm@cau.ac.kr

*sphoreum*을 접종하여 하룻밤 배양하여 생장 대수기 상태에 있는 배양액 500 μ l를 500 ml의 배지에 접종하여 48시간 동안 20°C에서 진탕 배양(180 rpm)하며, 2 시간 간격으로 흡광도를 측정하였고, 생체 발광량의 측정은 매 8 시간마다 배양액 1 ml를 luminometer tube(Rohren-Tubes No. 55.476, 5 ml, Sarstedt Co., Ger.)에 취하여 Luminometer(LUMAT LB 9507, EG & G Berthold, Ger.)를 사용하여 생체 발광량을 측정하였다. 생체 발광량의 단위는 RLU(Relative Light Units)로, 10초당 1.0 ml의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다. 모든 시료는 상온에서 측정하였으며, 측정 시간은 0.1초로 하였다.

균주의 냉동 및 동결건조저장

저온저장용 균주는 고체 배지에 접종, 20°C에서 배양하여 단일 colony를 얻은 다음, mLB 액체배지 50 ml에 접종하여 20°C에서 180 rpm으로 하룻밤 배양하여 생장 대수기 상태에 있는 배양액을 screw cap tube(2.0 ml)에 700 μ l 씩을 넣고 글리세롤 300 μ l를 넣어 잘 혼합한 다음, -20°C, -70°C 및 액체질소에 12주간 보관하였다. 동결건조는 배양액 300 μ l를 2.0 ml screw cap tube에 담은 후, -70°C에서 1시간 동안 동결한 다음, 동결건조기(FDU-540, EYELA, Japan)를 사용하여 4시간 동안 동결건조 하였다. 동결 건조 후, 10분간 질소가스를 충전하여 상온에 3주간 저장하였다. 또한, 동결 건조 과정에서 항 동결제로서 adonitol(최종농도 5%)을 사용하였다.

냉동 및 동결건조저장 균주의 생장 및 생체 발광량 비교

각 온도별로 냉동 보관한 시료를 50 ml mLB 배지에 50 μ l 씩 접종하여 48시간 동안 180 rpm, 20°C에서 배양하며, 균체량과 생체 발광량을 측정하여 비교하였다. 상온에서 3주간 저장한 동결건조 시료는 mLB 배지 1 ml를 첨가하여 완전히 녹인 다음, 30% 글리세롤을 함유한 -70°C 보관 균주를 대조군으로 하여 처리 전 균체량을 기준으로 동일한 균체량을 환산하여 50 ml의 mLB 배지에 접종하여 배양하며 균체량과 생체 발광량을 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

*P. phosphoreum*의 배양 배지로 modified LB(mLB)의 개발

일반적으로 *Photobacterium* sp.는 해양, 해수면 또는 해양동물의 내장에 존재하며, 종종 해양 어류의 발광 기관에 공생하기도 한다. 이런 서식처의 환경 때문에 이들은 성장을 위하여 Na^+ 를 요구하는데, 적정 Na^+ 의 농도는 160~280 mM이며, 몇몇 종들은 해수 수준의 Mg^{++} (50 mM)과 Ca^{++} (10 mM)을 필요로 한다(13). 이런 조건에 기초하여 생체발광 미생물인 *Photobacterium* sp.를 배양하는 기본배지로 Basal medium(BM)을 사용하며, 그 조성은 liter 당 6.1 g(or 12.1 g) Tris-HCl, 1.0 g NH_4Cl , 0.075 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.028 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1/2 strength Artificial sea water base(ASW)이다. Artificial sea water base는 liter당 23.4 g NaCl, 24.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g KCl, 2.9 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 로 구성되어 있으며, pH 7.5로 맞추어 사용한다(14).

