

Bioluminescence 안정성을 위한 *Photobacterium phosphoreum*의 고정화 물질에 관한 연구

이 은 수 · 김 현 숙 · †전 역 한
경희대학교 생명과학부 식품가공학과
(접수 : 1999. 3. 26., 게재승인 : 1999. 6. 24.)

Selection of Immobilization Material for Stabilization of Bioluminescence from *Photobacterium phosphoreum*

Eun-Su Lee, Hyun-Suk Kim, and Uck-Han Chun†

Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon 440-701, Korea
(Received : 1999. 3. 26., Accepted : 1999. 6. 24.)

Various materials including sodium alginate, *k*-carrageenan, collagen and polyacrylamide were studied in order to maintain stability of bioluminescence of *P. phosphoreum* for the purpose of continuous monitoring of toxic substances. Collagen and polyacrylamide were shown to be inadequate for immobilization of *P. phosphoreum* since the bioluminescence decreased when cells were mixed with such materials. In case of *k*-carrageenan, the bioluminescence was stable when compared with collagen and polyacrylamide. However, the *k*-carrageenan was not suitable for immobilization of *P. phosphoreum* as cells could not be mixed with the material properly in temperature at which gel formation already occurred. *P. phosphoreum* must be treated at low temperature below that of gel formation since these are psychrophilic luminescent bacteria. When cells were immobilized on sodium alginate, the bioluminescence was stably maintained for 20 minutes.

Key Words : *Photobacterium phosphoreum*, immobilization, bioluminescence

서 론

최근 식품이나 환경에서 독성 물질을 검사하기 위해 발광 미생물의 발광 현상을 이용한 많은 연구가 이루어지고 있다. 발광 미생물은 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Xenorhabdus*로 크게 4 genera로 분류할 수 있는데 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas*는 해양미생물로서 바닷물이나 다른 발광 바다 생물로부터 분리되어진다(1). 이러한 발광 미생물은 luciferase라는 효소를 생산하여 빛을 내는데 이 luciferase의 발광 현상을 이용하여 식품이나 수질 내에서 coliform bacteria(2)나 다른 유해 미생물(3)을 빠른 시간 내에 탐색할 수 있는 방법이 개발되었다. 또한 이 발광 미생물을 외부의 독성 물질에 노출될 경우 빛 발산에 민감한 영향을 주는 성질을 이용하여 독성 물질(4)이나 mycotoxin의 양(5)을 측정할 수 있는데 이러한 발광 미생물을 이용한 분석 방법은 반응이 신속, 정확하여 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히, 수질 오염에 대한 신속한 경보 시스템의 방안으로 발광 미생물을 이용하는 방법이 연구되고 있

다. 발광 미생물 중 *Photobacterium phosphoreum*은 다른 발광 미생물과는 달리 저온(4°C)에서도 생육이 가능하며 저온 상태에서 장기 저장이 가능하고 또한 비교적 저온의 수질에서도 측정이 가능하다. 현재까지 *P. phosphoreum*이나 또는 그 외 발광미생물을 이용한 독성 물질 측정 방법은 모두 batch system으로서 연속 monitoring이 불가능하고 동결 건조한 세포나 luciferase 자체를 사용한 연구는 많았지만 발광 미생물의 세포 자체를 고정화하여 사용한 연구는 거의 보고된 바가 없으므로 유지비가 많이 드는 연속 배양을 하지 않고도 연속 monitoring을 할 수 있는 고정화 방법을 모색하였다.

