

미생물 배양 배지의 보관성을 개선하기 위한 보습성분의 탐색

홍수영¹, 서유미¹, 강창열¹, 이병우², 오성관², 권무식², 이진성^{1,2*},

¹(주)나래바이오테크 부설 미생물소재연구소

²성균관대학교 생명공학부 유전공학과

lejis@naraebio.com

Screening of Humectant to Improve Conservation of Bacterial Culture Agar Plate

Su Young Hong¹, Yu Mi Seo¹, Chang Youl Kang¹,

Byungwoo Lee², SungKwan Oh², Moosik Kwon², and Jin-Sung Lee^{1,2*},

¹Research Institute of NaraeBioTech Inc.

²Dept. of Genetic Engineering, SungKyunKwan Univ.

요 약

현재 가장 일반적으로 사용되는 미생물 배양 용기인 petri dish를 통해 제조된 미생물 배양 배지의 보관은 냉장과 실온 보관 시 수분 증발에 대한 보호 효과가 극히 낮아 한 달 이상으로 배지 품질을 유지하기 어려운 단점이 있다. 따라서 본 연구는 petri dish를 이용하여 미생물 배양 배지를 제조할 때 glycerol 등 7종의 보습성분을 첨가하여 이에 따른 미생물 배양 배지의 수분 증발 억제 효과와 표준균주별 증식반응을 비교, 분석한 것으로 결과적으로 sodium lactate를 제외한 6종의 보습성분이 배지의 수분 증발을 억제하는 효과가 있으며 이들에 대한 표준균주별 증식반응에서도 양성의 결과를 보여주었다. 앞으로 본 연구의 결과는 즉시 사용 배지(PPM, Pre-Plated Media)의 유통기한 연장 효과 및 품질향상에 유용한 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

1. 서론

Petri dish는 현재 가장 일반적으로 사용되는 미생물 배양용기로서 미생물의 배양, 증균, 확인 및 동정 시험에 필수적인 소모성 제품이다. 하지만 상부와 하부의 단순한 구조로 인해서 배지 제조 후 배지내 수분의 증발이 쉽게 일어나 배지의 품질 유지가 4°C에서 1개월 전후로 짧다는 단점을 갖는다. 이러한 Petri dish를 이용한 미생물 배양 배지의 짧은 유통기한은 미생물을 배양하고 신속한 선별 및 감별을 위한 발생성 배지(chromogenic media)[1] 및 이를 응용한 다양한 즉시 사용 배지(PPM, Pre-Plated Media)의 개발에 중대한 장애요인이 되고 있다.

미생물의 최적 배양에 있어서 가장 중요한 요인으로는 수분, pH, 온도 및 산소 등이 있는데[2] 그 중에서 수분과 산소는 선택적 개폐가 가능한 새로운 형태의 LOP(Lab On a Plate)[5]라는 페트리디쉬를 대체하는 미생물 용기가 개발되어 제품화되면서 많은 부분에서 개선되고 있지만 미생물 배양 배지가

함유하는 수분의 증발을 새로운 배지 조성물의 개발을 통해서 해결하고자 하는 연구는 아직까지 보고되고 있지 않다.

보습제는 화학적 밀폐효과를 통해 수분의 증발을 억제하는 것으로 이는 보습제에 포함된 습윤성분으로부터 공급된 수분이 보호효과를 가지는 되는 것이다[3]. 따라서 보습제를 사용하게 되면 보습효과를 증대시킬 수 있는데 이는 보습성분이 물 분자를 잡아주는 효과, 즉 물 분자의 증발을 억제하는 기능을 갖기 때문이다. 현재 보습제로 가장 많이 사용되는 것으로는 urea, lactic acid, glycerin, panthenol, propylene glycol, hyaluronic acid, 그리고 sorbitol 등을 들 수 있다[3, 4].

