Bull. Korean Fish. Soc. 16(2), 68—74, 1983 韓水誌 16(2), 68—74, 1983

호염성 세균 *Listeria denitrificans* HB-38 균주의 분리 및 생리적 성질[*1,*2]

홍 용 기 · 서 정 훈
부산수산대학 자원생물학과 경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation and Physiological Properties of a Moderately Halophilic Bacterium *Listeria denitrificans* HB-38

Yong Ki HONG
Department of Marine Biology, National Fisheries University of Pusan
Namgu, Pusan, 608 Korea
and
Jung Hwn SEU
Department of Microbiology, Kyungpook National University
Taegu, 635 Korea

A moderately halophilic bacterium, *Listeria denitrificans* HB-38, isolated from mud on the seashore in Sooyoung bay, Pusan, showed the requirement of 4% sodium chloride for cell growth in a medium with salts typical of a marine environment, and showed that of 10% in a medium with salts typical of a terrestrial environment. The optimum temperature and pH for growth were 40°C and pH 7.5 in the medium containing 10% sodium chloride and ions typical of a terrestrial environment. Sodium chloride as a protoplast stabilizer gave more stability than sorbitol or sucrose, meanwhile the protoplast did not require higher concentration of stabilizer than that of *E. coli* protoplast. Succinic dehydrogenase of HB-38 had a halophilic property showing maximal activity in the presence of 9% sodium chloride. The strain HB-38 did not harbor an extrachromosomal DNA.

서 론

일반적으로 호염성 세균이란 그의 배양과 보존에 3% 이상의 NaCl 농도를 필히 요구하는 것으로서 moderate halophile 과 extreme halophile 로 대별되며, 높은 NaCl 환경에서도 견디면서 생육가능한 내염성 세균과는 구별된다[6,12]. 이들은 주로 염전이나 염호등에 많이 분포되어 있으며 고농도의 염에의한 상대적 유리 수분의 함량이 적은 환경조건에서나 광선의 강도가 아주 강한 곳에서도 그 생육이 가능하다[5,20]. 따라서 이들 호염성 세균은 각종 해산물이나 피혁가공 도중에 많이 오염되기도 한다[13]. 반면에 이는 고농도의 NaCl 환경하에서 일반세균의 오염없이 제균배양(axenic cultivation)이 가능하므로 앞으로 이들 세균의 대사작용을 이용하여 단백질, 핵산, 대사산물등의 생체성분들을 직접 *in vitro* 에서 무균처리 조건없이도 생합성할수 있을것이다. 이와 같은 호염성 세균에 대하여 현재까지 extreme halophile에 관한 배양조건과 생화학적, 유전학적 연구가 많이 이루어져오고 있으며[3,5,6,22] moderate halophile에 관해서는 pickle-making, vegetable salting, fish and meat brines 등에서 분리된 몇종에 대하여 그 배양조건들을 조사한 정도이고[6] 최근

* 1 이 논문은 1982년도 문교부 기초과학연구 조성비에 의하여 연구되었음.
* 2 부산수산대학 해양과학연구소 연구업적 제89호(Contribution No. 89 of Institute of Marine Sciences, National Fisheries University of Pusan)

에 *Micrococcus varians* [10,11] 와 *Bacillus* sp.[18] 로 부터의 halophilic nuclease에 대하여 알려지고, *Acinetobacter* sp.[17] 와 *M. halobius*[19] 로부터의 amylase 정제 및 성질들이 밝혀지고 있다. 본 연구에서는 해양환경에서 분리한 moderate halophile HB-38 균주에 대하여 우선 최적 배양조건 및 균동정을 한 다음, NaCl에 대한 몇가지 생리적 성질을 밝혀 해양세균의 호염성의 원인을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 호염성 균의 분리 및 동정

부산 수영만의 조간대 저질을 균원시료로 하여 20% NaCl을 함유한 분리용배지(Table 1)에서 생육하는 colony 중에서 생육속도가 가장 빠르며 NaCl을 첨가하지 않은 배지에서는 생육하지 못하는 HB-38 균주를 선정하여 본 실험에 사용하였으며, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8판[9]에 따라 분류하였다.

2. 배양조건

HB-38 균주의 액체배양을 위해서는 Larsen 배지[12]를 변형한 basal medium(Table 1)에 10% NaCl과 육상환경조건[21]의 염들을 첨가하여 40°C의 진탕배양기 (120 strokes/min, 진폭 5 *cm*)에서 24시간 배양하였으며, 균생육도는 spectronic 20 spectrophotometer의 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다. 고체배양은 위의 액체배지에 1.8% agar를 첨가하여 같은 조건에서 배양하였다. *E. coli* KP M 105 균주는 nutrient broth를 사용하여 37°C에서 16시간 진탕배양하였다.

