

## 동결건조법에 있어 *Nocardia mediterranei*의 세포막 손상과 재수화 방법에 따른 생존도

이동희 · 이노운\* · 최남희<sup>1</sup>  
건국대학교 미생물공학과, <sup>1</sup>(주)중근당

### Membrane Injury of *Nocardia mediterranei* upon Lyophilization and Viability Depending on Rehydration Methods

Yi, Dong-Heui, No-Woon Lee\* and Nam-Heui Choi<sup>1</sup>

Department of Microbiological Technology, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea  
<sup>1</sup>Chong Kun Dang Corp., 410 Shindorim-Dong, Guro-Gu, Seoul 152-070, Korea

**Abstract** — In order to examine the viability depending on rehydration process and membrane injury of *Nocardia mediterranei* upon lyophilization, We labeled <sup>3</sup>H-thymidine in deoxyribonucleic acid of *N. mediterranei* to obtain information on the mechanisms of injury caused by lyophilization. Suspensions of rehydrated cells were incubated with added DNase in a buffer solution. Extracellular radioactivity levels appeared to be high in the rehydrated solutions after lyophilization than freezing-thawing. Thus, the membrane systems were injured by lyophilization, but not overwhelmed. These considerations were confirmed by electron microscopy. In effects of rehydration, the cell membrane was seriously damaged by strong atmospheric pressure as soon as the inner ampule was opened, but this was not the case without admitting air under vacuum. *N. mediterranei* cells, with no additives, were lyophilized and reconstituted without admitting air, virtually about 84% of the cells were viable.

*Nocardia mediterranei*는 포자를 생성하지 않는 균주로서 산업적으로 매우 중요한 ansamycin계 항생물질인 rifamycin B를 생산하는 방선균이다(1-4). 이 rifamycin은 그람 양성균 및 음성균에 강력한 항균 작용을 나타내며, 특히 항결핵 치료제로 널리 사용되고 있다(5). 일반적으로 방선균에 의한 항생물질을 생산할때 무엇보다도 가장 중요한 것은 활성이 높은 균주를 균일하게 사용하는 것이다. 이를 위해 오늘날 가장 보편적으로 사용하는 방법은 한천배지에서 계대배양하여 사용한다. 이 방법은 다른 미생물에 의한 오염, 계속적인 이식 작업으로 작업량 과다 및 변이 발생(6) 등의 요인으로 균일한 고역가균주 사용이 쉽지않다. 이러한 결점을 보완하기 위해 가장 많이 사용하고 있는 방법은 균주를 동결보존하는 것이다

(7). 또한 동결건조법은 장기간 보존 가능한 장점이 있다(8,9). 그러나 동결건조법이 균주의 생존도에 미치는 인자에 관한 연구 자료는 많이 보고되고 있으나(10-13), 동결건조가 세포막에 미치는 영향과 재수화 과정에 관한 연구 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 실험은 동결건조법에 의해 균주의 활성도를 유지하면서 장기간 보존하기 위해 동결건조법이 *N. mediterranei*의 세포막 손상에 미치는 영향을 <sup>3</sup>H-thymidine을 사용하는 DNA유출방법과 전자현미경으로 조사하였으며, 재수화 과정이 생존도에 미치는 영향을 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주 *Nocardia mediterranei* (ATCC 13685)를 한천배지에 계대한 후 전배양 배

**Key words:** Lyophilization, rehydration, incorporation, membrane injury

\*Corresponding author

지에서 배양한 액을 지름이 18 mm인 시험관에 분주하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 급속동결시킨 frozen vegetative mycelium(F.V.M.)를 종균으로 사용하였다. 한천배지 조성은 oat flakes 15g, glucose 4g, malt extract 10g, yeast extract 4g, agar(Bacto) 20g, 증류수 1l를, 전배양 배지 조성은 glucose 20g, beef extract(Difco) 5.0g, peptone(Difco) 5.0g, yeast ext.(Difco) 5.0g, caseitone(Difco) 3.0g, 증류수 1l를 사용하였다.

### 배양조건

균주는 한천배지에 single colony가 출현할 수 있도록 0.8% NaCl 용액으로 희석( $10^{-7}\sim 10^{-9}$ )하여 도포한 후  $28^{\circ}\text{C}$ 에서, 9일간 배양하여 균주를 선발한다. 이 균주는 전배양 배지 100 ml씩 들어있는 500 ml 둥근 플라스크에 선발된 균주를 6~7 loops 식균하여 진폭 5 cm, 120 stroke/min의 reciprocal shaker에서  $28^{\circ}\text{C}$ 로 48시간 배양하였다.

### 동결 및 동결건조

10 ml 용기에 균주 1 ml를 넣어  $-70^{\circ}\text{C}$ (acetone + dry ice)에서 급속 동결시킨 후 lyophilizer(LABCON Co., U.S.A.)에 연결시켜 0.005~0.01 torr 진공상태에서 5시간 건조 후 밀봉하여 동결건조하였다. 이 동결건조된 용기는  $-70^{\circ}\text{C}$  초저온 냉동고에 보존하여 제조일로부터 10일 이내에 사용하였다.

### 생균수 및 생존도 결정

시료를 vortex mixer를 사용하여 0.8% NaCl으로  $10^{-6}\sim 10^{-9}$ 까지 희석하여 충분히 혼합한 후 한천배지에 도말하여  $28^{\circ}\text{C}$  항온실에서 5일간 배양한 후 출현한 colony수를 측정하여 그 평균값을 구하였다. 이때 출현한 colony수는 colony forming unit(CFU)로 정의하였다. 따라서 생존도(viability)는 F.V.M. 대조균의 생균수에 대해 동결건조한 생균수의 비율을 %로 표시하였다.

$$\text{생존도(viability)\%} = \frac{\text{CFU after lyophilization}}{\text{CFU of F.V.M.}} \times 100$$

### $^3\text{H}$ -thymidine incorporation

지름 24 mm인 시험관에 10 ml 전배양 배지를 넣어 1%의 *N. mediterranei*를 식균하여  $28^{\circ}\text{C}$ 의 reciprocal shaker(진폭 5 cm, 120 stroke/min)에서 배양한 결과,