본 연구는 미생물 배양 고체배지에 수분 증발을 억제하는 기능을 갖는 7종의 보습성분을 미생물 배양 배지에 첨가하여 이들 보습성분의 다양한 농도에 대한 표준균부별 증식 반응성과 수분 증발 억제 효과를 탐색하여 미생물 배양 배지에 대한 적용 가능성을 보고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

본 연구에서는 Himedia사(Mumbai, India)의 Plate count agar(casein enzymic hydrolysate 5.0g, yeast extract 2.5g, dextrose 1.0g, agar 15.0g, distilled water 1,000ml)를 표준 배지로서 사용하였다. Plate count agar 배지의 제조는 실온에서 완전히 교반하고 plate count agar 분말을 첨가한 다음, 121도, 1기압 하에서 15분간 습열 멸균하였다. 멸균된 배지에 각 보습성분을 농도별로 첨가하고 배지 제조 전에 칭량된 Petri dish에 17ml씩 분주한 후, 무균대내에서 30분간 식히고 이에 대한 중량을 칭량하여 준비하였다.

본 연구에 사용한 표준균주는 한국미생물보존센터(KCCM)와 생물자원센터(KCTC)로부터 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCCM 41324, *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Bacillus subtilis* KCCM 11316, *Enterococcus faecalis* KCCM 11814, *Streptococcus pyogenes* KCCM 11873, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569의 6종의 그람양성세균과 *Shigella flexneri* KCCM 40948, *Shigella sonnei* KCCM 11903, *Yersinia enterocolitica* KCCM 41657, *Enterobacter aerogenes* KCCM 12177, *Escherichia coli* KCCM 11234, *Serratia marcescens* KCCM 21204, *Proteus mirabilis* KCCM 11797, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 11328, *Citrobacter freundii* KCCM 11931, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KCCM 40890, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* KCTC 2930, *Salmonella typhimurium* KCTC 12401, *Enterobacter sakazakii* KCTC 2949의 13종의 그람 음성세균, *Candida albicans* KCCM 11282, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11991의 2종의 효모를 분양받아 본 연구에 사용하였다.

각 보습성분에 대한 표준균주의 증식반응은 표준균주를 각 농도별로 보습제가 첨가된 배지에 희석도 말하여 35℃에서 18-24시간 배양한 다음, 대조군인 보습제가 첨가되지 않은 조건과 비교하여 증식 여부와 정도를 정성적으로 확인하는 방법으로 수행하였다.

배지 제조시 첨가한 보습성분은 현재 보습효과가 인정되고 있는 glycerol (Himedia, India), propylene glycol (Yakuri pure chemical, Japan), hyaluronic acid sodium salt (Wako pure chemical, Japan),

sodium lactate (Daejung chemical, Korea), trehalose dihydrate (Wako pure chemical, Japan), meso erythritol (Sigma, USA), chondroitin (Sigma, USA)등 7종으로 glycerol은 1, 5, 10%로, propylene glycol은 1, 3, 5%, sodium lactate는 1, 3, 5%, trehalose는 1, 3, 5%, hyaluronic acid는 0.01%, 0.02%, meso erythritol은 0.1%, 1%, chondroitin은 0.01%, 0.05%, 0.1%가 되도록 plate count agar에 첨가하여 시험 배지를 준비하였다.

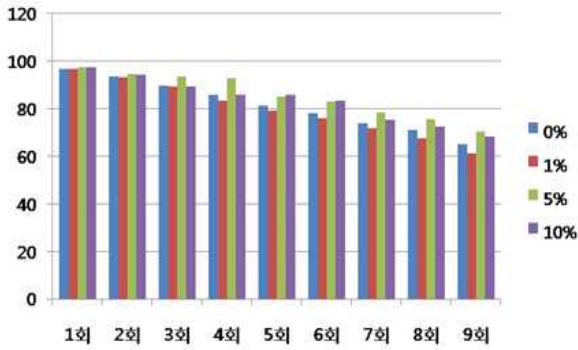
수분 증발 측정 기간은 24시간 간격으로 3반복으로 하여 총 9일(9회) 실시하였다. 증발된 수분의 측정은 배지의 전체 무게를 측정된 다음에 배지 분주 전 미리 칭량된 용기의 중량을 뺀 값이 실제 수분 변화가 일어난 배지 중량으로 추정(용기와 배지 중량-용기중량=순 배지중량)하고 이를 최초 배지량인 17ml을 100으로 한 것에 대한 백분율로 하여 계산하였다. 시간에 대한 각각의 보습성분별 처리 농도의 보습효과는 SPSS(ver.13.0) 통계 프로그램의 paired samples T-test를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다.