Table 1. The compositions of media

Isolation medium for halophilic bacterium HB-38(pH 7.4)			
NaCl	20 %	Meat extract	0.5%
Sucrose	0.5%	Yeast extract	0.5%
Peptone	0.5%	Agar	1.8%
Basal medium for the cell growth of HB-38(pH 7.4)			
KCl	0.5%	Yeast extract	0.5%
Peptone	0.5%		
Ions typical of a marine environment			
$MgSO_4$	50mM	$CaCl_2$	10mM
Ions typical of a terrestrial environment			
$MgSO_4$	2mM	$CaCl_2$	0.55mM

Natural nutrients in each medium were sterilized separately.

3. Protoplast의 안정도

배양한 균체들을 ST 용액 〔3% NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)〕으로 2회 washing 한후, 균체 200 *mg*(wet weight)을 ST 용액 10 *ml* 에 현탁하여 lysozyme 20 *mg* 과 trypsin 20 *mg* 을 첨가하여 30°C에서 10분간 세포벽을 분해한후 얻은 protoplast를 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 회수하였다. Protoplast 안정도는 각 농도의 stabilizer가 함유된 50배량의 M/15-인산완충용액(pH 7.2)에 희석하여 1시간후 토출된 단백질량을 280 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

$$\text{protoplast 안정도} = \frac{\text{raw cell 로부터 토출된 단백질 흡광도}}{\text{protoplast 로부터 토출된 단백질 흡광도}} \times 100(\%)$$

4. Succinic dehydrogenase 효소액 조제

HB-38의 succinic dehydrogenase는 10% NaCl과 육상조건의 염을 함유한 배지에서 배양한 세포를 M/15-인산완충용액(pH 7.2)으로 2회 washing 한후, 균체 100 *mg*(wet weight)을 다시 완충액 1 *ml* 에 현탁하여 세포마쇄기로 30분간 마쇄한 것을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 효소로 사용하였다. 대장균은 nutrient broth에서 배양한 세포를 위와같이 처리하여 사용하였으며, bovine liver의 succinic dehydrogenase는 시판 소의 간 100 *mg* 을 완충액 1 *ml* 로 마쇄한 다음, 원심상등액을 사용하였다.

5. Succinic dehydrogenase 활성측정

Thunberg tube를 사용하여 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride가 환원되어서 생성하는 diformazan을 470 nm에서 그 흡광도를 측정하였다[23].

6. Succinic dehydrogenase의 염석

효소액 1 *ml* 에 $(NH_4)_2SO_4$ 혹은 NaCl을 첨가하여 4°C에서 overnight 염석시킨후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 M/15-인산완충용액 (pH 7.2)에 현탁한 다음 투석하여 9% NaCl이 함유된 반응액에서 그 역가를 측정하였다.

7. Curing 및 DNA 추출

Ethidium bromide에의한 호염성인자의 curing test [2]를 위하여, 6.1×10^3 cells/*ml*의 농도로 40°C에서 24시간 진탕배양한후 호염성인자의 유실을 NaCl이 첨가되지않은 배지에 replica plating하여 조사하였다. 그리고 DNA는 Miura법[15]에 따라 추출하였으며 0.7% agarose를 사용하여 전기영동[14]하였다.

결과 및 고찰

1. 사용균주의 동정

본 실험에 사용한 균주 HB-38은 Gram 양성균으로 포자를 형성하지않는 coccobacilli 이며 catalase 양성이므로 *Listeria* 속에 속하는 것으로 추정된다. 이 HB-38의 몇 가지 특성을 *L. denitrificans* [9]와 비교해보면 Table 2와 같으며, 탄수화물로 부터 48시간 배양후 gas 발생없이 산을 생성하는 능력을 조사해본바 Table 3과 같이 *L. denitrificans*와 유사한 결과를 나타내었으므로 *L. denitrificans* HB-38로 명명 하였다.