Photobacterium sp.는 yeast extract broth와 같은 복합배지에서 잘 성장하며, 막대 형태이다. Artificial seawater base와 0.2% D-glucose를 포함하는 yeast extract 고체배지나 Basal medium에서는 흰색의 colony를 형성하는 특징을 가지고 있다(15). 특히 생체발광현상을 보이는 종들을 배양하기 위하여 Luminescence medium(LM)을 사용하는데, BM에 0.3%(v/v) 글리세롤과 0.5% yeast extract, 0.5% 트립톤, 0.1% CaCO_3 를 첨가한다(16).

본 연구에서는 Luria broth(LB) 배지에 *P. phosphoreum*의 일반적인 배양 배지인 NB 배지와 동일하게 탄소원으로 글리세롤을 0.3% 농도로 첨가하고, 해양미생물인 *P. phosphoreum*의 생장에 필요한 Na^+ 을 조건에 맞추어 1.5% 보정, 첨가하였다. 이러한 mLB배지에서 균의 생장 및 생체 발광량을 NB 배지와 비교 분석한 결과, 생장 유도기 및 대수기에서 동일한 성장 양상을 보였으며, 생장 대수기에서 생장 휴지기로 넘어갈 때, mLB 배지에서 더 높은 세포 성장을 보여 주었고, 이에 따라 생체 발광량의 최고치는 mLB 배지에서 NB 배지에서 보다 25% 높은 값을 나타내었다(Fig. 1). 생체 발광량은 생장 대수기에서 균체 성장에 따라 증가하기 시작하여 생장 휴지기로 넘어갈 때에 최고조에 달하였고, 그 이후에는 급격히 감소하였다. 이상의 결과, *P. phosphoreum*을 위한 배지로 mLB 배지가 활용될 수 있는 가능성을 보여 주었다. 또한 NB 배지와 비교하여는, mLB 배지가 NB 배지 제조단가의 46.5%에 해당하여 비용절감 효과를 가져올 수 있다(Table 1).

최적 냉동 저장 온도

본 실험에서는 *P. phosphoreum*을 장기간 저장 후, 배양 시 최적의 생체 발광능을 가질 수 있는 저장 온도를 찾고자, *P. phosphoreum* 배양액을 일반적인 방법에 따라 글리세롤을 30% 첨가하여 -20°C, -70°C, 액체질소에서 12주간 보관하였다가, mLB 배지에서 48시간 동안 진탕 배양하며, 균 생장 및 생체

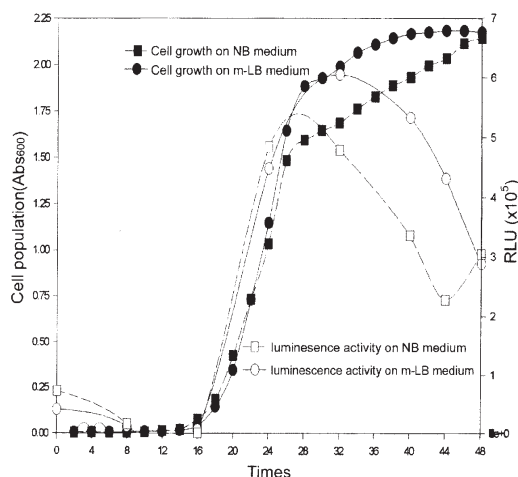


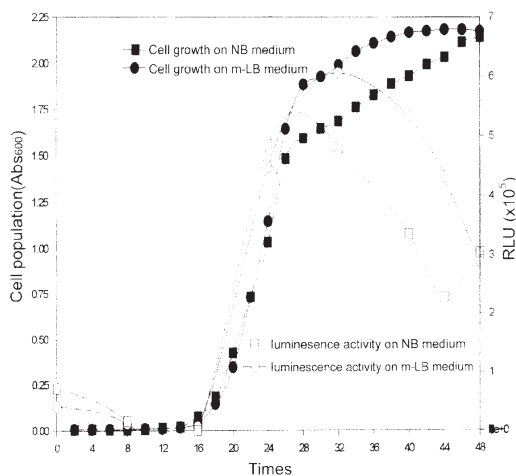
Fig. 1. Cell Populations and bioluminescent activities on a Nutrient Broth medium and a modified LB medium.

