

## *Xanthomonas translucens* KCTC 2751의 최적배양과 빙핵 활성 검토

김영문 · 강성일 · 장영부 · 전병진 · 공재열\*

부경대학교 생물공학과

### The Investigation on the Optimum Culture Conditions and the Ice Nucleating Activity of Bacterium *Xanthomonas translucens* KCTC 2751

Young-Mun Kim, Sung-Il Kang, Young-Boo Jang, Byung-Jin Jun, and Jai-Yul Kong\*

Department of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University

**Abstract** The optimum culture conditions for the ice nucleating activity and the cell growth of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751 were investigated. The optimum initial pH and temperature for the cell growth and the ice nucleating activity were 6.5 and 25°C, respectively. The optimum culture medium for the ice nucleating activity was composed of 1.0% maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested of gelatin, and 0.03% KCl in distilled water. Freezing operations carried out on distilled water showed that the degrees of supercooling were -7.90°C without ice nucleators, -1.56°C with silver iodide as a commercial ice nucleator, and -1.36°C when *Xanthomonas translucens* KCTC 2751 were added. During progressive freeze-concentration assays, the addition of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751 led to lower saccharose concentrations in the crystals, while the cells led to higher saccharose concentrations in the concentrated phase.

**Key words:** ice nucleating activity, *Xanthomonas translucens*, optimum, supercooling, freeze-concentration

## 서론

이른 봄이나 늦가을에 기온이 급격히 낮아짐에 따라 작물의 여러 생육 장애를 일으키는 동상해(frost injury)가 발생되어 왔다. 이러한 동상해는 예로부터 자연 현상으로 인식되어 왔으나 Schnell과 Vail(1-3)에 의해 식물의 낙엽이나 식물잎 표면으로부터 동상해의 원인이 되는 *Pseudomonas syringae*가 발견 보고된 후 *Erwinia herbicola*(4,5), *Erwinia ananas*(6,7), *Xanthomonas campestris*(8,9) 등이 냉해를 일으키는 미생물로서 차례로 발견 보고되었다. 이러한 냉해의 원인이 되는 빙핵활성 미생물들의 특징은 세포벽에 모두 ice nucleating protein을 가지고 있어 주위 환경의 수분을 급속히 동결시키는 것이다(10,11).

일반적으로 순수한 물은 약 -40°C까지 과냉각을 일으킨 후 homogeneous ice nuclei가 형성되어 그 주위로 빙결점이 성장하여 0°C에서 동결된다. 하지만 순수한 물에 heterogeneous ice nuclei가 첨가 되면 -10°C이내에서 과냉각이 일어나고 0°C에서 동결이 된다. 이렇게 효율이 좋은 heterogeneous ice nuclei가 수용액에 존재하면 물의 동결점을 상승시켜서 물의 결빙을 촉진시킬 수 있으므로 물을 얼음이나 눈으로 변환시키는데 그 만큼의 에너지를 절약할 수 있다(12).

빙핵활성 미생물들은 heterogeneous ice nuclei의 일종인 ice nucleating protein을 가지고 있고 당류 및 인지질의 결합여부에 의해 복합체의 형성을 달리하여 다양한 빙핵 구조와 빙핵 균락을

을 보이는데 특정 범위에 따라 bacterial ice nucleation 구조를 class A(-4.4°C 이내), class B(-4.8 - -5.7°C), 그리고 class C(-7.6°C 이하)로 분류된다(13).

이런 빙핵활성 균주는 inorganic chemical particle(AgI 등)을 대체할 수 있는 빙핵체로 연구되어 세설 촉진제로 이용되고 있으며(14), 난동결성 식품인 우유, 레몬 주스, 오렌지 주스, 대두 단백질 용액의 동결 농축 및 동결 건조에 연구되고 있다(15-18).

본 연구에서는 빙핵활성 미생물의 하나인 *Xanthomonas translucens* KCTC 2751를 최적 배양하여 균주의 생장과 thermoelectric thermometry를 사용하여 빙핵 활성능을 보았으며, 10% sucrose 용액에 *X. translucens*를 첨가하여 동결 농축도를 측정, 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용된 균주 *Xanthomonas translucens* KCTC 2751는 KCTC(Korean Collection for Type Culture)로부터 분양받았다.

### 배지조성 및 배양방법

균주보존 배지로서는 nutrient medium(Difco, Co.)을 사용하였다. 전배양은 100 mL 삼각플라스크의 액체배지에 접종하여 25°C, 180 rpm으로 30 hr 동안 진탕배양하였고, 본 배양은 250 mL 삼각플라스크의 액체배지에 1%(w/v) 전배양액을 접종하여 동일한 조건으로 진탕 배양하였다.