48시간에 stationary phase에 도달하였으며, 이때의 세포수는 약  $50 \times 10^9$  CFU/ml이었다. 이 조건하에서  $^3\text{H}$ -thymidine(New England Nuclear사 제품)을 *N. mediterranei*의 deoxyribonucleic acid (DNA)에 표지하기 위해 전배양 배지 10 ml를 24 mm 시험관에서 30시간 배양한 후  $10 \mu\text{Ci}$ 의  $^3\text{H}$ -thymidine을 주입하여 계속 18시간 연장 배양하므로써 표지하였다. 이때 표지되지 않는  $^3\text{H}$ -thymidine을 제거하기 위하여  $\text{MgCl}_2(5 \times 10^{-3}\text{M})$ 를 함유한 Tris-HCl buffer(pH 7.3,  $10^{-2}\text{M}$ )로 원심분리(3000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ )하여 3~4회 세척하였다.

### DNase 처리 및 동위원소 분석

$^3\text{H}$ -thymidine이 표지된 약  $50 \times 10^9$  CFU/ml인 *N. mediterranei*를 1 ml씩 8개의 무균 시험관에 분주하여 4개의 시험관에 DNase(Sigma Chemical Co. U.S.A.)를 최종농도  $800 \mu\text{g/ml}$ 되게 첨가하고, 나머지 4개 시험관에는 DNase를 첨가하지 않았으며 DNase를 첨가한 2개의 시험관 시료와 첨가하지 않는 2개의 시료를 함께  $30^{\circ}\text{C}$  water bath에서 교반하면서 배양하고 나머지 4개의 시료는  $4^{\circ}\text{C}$  항온실에 보관하였다. 이 시료의 방사선 동위원소의 분석은 8개의 시료를 원심분리(5000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ )하여, 상등액을 각각 scintillation vial(Beckman, Mini Poly-Q Vials)에 20 ml씩 넣고 non-aqueous scintillation fluid(Beckman사 제품)를 4 ml씩 첨가하였다. 잘 흔들어 준 후 liquid scintillation counter(Beckman LS-3801)로 방사선량을 측정하였다.

### 재수화 방법

동결건조 후 재수화는 보통 공기를 허용하여 이루어진다. 그러나 Fig. 1은 공기를 허용하지 않는 상태에서 시료를 재수화하는데 사용하는 장치이다. 그림에서 외부용기에 증류수 3 ml를 넣고, 끝이 얇고 날카로운 내부용기(inner ampule)를 오염 방지를 위해 UV-lamp로 3~4분 살균한 후 끝이 아래를 향해 증류수에 닿도록 주의하여 넣는다. 증류수와 내부용기가 들어 있는 외부용기(outer ampule)를  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결한 후 lyophilizer에 연결하여 0.1 torr 상태로 유지하여 2~3분 진공시킨 후 밀봉하였다. 재수화는 외부용기를 흔들어 내부용기의 날카로운 끝이 진공상태에서 파손되므로써 이루어진다. 또한 동결건조후 재수화에 미치는 영향을 조사하기 위해 4가지 재수화 방법을 고안하여 다음과 같이 실시하였다. 첫번째, 공기를

허용한 상태에서 재수화. 두번째, 공기가 없는 진공 상태인 밀봉된 2중용기에서 재수화. 세번째, 공기를 허용한 개봉된 2중용기에서 재수화. 네번째, N<sub>2</sub>-gas를 주입한 밀봉된 용기에서 재수화하였다. Fig. 2는 위의 4가지 재수화 방법을 실험하기 위해 사용한 장치이다.

