

## Streptomyces aureofaciens 동결건조후 재수화 방법이 생존도에 미치는 영향

이노운\* · 이현우 · 이동희

건국대학교 미생물공학과

**초록** : 동결건조후 재수화 방법이 *Streptomyces aureofaciens* 생존도에 미치는 영향을 실험하기 위해  $^3\text{H}$ -adenine을 DNA에 주입시킨후 유출되는 방사선량과 균을 전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과 *Streptomyces aureofaciens*의 손상은 동결건조 과정에서 일어나는 것 보다 재수화 과정에서 공기를 허용한 상태에서 재수화시 크게 일어났으며, 그 생존도는 약 20%이고, 공기가 없는 밀봉된 진공상태의 이중 용기에서 재수화시 약 91%로 나타났다. 공기를 허용한 개봉된 이중 용기에서 증류수에 잠긴 채 재수화한 생존도는 약 36%이며, 이중 용기에  $\text{N}_2$ -gas를 주입하여 밀봉된 상태에서 재수화한 경우 약 83% 생존도를 나타냈다. 따라서 생존도는 재수화 과정에서 산소의 영향을 매우 크게 받는 것으로 나타났다(1995년 9월 25일 접수, 1995년 12월 4일 수리).

### 서 론

Tetracycline은 그람양성균, 그람음성균, 포도상구균등 광범위한 항균 스펙트럼을 갖고 있으며, 경구용 주사제 및 외용약으로 사용되고 있다. Tetracycline계인 chlortetracycline의 최초 항생제가 *Streptomyces aureofaciens*에 의해 생산되었다.<sup>1)</sup> 오늘날 미생물을 이용하는 산업화에 있어, 장기간 활성 변화와 유전적 변이 없이 안전하게 보존하면서 필요시 언제라도 복원하여 발효에 사용할 수 있는 방법이 모색되어야 한다. 현재 산업적으로 가장 많이 이용하고 있는 동결방법은<sup>2-4)</sup> 장기보존상 상당한 제한이 따르고 있다. 장기보존 가능한 동결보존법은 낮은 생존도와 활성도의 문제점이 대두되고 있는 실정이다.<sup>5-12)</sup> Beker 등<sup>13)</sup>은 yeast cell의 탈수와 차후 재수화는 세포질막 투과성을 증가시키는 원인이 된다고 하였으며, Rogers 등<sup>14)</sup>은 진공상태에서 배양액을 저장함으로써 생존율이 가장 높았으며, 공기나 산소의 존재하에서 저장한 배양액은 가장 낮은 생존율을 나타냄을 발견하였다.

따라서 재수화 방법이 동결건조한 *S. aureofaciens*의 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여  $^3\text{H}$ -denine을 *S. aureofaciens*의 DNA에 incorporation시킨 다음 동결건조후 재수화하여 cell외로 유출된 방사선량을 측정하므로써 재수화 방법에 따른 생존도를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Streptomyces aureofaciens* LAM 444를  $-70^\circ\text{C}$ 에서 급속동결한 동결균체(frozen spore suspension) 상태로  $-70^\circ\text{C}$ 에 보존하면서 1개월

이내에 사용하였다. 한천배지 조성은 malt extract 10g, yeast extract 4g, glucose 4g, agar(Bacto) 20g, 증류수 1L(pH  $6.7 \pm 1$ )를 사용하였다.

#### 배양조건

20 ml 한천배지가 들어있는 지름 24 mm 시험관에 *S. aureofaciens*를 도포하여  $28^\circ\text{C}$  항온실에서 7일간 배양한 다음 수확하여 0.8% NaCl 2 ml를 넣어 백금으로 긁어 균체현탁액( $80 \times 10^9 \text{CFU/ml}$ )을 제조하였다.