고정화 방법을 위해서는 물리 또는 화학적인 힘에 의해 세포를 포획(포획법)하거나 결합(결합법)하는 방법이 있는데 다공성의 담체 안에 세포를 물리적으로 포획시키는 방법이 세포 고정화에 가장 널리 사용되는 방법으로 전하를 띤 polymer의 이온교차결합에 의한 gel 형성법(ionotropic), 가열된 polymer의 cooling에 의한 gel 형성법(thermal), 화학반응에 의한 gel 형성법(crosslinking 또는 radical polymerization)이 있으며(6) 고정화에 이용되는 물질로는 단단하고, 화학적으로 불활성이며, 세포와 단단히 결합하고, 높은 부하량(load capacity)을 가져야 한다. gel 포획의 경우 충분히 다공성이어야 하고 입자 크기는 입자내의 확산 제한을 피하기 위해 충분히 작아야 하며 특히 이 연구에서는 발광 미생물을 사용하므로 발광성이 안정하고 오랫동안 지속되어야 하는 물질을 선택하여야 한다(7). 일반적으로

† Corresponding Author : Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon 440-701, Korea
Tel : 0331-201-2626, Fax : 0331-204-8116
e-mail : uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

세포 고정화에 많이 이용되는 물질로는 다공성의 고분자인 agar, *k*-carrageenan(8, 9), alginate(4, 10), collagen(11), polyacrylamide(12), cellulose(13), gelatin, chitosan 등이 있다.

본 연구에서는 수질의 독성 물질을 측정하고자 발광 미생물인 *P. phosphoreum*을 효과적으로 이용하기 위하여 고정화 방법을 사용하여 bioluminescence를 안정되게 유지하는 한편 bioluminescence가 용이하게 투과할 수 있는 고정화 물질을 알아보았으며, 이를 위해 4가지의 gel 형성 방법(ionotropic, thermal, crosslinking 및 radical polymerization)에 따른 물질을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지 조성

본 연구에 이용된 발광 미생물은 해양 미생물인 *Photobacterium phosphoreum* KCTC2852로서 NaCl이 함유된 배지를 사용하여 배양하였다. NaCl이 함유된 배지의 조성은 12.5g/L Nutrient broth No.2(4.3g/L Meat peptone, 4.3g/L Casein peptone, 6.4g/L Sodium chloride), 25g/L Sodium chloride, 5g/L Yeast nitrogen base(without amino acid), 3mL/L Glycerol이며 potassium phosphate buffer를 이용하여 pH를 7.0으로 조절하였다. 액체 배지에서 log phase상태, 즉, OD₆₀₀=0.5~1.0의 균주를 액체 배지에 10% 재 접종하여 20°C, 100rpm의 조건으로 12~14시간 현탁 배양하였다.

고정화 물질의 선택

최적의 고정화 물질을 선택하기 위하여 gel 형성 방법에 따라 각각 *k*-carrageenan, sodium alginate, collagen, polyacrylamide를 선정하여 *P. phosphoreum*을 고정화하고 20분 동안의 bioluminescence의 변화를 조사하였다.

모든 고정화 물질은 증류수보다는 2.5% NaCl 용액으로 제조하는 것이 세포의 bioluminescence를 더 안정하게 유지하였으므로 2.5% NaCl로 제조하였고 세포는 2.5% NaCl 용액으로 10²배 희석한 세포와 각 물질과 1:9의 비율로 섞어 최종적으로 10³배 희석되도록 고정화하고 총 부피는 200 μ l로 정하여 bioluminescence의 안정성을 알아보았다.

k-carrageenan : *k*-carrageenan(Sigma Co.)은 적은 양으로도 gel 형성이 가능하고 양이온의 첨가 시 sulphate groups (OSO₃⁻)인 음이온의 영향으로 gel이 더 단단해지므로(14) 2.5% NaCl 용액으로 낮은 농도의 gel을 제조하였다. 고정화 세포는 2.5%(w/v) NaCl 용액으로 0.5%(w/w), 0.7%, 0.9%, 1.0%, 1.5%, 2.0%를 각각 제조하여 멸균한 후 온도가 내려가 gel이 형성되기 전에 luminometer tube에 각각 180 μ l씩을 취하였고 35°C, 40°C, 45°C, 50°C의 온도로 조절을 한 후 세포와 혼합하였으며 free cell(control)인 경우에는 2.5% NaCl 용액을 180 μ l 취하여 *k*-carrageenan과 같은 온도로 조절하였다.