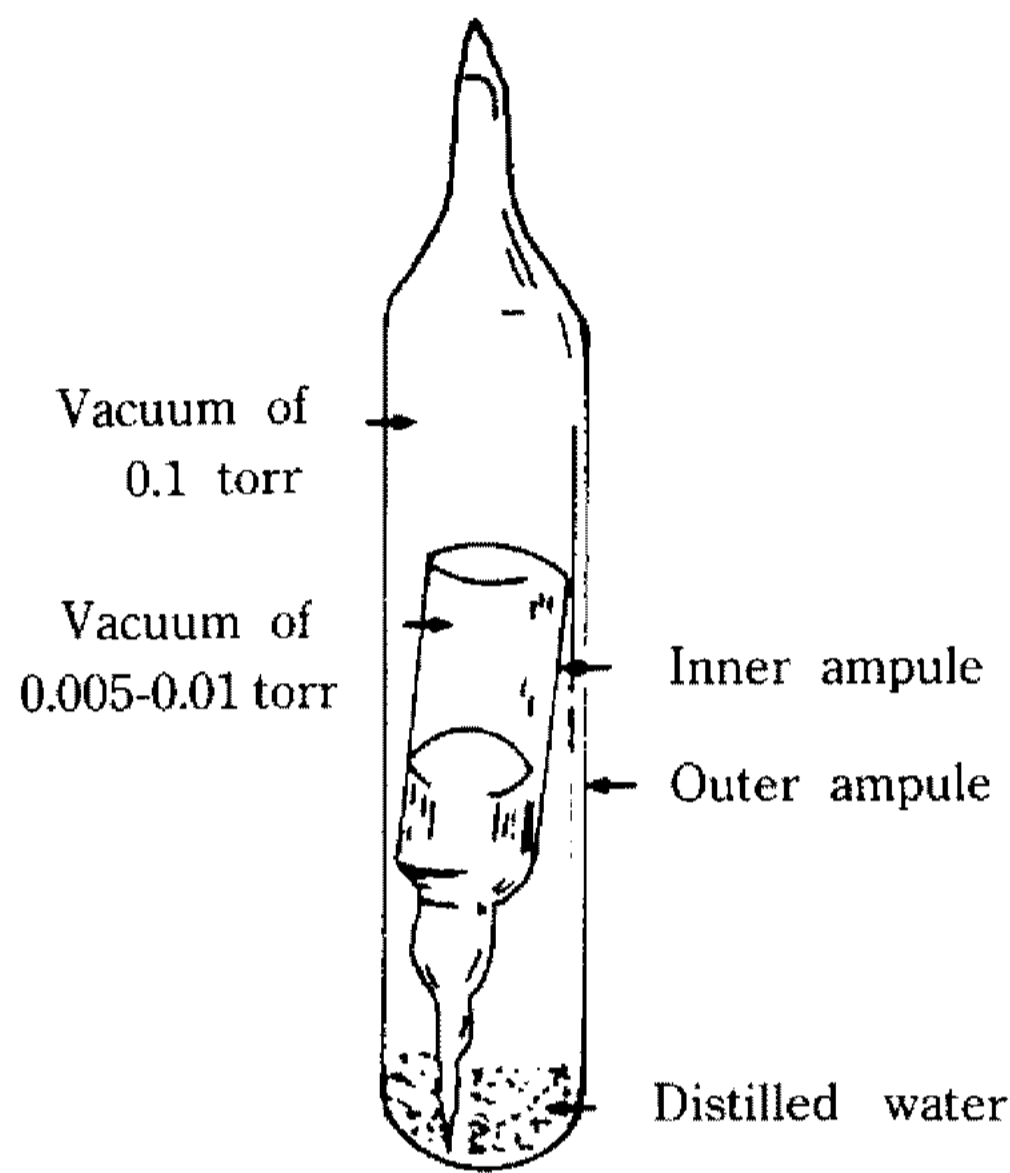


Fig. 1. Diagram of double ampule system used to rehydrate dried cells without exposure to air.

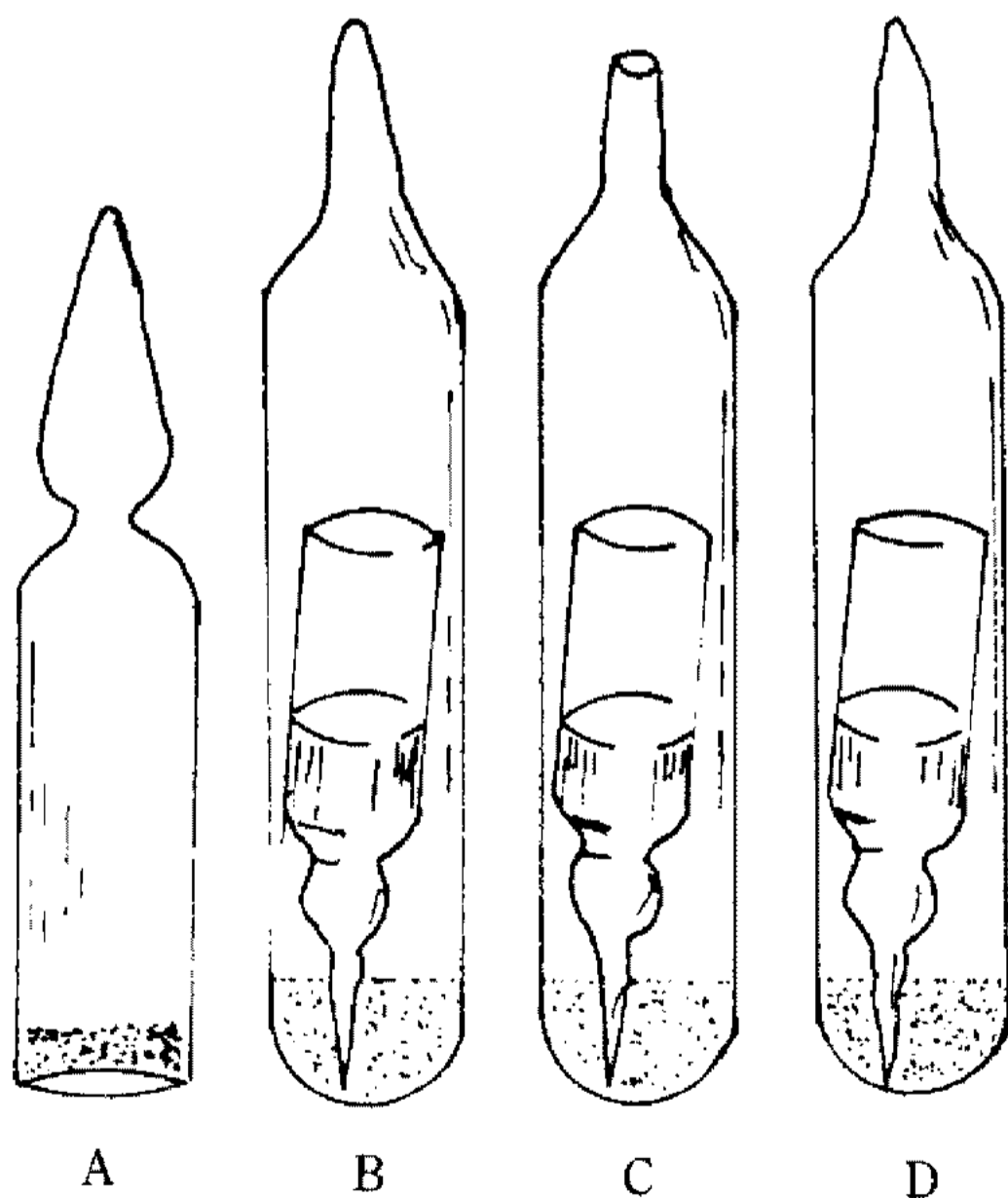


Fig. 2. Diagram of the varied ampule system used to rehydrate after lyophilization of *Nocardia mediterranei*. A: with admitting air at single ampule B: without admitting air at double ampule under vacuum C: with admitting air at double ampule D: with admitting N<sub>2</sub>-gas at double ampule under no vacuum

## 결과 및 고찰

### <sup>3</sup>H-thymidine의 표지시간 최적화

표지시간(labeling time)은 0~20시간까지 시간을 변경하면서 <sup>3</sup>H-thymidine이 incorporation되어 세포막 손상에 의해 누설된 세포의 방사선량을 측정된 결과 Fig. 3에서 나타낸 바와같이 18시간에 CPM (count per minute)값이 최대치를 나타냈으며, 20시간에는 최대치와 거의 비슷한 CPM값을 나타내었다. 따라서 <sup>3</sup>H-thymidine 표지시간은 18시간으로 결정하였다.