### Thermoelectric thermometry의 제작

Thermal insulation cell은 직경 1 cm인 아크릴 관에 동판을 접합시키고 glass wool, 난연성 발포 스티로폼, 폴리우레탄폼을 사용하여 주위 환경으로부터 열을 차단시키고, 동판을 통한 1차원

\*Corresponding author: Jai-Yul Kong, Department of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Daeyeon-3dong, Namgu, Busan 608-737, Korea  
Tel & Fax: 82-51-620-6181

E-mail: kongjy@pknu.ac.kr

Received September 27, 2005; accepted March 8, 2006

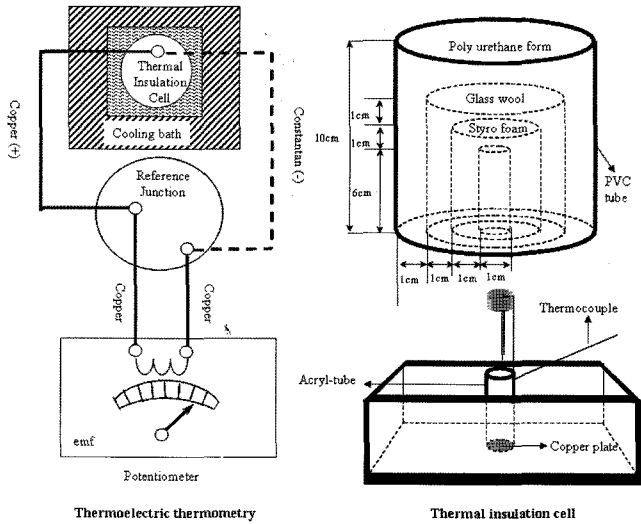


Fig. 1. The schematic diagram of thermoelectric thermometry and thermal insulation cell.

적인 열확산을 측정하도록 제작하였다(19,20).

Thermoelectric thermometry는 thermal insulation cell을 cooling bath(Jeio tech. RBC 20 series)의  $-20^{\circ}\text{C}$ 인 brine(ethylene glycol : water = 50 : 50)에 넣고 cell 내부 시료의 온도를 1차원적으로 강하시켰으며, T-type thermocouple(21)을 사용하여 열기전력을 potentiometer(Rikadenki HR-3312, Kogyo Co., LTD)로 측정하였다(Fig. 1).

그리고 측정된 열기전력은 온도변환식에 적용하여 온도로 환산하였다. 열기전력에 대한 온도변환식은 NIST(National Institute of Standards and Technology) T-type thermocouple의 polynomial fit curve를 참고로 하고(22), NaCl의 보메도에 따른 동결점의 변화에 의한 실험으로 만들어 내었다.

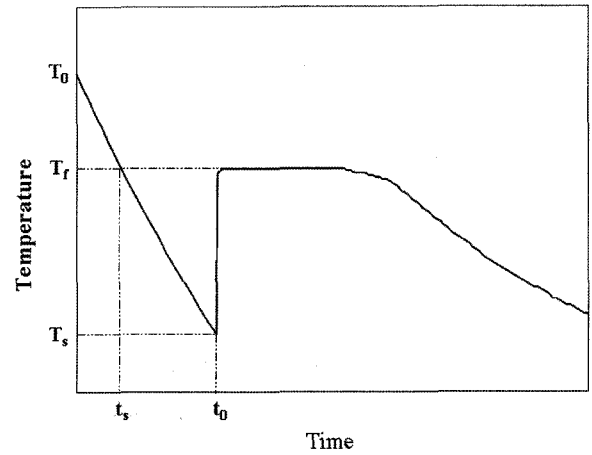
$$T = 0.02636 \times E + 0.05669$$

T: Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )

E: thermal electromotive force ( $\mu\text{V}$ )

빙핵활성능의 측정

배양한 균주는 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하였으며, 균체는 멸균한 증류수에 2회 세척하여 배지성분을 제거하였으며, 10배 희석하여  $A_{660}$ 에서 측정하였다. 또한, 이 현탁액의 1 mL을 흡광도값이  $0.01(1.0 \times 10^7)$ 이 되도록 한 후 3 mL의 시료를 thermal insulation cell에 넣고 thermocouple을 동판에서 5 mm의 높이로 설치한 후, insulator로 cell의 주위를 단열시킨 후 열기전력을 측정하였다. Thermal insulation cell은  $10^{\circ}\text{C}$  circulator에 일정시간 놓아두어 시료의 초기 온도를 일정하게 맞추었다. 시료의 온도가  $10^{\circ}\text{C}$ 로 되면,  $-20^{\circ}\text{C}$  cooling bath에 넣고 열기전력의 변화를 potentiometer로 기록하였다. 표준시료는 균체를 첨가하지 않은 증류수 3 mL을 사용하였다. 이러한 동결실험 결과로부터 얻어진 동결곡선으로부터 과냉각시간, 과냉각온도, 동결온도 등을 측정하여 빙핵활성을 비교평가 하였다. 측정한 온도변화의 동결곡선은 Fig. 2와 같으며 과냉각온도( $T_s$ )는 최저온도를, 동결점( $T_f$ )은 급격히 온도가 상승하여 일정하게 지속되는 온도로 결정한다. 이때 과냉각도를 나타내는  $T_f$ 와  $T_s$ 의 차가 적을수록 빙핵활성이 좋은 것으로 평가한다(20).



$T_0$  : Initial temperature  
 $T_f$  : Freezing temperature  
 $T_s$  : Supercooling temperature (ice nucleation temperature)  
 $T_s - T_0$  : Degree of supercooling  
 $t_0$  : Time at  $0^{\circ}\text{C}$   
 $t_s$  : Supercooling time

Fig. 2. The typical freezing curve of solution material.

동결농축물의 측정

10%(w/w)의 saccharose 수용액 30 mL을 밑면에 전열판이 붙어 있는 시료용기에 담은 후,  $10^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고 속에서 일정시간 방치하였다. 시료 내부의 온도가 일정하게 된 후, 동결조 내의 냉매에 시료 용기의 전열판만을 침지시켜 1차원 동결을 행하였다. 시료의 동결개시 후에는 수직방향(상승)으로 진행되는 동결계면의 부근을 임펠러에 의해 교반시키며, 동결계면의 진행에 병행하여 임펠러의 위치도 동시에 상승시켰다.

