

## 저장 온도에 따른 고정화 *Photobacterium phosphoreum*의 Bioluminescence 안정성의 변화

김 현 숙 · 이 은 수 · 정 성 제 · 유 승 오 · †전 역 한  
경희대학교 생명자원과학부 식품가공학과  
(접수 : 1998. 11. 21, 게재승인 : 1999. 2. 22.)

### The Effect of Temperature on the Stability of Bioluminescence from Immobilized *Photobacterium phosphoreum*

Hyun-Suk Kim, Eun-Su Lee, Sung-Je Jung, Seong-O Yoo, and Uck-Han Chun†  
Department of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science,  
Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea  
(Received : 1998. 11. 21., Accepted : 1999. 2. 22.)

The objective of this work was to improve bioluminescence stability of *Photobacterium phosphoreum* when it stored in view of developing continuous on-line monitoring system for pollutants. Long-term experiments were made to determine the effect of immobilization and storage temperature on the maintenance and stability of bioluminescence from luminescent bacteria. The immobilized cells of *P. phosphoreum* were compared with free cells in terms of maintenance of bioluminescence at room temperature. The bioluminescence of cells immobilized showed higher bioluminescence intensity than free cells and strontium alginate is the suitable matrix for the long term stable maintenance of bioluminescence. The effect of temperature on the bioluminescence stability was investigated with free and immobilized cells stored at 20°C, 4°C, -20°C and -70°C for 20 days. Both free and immobilized cells stored at 4°C emitted a stable bioluminescence while the bioluminescence markedly decreased with those stored at 20°C, -20°C and -70°C.

Key Words : *Photobacterium phosphoreum*, immobilization, bioluminescence

#### 서 론

최근 발광 미생물을 이용한 수체의 독성물질 측정에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이는 독성물질에 대한 반응이 신속, 정확할 뿐 아니라 재생산성이 좋아 연속적으로 이용 가능하기 때문이다(1). 해양 미생물인 *Vibrio fischeri*, *Photobacterium*, *Alteromonas*와 *Xenorhabdus* 등이 대표적인 발광 미생물로서 생체발광 반응에는 luciferase 효소가 관여하고 있으며, 긴 사슬의 aldehyde와 riboflavin mononucleotide(FMNH<sub>2</sub>)의 산화가 이루어져 반응 결과 빛을 발하게 된다(2). 다른 발광 미생물들과 달리 *Photobacterium phosphoreum*은 4°C의 낮은 온도에서도 성장과 저장이 가능해 저온의 수질도 monitoring할 수 있다는 장점이 있어 많은 연구가 이루어지고 있다. *P. phosphoreum*을 이용한 독성물질 검사의 예로 Microtox 측정시스템이 있으며,

그 원리는 산업폐수 등에 함유된 화학물질의 독성에 의해 *P. phosphoreum* 세포의 대사·생리활동이 저하되어 bioluminescence intensity가 감소되며, 그 EC<sub>50</sub>등을 측정하는 것으로서, 이 때 감소된 bioluminescence는 독성물질에 대한 지시기능(indicator)을 한다. 실제 *P. phosphoreum*을 독성물질 연속 측정에 이용하기 위해서는 bioluminescence 안정성을 높여 독성물질에 대한 반응성을 향상시키는 일이 선행되어야 한다. 본 연구에서는 *P. phosphoreum*의 bioluminescence 안정성을 오랫동안 유지시키기 위한 수단으로 고정화 방법을 이용하였다. 독성물질 검사를 위한 고정화의 경우, 독성물질과 화학반응을 일으키거나 분해되지 않는 분산성이 좋은 불용성 물질이어야 하며, 특히 발광 미생물의 경우 빛 투과성이 고려되어야 한다(3). 이러한 조건을 만족시키는 고정화 matrix로 sodium alginate가 제안되고 있다(1,6). Sodium alginate는 strontium chloride와 함께 결합하여 조직이 안정화되며 고정화 과정이 비교적 간단하고, matrix 내에서의 세포 생장이 가능할 뿐 아니라, 발광 미생물의 경우 bioluminescence metabolism을 해치지 않고 오히려 유지되도록 돕는다(3, 7). 고정화한 발광 미생물의 bioluminescence를 안정하게 오랜 기간 유지하는 데 있어 가장 중요한 것은 저장 온도다. 온도는 미생물의 성장과 생존에 가장 큰 영