3. 결과

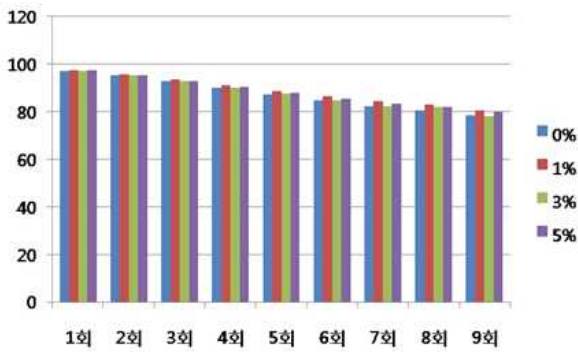
3.1. 보습효과

Plate count agar 배지에 첨가한 보습성분들에 대한 수분 증발 억제 효과를 탐색하기 위해서 사용한 7종류의 보습성분(glycerol, propylene glycol, hyaluronic acid sodium salt, sodium lactate, trehalose dihydrate, meso erythritol, chondroitin) 모두는 95%(P<0.05)의 신뢰수준에서 수분 증발을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다[그림 1]. 보습제별 수분 증발 억제 효과가 가장 높은 농도를 대조군과 비교하여 살펴보면, Glycerol은 5% 농도에서 5.33%, propylene glycol은 1% 농도에서 2.18%를, meso erythritol은 0.1% 농도에서 4.18%, chondroitin은 0.1% 농도에서 3.67%, sodium lactate는 5% 농도에서 4.96%, trehalose 5% 농도에서 3.91% 및 hyaluronic acids는 0.02% 농도에서 1.21%로 가장 높은 수분 증발 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한, sodium lactate, trehalose 및 hyaluronic acid는 배지에 첨가되는 농도가 증가할수록 수분 증발 억제효과도 비례하여 높게 나타났다 [그림 1(C, D, E)].

