

Trehalose가 발광미생물의 동결건조시 생존 및 발광강도에 미치는 영향과 첨가방법에 대한 연구

박지은, 장덕진

명지대학교 청정기술원 및 환경·생물공학과

전화 (0335)330-6340, FAX (0335)337-2902

Abstract

In this work, effects of trehalose on the recovery of bioluminescence and viability of *luxAB*-containing recombinant bacteria were investigated. In case of a recombinant, UV2, only 2.5% of bioluminescence and 2.7% of cell viability were restored after 3.5hr of freeze-drying without trehalose, which implies that cells were heavily damaged during the dehydration. To improve these losses, trehalose was added before freeze-drying on different modes. Trehalose increased the bioluminescence and viability of freeze-dried UV2 in all conditions tested and it was observed that addition of trehalose into the broth (final concentration, 0.08M) for 15min before the freeze-drying resulted in 45% of bioluminescence and 50% of cell viability. For the other luminescent recombinant, YH9, trehalose showed a similar efficacy.

서론

동결건조는 미생물이나 식품, 의약품의 보존과 저장의 방법으로 널리 사용되고 있으나 단백질의 변성이나 미생물의 경우 생존력이 급격히 감소하는 등의 부작용을 초래한다. 이들 부작용을 줄이기 위해서 동결건조시 보존제로서 glucose, sucrose, maltose, trehalose, skim milk 등을 첨가하며 이 중 trehalose가 동결건조시 탁월한 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. Trehalose는 1861년 곤충의 자낭균에서 발견된 이후 세균, 곰팡이, 버섯, 효모 그리고 일부 식물체 등에서 발견되는 비환원성 이당류(Glucose- α (1 \rightarrow 1)-glucose)로서 주로 영양분의 고갈, 고온, 산소 결핍, 삼투압 등 다양한 종류의 물리 화학적 외부 충격에서 비롯되는 영향으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다¹⁾. Trehalose의 보존제로서의 반응기작은 크게 2가지 가설이 있는바, trehalose가 세포의 단백질과 세포막 인지질과 수소결합을 하여 세포의 구조를 그대로 유지시켜 건조상태가 되어도 세포를 보호하거나²⁾ 또는 trehalose가 glass matrix를 형성하여 동결하는 동안 형성된 얼음결정으로부터 세포를 보호한다고 알려져있다³⁾. 본 연구에서는 trehalose가 동결건조된 발광 미생물의 발광량과 세포 생존율을 보존하는데 효과가 있는지 살펴보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 연구에서는 한국의국어대학교 이규호 교수팀이 발광형질을 부여하기 위하여 야생 균주에 *luxAB*를 도입한 재조합 미생물 UV2와 YH9을 사용하였으며 UV2는 LB배지에 YH9은 R2A배지에 30℃, 200rpm에서 진탕배양하였다. *luxAB*가 삽입된 균주를 selection하기 위하여 UV2는 ampicillin(100 μg/mL)을 YH9은 tetracycline (7.5 μg /mL)을 첨가하였다.

발광량 및 CFU 측정

UV2와 YH9은 *luxAB*만을 삽입했기 때문에 빛을 내기 위해서 substrate를 인위적으로 첨가해주어야 한다. Substrate로는 n-decyl aldehyde를 사용하였으며 UV2는 0.33%, YH9은 0.01%의 농도로 배지에 희석하여 사용하였다. 발광량의 측정은 luminometer(Tuner, TD-20/20)를 사용하였으며, 동결건조한 균주는 30 μL의 배지에 재현탁한 후 발광량을 측정하였다. CFU는 항생제가 포함된 agar 배지에 도말한 후 30℃에서 48시간 동안 배양하여 colony가 형성된 후 이를 계수하였다. 발광량과 CFU를 위의 방법으로 동결건조 전·후로 측정하여 이를 비교하였다.

동결건조

동결건조는 대수성장기의 균주를 trehalose와 혼합한 현탁액을 바로 동결건조를 시행한 것과 현탁액을 30℃에서 15분동안 진탕배양한 후 동결건조를 시행한 것, 그리고 trehalose가 첨가된 배지에 약 6~7시간 가량 배양한 후 배양액을 동결건조를 시행한 것으로 3가지로 나누어서 실험을 진행하였다. 이들 trehalose를 함유한 균주를 30 μL씩 384-well plate에 넣고 액체질소에 5분 동안 예비 동결시킨 후 3시간 30분 동안 동결건조를(Heto) 시행하였다.