Table 1. Comparison between Nutrient Broth medium and Modified LB medium.

구분	조성	첨가량	가격 (원) ^a	제조	
				단가	%
Nutrient Broth medium	Nutrient broth No. 2	12.5 g/l	21,400/100 g	2.675	
	Yeast Nitrogen Base w/o a.a	5.0 g/l	74,500/100 g	3.725	
	Glycerol	3.0 ml/l	58,900/100 ml	1.767	
	NaCl	25.0 g/l	30,100/500 g	1.505	
				9.672	100
Modified LB medium	Luria Broth Base	20.0 g/l	91,400/Kg	1.828	
	Glycerol	3.0 ml/L	58,900/100 ml	1.767	
	NaCl	15.0 g/l	30,100/500 g	903	
				4.498	46.5

^aRefer to 1999 Sigma and Fluka Catalogs

발광량을 비교 분석한 결과, 생장 유도기는 -20°C 에 보관되었던 시료가 약 10시간으로 가장 짧았고, -70°C 와 액체질소에 보관되었던 시료들은 약 14시간으로 -20°C 에 보관 시 생장 유도기를 4시간 정도 단축시키는 결과를 보여주었다. 생체 발광량 역시 균 생장과 비례하여 생장 대수기에서 생장 휴지기에 접어들 때 최고치를 보였는데, -20°C 에 보관 시 최고조에 이른 시간이 빨리 오며 더 높은 수치를 보여주었다(Fig. 2). -70°C 와 액체질소 저장에서는 생장 대수기의 시간이 비슷한 것으로 나타났다. 생체 발광량은 균체량이 많은 -70°C 저장시료에서 좀더 높은 수치를 나타내었다. 본 실험 결과, 액체배양액을 냉동상태로 3개월 저장 시, -20°C 저장이 -70°C 저장이나 액체질소에서의 저장보다 균 활성 유지, 생장 유도기의 단축 및 생체 발광량에서 보다 좋은 결과를 보였다. 이러한 결과는 저온에서의 세포의 피해가 적은 것에 기인하는 것으로 사료된다.

**Fig. 2.** Cell populations and Bioluminescence activities of 30% Glycerol stocks stored at -20°C , -70°C and LN_2 .

김 등(17)은 2.5%(w/v) NaCl 용액 100 ml에 생장 대수기의 *P. phosphoreum* 배양액을 10%(v/v)로 접종하여 30일간 -20°C , -70°C , 4°C , 20°C 에 저장하며 3일마다 생균수를 측정 한 결과, -20°C , -70°C 에 냉동 저장한 세포의 경우, 측정 기간동안 일정한 값을 유지하였으나, 20°C 및 4°C 의 경우는 세포가 성장하여 각각 저장 3일, 6일 후 최고의 흡광도를 보였다. 이는 *Photobacterium* 속에 포함되는 모든 종들은 20°C 에서 성장을 할 수 있으며, *P. phosphoreum* 및 *P. angustum*의 몇몇 strain은 4°C 에서도 성장은 가능한 특성 때문이다(18). 따라서 3개월 정도의 중단기 저장에서는 세포의 성장을 억제하며, 저온 피해를 최소화 할 수 있는 -20°C 저장이 최적 저장조건으로 사료된다.