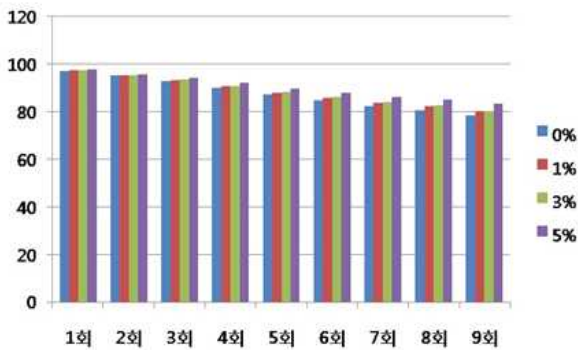
(A) Glycerol



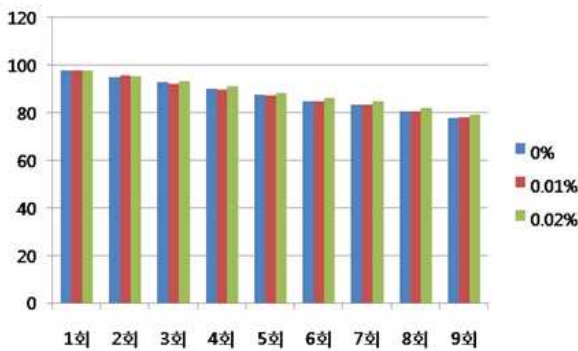
(B) Propylene glycol



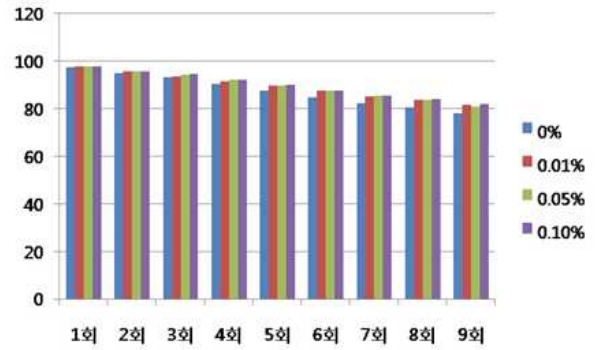
(C) Sodium lactate



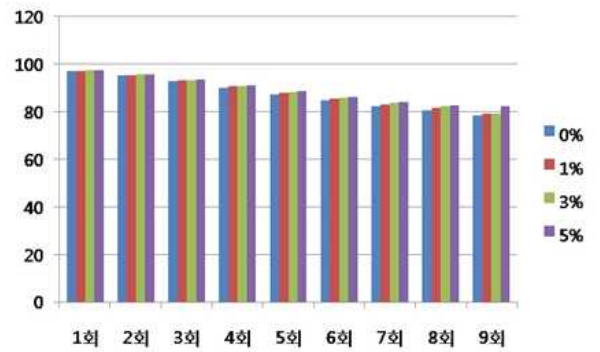
(E) Hyaluronic acid



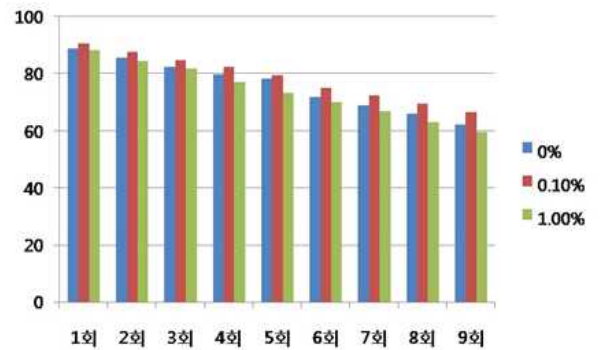
(G) Chondroitin



(D) Trehalose



(F) meso Erythritol



[그림 1] 7종의 보습성분의 농도에 따른 Plate count agar의 수분 보습효과

본 연구로부터 가장 높은 수분 증발을 억제 효과를 보이는 보습첨가제는 5% 농도의 glycerol로서 대조군에 비해서 약 5.33%의 보습효과를 보여주었다. 또한, 가장 낮은 보습 효과를 보이는 보습 첨가제는 0.02%의 hyaluronic acids로 대조군에 비해 약 1.21%의 수분 증발 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

결론적으로 본 연구에 상용한 7종의 보습성분들을 미생물 배양 배지 제조에 보습첨가제로서 사용하면 수분증발을 억제하는 효과를 충분히 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

[표 1] 보습첨가제의 농도별 표준균주의 증식 반응성 비교

Bacterial strains	Propylene glycol		Trehalose			Sodium lactate			Chondroitin			Glycerol			Hyaluronic acid	Meso erythritol
	1%	5%	1%	3%	5%	1%	3%	5%	0.01 %	0.05 %	0.1 %	1%	3%	5%	0.02%	0.1%
<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>B. subtilis</i> (ATCC6633)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>Y. enterocolitica</i> (ATCC 23715)	L	L	L	L	L	L	I	I	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	L	L	L	L	L	L	I	I	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>C. freundii</i> (ATCC 8090)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>S. marcescens</i> (ATCC 14756)	L	L	L	L	L	L	I	I	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	L	L	L	L	L	L	I	I	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933)	L	L	L	L	L	L	I	I	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>E. aerogenes</i> (ATCC 13048)	L	L	L	L	L	L	I	I	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>S. sonnei</i> (ATCC 25931)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L
<i>S. enterica</i> (ATCC 43971)	L	L	L	L	L	L	P	P	L	L	L	L	L	L	P	L

L, I, and P indicate luxurious, inhibit, and partial growth.