일정 동결시간이 경과한 후, 농축시료 용액인 미동결 부분을 전부 분리시키고, 이때의 saccharose 농도는 용액의 온도가  $20^{\circ}\text{C}$ 일 때 hand-held refractometer N-1 $\alpha$ (ATAGO USA, Inc.)를 이용하여 측정하였으며, 동결 부분도 해동 후 동일한 방법에 의해 농도를 구하였다(23).

결과 및 고찰

탄소원의 영향

Kozloff 등(5)은 빙핵활성에 당류와 단백질이 관여한다고 보고하고 있어 *X. translucens* KCTC 2751이 생장하는 동안 탄소원이 빙핵활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 nutrient medium에 단당 및 이당을 각각 1%(w/v) 농도가 되도록 따로 멸균 첨가하였다. *X. translucens* KCTC 2751의 전배양액을 1% 집중하여  $25^{\circ}\text{C}$ , 180 rpm에서 정지기인 25 hr까지 배양하여 균체의 생장과 빙핵활성을 측정하였다(Table 1).

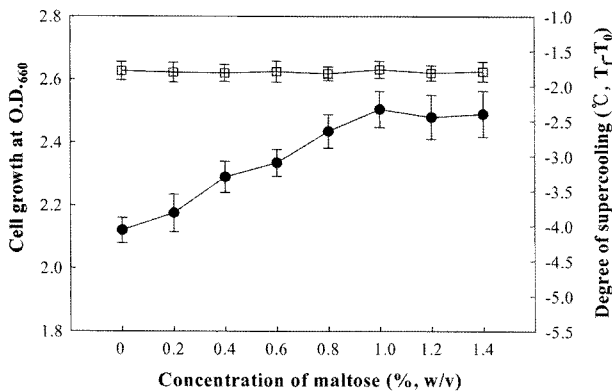
이것은 Kim 등(20)이 단당인 fructose에서 균체 생장이 뛰어나고, 빙핵활성이 뛰어나다고 보고된 것과는 달리 본 연구에서는 sucrose와 maltose가 대조구들보다 균체 생장이 뛰어나고, 빙핵활성은 glucose, lactose, maltose, fructose에서 과냉각도가 control과 유사하게 나타났다. 따라서 maltose를 0-1.4% 농도별로 첨가하여 배양하였을 경우에는 maltose의 농도가 1.0% 이상일 때는 균체의 생장이 일정하였으며, 과냉각도도 유사하여 1.0% maltose를 최적 탄소원으로 선정하였다(Fig. 3).

**Table 1. Effects of various carbon sources on the cell growth and the degree of supercooling of Xanthomonas translucens KCTC 2751**

Carbon source	Cell growth (O.D. <sub>660</sub> ) <sup>1)</sup>	T <sub>f</sub> -T <sub>0</sub> (°C) <sup>2)</sup>	t <sub>s</sub> (sec)
Control	2.140 ± 0.080	-1.76 ± 0.13	224 ± 18
Glucose	2.150 ± 0.070	-2.00 ± 0.15	256 ± 21
Fructose	2.200 ± 0.050	-2.05 ± 0.16	270 ± 22
Sucrose	2.435 ± 0.060	-5.80 ± 0.23	857 ± 32
Maltose	2.505 ± 0.050	-1.80 ± 0.12	228 ± 17
Lactose	2.125 ± 0.080	-2.10 ± 0.18	276 ± 25
Galactose	1.990 ± 0.040	-6.46 ± 0.22	892 ± 30
Citric acid	0.470 ± 0.060	-3.13 ± 0.25	408 ± 5
water		-7.90 ± 0.11	1130 ± 16

<sup>1)</sup>Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in nutrient medium containing 1.0% carbon source.

<sup>2)</sup>The degree of supercooling. The concentration of test sample was adjusted to a O.D.<sub>660</sub> reading of 0.01 (3 mL).



**Fig. 3. Effects of maltose concentration on the cell growth and the degree of supercooling of Xanthomonas translucens KCTC 2751.** Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in nutrient medium containing each other concentration of maltose. ●: cell growth at O.D.<sub>660</sub>, □: degree of supercooling.

**질소원의 영향**

균체의 생육과 병핵활성에 가장 큰 영향을 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위해 증류수에탄소원을 maltose 1.0% 로 고정시킨 후 yeast extract, digested of gelatin, bacto peptone, beef extract, digested of gelatin 등을 각각 1.0%씩 첨가하여 X. translucens KCTC 2751 전 배양액을 1% 접종 후 25°C, 180 rpm에서 25 hr 배양하였다. 그 결과, X. translucens KCTC 2751의 과냉각도는 proteose peptone, digested of casein, yeast extract가 다른

질소원들보다 높았고, 균체의 생장은 yeast extract가 가장 뛰어났다. 이것은 Obata 등(24)이 yeast extract를 질소원으로 선정하였을 경우 높은 균체 성장과 병핵활성을 나타냈다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다(Table 2).

그리고 선정된 yeast extract와 다른 질소원들과의 combination 효과를 보기위해 yeast extract를 고정시킨 후, 다른 질소원들을 첨가한 결과, digested of gelatin이 가장 과냉각도가 높은 proteose peptone과 유사한 병핵활성을 보이면서 높은 균체 생장을 나타내었다(Table 3).