온도 조절은 luminometer tube에 각 농도의 *k*-carrageenan을 넣은 후 water-bath에 충분한 시간동안 열을 가하여 꺼낸 후 cell과 혼합하는 방식으로 고정화하여 상온에서 실험하였다.

Sodium alginate : sodium alginate(Hayashi chemical Ltd., Japan)는 1%(w/w)에서 7%까지 농도가 다른 시료 7개를 2.5% NaCl 용액으로 제조하여 멸균하여 사용하였다. Gel의

crosslinking을 위해 사용된 0.31M의 SrCl₂는 bioluminescence에 영향을 주지 않았으므로 이 실험에서는 고정화 과정을 간단히 하기 위해 SrCl₂를 첨가하지 않고 단지 alginate와 cell만을 혼합하여 사용하였다.

Collagen : Collagen으로는 polypeptide(Sigma Co.)를 사용하여 1%(w/w), 3%, 5%, 7%를 2.5% NaCl 용액으로 제조하였으며 gel을 형성하기 위한 glutaraldehyde(25% solution, Junsei chemical Co.)를 사용하였다.

Polyacrylamide : polyacrylamide gel의 제조 방법으로는 Skryabin등(12)의 방법을 응용하여 acrylamide(BIO-RAD)와 N,N'-methylenebisacrylamide(Bis)(BIO-RAD)를 19:1의 비율로 섞어 18% solution으로 만들고 0.5%의 ammonium persulfate(Sigma Co.)와 50% TEMED (tetramethylethylenediamine)(BIO-RAD)의 비율을 여러 가지로 하여 고정화하여 bioluminescence의 안정성을 알아보았다.

Bioluminescence의 측정

Free cell인 경우 starter를 10% 재 접종 후 12 ~ 14시간 정도 배양한 세포를 2.5% NaCl용액으로 10³배 희석한 후 Luminometer tube에 200 μ l(control)을 취하여 bioluminescence를 측정하였고, 고정화한 세포의 경우는 10²배로 희석한 세포를 matrix와 1:9의 비율로 혼합한 후 혼합액으로부터 200 μ l 취하여 Luminometer로 측정하였다.

Luminometer

Bioluminescence를 측정하기 위해 luminometer(Berthold Lumat LB 9507, Germany)를 사용하였고 tube는 Sarstedt (Röhren-Tube, No55.476, 5mL, 75×12mm, Germany)를 사용하였으며 측정 시간은 0.1초로 정하였다. Luminometer는 빛의 양에 따라 photocathode로부터 나온 photo electrons가 photomultiplier에 의해 증폭되어 pulse를 유발하는데 이때 생성되는 pulse의 양을 수치로 나타내며 빛의 양과 비례하고 단위는 RLU(Relative Light Units)이다.

결과 및 고찰

세포 농도의 최적 조건

접종균(starter)을 10% 재 접종하여 bioluminescence가 안정하게 유지하는 상태의 세포를 이용하기 위해서 *P. phosphoreum*을 14시간 배양 후 luminometer의 측정 범위내의 세포 농도로 희석하였다. 희석으로서 세포의 용균 현상을 방지하기 위해 대부분 0.9% NaCl 용액으로 희석을 하지만 *P. phosphoreum*은 해양 미생물로서 더 높은 농도의 NaCl이 요구되므로 3% NaCl, 2.5% NaCl, 배지, 생리 식염수(0.9% NaCl)로 각각 희석해서 bioluminescence의 intensity를 측정하였다.