### DNase 처리시간 최적화

<sup>3</sup>H-thymidine이 표지된 DNA를 DNase에 의해 분해하므로써 세포막 손상에 의한 누설된 세포의 <sup>3</sup>H-thymidine량을 정확히 측정하기 위해 실험하였다. MgCl<sub>2</sub>(5×10<sup>-3</sup> M)가 함유된 Tris-HCl buffer를 사용하여 시료에 DNase를 최종농도 800 µg/ml되게 첨가한 후 30°C에서 0~20시간까지 처리한 결과 DNase 최적 처리시간은 15시간으로 나타났다. 또한 DNase에 의한 동위원소 분해는 거의 없었다(Fig. 4). Tris-HCl buffer에 MgCl<sub>2</sub>의 첨가는 DNase가 DNA를 분해하기 위해서는 Mg<sup>2+</sup>이온이 필요한 것으로 보고되었다(14).

### 동결건조가 세포막 손상에 미치는 영향

*Saccharomyces cerevisiae* 균주의 deoxyribonucleic

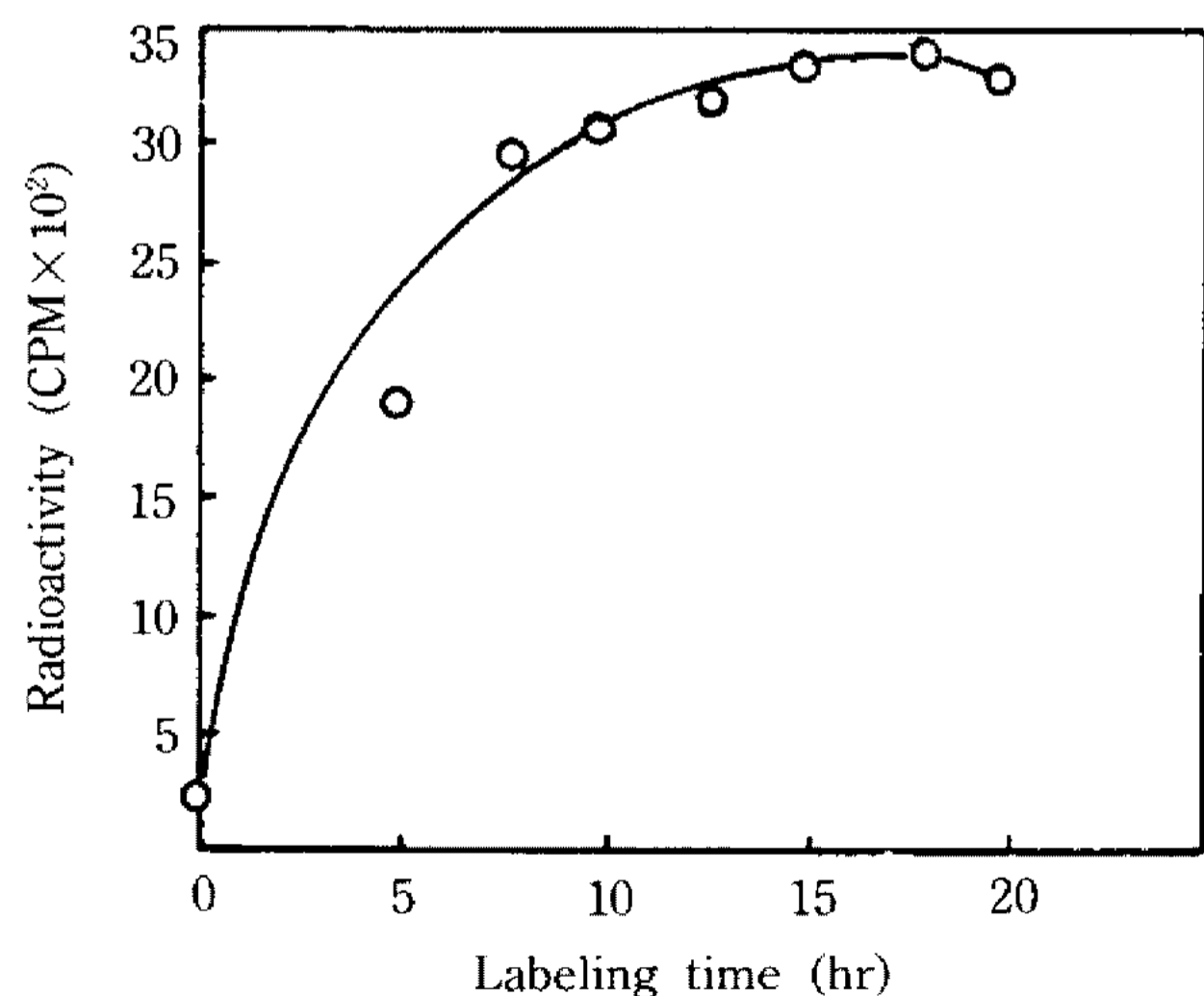
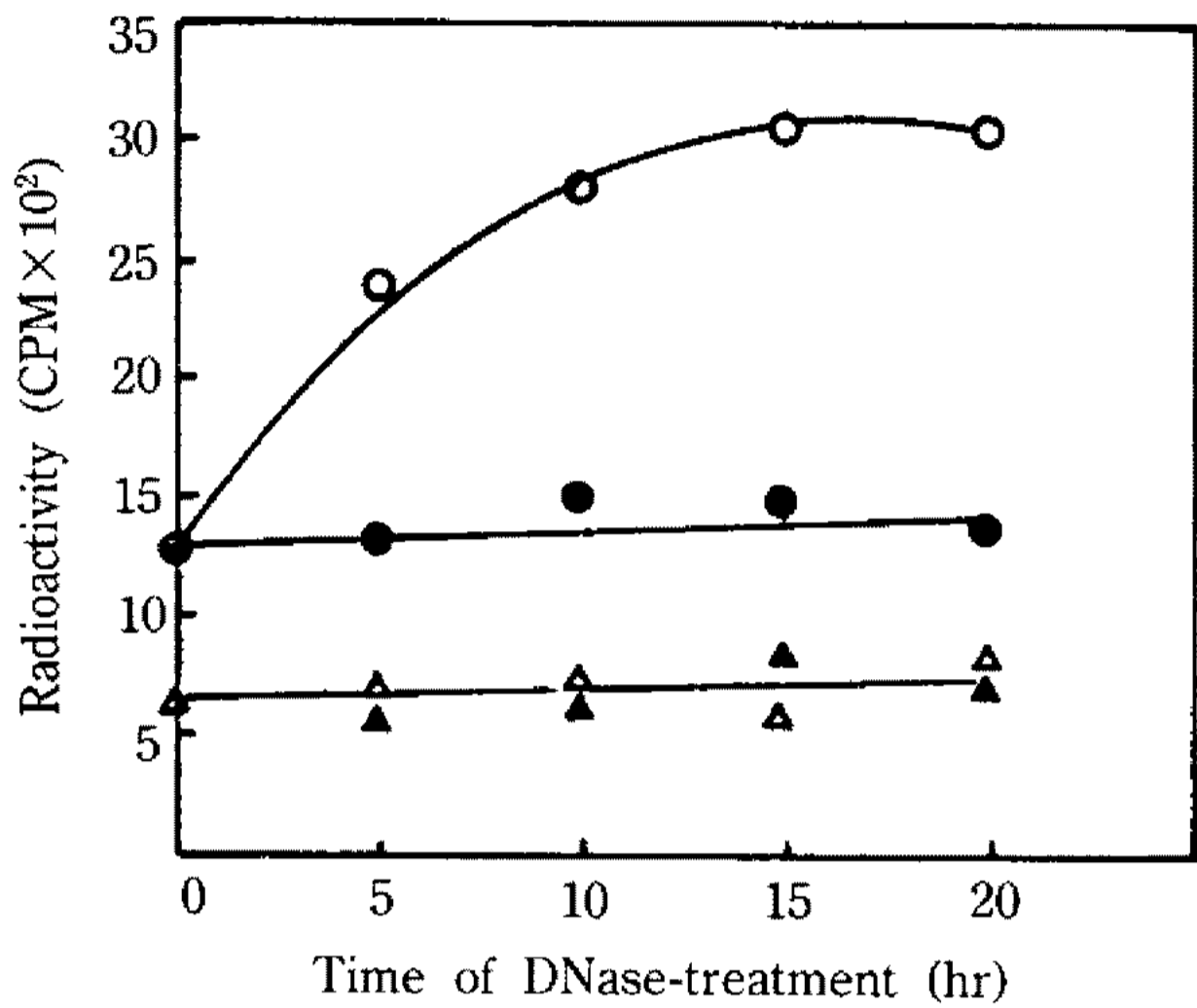