결과 및 고찰

위의 3가지 방법으로 동결건조한 결과, UV2의 경우 대수성장기의 균주에 trehalose를 혼합한 후 바로 동결건조한 경우 최적농도가 0.33M로 조사되었으며, 이때 발광량과 CFU의 회복율이 각각 40.4%, 39%였고(Fig. 1), 대수성장기의 균주에 trehalose와 혼합한 현탁액을 15분 동안 진탕배양한 후 동결건조한 경우 최적농도가 0.08M 이상으로 조사되었으며, 이때 발광량과 CFU의 회복율은 약 45%, 50%(Fig. 2), 그리고 trehalose가 첨가된 배지에 6~7시간 가량 배양 후 배양액을 동결건조한 경우 최적농도가 0.16M로 조사되었으며, 이때 발광량과 CFU의 회복율이 각각 40.4%, 39%(Fig. 3)로 측정되었다. 또한 trehalose가 첨가된 배지에 배양한 경우 삼투압으로 인하여 0.2M 이상에서는 성장하지 않았다. YH9의 경우 대수성장기의 균주에 trehalose를 혼합한 후 바로 동결건조한 경우 최적농도가 0.16M로 조사되었으며, 이때 발광량과 CFU의 회복율이 각각 26.9%, 27.7%였고(Fig. 4), trehalose를 혼합한

현탁액을 15분 동안 진탕배양한 후 동결건조한 경우 최적농도가 0.16M로 조사되었으며, 이때 발광량과 CFU의 회복율은 48.7%, 54.1%(Fig. 5), 그리고 trehalose가 첨가된 배지에 6~7시간 가량 배양 후 배양액을 동결건조한 경우 최적농도가 0.16M로 조사되었으며, 이때 발광량과 CFU의 회복율이 각각 31.5%, 33.7%로(Fig. 6) 측정되었다. 그리고 YH9도 UV2와 마찬가지로 trehalose가 첨가된 배지에 배양한 경우 삼투압으로 인하여 0.2M 이상에서는 성장하지 않았다. Trehalose를 첨가한 3가지 방법을 비교할 때 trehalose를 첨가하고 15분 동안 진탕배양한 현탁액이 가장 우수한 회복율을 보이고 trehalose를 첨가한 배지에 6~7시간 가량 배양한 배양액, 그리고 trehalose가 혼합된 현탁액을 바로 동결건조한 순서가 회복율이 우수한 순서로 조사되었다. Trehalose는 동결건조시 세포내 세포질에서 보존제로서의 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다.²⁾ 본 실험의 결과로 미루어 trehalose의 보존제로의 기능을 높이기 위해서는 trehalose가 세포질로 들어갈 시간이 필요한데 배지에 첨가할 경우 삼투압으로 인해 성장이 저해되므로 대수성장기의 균주에 trehalose를 첨가하고 어느 정도의 시간 동안 진탕배양한 후 동결건조를 시행하는 것이 최적의 방법이라고 사료된다.

요약

제조합 발광미생물인 UV2와 YH9을 보존제로서 trehalose를 혼합한 현탁액을 바로 동결건조한 것과 이 현탁액을 30°C incubator에서 15분 동안 진탕배양한 후 동결건조한 것과 trehalose가 첨가된 배지에 약 6~7시간 정도 배양한 배양액을 동결건조한 결과, trehalose를 첨가한 후 15분 동안 진탕배양했을 경우가 UV2는 0.08M의 이상에서 약 45.0%, 50.0%, YH9은 0.16M에서 48.7%, 54.1%로 회복율을 가장 높이는 최적의 조건으로 조사되었다.

사사

본 연구는 환경부 환경공학기술개발사업(자동수질측정장치개발) 및 BK21 사업단의 도움으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Eleutherio, E. C. A., Araujo, P. S. and Panek. A. D., "Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*", 1993, *Cryobiology*, 30, 591~596.
2. Samuel B. Leslie, Eitan Israeli, Bruce Lighyhare, John H. Crowe, and Lois M. Crowe, "Trehalose and sucrose protect both membrane and proteins in intact bacteria drying", 1995, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3592~3597.