Table 2. Characteristics of *L. denitrificans* and HB-38

	L. denitrificans	HB-38
Gram stain	+	+
Spore	−	−
Shape	rod	rod
Motile	+	+
Catalase	+	+
Indol production	−	−
Casein hydrolysis	−	−
Nitrate reduction	+	+

Table 3. Acid production from carbohydrates by *L. denitrificans* and HB-38

	L. denitrificans	HB-38
L-arabinose	+	+
D-galactose	+	−
Lactose	+	−
Sucrose	+	+
Xylose	+	+
Dextrin	+	+
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Maltose	+	+
Mannose	+	+
Starch	+	+
Raffinose	−	−

2. HB-38의 생육에대한 NaCl 요구량

Basal medium (Table 1)에 육상환경조건과 해양환경조건으로 각각 달리하여 40°C에서 24시간 진탕배양한후 540 nm에서 그 흡광도를 측정하여 균체 증식정도를 나타내었다. Fig. 1에서와 같이 해양조건배지에서는 4% NaCl이, 그리고 육상조건배지에

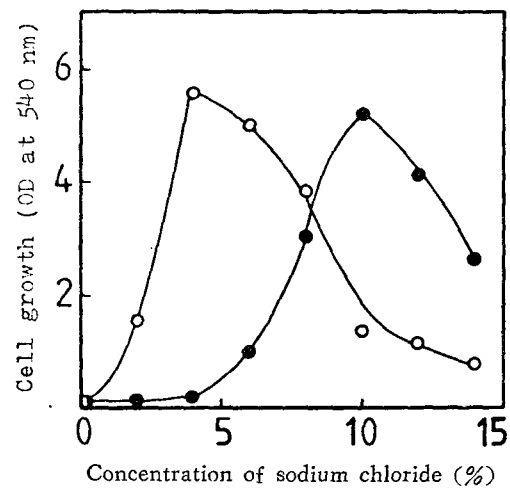

Fig. 1. Sodium chloride requirement on the liquid culture of *L. denitrificans* HB-38. Cultivation was carried out in the basal medium with terrestrial environment (●—●) or marine environment(○—○) at 40°C for 1 day on reciprocal shaker.

Table 4. Sodium chloride requirement on the solid culture of *L. denitrificans* HB-38

NaCl(%)	Culture time (hr)				
	24	48	72	96	240
0	−	−	−	−	−
5	±	±	±	+	+
10	+	++	++	++	++
15	++	+++	+++	+++	+++
20	+	+	+	+	+
25	±	±	±	±	±
30	−	−	−	−	−

The basal medium with terrestrial environment was supplemented by the addition of 2% agar as solid medium. Cultivation was carried out at 40 °C. +++, excellent growth; ++, good growth; +, poor growth; −, no growth.

서는 10% NaCl 농도에서 생육최적임을 보였다. 같은 조건에서 정치배양을 했을경우도 균체증식량만 1/4로 감소하였지만 같은 NaCl 요구량을 보였다. 고체배지상에서의 생육에대한 NaCl 요구도는 Table 4와 같이 10% 내지 15% NaCl 농도에서 가장 균성장이 좋았다. 따라서 HB-38 균주는 moderate halophile로 분류하였다.

3. 온도변화에 의한 HB-38의 생육도

10% NaCl과 육상조건의 염을 함유한 basal medium에서 배양온도를 달리하여 48시간동안 정치배양을 한 결과 Fig. 2에서 보는바와같이 40°C 배양조건에서 최적온도였다. 이는 일반적인 extreme halophile의 최적생육온도와 같았다[6].

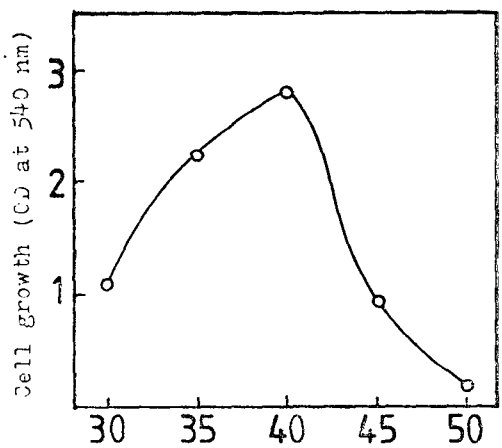

Fig. 2. Effect of temperature on the cell growth of *L. denitrificans* HB-38. Standing culture was performed for 48 hrs in the basal medium containing 10% sodium chloride and ions of terrestrial environment.

4. 배지 pH에의한 HB-38의 생육도

10% NaCl과 육상조건 염을 함유한 basal medium의 pH를 달리하여 40°C에서 24시간동안 진탕배양하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 결과 Fig. 3과같이 pH 7.5의 배지에서 최적 균생육도를 보였다.