이 결과는 yeast extract의 최적 농도를 선정하기 위해 digested of gelatin의 농도를 1.0%로 고정시킨 후 yeast extract를 0-1.6%의 농도별로 첨가한 결과, 1.4% 이상에서는 첨가한 yeast extract의 농도에 비해 균체의 생장이 저조하였고, 1.0% 이상에서는 과냉각도도 유사하였으므로 1.4%의 yeast extract를 최적 농도로 선정하였다(Fig. 4).

다음으로 yeast extract를 1.4%로 고정시킨 후 digested of gelatin을 0-1.6%의 농도별로 첨가한 결과 0.8% 이상에서는 균체의 생장이 거의 일정했으며, 과냉각도도 농도에 영향을 받지 않았으므로, 0.8%를 digested of gelatin의 최적농도로 선정하였다(Fig. 5).

**무기 염류의 영향**

세포 생육에 대단히 중요한 역할을 하는 여러 가지 무기염류가 X. translucens KCTC 2751에 미치는 영향을 보기위해 KCl, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> 등을 첨가하였다. 그 결과, 세포의 성장에서는 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O가 가장 뛰어났지만 과냉각도는 KCl, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> 등에 비해 떨어졌다. 그래서 과냉각도가 높

**Table 2. Effects of various nitrogen sources on the cell growth and the degree of supercooling of Xanthomonas translucens KCTC 2751**

Nitrogen source	Cell growth (O.D. <sub>660</sub> ) <sup>1)</sup>	T <sub>f</sub> -T <sub>0</sub> (°C) <sup>2)</sup>	t <sub>s</sub> (sec)
Bacto peptone	2.550 ± 0.200	-3.22 ± 0.16	443 ± 19
Yeast extract	4.890 ± 0.300	-2.38 ± 0.13	313 ± 16
Meat extract	1.720 ± 0.130	-3.46 ± 0.10	458 ± 12
Proteose peptone	3.100 ± 0.220	-2.34 ± 0.12	309 ± 14
Tryptone peptone	2.905 ± 0.190	-2.90 ± 0.17	380 ± 20
Digested of casein	1.665 ± 0.110	-2.52 ± 0.15	333 ± 18
Digested of gelatin	3.070 ± 0.120	-2.29 ± 0.20	297 ± 24
Urea	0.021 ± 0.004	-7.30 ± 0.14	1034 ± 17
Beef extract	1.395 ± 0.120	-3.16 ± 0.2	1422 ± 25
Water		-7.90 ± 0.11	1130 ± 16

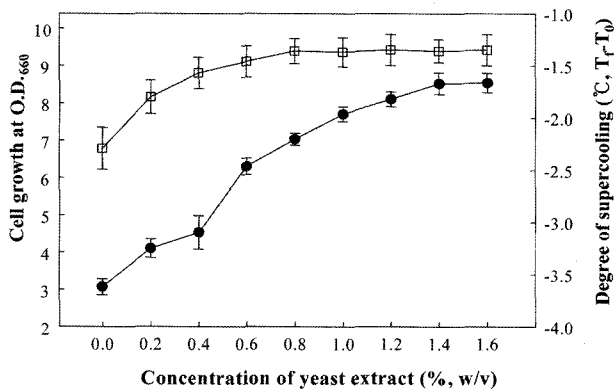
<sup>1)</sup>Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in distilled water containing 1.0% maltose and 1.0% nitrogen source.

<sup>2)</sup>The degree of supercooling. The concentration of test sample was adjusted to a O.D.<sub>660</sub> reading of 0.01 (3 mL).

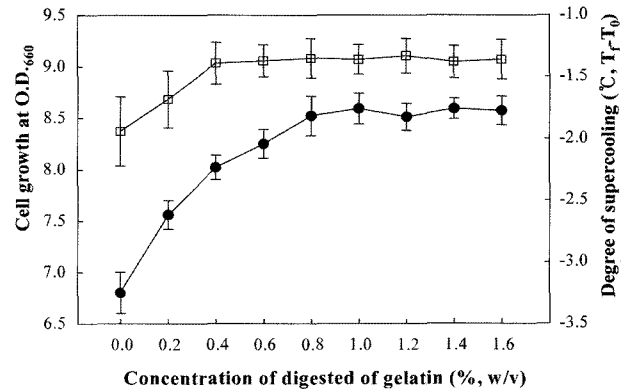
**Table 3. Effects of various nitrogen sources and yeast extract in combination on the cell growth and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751**

Nitrogen source	Cell growth (O.D. <sub>660</sub> ) <sup>1)</sup>	T <sub>r</sub> T <sub>0</sub> (°C) <sup>2)</sup>	t <sub>s</sub> (sec)
Bacto peptone	6.060 ± 0.200	-1.92 ± 0.17	245 ± 20
Meat extract	6.740 ± 0.230	-1.57 ± 0.12	200 ± 14
Proteose peptone	6.610 ± 0.260	-1.39 ± 0.11	174 ± 12
Tryptone peptone	7.200 ± 0.280	-1.81 ± 0.15	234 ± 18
Digested of casein	7.250 ± 0.270	-1.59 ± 0.14	212 ± 17
Digested of gelatin	7.700 ± 0.300	-1.41 ± 0.11	182 ± 13
Urea	0.058 ± 0.010	-7.10 ± 0.16	1010 ± 19
Beef extract	6.620 ± 0.210	-1.70 ± 0.18	222 ± 22
Water		-7.90 ± 0.11	1130 ± 16

<sup>1)</sup>Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.0% yeast extract and 1.0% the other nitrogen source.  
<sup>2)</sup>The degree of supercooling. The concentration of test sample was adjusted to a O.D.<sub>660</sub> reading of 0.01 (3 mL).