#### 동결건조

10 ml 용기(Fig. 1: Inner ampule)에 균주 1 ml를 넣어  $-30^\circ\text{C}$ ,  $-50^\circ\text{C}$ ,  $-70^\circ\text{C}$ (acetone + dry ice)와  $-196^\circ\text{C}$ (liquid nitrogen)에서 급속 동결시킨 후 lyophilizer(Labcon Co., U.S.A)에 연결시켜 0.005~0.01 torr 진공상태에서 4시간 건조후 밀봉하였다. 이 동결건조된 용기는  $-70^\circ\text{C}$  초저온 냉동고에 보존하여 제조일로부터 10일 이내에 사용하였다.

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

20 ml 한천배지가 분주된 24 mm 시험관에 *S. aureofaciens* 0.1 ml를 도포하여 40시간 배양한 다음  $^3\text{H}$ -adenine 30  $\mu\text{Ci}$ 를 고르게 주입한후 계속 약 130시간 연장배양함으로써 deoxyribonucleic acid(DNA)에 incorporation 시켰다. 배양이 끝나면 한천 사면배지에 2 ml 증류수를 넣고 백금으로 조심스럽게 긁어 현탁액을 제조하였다. 이때 DNA에 incorporation되지 않은  $^3\text{H}$ -adenine을 제거하기 위하여  $\text{MgCl}_2(5 \times 10^{-3} \text{M})$ 를 함유한 Tris-HCl buffer(pH 7.3,  $10^{-2} \text{M}$ )<sup>15)</sup>로 원심분리(3,000 rpm, 5 min,  $40^\circ\text{C}$ )하여 3~4회 세척 하였다.

찾는말 : Freeze-drying, rehydration, viability, *Streptomyces aureofaciens*

\*연락처

**DNase 처리 및 동위원소 분석**

<sup>3</sup>H-adenine이 표지된 *S. aureofaciens*를 동결건조후 1 ml씩 8개의 무균 시험관에 분주하여 4개의 시험관에 DNA를 분해하기 위해 DNase(Sigma Chemical Co., U.S. A)를 최종농도 800 µg/ml되게 첨가하고, 나머지 4개 시험관에는 DNase를 첨가하지 않았다. DNase를 첨가한 2개의 시험관 시료와 첨가하지 않은 2개의 시료를 동시에 30°C water bath 내에서 진폭 3 cm, 60 stroke/min의 reciprocal shaker로 20시간 교반하였다. 나머지 4개의 시료는 다른 실험을 하는 동안 4°C 항온실에 보관 후 측정하였다. 이 시료의 방사선 동위원소의 분석은 8개의 시료를 원심분리(5,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 각각 scintillation vial에 넣고 none-aquous Scintillation fluid(Bekman Co.)를 3 ml씩 첨가하였다. 잘 흔들어준 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 오염방지를 위해 UV-lamp로 3~4분 살균한 후 끝이 아래를 향해 증류수에 잠기도록 주의하여 넣었다. 증류수와 내부용기가 들어있는 외부용기(outer ampule)를 -70°C에서 동결한 후 lyophilizer에 연결하여 0.1 torr 상태로 유지하여 2-3분 진공시킨 후 밀봉하였다.

**생존도 측정**

생존도 측정을 위하여 표지된 *S. aureofaciens*(80×10<sup>9</sup> CFU/ml)를 Tris-HCl buffer로 3회 세척하여 DNA에 incorporation되지 않은 <sup>3</sup>H-adenine을 제거한 후 방사선량

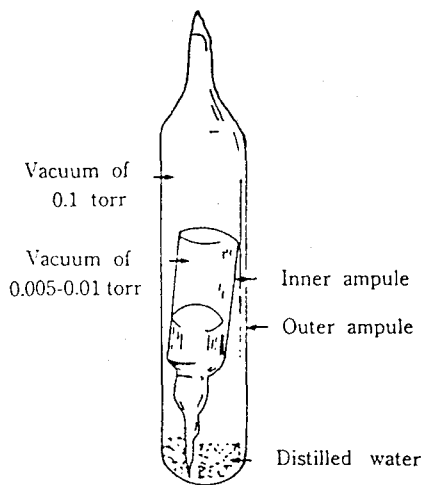


Fig. 1. Diagram of double ampule system used to rehydrate freeze-dried cells without exposure to air