† Corresponding Author ; Department of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea  
Tel : 0331-201-2626, Fax : 0331-204-8116,  
e-mail : uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

향을 주는 환경 인자이며, 특히 발광 미생물의 경우 발광 메커니즘에 관여하여 bioluminescence 안정성에 많은 영향을 미친다(8). 따라서 발광 미생물 저장 시 bioluminescence를 최대한 유지시킬 수 있는 적정온도의 선정이 필요하다. 본 연구에서는 *P. phosphoreum*의 bioluminescence 안정성을 향상시킬 수 있는 고정화 조건과 저장 온도를 조사하였다.

**재료 및 방법**

**균주 및 배양방법**

본 실험에 사용된 bioluminescent bacteria는 *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852로서 NaCl이 함유된 배지에서 배양하였다. 액체 배지에서 12~14시간 배양한 집중균의 세포 농도는 0.5~0.8A<sub>660</sub>이며, 이를 10%(V/V) 접종하여 20℃, 100rpm의 교반 배양기 (Vision Scientific Co., K.M.C.-8480SF, Korea)에서 배양하였다. NaCl이 함유된 배지의 조성은 Table. 1에 나타내었다. 각 시약은 Fluka, Duksan Co., Difco Co, Sigma Co.를 사용하였고, pH는 0.1M potassium phosphate buffer를 사용하여 7.0으로 조절하였다.

Table 1 Composition of Culture medium containing NaCl

Components	Concentration
Nutrient broth No 2 (meat peptone 43g/l, casein peptone 43g/l, sodium chloride 6.4g/l)	15g
Sodium chloride	25g
Yeast nitrogen base(without amino acid)	5g
Glycerol	3mL
	Distilled water to 1L

**세포농도 측정**

집중균을 10%(V/V) 접종하여 배양한 세포를 2.5%(W/V) NaCl용액과 1:2(V/V) 비율로 희석하여 cuvette에 1mL 취한 후, UV-visible spectrophotometer (Shimadzu Co, UV-1201, Japan)를 사용하여 660nm에서 실온 측정하였다.

**세포의 고정화**

고정화 물질로 sodium alginate (Hayashi Co Ltd, Japan)를 사용하였으며, strontium chloride(Sigma Co., U.S.A.)의 첨가 유무에 따라 strontium alginate와 sodium alginate로 구분하였다. Sodium alginate와 strontium chloride용액은 2.5%(W/V) NaCl용액으로 제조, 4℃에 보관 후 사용하였으며, 모든 고정화과정은 20~22℃에서 이루어졌다. 10%(V/V) 접종하여 세포농도가 0.5~0.6A<sub>660</sub>에 이를 때까지 12~14시간 배양한 세포를 2.5%(W/V) NaCl용액으로 10<sup>2</sup> 희석한 후, 2.5%(W/W) sodium alginate와 1:9(V/V)의 비율로 혼합하였다. Strontium alginate 고정화의 경우, 세포와 sodium alginate 혼합액에 동량의 0.3M(W/V) strontium chloride용액을 첨가한 후, 불투명한 반구형의 gel이 형성되도록 15분간 상온에 방치해 두었다.

**Bioluminescence 측정**

Bioluminescence 측정기구로 Berthold (Germany)로부터 구

입한 luminometer (Lumat. LB, 9507)와 luminometer tube (Sarstedt Rohren-Tubes No.55.476, Germany) (75×12mm, 5mL)를 사용하여 0.1초간 상온에서 측정하였다. Free cell의 경우 10%(V/V) 접종하여 세포농도가 0.5~0.6A<sub>660</sub>에 이를 때까지 12~14시간 배양한 세포를 2.5%(W/V) NaCl용액으로 10<sup>3</sup> 희석한 후 동일한 방법으로 측정하였다. Luminometer로 측정된 최초 bioluminescence intensity (RLU)를 100%로 환산하였다.

**저장**

-70℃, -20℃, 4℃, 20℃를 저장 온도로 설정하였으며, 저장 기간은 1~20일로 하였다. -70℃, -20℃의 경우, cryoprotectant로서 멸균된 glycerol (Difco Co. Ltd., U.S.A.) 200μl를 첨가하여 저장하였다. 이 때 시료의 수분 증발을 막기 위해 sealing film (Whatman, Cat No.2150663)으로 밀봉 처리하였다.