**Fig. 4. Effects of yeast extract concentration on the cell growth and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751.** Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.0% digested gelatin and each other concentration of yeast extract. ●: cell growth at O.D.<sub>660</sub>, □: degree of supercooling.



**Fig. 5. Effects of digested of gelatin concentration and on the cell growth and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751.** Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.4% yeast extract and each other concentration of digested gelatin. ●: cell growth at O.D.<sub>660</sub>, □: degree of supercooling.

고 두 번째로 세포의 생장의 뛰어난 KCl을 무기염류로 선정하였다(Table 4).

또한 KCl을 0-0.08%까지 농도별로 첨가한 결과 0.03% 이상에서는 균체의 생장은 큰 변화가 없었고, 과냉각도는 KCl의 농도에 영향을 받지 않았는데 이것은 Lee(25)가 KCl의 농도가 높을

수록 빙핵활성을 떨어뜨린다는 보고와는 상이하였다. 따라서 0.03%의 KCl을 최적 무기염류로 선정하였다(Fig. 6).

**초기 pH에 의한 영향**

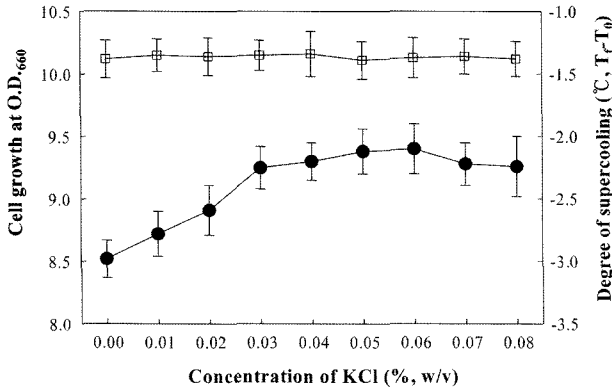
균체의 생장은 초기 pH에 의해 크게 영향을 받으므로, 1.0%

**Table 4. Effects of various inorganic salts on the cell growth and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751**

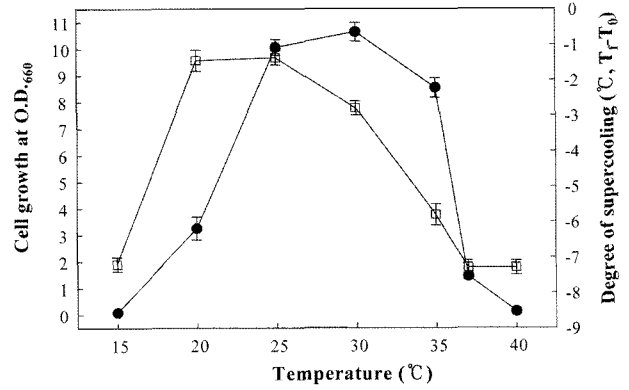
Inorganic salt	Cell growth (O.D. <sub>660</sub> ) <sup>1)</sup>	T <sub>r</sub> T <sub>0</sub> (°C) <sup>2)</sup>	t <sub>s</sub> (sec)
Control	8.520 ± 0.130	-1.36 ± 0.15	175 ± 18
KCl	9.300 ± 0.160	-1.35 ± 0.13	174 ± 16
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	8.740 ± 0.150	-1.42 ± 0.15	182 ± 18
CaCl <sub>2</sub>	8.230 ± 0.120	-1.57 ± 0.12	210 ± 14
FeSO <sub>4</sub>	10.800 ± 0.390	-1.70 ± 0.18	222 ± 22
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.920 ± 0.160	-1.76 ± 0.15	233 ± 18
NaCl	8.600 ± 0.160	-1.94 ± 0.16	258 ± 19
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4.950 ± 0.300	-1.80 ± 0.14	240 ± 17
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.080 ± 0.230	-1.35 ± 0.14	173 ± 18
Water		-7.90 ± 0.11	1130 ± 16

<sup>1)</sup>Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested gelatin and 0.04% inorganic salt.

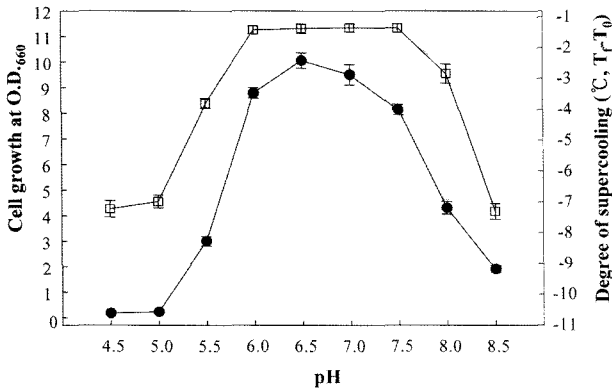
<sup>2)</sup>The degree of supercooling. The concentration of test sample was adjusted to a O.D.<sub>660</sub> reading of 0.01 (3 mL).



**Fig. 6.** Effects of KCl concentration on the cell growth and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751. Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested gelatin and each other concentration of KCl. ●: cell growth at O.D.<sub>660</sub>, □: degree of supercooling.