여러 가지 농도의 NaCl 용액으로 희석하여 bioluminescence를 측정하여 적당한 희석용액의 농도를 선택하였다. 증류수나 0.9% NaCl 용액으로 희석한 것은 bioluminescence가 급격히 떨어졌으나 2.5%, 3%의 NaCl 용액 및 NaCl이 함유된 배지 용액으로 희석한 것은 bioluminescence 안정성을 보였다(Figure 1). 그러나 배지 용액으로 희석하였을 경우에는 시간이 지남에 따라 bioluminescence가 약간 증가하면서 안정성을 보였다. 그러나

2.5%와 3% NaCl 용액보다는 intensity가 낮았다. 이것은 배지에는 여러 가지 물질이 들어가 빛 발산 시 배지 속의 용질들과의 충돌로 bioluminescence intensity가 낮아지기 때문인 것으

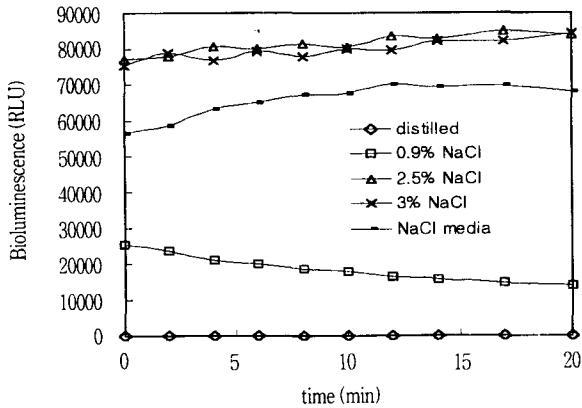


Figure 1. The effect of solution for dilution on bioluminescence intensity and stability. Cells grown for 14 hr were diluted with distilled water(◇), 0.9% NaCl solution(□), 2.5% NaCl solution(△), 3% NaCl solution(×) and liquid media with NaCl(○).

로 생각되어진다. 따라서 luminometer로 bioluminescence 측정을 위한 세포의 희석 용액은 2.5% NaCl 용액으로 결정하였으며 고정화 물질도 bioluminescence의 안정성을 위하여 2.5% NaCl 용액으로 제조하였다.

material 종류에 따른 bioluminescence의 변화 k-carrageenan

k-carrageenan은 gel 형성 능력이 매우 좋으므로 0.6%의 적은 농도에서도 gel 형성이 가능하다. k-carrageenan gel의 경도(14)와 bioluminescence의 안정성을 위하여 2.5% NaCl 용액을 사용하여 제조하였다. 여러 가지 농도의 k-carrageenan과 온도에 대해서 *P. phosphoreum*을 고정화시킨 후 일정 시간 동안의 bioluminescence를 측정하였다. k-carrageenan은 우선 열을 가한 후 식으면서 gel이 형성되는 물질이므로 고정화 할 때의 온도와 농도를 달리하여 bioluminescence의 안정성을 조사하였는데 45℃ 온도 이하의 k-carrageenan에서는 bioluminescence intensity가 안정함을 보였는데(Figure 2) 이것은 이 연구에서 사용하는 발광 미생물이 *P. phosphoreum*이 저온균이기 때문에 온도가 높으면 성장과 bioluminescence의 형성이 방해되기 때문이다.