을 측정할 결과 1.2×10<sup>3</sup>CPM(=주입된 정상균 방사선량: A)값을 나타내었다. 또한 세포막이 완전히 손상시 방사선량(B)을 측정하기 위해 *S. aureofaciens*(80×10<sup>9</sup>CFU/ml)를 sonicator(Model K LX 150)로 강도 6S에서 1분 동안 sonication한 후 DNase를 20시간 처리하여 유출된 방사선량은 7.5×10<sup>3</sup> CPM값을 나타냈다. 따라서 실험에 따른 방사선량(C)을 측정함으로써 생존도를 구할수 있었다. 이 생존도 결정은 Yi 등<sup>15)</sup>의 방법을 변형 사용하였다.

$$\text{생존도(\%)} = \left[ 1 - \frac{C-A}{B-A} \right] \times 100$$

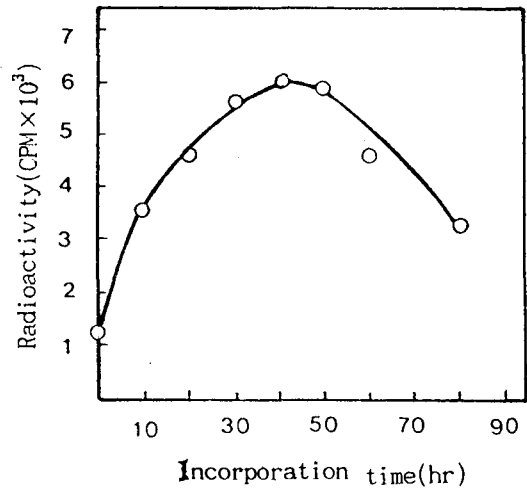


Fig. 2. Changes in the detected radioactivities on <sup>3</sup>H-adenine incorporation of *Streptomyces aureofaciens*. The freeze-dried samples were rehydrated with admitting air at single ampule

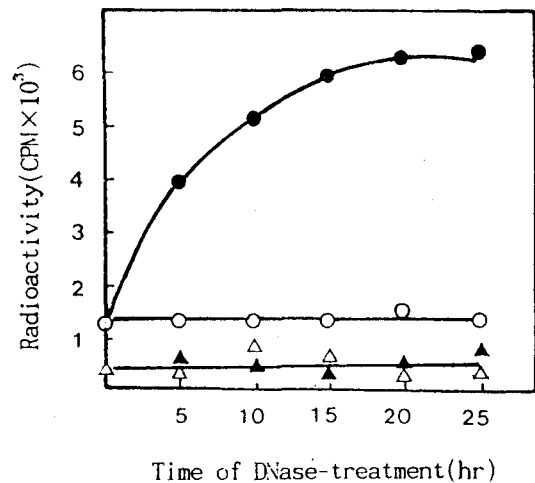


Fig. 3. Changes of the detected <sup>3</sup>H-adenine following DNase-treatment. The freeze-dried sample were rehydrated with admitting air at single ampule. ●-●, Supplement of DNase to the rehydrated cells after freeze-drying; ○-○, non-supplement of DNase to the rehydrated cells after freeze-drying; ▲-▲, supplement of DNase to -70°C treated cells; △-△, non-supplement of DNase to -70°C treated cells.