5. Protoplast 안정도의 비교

생육환경에 고농도의 염을 요구하는 호염성세균

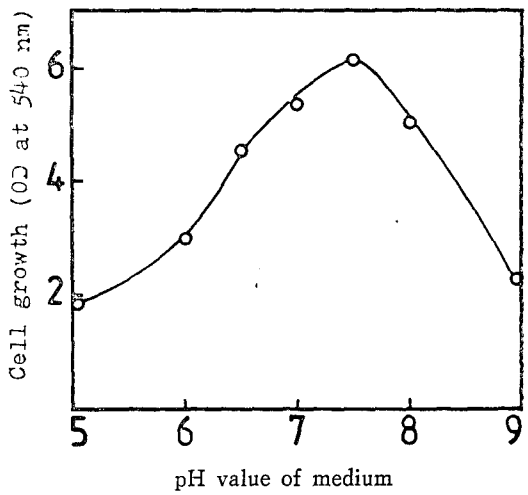

Fig. 3. Effect of pH on the cell growth of *L. denitrificans* HB-38. Shaking culture was performed for 1 day at 40°C in the basal medium containing 10% sodium chloride and ions of terrestrial environment.

HB-38과 비호염성인 *E. coli* KPM 105와의 세포내압을 상대적으로 비교해 보고자 protoplast 상태에서 각 농도의 stabilizer를 첨가한 M/15-인산완충액(pH 7.2)에 현탁시켜서 토출되는 단백질량을 측정하여 protoplast 안정도를 나타낸바 Fig. 4와 같다. HB-38은 3% NaCl, 10% sorbitol, 그리고 30% sucrose 농도에서 각각 가장 안정하였으므로 비호염

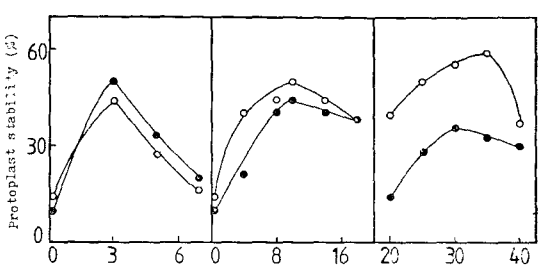

Fig. 4. Effect of stabilizers on the protoplast stability. Each concentrations of stabilizers were added into protoplast suspension (M/15-phosphate buffer, pH 7.2) which was prepared from the cells of *L. denitrificans* HB-38 (●—●) and *E. coli* KPM 105 (○—○).

성세균의 세포와 유사하였다. 따라서 호염성세포의 protoplast 안정화와 생육에 필요한 높은 염요구성과는 서로 관련이 없는것으로 여겨진다.

그리고 HB-38균주의 경우 *E. coli* KPM 105와 비교해서 stabilizer로서 NaCl이 sorbitol이나 sucrose보다 protoplast에 더 안정성을 주는것으로 보여진다.

6. Succinic dehydrogenase 활성에 미치는 NaCl의 효과

호염성세균의 NaCl 요구성의 한 원인을 조사하고자 HB-38과 비호염성인 *E. coli* KPM 105 및 bovine liver 세포의 기초대사작용중의 한 효소인 succinic dehydrogenase의 작용에 필요한 NaCl의 요구도를 조사하였다. 최종농도로서의 NaCl을 각각 첨가한후 그 활성을 측정한 결과 Fig. 5에서 보는 바와같이 비호염성세포에서는 NaCl이 그 활성을 급격히 저해하였으나, 반면에 HB-38의 succinic dehydrogenase 작용에는 NaCl이 반드시 요구되며 9% 농도에서 최적활성을 보였다. 이는 본 균의 최적생육에 필요한 10% NaCl 농도와 거의 일치한다. 또 Holmes[7,8]등에 의한 obligately halophilic bacterium의 거의 모든 효소들이 최적활성에 NaCl을 요구한다는 결과와도 같으므로 호염성의 원인은 세포내 효소작용에 NaCl을 반드시 요구함에 기인한다고 볼 수있다. 그리고 HB-38균주가 생성하는 extracellular α-amylase의 활성에 역시 4%이상의 NaCl을 요구하였다(미발표 자료).