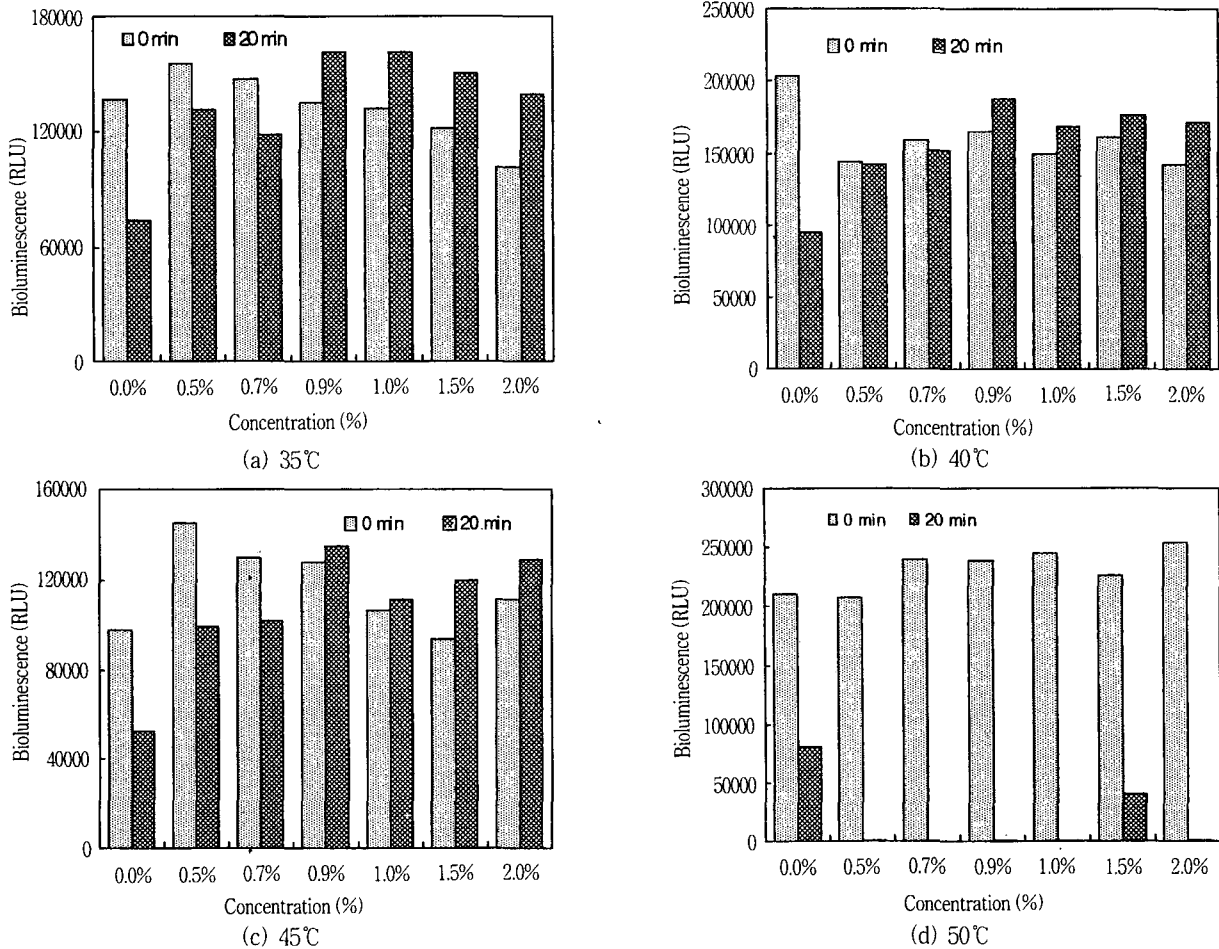


Figure 2. The bioluminescence intensity of immobilized cells with k-carrageenan at various concentrations and temperatures. *P. phosphoreum* harvested at 14 hr cultivation was mixed with various concentrations of k-carrageenan and bioluminescence was measured at 0 min and 20 min.

이 *k*-carrageenan은 농도가 높을수록 gel 형성 온도가 높아지는 등 농도마다 gel 형성 온도가 다르고 이 실험에서는 적은 양($200\mu\text{l}$)을 사용하기 때문에 cell과 혼합하기 전에 굳어버리는 등 고정화 작업이 쉽지는 않았다. 45°C 이하의 온도에서는 모든 농도에서도 빛 안정성이 좋았고 50°C 의 온도에서는 bioluminescence가 급격히 떨어지는 것이 관찰되었지만 45°C 이하의 온도에서 빛 안정성이 좋았다 하더라도 0.9%이상 농도의 gel은 cell과 혼합하기 전에 이미 굳었기 때문에 cell과 혼합했을 때는 gel이 부서졌기 때문에 cell을 고정화했다고는 볼 수 없었으며, 더 낮은 농도에서는 빛 안정성이 좋고 낮은 온도에서도 고정화하기가 쉬운 반면 gel의 경도가 너무 낮아 잘 부서지기 쉽고, 0.9%이상의 농도에서는 gel의 경도는 좋으나 cell의 빛 안정성에 영향을 주는 온도에서 고정화하여야 하기 때문에 bioluminescence가 급격히 떨어진다. 따라서 *k*-carrageenan은 젯산균 같은 고온균을 고정화(8)하는 데는 좋은 물질로 많이 이용되고 있지만 저온성 발광 미생물의 고정화 물질로는 부적합하다.