장기저장을 위한 동결건조의 처리 방법

장기저장을 위한 최적 저장 조건을 확립하기 위해 항 동결제를 첨가하는 방법을 연구하였다. 냉동시 세포보호를 위하여 항 동결제로 10% adonitol을 균 배양액과 1:1로 혼합하여 최종 농도 5%로 하여 동결 건조한 시료와 첨가치 않은 시료를 상온에서 3주간 보관한 후, 배지에 녹여 배양하며 균 생장과 생체 발광능을 비교한 결과, adonitol을 첨가한 균은 생장 유도기에서 생장 대수기로 넘어가는데 10시간 걸린 데 반하여, adonitol을 첨가시키지 않은 균은 26시간으로 생장 유도기 시간이 두 배 이상 늘어나 회복되는데 많은 시간이 소요되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 동결건조 시킨 시료에서도 생체 발광량은 생장 대수기에서 생장 휴지기로 넘어갈 때 최고조에 달하는 양상을 보여주어, 생체발광은 저장 방법에 관계없이 세포 생장 곡선 상에서 일정한 양상을 보여주었다. Adonitol을 첨가한 시료에서 생체 발광량이 최고도에 달한 시점 역시 생장 대수기에서 생장 휴지기로 넘어가는 집중 후 24시간 후로, 대조군으로 사용한 -70°C 보관 30% 글리세롤 첨가 시료와 adonitol을 첨가치 않은 시료에 비하여 빠르게 나타났다.

위와 같이 항 동결제의 첨가로 인하여 균 활성 및 생체 발광능이 유지되는 것은 일반적으로 사용되는 항 동결제인 글리세롤과 마찬가지로 adonitol이 냉동 및 건조 시 심한 탈수 현상을

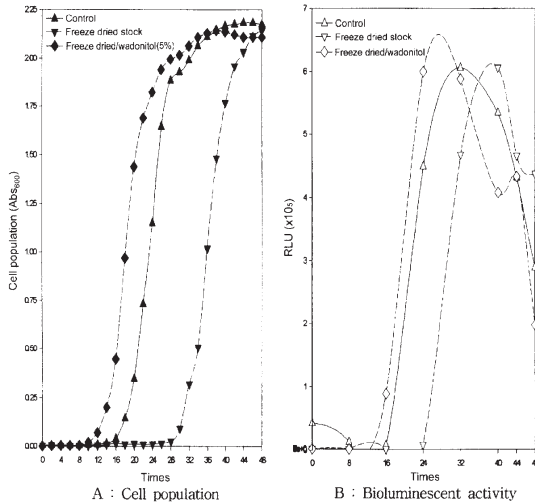


Fig. 3. Cell populations (A) and bioluminescent activities (B) of freeze-dried cell stock with and without 5% adonitol as cryoprotectant. Control is 30% glycerol stock stored at -70°C

방지하여 세포를 보호하며, 냉동 및 건조에 대한 세포의 감수성에 영향을 미치기 때문에 사료된다. 김(19)은 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium bifidum*의 생존율을 향상시키기 위한 실험에서 11% 탈지 우유에 adonitol을 0.75M로 첨가하여 항 동결제로 사용, 동결 건조하여 생존율을 조사한 결과, *Lactobacillus*의 경우 42.8%, *Bifidobacterium bifidum*은 32.3%의 생존율을 보여 탈지 우유만을 사용한 대조군에 비하여 생존율이 높아, 본 실험의 결과와 유사한 결과를 나타내고 있다. 현재 진행되고 있는 생체발광균주 *P. phosphoreum*을 이용한 환경오염 측정용 biosensor의 개발이 산업화되면, 산업현장으로의 정기적인 균주의 수급은 본 연구가 많은 도움을 주리라 사료된다.