3.2. 균주 반응

본 시험에 적용한 7종의 보습성분 중에서 통계적으로 유의한 효과가 인정되는 각 보습성분별 농도에 대한 미생물의 균주(그람양성 세균 6종, 그람음성세균 13종, 효모 2종) 반응성을 조사한 결과[표 1], propylene glycol, trehalose, chondroitin, meso erythritol, hyaluronic acid 및 glycerol은 각 시험농도에서 대조군과 비교할 때 미생물 생장이 억제되지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나 sodium lactate는 3%와 5%에서, hyaluronic acid는 0.02%에서 본 연구에 사용된 대부분의 표준균주의 생장을 억제하는 것으로 나타났다.

특히 plate count agar 배지에서 *Serratia marcescens* KCCM 21204S가 붉은색 집락으로 생장하는 대조군과 달리 5% 농도의 sodium lactate 조건에서 *Serratia marcescens* KCCM 21204S의 집락은 흰색으로 증식되었고 또한 동일한 5%의 sodium lactate 농도에서 *Staphylococcus aureus*의 생장이 억제되는 것으로 확인되었다. 이러한 현상은 sodium lactate가 특정 세균에 있어서 최적의 생장을 억제 또는 저해하거나 색소의 생합성과 관련한 대사 경로에 작용하여 생리적 특성을 변화시키는 기능도 있는 것으로 생각된다.

따라서 보습성분의 실제 적용에 있어서는 다양한 균주의 생육 특성을 생화학적 시험과 병행해서 살펴 보아야 할 것으로 사료된다.

3. 결론

본 연구는 가장 일반적인 미생물 평판 배양 용기인 petri dish의 단순한 용기구조에서 기인된 장기간 보관이 어려운 단점을 개선할 수 있는 하나의 방법으로 petri dish을 이용하여 미생물 배지를 제조할 때 수분억제효과를 가지는 다양한 보습성분을 첨가함으로써 배지의 수분 증발을 억제하는 보습성분을 탐색하고, 표준균주의 반응양상을 분석을 통해서 이들 배지 제조시 보습성분의 이용 가능성을 탐색한 것이다.

본 연구를 통해서 다양한 보습성분들이 petri dish에 분주된 배지에 첨가하여 제조할 때 sodium lactate 및 hyaluronic acid를 제외한 5종의 보습제, 즉 propylene, glycol, trehalose, chondroitin, meso erythritol는 미생물배지의 장기보관을 위한 보습성분으로서의 유용성을 확인하였다.

마지막으로 다양한 보습첨가제가 미생물배지의 조성성분으로 첨가되어도 미생물의 생장을 저해하지 않으면서 수분증발을 억제하는 기능이 있음이 본 연구를 통해서 처음으로 확인되었다.

앞으로 본 연구 결과를 통해서 미생물 배양 배지를 장기간 품질이 유지되는 즉시사용배지의 제품개발이 촉진될 것으로 기대한다.

※ 본 연구는 중소기업청 “산학협력 기업부설연구소 설치지원사업(2008)”의 지원으로 수행되었습니다.

4. 참고문헌

- [1] Biolife Manual, INGRAF Milano, 3rd Ed., Rev. 1. Biolife, Milan, Biolife Italiana SRL 2000.
- [2] 김신무외 18인, 임상미생물학 실습(제3판), 고려의학, 2006.
- [3] Marie Loden, The skin barrier and use of moisturizers in atopic dermatitis, Clinics in Dermatology 2003(21)145-157.
- [4] 강호정, 함정희, 수종의 보습기제의 피부보습효과에 관한 연구, 대한피부과학회지, 1996. 34(6):869-874.
- [5] 이진성, 서유미, 강창열, 정용대, 이상수, 오정균. LOP와 Petri Dish의 수분 보호능에 관한 비교연구. 2008. 2008년 한국산학기술학회 추계 학술발표논문집.