Table 1. Effects of freezing-temperature and freeze-drying on the viability

Condition	A	B	C	D	E
Radioactivity (CPM)	$2.30 \times 10^3$	$1.80 \times 10^3$	$1.60 \times 10^3$	$1.45 \times 10^3$	$6.22 \times 10^3$
Viability (%)*	83	91	94	96	20

A, Freezing at  $-30^\circ\text{C}$ (acetone+dry ice); B, Freezing at  $-50^\circ\text{C}$ (acetone+dry ice); C, Freezing at  $-70^\circ\text{C}$ (acetone+dry ice); E, Freezing at  $-196^\circ\text{C}$ (liquid nitrogen); F, Freeze-drying after freezing at  $-70^\circ\text{C}$  and rehydrated with admitting air at single ampule. \* Radioactivity level of normal cells labeled with  $^3\text{H}$ -adenine,  $1.20 \times 10^3$  CPM; Radioactivity level of completely damaged cells labeled with  $^3\text{H}$ -adenine,  $7.50 \times 10^3$  CPM.

## 결과 및 고찰

### $^3\text{H}$ -adenine 주입시간 최적화

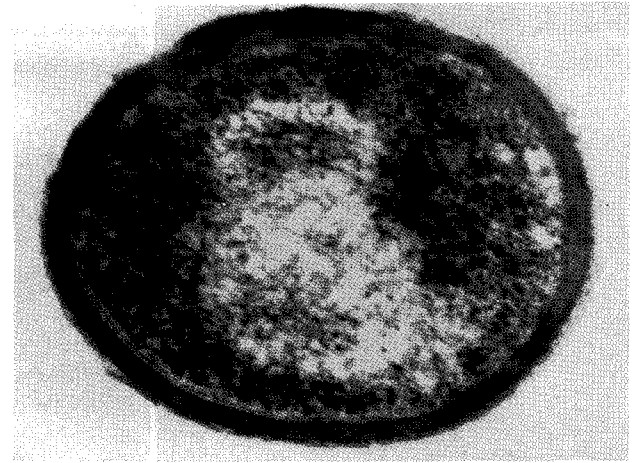
주입시간(incorporation time)은 한천배지 20 ml를 주입한 사면 한천배지 시험관에 *S. aureofaciens*를 도말함과 동시에  $^3\text{H}$ -adenine을 주입한 시간을 0시간이라 할 때, 10 시간 간격으로 80시간 까지 실험한 결과 Fig. 2에서와 같이 40시간인 경우 CPM값이 최대치로 나타났다. 따라서  $^3\text{H}$ -adenine 주입시간은 40시간으로 결정하였다.

### DNase 처리시간 최적화

DNase가  $^3\text{H}$ -adenine이 주입된 DNA를 분해함으로써 *S. aureofaciens*의 손상에 의한 누출된 세포의 방사선량을 정확히 측정할 수 있었다.  $\text{MgCl}_2(5 \times 10^{-3}\text{M})$ 가 함유된 Tris-HCl buffer를 사용하여 시료에 DNase를 최종농도  $800 \mu\text{g/ml}$ 되게 첨가한 후  $30^\circ\text{C}$ 의 reciprocal shaker가 부착된 water bath 내에서 0~25시간까지 처리한 결과, DNase 최적 처리시간은 20시간으로 나타났다(Fig. 3) 또한 DNase에 의한 동위원소 분해는 거의 없었다. Tris-HCl buffer에  $\text{MgCl}_2$ 의 첨가는 DNase가 DNA를 분해하기 위해서  $\text{Mg}^{2+}$  이온이 필요한 것으로 보고되고 있다.<sup>16)</sup>

### 동결온도 및 동결건조가 생존도에 미치는 영향

동결온도가 생존도에 미치는 영향을 조사하기 위해  $-30^\circ\text{C}$ ,  $-50^\circ\text{C}$ ,  $-70^\circ\text{C}$ ,  $-196^\circ\text{C}$ 에서 각각 동결하여 해빙 후 방사선량을 측정된 결과 Table 1에서와 같이 동결

Fig. 4. Transmission electron microscopy of intact *Streptomyces aureofaciens*( $\times 50,000$ )