**결과 및 고찰**

**세포 농도에 따른 bioluminescence intensity**

세포 농도와 *P. phosphoreum*의 bioluminescence intensity 간에 상관성을 조사하기 위하여 세포 농도와 bioluminescence를 측정하였다. 액체 배지에서 12~14시간 배양하여 0.5~0.8A<sub>660</sub>인 세포를 집중균으로 사용하였으며, 이를 10%(V/V) 접종 후 2시간 단위로 18시간 동안 측정하였다. 세포 농도와 bioluminescence측정에 있어 세포의 희석 배율을 달리하였다. 세포농도 측정의 경우 10%(V/V) 접종하여 배양한 세포의 농도가 1.0A<sub>660</sub>를 넘지 않도록 2.5%(W/V) NaCl용액과 1:2(V/V)의 비율로 희석하였으며, bioluminescence 측정의 경우 세포를 10<sup>4</sup> 희석하였다. Bioluminescence intensity가 최고 값에 도달한 것은 세포 농도가 0.5~0.8A<sub>660</sub>인 세포를 접종한 후, 12시간이 지나서였으며 이 때의 세포농도는 0.58A<sub>660</sub>이었다. 세포 농도는 12시간 이후에도 계속 증가하였으나 bioluminescence는 오히려 감소하였다. 이러한 현상은 inner filter 효과로 설명될 수 있다. 발광 미생물은 빛을 발산할 뿐 아니라 흡수 또는 분산하기 때문에 일정 시간이 지나면 세포 농도와 관계없이 bioluminescence의 감소를 보이는 것으로 사료된다(9).

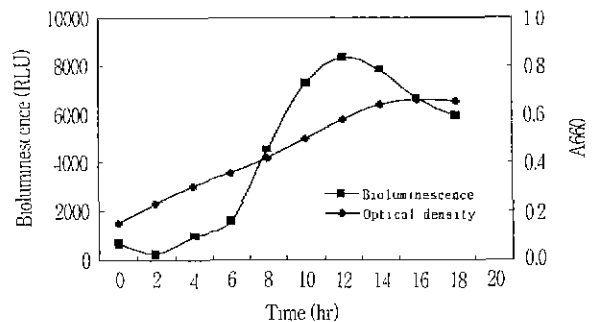


Figure 1. The growth curve and bioluminescence intensity. The maximum bioluminescence intensity was appeared at 12 hrs at which concentration of cell was 0.85A<sub>660</sub>. The bioluminescence emission then decreased although the cells were still growing probably due to the inner filter effect in which bioluminescent cultures not only emit light but also absorb and scatter it.

**고정화 세포의 bioluminescence intensity**

세포의 고정화에 있어 가장 중요한 것은 고정화 물질의 선택이다. 발광 미생물의 경우 bioluminescence를 오랫동안 유지시켜 줄 수 있어야 한다(3). 이와 같은 조건을 만족시켜 주는 고정화 물질로서 sodium alginate와 strontium chloride를 사용하였다(3,7). 세포와 2.5%(W/W) sodium alginate 혼합액에 동량의 0.3M(W/V) strontium chloride용액을 첨가한 후 상온에서 90분 동안 bioluminescence 변화를 측정하였다. 열은 황색의 반투명한 액체인 sodium alginate는 strontium chloride의  $Sr^{2+}$  이온과 결합하여 접촉면부터 서서히 백색의 불투명한 gel을 형성하였으며 약 15분이 소요되었다. Sodium alginate와 혼합한 세포의 경우, 시간이 지나면서 bioluminescence의 감소를 나타낸 반면, strontium alginate로 고정화한 세포의 경우 strontium chloride용액 첨가 직후 bioluminescence의 감소를 보였으나, sodium alginate와 strontium chloride용액의 반응이 진행됨에 따라 bioluminescence가 증가하여 15분 경과 후 87%의 bioluminescence 유지도를 나타내었다. 이는 Strontium chloride의  $Sr^{2+}$  이온이 sodium alginate의 구성 성분인 L-guluronic acid와 결합하여 세포의 자유로운 이동을 막아 높은 bioluminescence 유지도를 보인 것으로 사료된다.