감사의 글

이 연구는 산업자원부 공업기반기술사업의 지원금과 중앙대학교 교내 학술연구비의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김기일 . 1995. 동결 건조 *Lactobacillus casei* YIT 9018 과 *Bifidobacterium bifidum* 의 생존율 개선에 관한 연구 . 중앙대학교 석사학위 논문 .
- Nealson, K. H. and J. W. Hastings. 1979. Bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55, 123-142.
- Bowman, T. E. and F. Phillips. 1984. Bioluminescence in the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*, caused by pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 97, 526-528.
- Akhurst, R. J. and W. M. Brooks. 1984. The distribution of entomophilic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in North Carolina. *H. Invert. Path.* 44, 140-145.
- West, P. A., J. A. Lee, and T. N. Bryant. 1983. A numerical taxonomic study of species of *Vibrio* isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 263-283.
- Grimont, P. A. D., A. G. Steigerwalt, N. Boemare, F. W. Hickman-Brenner, C. Deval, F. Grimont, and D. J. Brenner. 1984. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic study of the genus *Xenorhabdus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 378-388.
- Hastings, J. W. and K. H. Nealson. 1981. The symbiotic luminous bacteria, p. 1322-1345. In Starr, M. P. H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria-1981*. Springer-Verlag, Berlin.
- Griffiths, M. W. 1996. The role of ATP bioluminescence in the food industry: New light on old problems. *Food Tech.* 6, 62-72.
- Shaw, J. J. and C. I. Kado. 1986. Development of a *Vibrio* bioluminescence gene-set to monitor phytopathogenic bacteria during the ongoing disease process in a non-disruptive manner. *Biotech.* 4, 560-564.
- Chappelle, E. W. and G. V. Levin. 1968. Use of the firefly bioluminescence reaction for the rapid detection and counting of bacteria. *Biochem. Med.* 2, 41-52.
- Engbrecht, J., K. Nealson, and M. Silveanu. 1983. Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32, 773-781.
- Kricka, L. J. 1988. Clinical and biochemical applications of luciferases and luciferins. *Anal. Biochem.* 175, 14-21.
- Stewart, G., T. Smith, and S. Denyer. 1988. Genetic engineering for bioluminescent bacteria. *Food Sci. Technol. Today* 3, 19-22.
- Reichelt, J. L. and P. Baumann. 1973. Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch. Microbiol.* 94, 283-330.
- Macleod R. A. 1968. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. *Adv. Microbiol. Sea* 1, 95-126.
- Zobell C. E. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes, *J. Mar. Res.* 4, 42-75.
- Cosenza B. J. and J. D. Buck. 1966. Simple device for enumeration and isolation of luminescent bacterial colonies. *Appl. Microbiol.* 14, 692.
- Kim, H. S., S. J. Jung, K. H. Chung, and U. H. Chun. 1999. The effect of storage temperature on the viability and Bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 14, 523-527.
- Bergey, D. H. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, p 539-545.

(Received February 15, 2000/Accepted March 8, 2000)

ABSTRACT: Studies on the Culture Media and the Optimal Storage Conditions of Bioluminescent Bacteria *Photobacterium phosphoreum*

Dong Wook Cho, Uk Han Chun¹, Byung Yong Kim¹, Eun Ki Kim², and Young Tae Hahm*
(Dept. of Biotechnology, Chung Ang University, Ahnsung 456-756, Korea, ¹Dept. of Food Science and Technology, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea, ²Dept. of Biotechnology, In Ha University 402-751, Inchun, Korea)

Vibrio, *Photobacterium*, *Alteromonas* and *Xenorhabdus* species are capable of emitting light, called bioluminescence. They exist in marine, freshwater and terrestrial environments. Bacterial bioluminescent reaction is that reduced riboflavin phosphates and a long-chain aldehyde are oxidized in the presence of molecular oxygen and enzyme luciferase. This experiment aims to develop the proper culture media and to optimize the storage condition for the recovery of bioluminescent activity in *Photobacterium phosphoreum*. The Luria broth (LB) medium was modified for cultivation of *Photobacterium phosphoreum*, called as modified LB (mLB) medium. The mLB medium is LB fortified with 3% glycerol and 1.5% NaCl. In mLB medium, bacterial growth and bioluminescent activity are 25% higher than those in a Nutrient broth medium. When the cell stocks were stored at -20°C, -70°C and LN₂ for 3 months, cell growth and bioluminescent activity of culture after stored at -20°C were better than those of other treatments. The highest bioluminescent activity obtained at the late exponential phase in all treatments. When the cell stock was freeze-dried with 5% adonitol as a cryoprotectant, the recovery of cell was better than those of control and freeze-dried cell stock without addition of cryoprotectant.