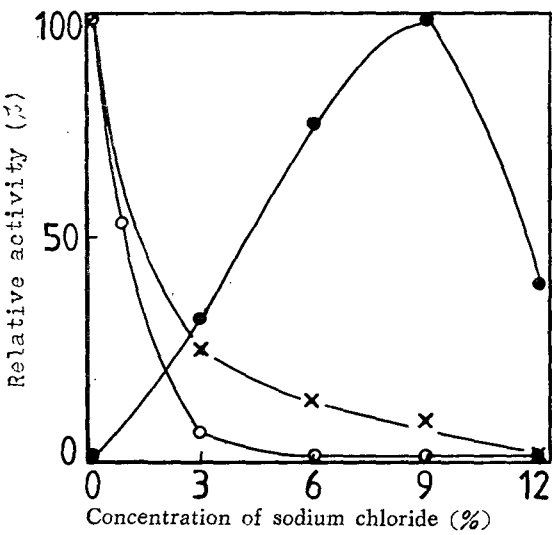

Fig. 5. Effect of sodium chloride on the activity of succinic dehydrogenase. The enzyme was prepared from *L. denitrificans* HB-38 (●—●), *E. coli* KPM 105 (○—○), and bovine liver (×—×).

7. Succinic dehydrogenase의 염석

호염성세균 HB-38이 생성하는 succinic dehydrogenase의 고농도 염에의한 안정성을 비호염성세포의 효소와 비교하고자 $(NH_4)_2SO_4$와 NaCl을 사용하여 각각 분별침전법으로 염석하여 그 활성을 조사한바 Fig. 6과 같다. HB-38과 bovine liver의 succinic dehydrogenase는 각 염의 65%포화농도에서 변성침전하였고 *E. coli* KPM 105의 경우 75% 포화농도에서 침전하였다. 따라서 높은 염 포화농도에서의 succinic dehydrogenase 효소단백질의 구조적 안정성이 균 생육환경에의 염 요구성과는 일치하지 않는것으로 보인다.

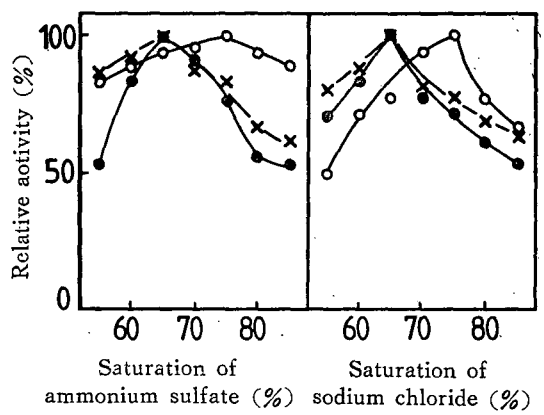

Fig. 6. Fractionation of the succinic dehydrogenase by salting-out. The enzyme was prepared from *L. denitrificans* HB-38 (●—●), *E. coli* KPM 105 (○—○), and bovine liver (×—×).

8. HB-38 균주의 호염성인자에 대한 curing test

호염성세균인 HB-38균주에 호염성을 부여하는 extrachromosomal DNA의 존재여부를 조사하기위하여 ethidium bromide를 사용하여 curing시켜 보았으나 Table 5에서 보는바와 같이 전연 curing된 변이주를 얻을수 없었다. 이를 재검토하기 위하여 HB-38의 DNA를 추출한 다음 0.7% agarose를 사용하여 10 volts/cm 전압으로 2시간동안 전기영동하여본 결과, 역시 extrachromosomal DNA의 부분

을 볼수없었다. 따라서 이의 호염성은 chromosomal DNA에 기인하여 지배받는 것으로 보여진다.

Table 5. Elimination of halophilic factor in *L. denitrificans* HB-38 by the treatment of ethidium bromide

Concentration ($\mu g/ml$)	Viable cells/ ml	Eliminated colony/ tested colony
0	3.8×10^9	0/81
10	4.9×10^3	0/127
20	3.9×10^1	0/39
30	0	—

요 약

부산 수영만의 조간대 저질에서 moderate halophile인 *Listeria denitrificans* HB-38을 분리하여 생육에 필요한 NaCl 요구도를 조사한바, 해양환경조건의 배지에서는 4% NaCl에서 육상환경조건의 배지에서는 10% NaCl에서 최적농도였으며, 균생육 최적온도는 40°C였고, 생육최적 pH는 7.5이었다. 그리고 비호염성인 *E. coli* KPM 105와 protoplast 안정성을 비교해본 결과, 더 높은 stabilizer의 농도를 요구하지는 않았으며, stabilizer로서 NaCl이 sorbitol이나 sucrose보다 protoplast에 더 안정성을 주는 것으로 나타났다. HB-38균주의 succinic dehydrogenase 활성에는 NaCl 농도가 증가함에 따라 그 활성이 증가하다가 9%에서 최대에 달하였다. 반면에 이 호염성효소의 $(NH_4)_2SO_4$와 NaCl에 의한 염석은 비호염성인 *E. coli* 및 bovine liver 세포의 경우보다 더 높은 농도의 염에 의하는 것은 아니였다. 그리고 ethidium bromide에 의한 curing과 agarose gel 전기영동의 결과 HB-38은 extrachromosomal DNA를 가지지 않는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1) Britt, E.M. and P.Gerhardt. 1962. Bacterial permeability. J.Bacteriol. 76, 281-287.