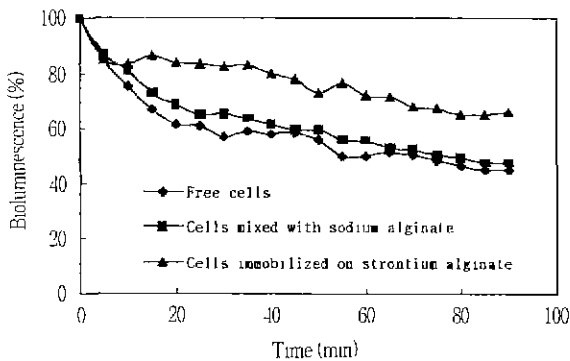


Figure 2. The profile of bioluminescence intensity during immobilization process. The bioluminescence of immobilized cells on strontium alginate was comparatively maintained during the immobilization process while free cells showed decay of bioluminescence in 90 min by about 40% indicating immobilization with strontium alginate was suitable for maintenance of bioluminescence.

**고정화 후 strontium chloride 상층액의 영향**

Strontium chloride는  $Sr^{2+}$  이온만이 gel내부로 침투하여 sodium alginate와 L-guluronic acid와 결합한다(3). 이 때 sodium alginate와 반응하지 않은  $Cl^-$  이온은 gel내부로 침투되지 못하고 상층액으로 존재하게 된다. 따라서 strontium chloride 상층액의 제거에 따른 bioluminescence를 비교하여 잔류하는 strontium chloride용액이 bioluminescence 안정성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 잔류하는 strontium chloride용액을 완전히 제거한 후 bioluminescence변화를 90분 동안 측정하였다. 측정 2분 경과 시 strontium chloride 상층액을 제거한 경우, 10%의 bioluminescence가 감소하여 strontium chloride를 그대로 둔 경우 보다 3배나 높은 감소율을 나타내었다. 시간이 지남에 따라 감소율의 차이는 현격히 드러났으며 90분이 경과되면서

strontium chloride 상층액을 제거한 경우 60% 정도의 bioluminescence가 소실되었다. 이와 같이 strontium chloride 상층액이 존재할 때 더 좋은 결과를 보인 것은 고정화가 완성된 시점에서 strontium chloride 상층액이 세포의 bioluminescence 안정성에 관여하며, 이는 상층액이 외부 환경 인자들로부터 세포를 보호해주는 완충 역할을 하는 것으로 사료된다

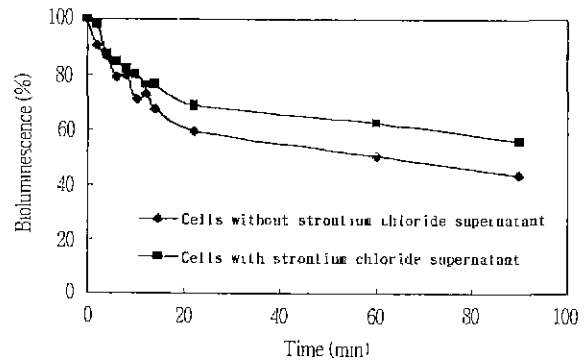


Figure 3 The effect of strontium chloride supernatant on the bioluminescence with immobilized cell. The bioluminescence markedly decreased when residual strontium chloride solution was removed from the test tube containing immobilized cells, on the other hand, bioluminescence was more stably maintained with strontium chloride supernatant for 90 min.