**Fig. 8.** Effects of various temperature on the cell growth and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751. Cells were grown for 25 hr at various temperature with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested gelatin, 0.03% KCl and initial pH 6.5. ●: cell growth at O.D.<sub>660</sub>, □: degree of supercooling.



**Fig. 7.** Effects of various initial pH on the cell growth and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751. Cells were grown for 25 hr at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested gelatin, 0.03% KCl and each initial pH. ●: cell growth at O.D.<sub>660</sub>, □: degree of supercooling.

maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested of gelatin, 0.03% KCl 배지의 초기 pH를 달리하여 pH 4.5-8.5 범위에서 배양하였다. 이 결과 Fig. 7에서 나타낸 것처럼 배양액의 초기 pH가 5.5 이하와 8이상에서는 균체의 생장이 현저하게 감소한 반면, 초기 pH가 6.0-7.5까지는 *X. translucens* KCTC 2751의 생장이 양호하였으며, pH 6.5에서 균체의 생장이 가장 높았다. Kim 등(20)과 Chen 등(26)이 pH가 중성인 영역에서 빙핵활성이 안정하다는 보고와 유사하게 균체의 빙핵활성도 초기 pH가 5.5 이하와 8.0 이상에서는 현저히 감소되는 반면, 초기 pH 6.0-7.5에서 거의 유사하게 높은 수치를 나타내었다. 이 결과로부터 *X. translucens* KCTC 2751는 초기 pH 6.5에서 가장 효율적인 생장과 뛰어난 빙핵활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

**온도에 의한 영향**

온도는 미생물 생장에 가장 많은 영향을 주는 중요한 환경요인으로, 온도가 상승하면 효소 반응이나 화학반응이 활발해져서 생장이 왕성해진다. 그러므로 최적의 배양 온도를 정하기 위해 15-40°C 범위에서 배양해 본 결과 균체는 30°C에서 최대 생장

하였으며, 37°C 이상에서는 크게 생장이 저해되는 것으로 나타났다. 이는 Kim 등(9)이 빙핵활성 단백질은 온도가 올라갈수록 열에 의해 불활성화 된다는 보고와 일치하였다(Fig. 8).

빙핵활성 또한 20-25°C에서 높게 나타났으며, 30°C 이상에서는 빙핵활성이 크게 떨어졌으며, 37°C 이상에서는 빙핵활성을 거의 보이지 않았다. 그러므로 최적 배양 온도를 25°C로 선정하였다.

**최적배양조건에서의 빙핵활성**

*X. translucens* KCTC 2751 균주를 25°C, pH 6.5, 1.0 maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested of gelatin, 0.03% KCl의 최적 배양 조건에서 배양하여 배양시간별로 균체의 생장과 빙핵활성을 조사하였다(Fig. 9).

유도기인 6 hr까지는 균체의 생장이 크게 증가하지 않았고, 빙핵활성인 과냉각도는 균주가 점차적으로 생장을 하면서 점점 높아졌다. 그리고 대수성장기인 9 hr를 지나면서 균체의 생장이 급격히 증가하였고, 15 hr부터는 과냉각도가 최대가 되어 사멸기인 33 hr까지는 과냉각도가 -1.36°C를 유지하였으며, 36 hr 이후에는 과냉각도가 감소되는 것을 보였다. 그리고 배양과정 pH의 변화는 pH 6.5에서 조금씩 상승하여 33 hr 이후에는 pH 8.0 이상을 보였는데 그 이후부터 빙핵활성이 감소하는 것을 보였다. 이상의 결과, 최적 배양 조건에서 24 hr 배양시, 균체의 생장은 최대를 보였으며, 빙핵활성 또한 과냉각도가 약 -1.36°C이며 과냉각시간이 약 172 sec로 나타났다(Table 5).

이것은 균체를 첨가하지 않은 증류수보다 과냉각도가 5.54°C 상승하였으며, 과냉각시간도 약 958 sec나 단축시켰다. 그리고 일반적인 빙핵제로 사용되는 silver iodide보다 과냉각도가 약 0.2°C 높게 나타났으며, 과냉각시간은 약 38 sec나 단축시켰다.

**동결 농축 실험**

Progressive freeze-concentration을 이용하여 *X. translucens* KCTC 2751 균주를 첨가한 saccharose 수용액과 첨가하지 않은 saccharose 수용액의 동결시간 경과에 따른 동결 부분(frozen fraction)과 미동결 부분(unfrozen fraction)의 농축도의 변화를 조사하였다. 여기서의 농축도는 동결농축 실험전의 용액에 대한 평균 농도를 나타낸 것으로, 미동결 부분의 농축도는 동일한 냉매온도(-10°C), 교반속도(200 rpm)의 조건하에서 동결시간의 경과와 함께 증가하

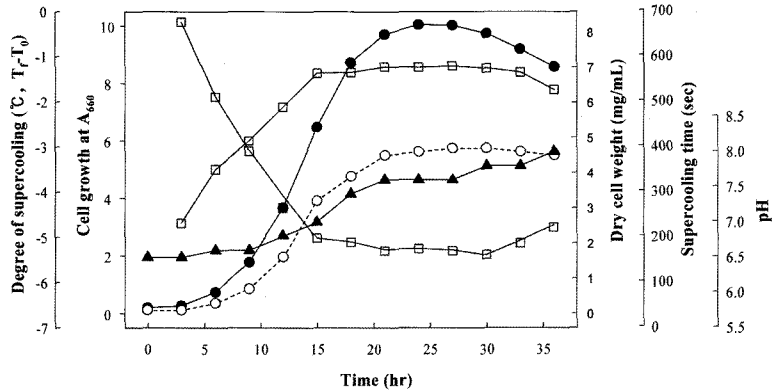


Fig. 9. The relationship between the growth curve and the degree of supercooling of *Xanthomonas translucens* KCTC 2751 under the optimal culture conditions. Cells were grown at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.4% yeast extract, 0.8% digested gelatin, 0.03% KCl and initial pH 6.5. ●: cell growth at O.D.<sub>660</sub>, ○: dry cell weight, □: degree of supercooling, ■: supercooling time, ▲: pH.