2) Davies, J. 1975. Genetic methods for the study of antibiotic resistance plasmids. Hash, J.H. Antibiotics. Colowick, S.P. and N.O.Kaplan. Methods in enzymology. Vol. XLⅢ. pp.41-55. Academic Press. N.Y.

3) Dfeifer, F., G.Weidinger and W.Goebel. 1981. Characterization of plasmids in Halobacteria. J.Bacteriol. 145, 369-374.

4) Dundas, I.D., V.R.Srinnivasan and H.O. Halvorson. 1963. A chemically defined medium for *Halobacterium salinarium* strain 1. Can.J.Microbiol. 9, 619-624.

5) Flannery, W.L. 1956. Current status of knowledge of halophilic bacteria. Bac.Rev. 20, 49-66.

6) Gibbons, N.E. 1969. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. Norris, J.R. and D.W.Ribbons. Methods in microbiology. Vol. 3B. pp.169-183. Academic Press. N.Y.

7) Holmes, P.K., I.D.Dundas and H.O. Halvorson. 1965. Halophilic enzymes in cell-free extracts of *Halobacterium salinarium*. J.Bacteriol. 90. 1159-1160.

8) Holmes, P.K. and H.O. Halvorson. 1965. Properties of a purified halophilic malic dehydrogenase. J.Bacteriol. 90, 316-326.

9) Holts, J.G. 1977. The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. pp.222-223. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

10) Kamekura, M. and H.Onishi. 1974. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. J.Bacteriol. 119, 339-344.

11) Kamekura, M. and H.Onishi. 1978. Properties of the halophilic nuclease of a moderate halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. J.Bacteriol. 133, 59-65.

12) Larsen, H. 1981. The family Halobacteriaceae. Starr, M.P., H.Stolp, H.G.Truper, A.Balows and H.G.Schlegel. The Prokaryotes, Vol. 1. pp. 985~993. Springer-Verlag, Berlin.

13) MacLeod, R.A., E.Onogrey and M.E.Norris. 1954. Nutrition and metabolism of marine bacteria. J.Bacteriol. 68, 680-686.

14) Maniatis, T., E.F.Fritsch and J.Sambrook. 1982. Molecular cloning. pp.150-172. Cold

Spring Harbor Laboratory. N.Y.

15)Miura, K.I. 1968. Preparation of bacterial DNA by the phenol-pH9-RNase methods. Grossman, L. and K.Moldave. Methods in enzymology. Vol. XⅡ-B. pp.543-545. Academic Press. N.Y.

16) Moore, R.L. and B.J.MacCarthy. 1969. Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria J.Bacteriol. 99, 248-252.

17) Onishi,H. and O.Hidaka. 1978. Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *Acinetobacter* sp. Can. J.Microbiol. 24, 1017-1023.

18) Onishi,H., T.Mori, S.Takeuchi, K.Tani, T.Kobayashi and M. Kamekura. 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp. Appl.Environ. Microbiol. 45, 24-30.

19) Onishi,H. and K.Sonoda. 1979. Purification and some properties of an extracellular amylase from a moderate halophile, *Micrococcus halobius*. Appl. Environ. Microbiol. 38, 616-620.

20) Robinson,J. 1950. A possible explanation of microbial halophilism. Dissertation. McGill University. Montreal. Canada.

21) Stanier.R.Y., E.A.Adelberg, J.L.Ingraham. 1976. The microbial world. 4th ed. pp.299-303. Prentice-Hall Inc. New Jersey.

22) Weidinger,G., G.Klotz, and W.Goebel. 1979. A large plasmid from *Halobacterium halobium* carrying genetic information for gas vacuole formation. Plasmid. 2, 377-386.

23) 赤堀四郎, 1956. 酵素研究法, 2卷, pp.495-508. 朝倉書店. 東京.