**저장 온도에 따른 bioluminescence intensity**

온도는 미생물의 성장과 생존에 가장 중요한 요소로서, 특히 발광 미생물의 경우 발광 metabolism에 영향을 주어 bioluminescence의 변화를 일으킨다(8). 저장 온도와 bioluminescence intensity의 관계를 알아보기 위해 free cell 및 sodium alginate와 strontium alginate로 고정화한 세포를  $-70^{\circ}C$ ,  $-20^{\circ}C$ ,  $4^{\circ}C$ ,  $20^{\circ}C$ 에 저장하여 20일 동안 bioluminescence변화를 살펴보았다.  $-70^{\circ}C$ ,  $-20^{\circ}C$ ,  $20^{\circ}C$ 의 경우 1일 저장 시 free cell과 고정화한 세포 모두 90% 이상의 bioluminescence 감소율을 나타냈으며, 동일한 조건의 세포일지라도 저장 온도에 따라 bioluminescence 감소 정도에 차이를 나타내었다.  $20^{\circ}C$ 의 경우 strontium alginate로 고정화한 세포가 다소 적은 감소율을 나타낸 반면,  $-70^{\circ}C$ 의 경우 free cell이 고정화한 세포보다 더 높은 안정성을 나타내었다.  $-20^{\circ}C$ ,  $20^{\circ}C$ 에서는 저장 2일 후에,  $-70^{\circ}C$ 에서는 8일 후에 bioluminescence의 생성이 전혀 일어나지 않았다. 20일 동안 가장 안정된 bioluminescence intensity를 보인 것은  $4^{\circ}C$ 로서 bioluminescence를 50% 정도 유지할 수 있는 최대 기간은 free cell의 경우 1일, sodium alginate와 혼합한 세포는 4일, strontium chloride를 첨가하여 고정화한 것은 8일 이었다. *P. phosphoreum*의 생장을 위한 최적 온도는  $20^{\circ}C$ 로 보고된 바 있으나 저장 면에 있어서는 부적합한 온도였으며 오히려 저온인  $4^{\circ}C$ 에서 높은 bioluminescence 유지도를 나타내었다