Sodium alginate

NaCl(2.5% w/v) 용액으로 각 농도별 sodium alginate 용액을 제조하여 cell과 혼합하고 gel을 형성하여 bioluminescence 안정성을 살펴보았다(Figure 3). 대체적으로 모든 농도에서 빛 안정성이 좋았으나 5% 이상의 농도에서는 점도가 너무 높고 낮은 농도에서는 점도가 너무 낮아 고정화 작업이 쉽지 않았다. 따라서 bioluminescence를 안정하게 유지하는 alginate의 최적 농도를 4%로 결정하였다.

Collagen

Collagen은 glutaraldehyde를 첨가해야 gel이 형성되므로 예비 실험을 통하여 gel이 형성되는 glutaraldehyde의 양을 총 부피의 25%로 정하여 glutaraldehyde를 넣고 어느 정도 gel이 굳어지기 전에 cell을 혼합하거나 cell을 먼저 collagen과 섞고 바로 glutaraldehyde를 첨가시키는 등 고정화 순서를 달리하여 bioluminescence가 안정되는 방법을 조사하였다.

Glutaraldehyde를 첨가 시 gel 형성은 되나 glutaraldehyde는 세포 호흡이나 성장에 영향을 끼치는 물질로서(15) biolumin-

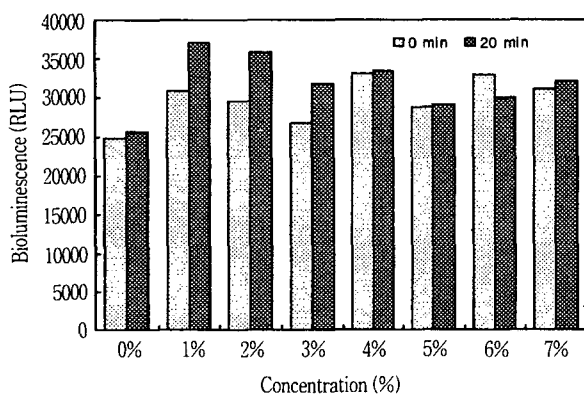


Figure 3. The bioluminescence intensity of immobilized cells with sodium alginate at various concentrations. *P. phosphoreum* harvested at 14 hr cultivation was mixed with various concentrations of sodium alginate and bioluminescence was measured at 0 min and 20 min.

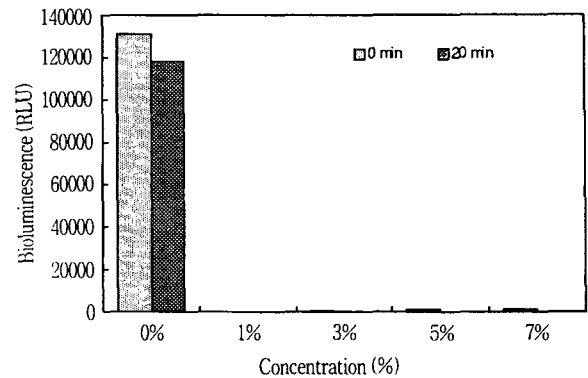


Figure 4. The bioluminescence intensity of immobilized cells with collagen at various concentrations. *P. phosphoreum* harvested at 14 hr cultivation was mixed with various concentrations of collagen and bioluminescence was measured at 0 min and 20 min.

escence를 저하시키므로 고정화 순서에 상관없이 collagen을 고정화 물질로 이용했을 때 bioluminescence 안정성이 좋지 않았다. Collagen만으로도 고정화하여 bioluminescence를 측정해보았으나 bioluminescence 안정성은 좋지 않았다.