Fig. 3. Changes in the detected radioactivities on <sup>3</sup>H-thymidine incorporation of *Nocardia mediterranei*. The lyophilized samples were rehydrated by admitting air.

acid에  $^3\text{H}$ -adenine을 표지하여 액체질소(liquid nitrogen)로 급속동결함에 따라 cell damage로 인해 세포내 물질이 세포외로 누설되므로서, 이 누설된



**Fig. 4. Changes of the detected  $^3\text{H}$ -thymidine following DNase-treatment.**

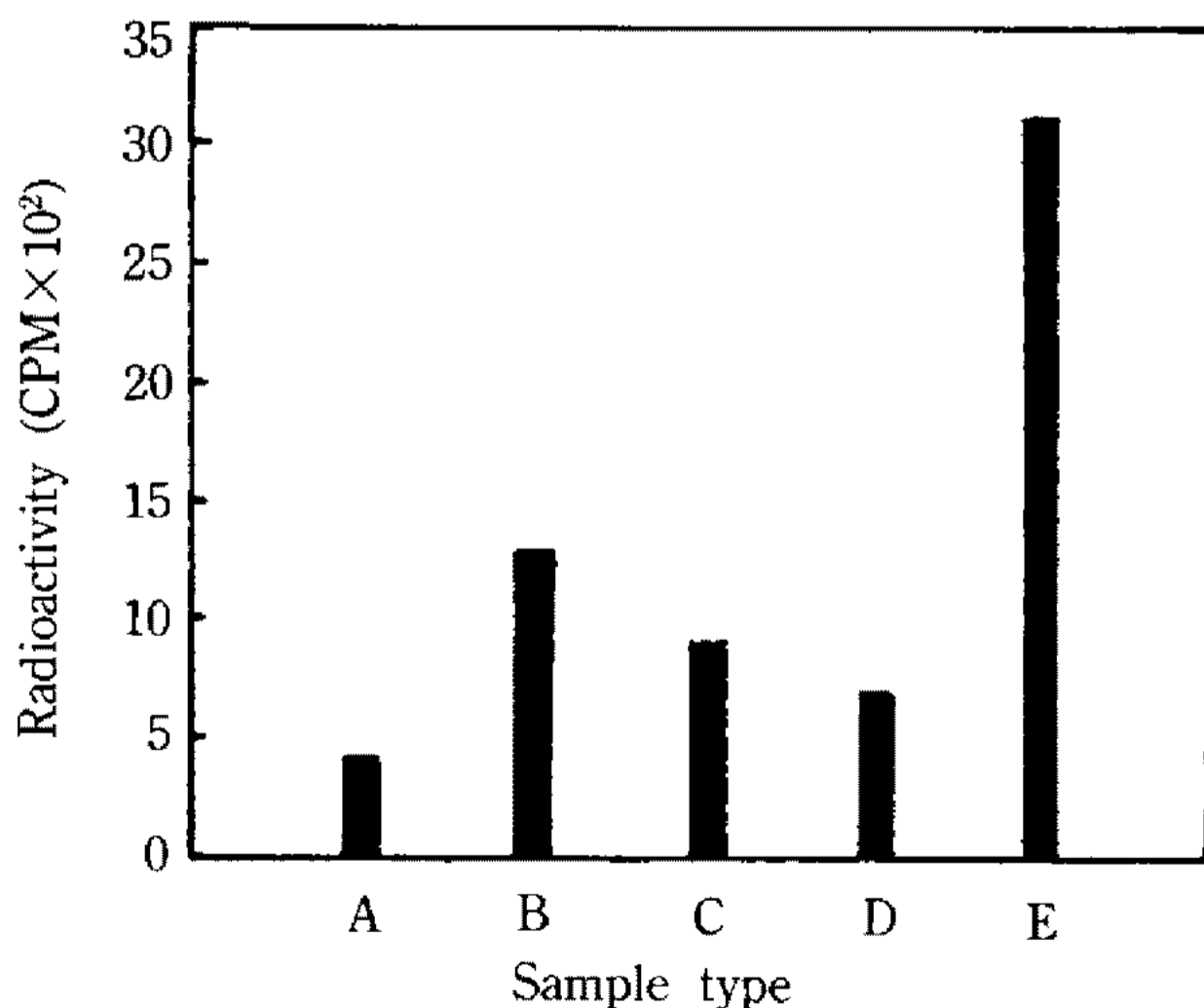
The lyophilized samples were rehydrated by admitting air.