**고정화 물질의 농도에 따른 bioluminescence intensity**

고정화 물질이 갖추어야 할 요구 조건 중 하나인 matrix의 견고성은 발광 메커니즘의 안정도에관여하는 요소로서 고정화

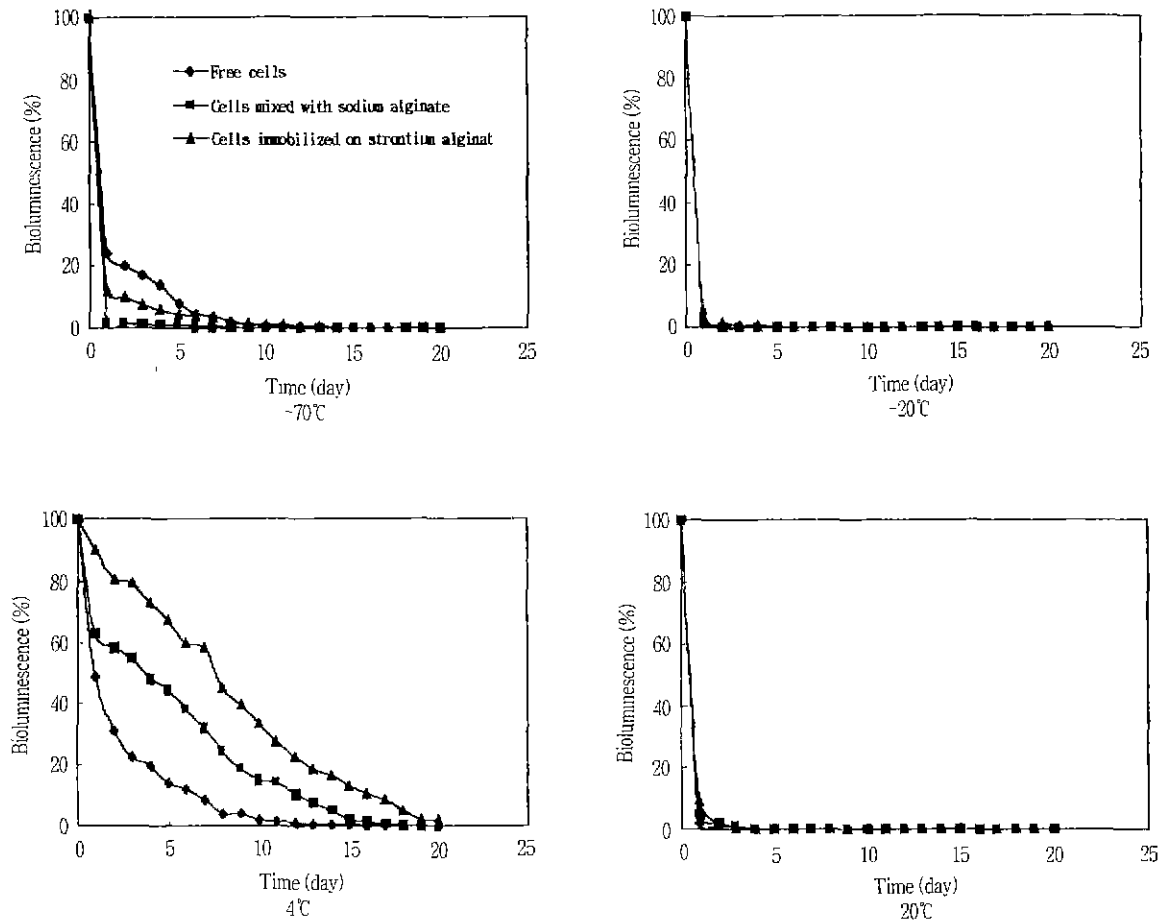


Figure 4. The effect of temperature for long storage on the bioluminescence maintenance of immobilized *P. phosphoreum*. The bioluminescence of immobilized cells with strontium alginate was maintained longer than 15 days and even free cells produced bioluminescence for 10 days when stored at 4°C. A maintenance of bioluminescence was lasted for less than 5 days at other storage temperatures

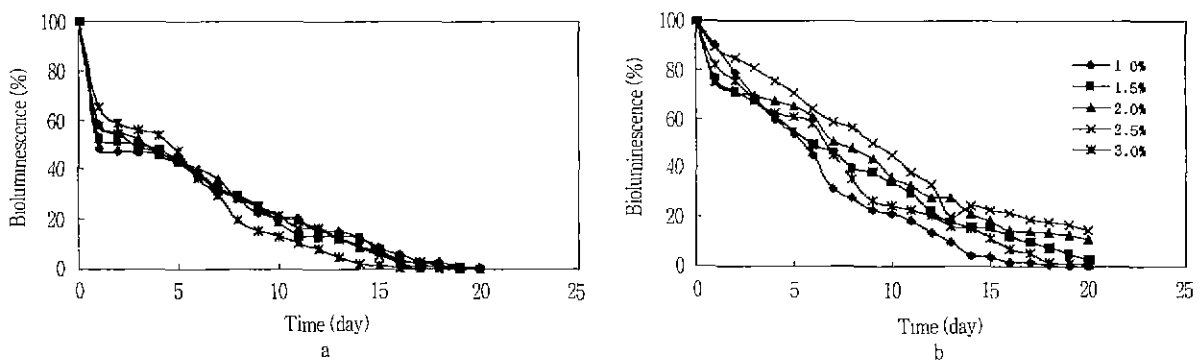


Figure 5. The effect of sodium alginate concentration on the stability of bioluminescence. Various sodium alginate concentrations were used to extend bioluminescence maintenance at 4°C. More stable maintenance of bioluminescence was shown with cells immobilized on strontium alginate(b) compared with cells mixed with sodium alginate(a). It was also found that 2.5%(W/W) strontium alginate was optimum concentration for the stable maintenance of bioluminescence at 4°C.

물질의 농도에 비례한다. 고정화 물질의 농도에 따른 bio-luminescence 유지도를 조사하여 최적 고정화 조건을 알아보았다. 고정화 matrix로서 1.0~3.0%(W/W) sodium alginate와 0.3M

(W/V) strontium chloride 용액을 사용하였다. Strontium chloride 용액의 첨가 유무, sodium alginate의 농도 등 조건을 달리하여 고정화하였으며, -70°C, -20°C, 4°C, 20°C에 저장하여