Table 5. Comparisons between the degree of supercooling of *X. translucens* KCTC 2751 and the silver iodide

Conditions	T <sub>F</sub> -T <sub>0</sub> (°C) <sup>1)</sup>	ts (sec)
Water	-7.90 ± 0.11	1130 ± 16
Water + AgI	-1.56 ± 0.18	210 ± 22
Water + <i>X. translucens</i> <sup>2)</sup>	-1.36 ± 0.16	172 ± 19

<sup>1)</sup>The degree of supercooling.

<sup>2)</sup>The concentration of test sample was adjusted to a O.D.<sub>660</sub> reading of 0.01 (3 mL).

였으며, 상대적으로 동결부분의 농축도는 감소하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 균체를 첨가한 saccharose 수용액의 경우에는 과냉각도가 균체를 첨가하지 않은 saccharose 수용액보다 높기 때문에 냉각면에 접하고 있는 용액의 일부가 과냉각 과정을 거칠 때 보다 빨리 빙결정 분산구조를 형성하고 동결시간 경과에 따라 균체를 첨가하지 않은 수용액보다 더 빠르게 빙결정 분산층이 성장하는 것을 알 수 있었다(23).

그 결과 균체를 첨가한 saccharose 수용액은 200 min 경과 후에는 동결 실험 전에 비하여 약 2.5배가 증가하였고, 동결 부분의 용질 농도는 약 30% 정도로 감소하였다. 그리고 균체를 첨가하지 않은 수용액은 200 min 경과 후에 동결 실험 전보다 약 2.1배가 증가하였고, 동결 부분의 용질 농도는 약 40% 정도로 감소

하였다. 그러므로 균체를 첨가한 saccharose 수용액은 균체를 첨가하지 않은 saccharose 수용액보다 약 40 min 정도 빨리 동결을 하여 동결 농축 시간이 더 단축되었으며, 동결 부분의 용질 농도도 더 낮게 나타났다.

이상의 결과를 인하여 *X. translucens* KCTC 2751 균주는 얼음이 결정화되는 온도보다 높은 온도에서 수용액을 동결시켜 주고, 얼음의 동결 속도를 향상시켜 주기 때문에 식품의 동결 농축 산업이나 동결 건조 산업 등에서 효과적으로 빙결정 형성을 유도할 수 있고, 동결 비용을 감소 시켜줄 수 있을 것으로 사료된다.

### 요 약

본 실험에서는 기존의 실험 방법인 Vail에 의해 고안된 drop freezing method에 의하여 빙핵활성을 측정하는 방법보다 정확한 빙핵활성을 연구하기 위하여 thermocouple을 사용한 Thermoelectric thermometry를 응용하여 장치를 제작하여 과냉각도와 과냉각 시간을 보는 방법으로 빙핵활성을 측정하였다.

본 실험에 사용된 균주는 KCTC에서 분양받은 *Xanthomonas translucens* KCTC 2751을 이용하여 균체 성장과 빙핵활성의 최적 조건을 검토하였다. 탄소원의 영향에서는, 1.0%(w/v) maltose에서, 질소원으로는 1.4% yeast extract(w/v)와 0.8% digested of gelatin(w/v), 무기 염류에서는 0.03% KCl, 온도와 초기 pH는 각

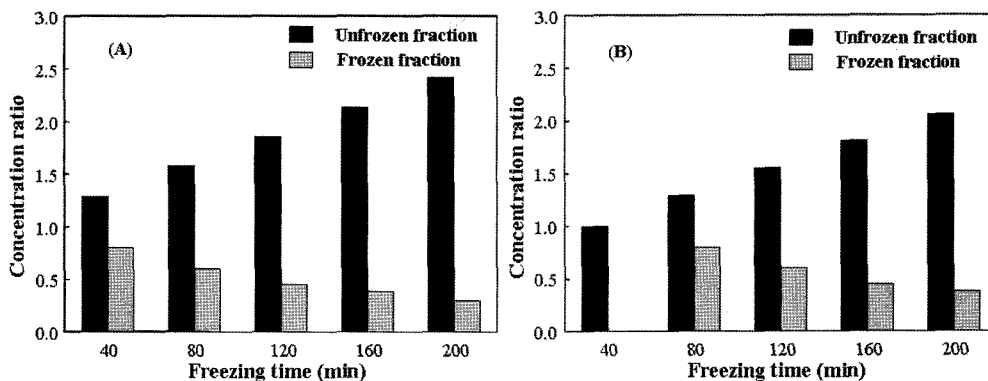


Fig. 10. The evolution of the concentration of saccharose during the crystallization step, in the unfrozen fraction and in the frozen fraction with addition of *X. translucens* KCTC 2751 (A) and without addition of *X. translucens* KCTC 2751 (B). The coolant temperature was -10°C and stirring speed was 200 rpm.