다양한 농도의 collagen으로 고정화하여 bioluminescence를 측정된 결과 collagen은 어느 조건에서도 bioluminescence가 급격히 떨어져 *P. phosphoreum*의 고정화 물질로 부적합하였다(Figure 4).

Polyacrylamide gel

Polyacrylamide는 monomer인 acrylamide와 bisacrylamide가 polymerization하면서 gel이 형성되는데 TEMED의 양이 많을수록 gel의 경도는 높아지고 gel 형성시간도 빠르지만 TEMED자체가 bioluminescence를 저하시키기 때문에 총 고정화 부피의 5%로 정하였다. Acrylamide와 bisacrylamide, ammonium persulphate, TEMED의 양은 Table 1에 나타내었다.

Polyacrylamide는 monomer 상태에서는 독성이 있으나 polymerization이 되면 독성이 없어지기 때문에(12) *P. phosphoreum*의 고정화 물질로 선택하였다. 그런데, 완전히 polymerization이 되어 gel이 형성이 되면 *k*-carrageenan처럼 되어 cell을 혼합할 수가 없기 때문에 gel이 굳기 전에 cell을 혼합시켰으나 bioluminescence가 급격히 감소하였다(Figure 5). 이는 polymerization동안 발생하는 free radical의 독성이 cell에 해를 끼치기 때문에 빛이 감소하는 것으로 사료된다.

Bioluminescence가 감소하는 또 하나의 원인으로 볼 수 있는 것은 polyacrylamide는 polymerization이 일어나면서 열을 발생시키는 발열 반응이다. 이 실험에서는 $200\mu\text{l}$ 정도의 적은 양으로 실험하여 bioluminescence를 저하시키는 정도의 열은 발생하지 않았지만 대량으로 고정화할 경우에는 bioluminescence를 저하시킬 수 있는 열을 발생시킨다. 따라서 polyacrylamide는 저온성 발광 미생물의 고정화 물질로 적합치 않다.

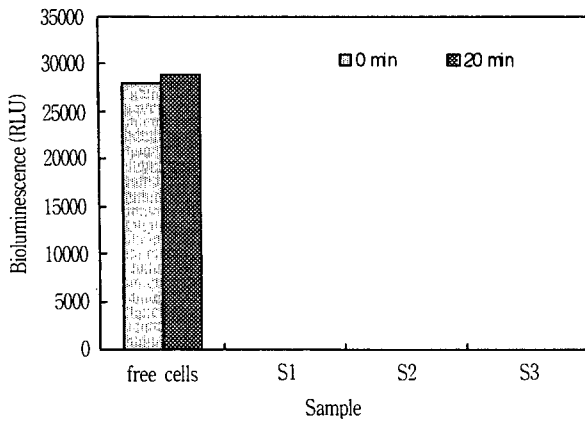


Figure 5. The bioluminescence intensity of immobilized cells with polyacrylamide at various concentrations. *P. phosphoreum* harvested at 14 hr cultivation was mixed with various concentrations of polyacrylamide and bioluminescence was measured at 0 min and 20 min.

Table 1. Volume ratio of polyacrylamide gel components. (unit : $\mu\ell$)

sample	acrylamide + bisacrylamide	ammonium persulphate	TEMED	cell
S1	100	70	10	20
S2	90	80	10	20
S3	85	85	10	20