20일 동안 bioluminescence를 측정하였다.  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ 에 저장한 세포의 경우, 저장 1일 만에 급격한 bioluminescence의 감소를 나타내 고정화 물질의 농도와 발광 유지도의 상관성을 파악할 수 없었다. 반면  $4^{\circ}\text{C}$ 의 경우 고정화 물질의 농도에 따른 차이를 보였다. Sodium alginate와 혼합한 세포의 경우, sodium alginate의 농도가 낮을수록 높은 bioluminescence 안정성을 나타내었다. 저장 1일, 3% sodium alginate와 혼합한 세포가 가장 높은 bioluminescence를 보였으나 시간이 지남에 따라 bioluminescence 감소율이 증가하는 반면, 1%와 1.5% sodium alginate는 1일 쯤 25%의 감소율을 보였으나, 저장 기간 동안 높은 bioluminescence 유지도를 나타내었다. Strontium chloride 용액을 첨가하여 반구형으로 고정화한 세포의 경우 gel의 경도와 관련하여 1% sodium alginate의 경우 장시간 반응시켜도 gel을 형성하지 못하였으며, sodium alginate 농도가 클수록 gel의 형성 시간은 단축되었다. Sodium alginate와 혼합한 세포와 달리 1% sodium alginate의 경우 낮은 bioluminescence 유지도를 나타내었다 이는 gel 형성 시간 및 경도와 관련하여 생각할 수 있는데 1% sodium alginate는 strontium chloride와 결합하여 gel이 형성되는데 오랜 시간이 걸리며 형성된 gel의 경도가 약하여 세포를 안정하게 고정시키지 못하기 때문인 것으로 사료된다. 저장 기간 동안 3% 보다 2.5% sodium alginate로 고정화한 세포가 더 높은 bioluminescence 유지도를 나타낸 것으로 보아 sodium alginate의 농도가 높을수록 bioluminescence 유지도가 증가하는 것은 아니었다. 따라서 발광 미생물의 저장에 있어 bioluminescence를 가장 오랜 기간 안정하게 유지시키기 위한 최적 조건은 2.5%의 sodium alginate에 strontium chloride를 첨가하여 고정화한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보관하는 것이다

## 요 약

*P. phosphoreum*의 고정화에 있어 중요한 것은 matrix의 선택이며, matrix로서 sodium alginate만을 사용하여 고정화하는 것보다는 strontium chloride를 첨가하였을 때 세포의 bioluminescence 유지도가 증가하였다. 저장 온도에 따른 bioluminescence 유지도와 관련하여  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한 세포의 경우 저장 1일 후에 급격한 bioluminescence의 감소를 보였으나  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한 세포는 bioluminescence의 유지도가 15일 이상 이어졌다. 따라서 *P. phosphoreum*의 bioluminescence 안정성에 있어 가장 좋은 결과를 나타낸 것은 2.5%(W/W) sodium alginate와 0.3M(W/V) strontium chloride를 사용하여

고정화한 세포였으며 저장 온도는  $4^{\circ}\text{C}$ 였다

## 감 사

본 연구는 1998년도 공업기술반(Project No. 971-327)('97 11. 1) 및 학술진흥재단 (98 자유공모과제) 연구비에 의하여 연구되었음

## 참 고 문 헌

1. Lee, J H and Chun, U H, (1996), Monitoring of Environmental Pollutants With *Photobacterium phosphoreum* Immobilized on Strontium Alginate(I), *유전 공학 논문집*, 8, 48-55
2. Meighen, E A., (1991), Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence, *Microbiol Reviews*, 55(1), 123-142
3. Emuly, J. T. and Leenen, M., (1996). Characteristics of and Selection Criteria for Support Materials for Cell Immobilization in Wastewater Treatment. *Wat Res.* 30 (12) 2985-2996
4. Hanife Bnuyukgungor, (1992), Stalstv and Lactobacillus bulgaricus Immobilized in -Carrageenan Gels. *J Chem. Tech. Biotechnol*, 53, 173-175
5. Colowick, S P. and Kaplan, N. O., (1987), Immobilization of Living Microbial Cells in Polyacrylamide Gel in Methods in Enzymology, *Academic press. Inc* 135, 198-216
6. Chun, U. H., Nina Simonov, Yaping Chen, Britz, M L., (1996), Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*, *Resources, Conservation and Recycling*, 18, 25-40
7. Knorr, D., Miazga, S. M. and Rita A. Teutonico, (1985). Immobilization and Permeabilization of Cultured Plant cells, *Food Technology*. Oct., 135-142
8. Brock. D. T. and Madigan, M. T., (1994), *Biology of Microorganisms*, 7th Prentice Hall, U.S.A., 332-333
9. Konstantinov, B. K., Prasad, D., (1993), Real-Time Compensation of the Inner Filter Effect in High-Density Bioluminescent Cultures, *Biotechnol and Bioengineering*, 42, 1190-1198