속도가 빠를수록 *S. aureofaciens*의 생존도가 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 *Nocardia mediterranei*의 Yi 등<sup>15)</sup>과 세균의 Proom 등<sup>17)</sup>의 보고 자료와 유사한 결과를 보였다. 따라서, *S. aureofaciens*의 동결건조를 위한 동결온도는  $-70^\circ\text{C}$ 에서 실시하였으며, 재수화는 이중 용기를 사용하지 않고 공기를 허용한 상태에서 용기를 파손하여 실시한 후 방사선량을 측정된 결과, 생존도는 약 20% 정도로 현저히 낮은 값을 나타내었다. 또한 동결건조 후 재수화한 *S. aureofaciens*의 상태를 전자현미경(PHILIPS CM 10)으로 관찰한 결과, 동결건조 직전(Fig. 4)의 상태와 상이하게 손상상태를 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 동결, 건조, 재수화 과정에서 각각 영향을 받았으리라 사료된다.

### 재수화 방법이 균체에 미치는 영향

동결건조 후 재수화 방법에 따라 생존도에 미치는 영향을 4가지 방법으로 실험한 결과, Table 2에서와 같이 공기가 허용된 상태에서 재수화시 균체의 생존도는 동결건조 직전 균체 대비 약 20% 생존도를 나타냈으며, 공기가 없는 밀봉된 진공상태의 이중 용기에서 재수화시 약 91%로 높은 생존도를 나타냈다. 또한 재수화시 산소의 영향에 관하여 실험하기 위하여 공기가 허용한 개봉된 이중 용기에서 증류수에 잠긴 채 재수화한 생존도는 약 36%를 나타냈으며, 이중 용기에  $\text{N}_2$ -gas를 주

Table 2. Effects of rehydration process after freeze-drying on the survival of *Streptomyces aureofaciens*

	Rehydration Condition			
	with admitting air at single ampule*	without admitting air at double ampule**	with admitting air at double ampule	with admitting $\text{N}_2$ -gas at double ampule
Radioactivity (CPM)	$6.24 \times 10^3$	$1.77 \times 10^3$	$5.23 \times 10^3$	$2.27 \times 10^3$
Viability (%)***	20	91	36	83

\*Inner ampule vacuum, 0.005~0.01 torr and cells, freezing at  $-70^\circ\text{C}$ . \*\*Outer ampule vacuum, 0.1 torr. \*\*\*Radioactivity level of normal cells labeled with  $^3\text{H}$ -adenine,  $1.20 \times 10^3$  CPM; radioactivity level of completely damaged cells labeled with  $^3\text{H}$ -adenine,  $7.50 \times 10^3$  CPM

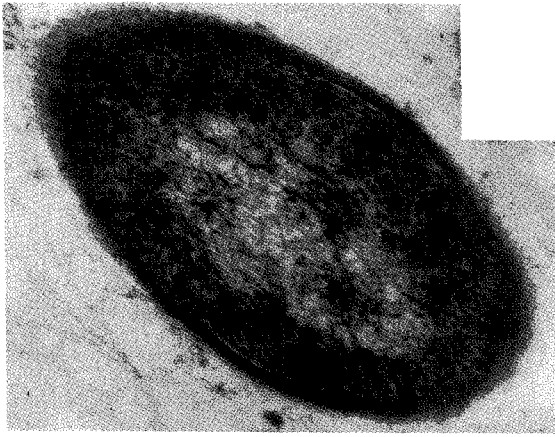


Fig. 5. Transmission electron microscopy of *Streptomyces aureofaciens* which were injured during the process of rehydration after freeze-drying( $\times 50,000$ ).

입하여 밀봉된 상태에서 재수화한 경우 약 86%를 나타냈다. 따라서 동결건조후 재수화 과정에서 균체 사멸 원인이 산소의 영향을 크게 받는 것으로 나타났다. Dimmick 등<sup>18)</sup>과 Lion 등<sup>19)</sup>은 동결건조된 박테리아는 산소 노출시 free radicals의 축적이 증가함을 보고하였으며, Heckly 등<sup>8,20)</sup>은 공기가 없는 밀봉된 진공상태의 이중용기에서 재수화시 거의 100%의 생존도를 나타내었다고 발표하였다.