요 약

식품이나 수질 내의 독성 물질 monitoring을 위해서 발광미생물인 *P. phosphoreum*이 많이 연구되고 있는데 이 독성 물질 측정을 위하여 *P. phosphoreum*을 더 효과적으로 이용하기 위해 고정화하여 이용하는 방법을 연구하였다. 고정화 방법을 크게 4가지로 나누어서 그 방법에 따라 각각 고정화 물질 한가지씩을 선택하여 *P. phosphoreum*의 bioluminescence 안정성을 알아보았다. Polyacrylamide나 collagen에서는 bioluminescence가 유지를 못하고 material과 cell을 혼합하자마자 급격히 떨어졌으나 alginate와 *k-carrageenan*에서는 빛 안정성이 매우 좋았다. 그러나, *k-carrageenan*은 온도를 높여야 gel이 형성되는 성질을 갖고 있기 때문에 저온성 발광 미생물인 *P. phosphoreum*에는 적합한 고정화 물질이 되지 못한다. 따라서 *P. phosphoreum*의 bioluminescence를 안정되게 유지하면서 고정화가 용이한 polymer로는 alginate가 적합하다.

참 고 문 헌

1. Baker, J. M., M. W. Griffiths, and D. L. Collins-Thompson (1992), Bacterial Bio luminescence : Applications in Food Microbiology. *J. Food Protect.* 55(1), 62-70.

2. Tanaka, H., T. Shinji(Iwano), K. Sawada, Y. Monji, S. Seto, M. Yajima, and O. Yagi (1997), Development and Application of a Bioluminescence ATP Assay Method for Rapid Detection of Coliform Bacteria, *Wat. Res.*, 31 (8), 1913-1918.

3. Griffiths, M. W. (1996), The Role of ATP Bioluminescence in the Food Industry : New Light on Old Problems, *Food Tech.*, 6, 62-72.

4. Britz, M. L., N. Simonov, and U. H. Chun (1997), Immobilized Luminescent Cell-based Flow Through Monitoring of Environmental Pollutants, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 7 (4), 250-257.

5. Yates, I. E. and J. K. Porter (1982), Bacterial Bioluminescence as a Bioassay for Mycotoxin, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 44, 1072-1075.

6. Knorr, D., S. M. Miazga, and R. A. Teutonico (1995), Immobilization and Permeabilization of Cultured Plant Cells, *Food Tech.*, 10, 135-142.

7. 구윤모, 서진호, 장용근, 박태현 공역 (1994), 생물공정공학, p.278-282, 교보문고.

8. Büyükgüngör, H. (1992), Stability of *Lactobacillus Bulgaricus* Immobilized in *k-carrageenan* Gels, *J. chem. Tech Biotechnol.*, 53, 173-175.

9. Chibata, I., T. Tosa, T. Sato, and I. Takata (1987), Immobilization of Cell with Carrageenan in "Methods in Enzymology", Vol. 135, p.189-198, Academic press, Inc.

10. Leenan, E. J. T. M., V. A. P. Dos Santos, K. C. F. Grolle, J. Tramper, and R. H. Wijffels (1996), Characteristics of and Selection Criteria for Support Materials for Cell Immobilization in Wastewater Treatment, *Wat. Res.* 30(12), 2985-2996.

11. Vieth, W. R. (1994), Bioprocess engineering : Kinetics, Mass transport, Reactors and Gene Expression, p.52-60, John Willey & Sons, Inc.

12. Skryabin, G. K. and K. A. Koshcheenko (1987), Immobilization of Living Microbial Cells in Polyacrylamide Gel in "Methods in Enzymology", Vol. 135, p.198-216 Academic press, Inc.

13. Szajáni, B., Z. Buzás, K. Dallmann, I. Gimesi, J. Krisch, and M. Tóth (1996), Continuous Production of Ethanol Using Yeast Cells Immobilized in Preformed Cellulose Beads, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 122-125.

14. Keogh, M. K., K. I. Laine, and J. F. O'connor (1995), Rheology of Sodium Caseinate-carrageenan Mixtures, *J. Texture studies*, 26, 635-652.

15. Brodelius, P. and K. Mosbach (1982), Immobilized Plant Cells, *Adv. Appl. Microbiol.*, 28, 1-26.