○: supplement of DNase to the rehydrated cells after lyophilization

●: non-supplement of DNase to the rehydrated cells after lyophilization

△: supplement of DNase to  $-70^\circ\text{C}$  treated cells

▲: non-supplement of DNase to  $-70^\circ\text{C}$  treated cells



**Fig. 5. Effects of freezing-temperature and lyophilization on the detected  $^3\text{H}$ -thymidine.**

A: control sample (0~5°C storage)

B: freezing at  $-30^\circ\text{C}$  (acetone + dry ice)

C: freezing at  $-70^\circ\text{C}$  (acetone + dry ice)

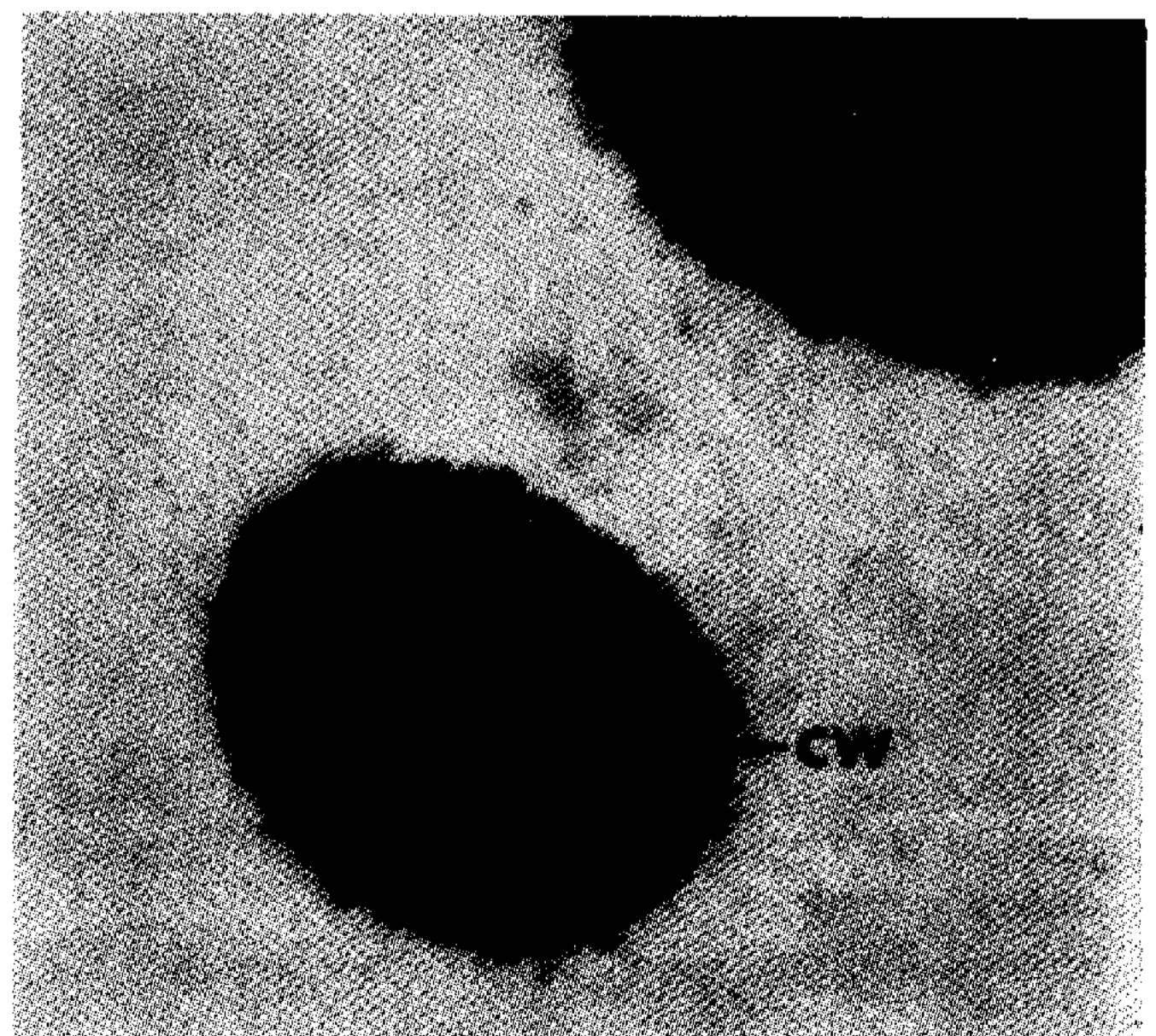
D: freezing at  $-196^\circ\text{C}$  (liquid nitrogen)

E: lyophilizing  $-70^\circ\text{C}$  treated cells and rehydrating them by admitting air