각 25°C, 6.5에서 균체 생장이 뛰어났고 과냉각도가 가장 높게 나타났다. 따라서 본 연구의 최적 배양 조건은 초기 배양 조건보다 균체의 양은 5배나 증가하였으며 과냉각도도 -1.76°C에서 -1.36°C로 상승하였다. 그리고 *Xanthomonas translucens* KCTC 2751를 첨가한 증류수의 과냉각도는 균체를 첨가하지 않은 증류수의 과냉각도(-7.9°C)보다 6.54°C 높게 나타났으며, 상업적으로 사용되는 빙핵제인 silver iodide를 첨가한 증류수의 과냉각도(-1.56°C)보다 0.2°C 높게 나타났다. 동결 농축 실험은 균체를 첨가한 saccharose 수용액은 200 min 경과 후에는 동결 실험 전에 비하여 약 2.5배가 증가하였고, 동결 부분의 용질 농도는 약 30% 정도로 감소하였는데 비해 균체를 첨가하지 않은 수용액은 약 2.1배가 증가하였고, 동결 부분의 용질 농도는 약 40% 정도로 감소하였다.

## 문 헌

- Lindow SE, Arny DC, Upper CD. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 831-838 (1978)
- Lindow SE. Epiphytic ice nucleation-active bacteria. Vol I, pp. 335-362. In: *Phytopathogenic prokaryotes*. Academic Press, Inc., New York, NY, USA (1982)
- Maki LR, Galyon EL, Chang-Chien MM, Caldwell R. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.* 28: 456-459 (1974)
- Lindow SE, Arny DC, Upper CD. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant Physiol.* 70: 1084-1089 (1982)
- Kozloff LM, Watanabe M. Ice nucleating activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* 153: 222-231 (1986)
- Maki LR, Willoughby KJ. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. *J. Appl. Meteorology* 17: 1049-1053 (1978)
- Hitoshi O, Saeki Y, Tanishita J, Tokuyama T. Ice-nucleating activity of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Ferment. Technol.* 65: 693-697 (1987)
- Watanabe M, Watanabe J. Screening, isolation, and identification of food originated compounds enhancing the ice-nucleation activity of *Xanthomonas campestris*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 64-66 (1994)
- Kim HJ, Park J. Ice nucleation activities of ice nucleation-active bacteria sterilized with heat, pressure and irradiation, and their thermophysical effects on water. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 326-336 (1997)
- Lindow SE. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21: 363-384 (1983)
- Schnell RC, Vail G. World-wide source of leaf-derived freezing nuclei. *Nature* 246: 212-213 (1973)
- Paul RP, Mannapperruma D. Development in Food Freezing. pp. 309-316. In: *Biotechnology and Food Process Engineering*. Schwarzberg HG, Rao MA (eds). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA (1990)
- Ruggles JA, Nemecek-Marshall M, Fall R. Kinetics of appearance and disappearance of classes of bacterial ice support an aggregation model for ice nucleus assembly. *J. Bacteriol.* 175: 7216-7221 (1993)
- Margaritis A, Bassi AS. Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11: 277-295 (1991)
- Arai S, Watanabe M. Freeze texturing of food materials by ice-nucleation with the bacterium *Erwinia ananas*. *Agric. Biol. Chem.* 50: 169-175 (1986)
- Kumeno K, Nakhama N, Honma K, Makino T, Watanabe M. Production and characterization of a pressure-induced gel from freeze-concentrated milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 750 (1993)
- Li J, Izquierdo MP, Lee TC. Effects of ice-nucleation active bacteria on the freezing of some model food systems. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32: 41-49 (1997)
- Lee MJ, Song KB. Application of ice nucleation active bacteria in freeze concentration of food products and characterization of ice nucleation protein. *Food Sci. Biotechnol.* 4: 164-168 (1995)
- Kong JY. The measurements of thermal diffusivity for Tofus. Ph.D. thesis, University of Tokyo, Tokyo, Japan. (1976)
- Kim MY, Bae SK, Kim JD, Kim JS, Kong JY. Thermodynamic properties of ice nucleation bacterium in freezing process. pp. 176-179. In: *9th International Food Machinery & Technology Exhibition*, Tokyo, Japan (2002)
- Schooley JF. *Thermometry*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 172-186 (1986)
- National Institute of Standards and Technology. NIST ITS-90 thermocouple database. Available from: [http://srdata.nist.gov/its90/download/type\\_t.tab](http://srdata.nist.gov/its90/download/type_t.tab), Accessed Jun. 12, 2004.
- Bae SK. Effects of freezing conditions on the concentration-efficiency in the progressive freeze-concentration. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 984-989 (1995)
- Obata H, Tanaka T, Kawahara H, Tokuyama T. Properties of cell-free ice nuclei from ice nucleation-active *Pseudomonas fluorescens* KUIN-1. *J. Ferment. Bioeng.* 76: 19-24 (1993)
- Lee YW. Inhibition of supercooling of food components by ice nucleation active bacteria. Publishing department of Dong-Eui Technical School, Busan, Korea. pp. 269-278 (1999)
- Chen ML, Chiou TK, Jiang ST. Isolation of ice-nucleating active bacterium from mackerel and its peoperties. *Fish. Sci.* 68: 934-941 (2002)