### 참 고 문 헌

- Duggar, B. M. (1948) Tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 177-181.
- Nath, J. and J. O. A. Anderson (1975) Effect of freezing and freeze-drying on the viability and storage *Lilium longiflorum* L. and *Zea mays* L. Pollen. *Cryobiology* **12**, 81-88.
- ITO, T. and T. Yokoyama (1983) Preservation of *Basidiomycete* cultures by freezing. *IFO Res. Comm.* **11**, 60-70.
- Watanabe, J., S. Sawaire, T. Okuda and H. B. Maruyama (1984) Preservation of microbial activities. *Jap. J. Freezing and Drying* **30**, 71-76.
- Ellis, J. J. and J. A. Roberson(1968) Viability of fungus cultures preserved by lyophilization. *Mycologia* **60**, 399-405.
- Taiki, K. (1985) Preservation of the antibiotic producing ability of a Streptomycece by lyophilization for 13 years. *IFO Res. Comm.* **12**, 101-106.
- Gomez, R., M. Takano and A. J. Sinsky (1973) Characteristics of freeze-dried cells. *Cryobiology* **10**, 368-374.
- Heckly, R. L. Dimmk (1968) Correlations between free radical production and viability of lyophilized bacteria. *Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 1081-1085.
- Ree, s. k and M. Y. Pack (1980) Effect of freezing and lyophilization on Lactic starter cell. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **8**, 19-25.
- Tsvetkov, T. and R. Brankova(1983) Viability of Micrococci and Lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* **20**, 318-323.
- 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 treated with certain proteolytic enzymes. *Egypt. J. Food Sci.* **14**, 313-322.
- Heckly, R. J. (1978) Preservation of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **24**, 1-53.
- Beker, M. J., J. E. Blumbergs, E. J. Ventina and A. I. Rapoport (1984) Characteristics of cellular membranes at rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Biotechnol.* **19**, 347-352.
- Rogers, L. A. (1914) The preparation of dried cultures. *J. Infect. Dis.* **14**, 100-123.
- Yi, D. H., N. W. Lee and N. H. Choi (1992) Membrane injury of *Nocardia mediterranei* upon lyophilization and viability depending on rehydration methods. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 243-248.
- Yasuhiko, K., M. Osumi (1987) Biochemical and electron-microscopic evidence for membrane injury in yeast cells quickly frozen with nitrogen. *J. Ferment. Technol.* **65**, 127-131.
- Poom, H. and L. M. Hemmons (1949) The drying and preservation of bacterial cultures. *J. Gen. Microbiol.* **3**, 7-18.
- Dimmick, R. L., R. J. Heckly and D. P. Hollis (1961) Free-radical formation during storage of freeze-dried *Serratia marcescens*. *Nature* **192**, 776-777.
- Lion, M. B. and Y. Avi-Dor (1963) Oxygen-induced inactivation of NADH-oxidase in lyophilized cells of *Escherichia coli*. *Isr. J. Chem.* **4**, 374-378.
- Robert J., R. J. Heckly (1985) Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Developments in industrial microbiol.* **26**, 379-395.

### Effects of Rehydration Methods on viability after Freeze-drying of *Streptomyces aureofaciens*

No-Woon Lee\*, Hyeon-Woo Lee and Dong-Heui Yi (Department of Microbiological Engineering, Kon-Kuk University, Seoul, 133-701, Korea)

**Abstract** : In order to examine the effect of rehydration methods on viability after freeze-drying of *Streptomyces aureofaciens*, we labeled the DNA of *S. aureofaciens* with <sup>3</sup>H-adenine. Extracellular radioactivity levels appeared to be high in the rehydrated solutions after freeze-drying than freezing-thawing. In effects of rehydration after freeze-drying, the viability of the cell appeared about 20% in case of with admitting air at single ampule, but that of which appeared about 91% in case of without admitting air at double ampule. Thus, *S. aureofaciens* cells were damaged during the process of rehydration after freeze-drying.

\*Corresponding author