방사선 동위원소를 측정하여 세포막 손상에 관한 실험을 하였다(15). 따라서 동결 및 동결건조에 의한 세포막 손상정도를 비교 관찰하기 위하여  $-30$ ,  $-70$ ,  $-196^\circ\text{C}$ 에서 각각 동결하여 18시간  $^3\text{H}$ -thymidine을 *N. mediterranei* 균주에 표지하고 DNase를 첨가하여 15시간 처리하는 실험 조건하에서 방사선량을 측정한 결과, 동결속도가 빠를수록 세포막 손상이 적게 일어남을 알 수 있었다(Fig. 5). 따라서 ice crystal size는 동결속도에 반비례하므로 세포를 급속동결시키므로서 활성도를 높일 수 있다는 Proom 등의 보고 자료(16)와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 동결건조시 방사선량은  $-30$ ,  $-70$ ,  $-196^\circ\text{C}$ 에서 동결한 방사선량보다 현저하게 높은 값을 나타내었다. 이 결과, 동결건조시 균체의 세포막이 손상되는 것으로 판단된다. 이 세포막 손상을 전자현미경(PHILIPS CM10.)을 사용하여 관찰하였다. 동결건조 직전의 형태는 세포벽과 세포막이 정상적이나(Fig. 6), 동결건조 후 재수화된 균체의 세포벽과 세포막은 손상되어 세포내의 구조물이 누설되는 현상(Fig. 7)을 관찰할 수 있었다. 이 실험결과는 박테리아의 동결건조시 동결 및 해빙에 의해 균체의 세포벽과 세포막이 손상되어 세포내의 구조물이 방출되어 생존율을 저하시킨다는 보고(17)와 일치하였다.

**재수화 방법이 균체에 미치는 영향**

박테리아의 동결건조 후 재수화 직전 공기에 노출



**Fig. 6. Transmission electron microscopy of intact *Nocardia mediterranei* ( $\times 30,000$ ).**

CW: cell wall, CM: cell membrane.



**Table 1. Effects of rehydration process after lyophilization on the survival of *Nocardia mediterranei***

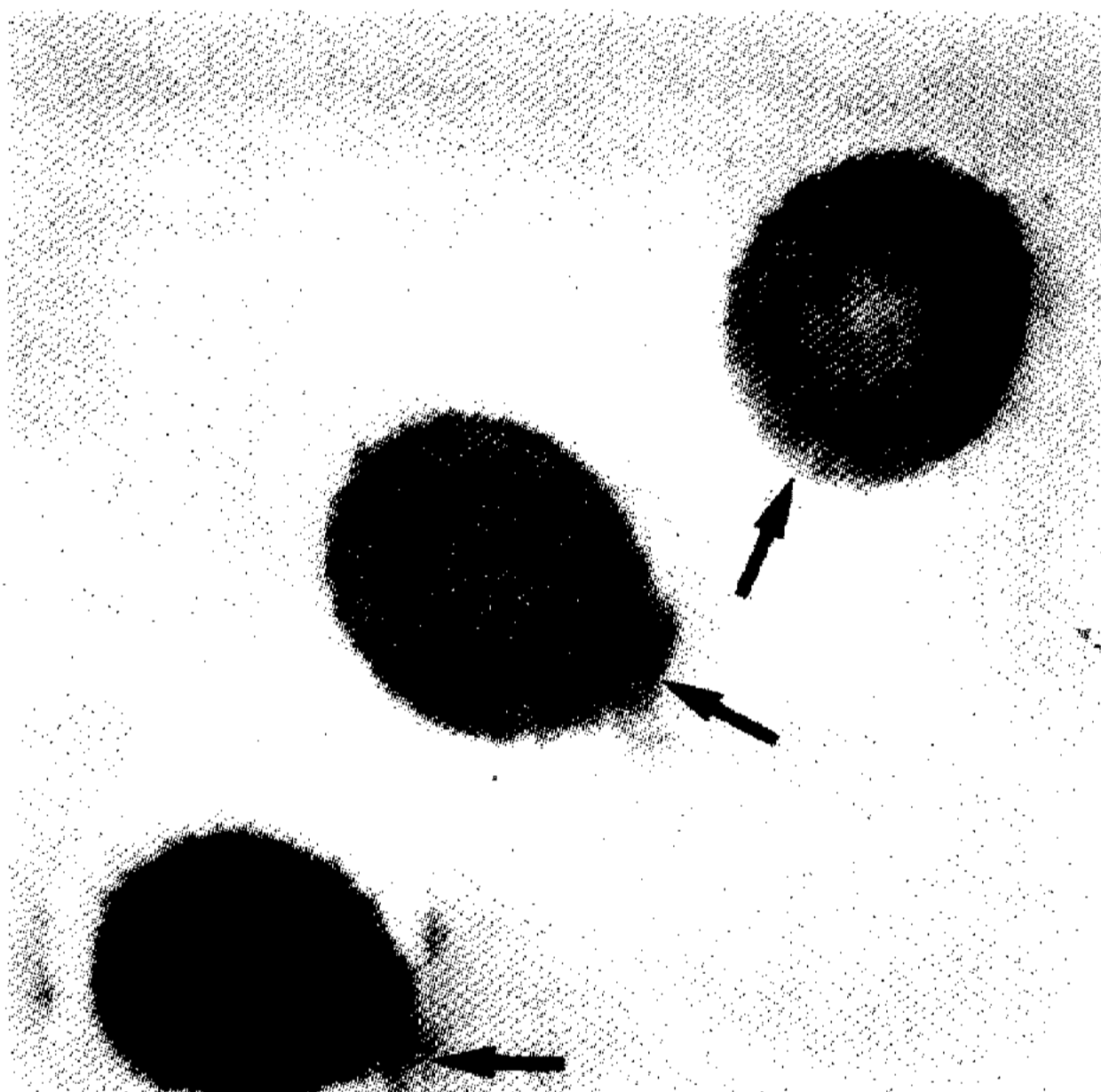
	Rehydration condition of lyophilization			
	With admitting air at single ampule	Without admitting air at double ampule*	With admitting air at double ampule	With admitting N <sub>2</sub> -gas at double ampule
Viable counts (CFU/ml)	8.4×10 <sup>9</sup>	44×10 <sup>9</sup>	39×10 <sup>9</sup>	41×10 <sup>9</sup>
Viability (%)	16	84	75	78

\*Outer ampule vacuum: 0.1 torr.