3. Fabio Librizzi, Eugenio Vitrano, and Lorenzo Cordone, "Dehydration and crystallization of trehalose and sucrose glasses containing carbomonoxy-myoglobin", 1999, *Biophys. J.*, 76, 2727~2734.

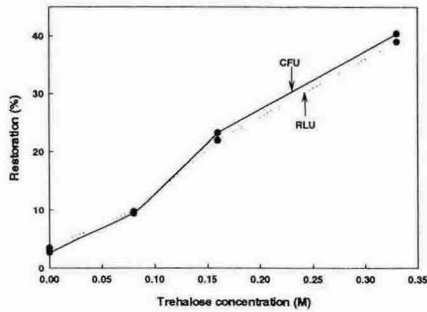


Fig. 1. Luminescence and CFU of UV2 following freeze-drying. Trehalose was added right before the freeze-drying.

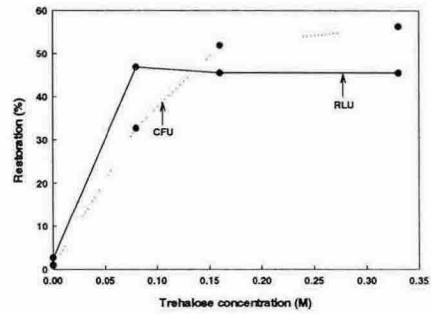


Fig. 2. Luminescence and CFU of UV2 following freeze-drying. Trehalose added broth incubated for 15min at 30°C before the freeze-drying.

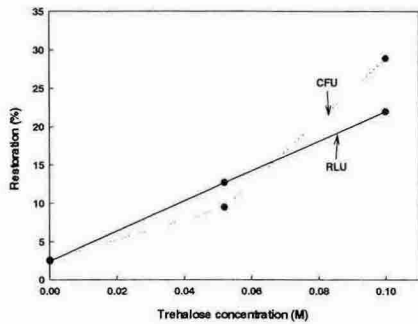


Fig. 3. Luminescence and CFU of UV2 following freeze-drying. Cell were cultured in medium with trehalose for 6~7hr at 30°C.

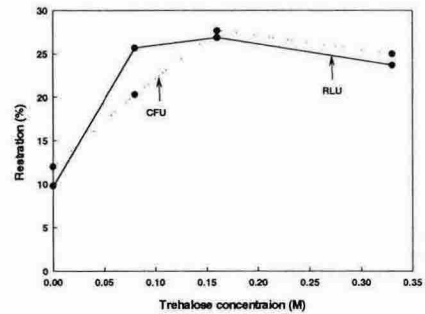


Fig. 4. Luminescence and CFU of YH9 following freeze-drying. Trehalose was added right before the freeze-drying.

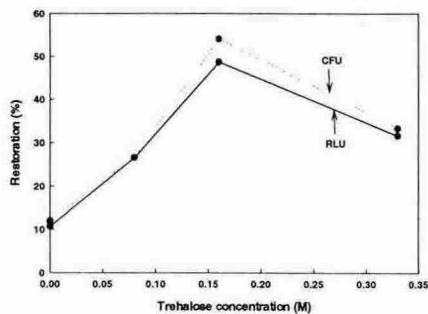


Fig. 5. Luminescence and CFU of YH9 following freeze-drying. Trehalose added broth incubated for 15min at 30°C before the freeze-drying.

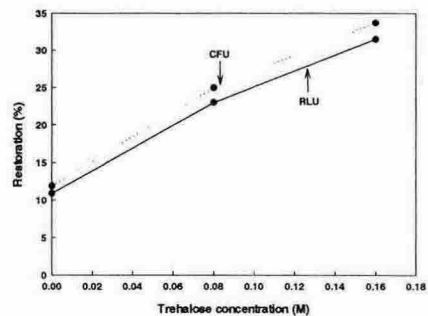


Fig. 6. Luminescence and CFU of YH9 following freeze-drying. Cell were cultured in medium with trehalose for 6~7hr at 30°C.