Inner ampule vacuum: 0.005~0.01 torr.

· Cryoprotectants were not used on all lyophilization

· Control-cells: frozen vegetative mycelium (F.V.M.) 52×10<sup>9</sup>/ml(100%).



**Fig. 7. Transmission electron microscopy of *Nocardia mediterranei* cells which were injured during the process of rehydration after lyophilization (×26,000).**

되는 시간이 경과될수록 활성도는 급격히 저하되며 (17), 공기가 없는 상태에서 복원시켰을 때 매우 높은 활성도를 얻을 수 있다고 보고하였다(10). 따라서 동결건조 후 재수화에 미치는 영향을 Fig. 2와 같은 장치를 사용하여 실험한 결과, 공기가 허용된 상태에서 재수화시(Fig. 2A) 균체의 생존도는 동결건조 직전 세포(F.V.M.)수 대비 약 16%를 나타냈으며, 공기가 없는 밀봉된 진공상태의 2중 용기에서는 (Fig. 2 B) 약 84% 생존도로서 매우 높게 나타났다. 또한 재수화시 산소의 영향에 관하여 실험하기 위하여 공기가 허용된 개봉된 2중 용기에서(Fig. 2C) 재수화한 생존도는 약 75%를 나타냈으며, 2중 용기에 N<sub>2</sub>-gas를 주입하여 밀봉된 상태에서 재수화한 경우(Fig. 2D)

생존도는 약 78%로 나타났다(Table 1). 따라서 동결건조법에 의해 세포를 건조 및 재수화하는 과정에서 균체 사멸의 원인이 되는 세포막 손상은 세포건조나 재수화시 산소의 영향보다는 외부용기를 개봉한 순간 진공상태에 있는 세포에 매우 큰 대기압이 작용하여 세포막 손상을 일으킴으로서 생존도를 급격히 저하시키는 것으로 판명되었다.

## 요 약

동결건조법이 *Nocardia mediterranei*의 세포막 손상에 미치는 영향을 <sup>3</sup>H-thymidine 표지에 의한 DNA 유출 방법과 전자현미경으로 조사하였으며, 재수화 과정이 생존도에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과 *N. mediterranei*의 동결건조시 세포벽과 세포막의 손상이 세포 사멸의 원인으로 판명되었다. 재수화 과정에 있어 공기를 허용한 상태에서 재수화시 생존도는 약 16%이고, 공기를 허용하지 않는 진공상태에서는 약 84%로 높게 나타났다. 따라서 동결건조법이 *N. mediterranei*의 생존도를 급격히 저하시키는 주원인은 동결건조 과정중 세포막 손상과 재수화시 산소존재의 영향보다는 동결건조 후 밀봉된 용기를 개봉한 순간 진공상태에 있는 세포에 매우 큰 대기압이 작용하여 세포막 손상을 일으킨 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

1. Sensi, P. and J.E. Thiemann. 1967. Production of rifamycins. *Prog. Indus. Microbiol.* 6: 21-60.
2. Lancini, G.C. and F. Parenti. 1978. Rifamycin biogenesis antibiotic and other secondary metabolites, Pp. 129-139. *FEMS Symposium*, No. 5.

Academic Press.

3. Lee, J.G., C.Y. Choi, B.L. Seng and M.H. Han. 1981. Optimal pH profile in rifamycin B fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **9**: 255-260.
4. Alvarez, A.M., A. Gelita, B. Resendiz, V. and F.N. Rodriguez. 1990. A strain of *Nocardia mediterranei* that produces a mixture of rifamycin B and W. *Biotechnol. Lett.* **12**: 283-288.
5. Hartmann, G., K.O. Honikel, F. Knusel and J. Nuesch. 1967. The specific inhibition of the DNA directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim. Biophys. Acta.* **145**: 843-844.
6. 고영희. 1986. 산업균주의 보존 방법, Pp. 1-15. 生物工程 技術의 原理와 産業的 應用, **1**, KAIST.
7. Tadayashi I. and T. Yokoyama. 1983. Preservation of basidicete cultures by freezing. *IFO Res. Comm.* **11**: 60-70.
8. Ellis, J.J. and J.A. Roberson. 1968. Viability of fungus cultures preserved by lyophilization, *Mycologia* **60**: 399-405.
9. Taiki K. 1985. Preservation of the antibiotic producing ability of a *Streptomyces* by lyophilization for 13 years. *IFO Res. Comm.* **12**: 101-106.
10. Heckly, R.J. and R.L. Dimmik. 1968. Correlations between free radical production and viability of lyophilized bacteria. *Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 1081-1085.
11. Rhee, S.K. and M.Y. Pack. 1980. Effect of freezing and lyophilization on lactic starter cell. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **8**: 19-25.
12. Tsvetkov, T. and R. Brankova. 1983. Viability of *Micococci* and *Lactobacilli* upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* **20**: 318-323.
13. Fayed, E.O., N.E. Sultan, N.I. Yassein and A.E. Sheata. 1986. The effect of lyophilization on viability and activity of lactic acid bacteria cultivated in Whey treated with certain proteolytic enzymes. *Egypt. J. Food Sci.* **14**: 313-322.
14. Rogers, L.A. 1914. The preparation of dried cultures. *J. Infect. Dis.* **14**: 100-123.
15. Yasuhiko, K., M. Sato and M. Osumi. 1987. Biochemical and electron-microscopic evidence for membrane injury in yeast cells quickly frozen with liquid nitrogen. *J. Ferment. Technol.* **65**: 127-131.
16. Proom, H. and L.M. Hemmons. 1949. The drying and preservation of bacterial cultures. *J. Gen. Microbiol.* **3**: 7-18.
17. Robert, J.H. 1985. Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Development in Industrial Microbiology.* **26**: 379-395.

(Received February 24, 1992)