

유전자 재조합 균주를 환경에 적용하기 위한 (동결) 건조 및 활성회복 조건 최적화

고경석¹ · 김명희² · 공인철^{2*}

¹한국지질자원연구원 지질환경재해연구부, ²영남대학교 건설환경공학부 환경공학전공

Optimum Conditions of Freezing Lyophilization and Bioluminescence Activity Recovery for Environmental Applications Using a Recombinant Strain

Kyung-Seok Ko¹ · Myunghee Kim² · In Chul Kong^{2*}

¹Geological & Environmental Hazards Division, Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources (KIGAM)

²School of Construction and Environmental Engineering, Yeungnam University

ABSTRACT

Bioreporter bacteria, such as recombinant bioluminescent bacteria, have been used for the detection of specific compounds in complex environmental media. In this study, optimum conditions for the preparation and application of deep-frozen and lyophilized recombinant bioluminescent strain KG1206 were investigated for the future application on contaminated environmental sites. Genetically engineered microorganism, *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206, contains TOL plasmid and the plasmid inserted P_m promoter on the upper part of *lux* gene in vector pUCD615, and *m*-toluate and benzoate are considered direct inducers for bioluminescence. Optimum conditions determined for the preparation and application of the deep-frozen and lyophilized strain were followings: cryoprotective agent (24% sucrose), lyophilization time (12 hrs), strain concentration (OD₆₀₀=0.6), reconstitution for frozen strain (quick reconstitution at 35°C), reconstitution for lyophilized strain (3~6 hrs exposure on LB medium), carrying conditions (keep at 20°C after reconstitution). These results demonstrate the feasibility of deep-frozen or lyophilized state of genetically engineered bioluminescent strain for environmental usage.

Key words : Genetically engineered microorganism(GEM), Bioluminescence, Deep-freeze, Lyophilization, TOL-plasmid

요 약 문

Bioreporter 균주는 복잡한 환경매체의 특정 오염원 탐지를 위해 유용하게 사용되고 있다. 특히 발광 유전자 재조합 균주는 민감하고 배경에 의한 영향을 받지 않는 장점이 있다. 사용한 유전자 재조합 균주(*Pseudomonas putida* mt-2 KG1206)는 TOL 플라스미드와 pUCD615 벡터에 P_m promoter가 삽입된 재조합 플라스미드를 함유하고 있으며, 톨루엔 계열 및 중요 분해산물에 대해 분해와 함께 발광을 생산하는 특성을 갖고 있다. 본 연구에서는 균주 동결 및 동결건조 준비 및 적용과정에 필요한 다양한 조건들을 조사하여, 향후 환경매체에 적용하기 위한 최적 방법에 대한 프로토콜을 작성하였다. 조사한 최적 조건들은 다음과 같다: 동결보호시약(24% sucrose), 동결건조 시간(12시간), 균주 농도(OD₆₀₀ = 0.6), 동결균주 활성회복(35°C에서 빠르게 해동), 동결건조 균주 활성회복(LB배지에 3~6시간 노출), 현장 운반 조건(활성 회복 후 20°C 정도의 실온). 본 연구 결과는 재조합 균주 환경 적용을 위해 필요한 균주 동결 및 동결 건조에 대한 중요한 자료들을 제시하고 있다.

주제어 : 유전자 재조합 균주, 생물발광, 동결, 동결건조, TOL 플라스미드

*Corresponding author : ickong@yumail.ac.kr

원고접수일 : 2006. 7. 10 게재승인일 : 2006. 8. 29

질의 및 토의 : 2006. 12. 31 까지

1. 서 론

경제 발전에 따른 인구집중화와 생활수준 향상은 환경 오염 증가를 초래하며, 이로 인해 발생한 오염물질, 특히 합성 인공화합물(xenobiotics)은 자연생태계의 불균형 및 인간 건강 위해성을 유발한다. 다양한 주요 오염원을 중 휘발성 유기화합물(volatle organic compounds; VOCs)을 포함한 석유탄화수소(petroleum hydrocarbons; PHCs)는 발생량 및 위해성 측면에서 주요 오염원이다(신창섭 등, 2001; 이영재 등, 2001; 이진홍 등, 1997).

오염원에 노출된 토양 및 수환경 관리를 위한 다양한 방법 중의 하나인 생물학적 모니터링(biomonitoring)은 환경 내 오염물질의 존재 여부 및 오염 정도, 환경에서의 변화와 물리, 화학적 그리고 생물학적 인자에 의한 영향을 결정하기 위해 생물체를 이용하는 방법으로 정의할 수 있다. 특히 오염된 지역의 생물학적 복원 가능성이나 효율적인 관리, 감시를 위해 다양한 특성을 가진 bioreporter인 유전자 재조합균주는 매우 이용 가능한 방법이며, 이러한 재조합 균주 중 생물발광(bioluminescence)이나 형광단백질(green fluorescence protein)을 생산하는 균주를 이용한 새로운 기술이 환경문제 해결을 위한 적절한 수단 의 한 방법으로 다양하게 개발되고 있다(Selifonova et al., 1993; Chatterjee and Meighen, 1995). 특히 생물발광은 자연현상으로 생물내의 화학반응에 의해 생물로부터 발광하는 빛을 일컬으며 (무)취추동물(firefly *Photinuspyralis*), 박테리아(*Photobacterium*, *Vibrio*) 등의 다양한 생물에서 관찰되고 있다(Steinberg and Poziomek, 1995; Meelson and Hastings, 1979; King et al., 1990). 이는 특정생물의 유일한 특성이므로 발광생물 외의 다른 생물에 의한 결과분석 오차를 방지할 수 있고, 화학적 분석에 의한 관리 및 감시와 비교해 볼 때 생태계에 오염된 총량보다는 생물이용(bioavailable) 가능한 양, 즉 생태계에 영향을 미치는 양을 가늠할 수 있다. 현장에서 직접 이용이 가능한 특성을 가지고 있어서 환경 친화적인 기술로 특수 오염원에 오염된 토양이나 지하수의 관리 및 감시에 적절하게 이용될 수 있을 것이다. 따라서 국외에서는 발광 유전자 재조합 균주를 이용하여 현장 적용을 위한 연구들이 이루어지고 있다(Willardson et al., 1998).

재조합 균주를 현장에 적용하기 위해서는 저장, 보관 및 운반 등의 문제점을 해결하기 위한 적절한 균주 보관 방법이 마련되어야 한다. 균주 보관의 일차적인 목적은 생물체를 살아있는 상태로, 오염되지 않고, 변이(variation or mutation) 없이 유지하여 본래의 분리균과 가능한 한 근

접한 상태로 보존하려 함에 있다. 박테리아를 보존하기 위한 수많은 방법들이 사용되어 왔지만, 모든 종이 기존의 제시된 방법에 부합하여 유사한 반응을 나타내는 것은 아니었다. 같은 종에 속하는 몇몇 균주조차도 동일한 과정을 거치면서 다른 결과를 나타내기도 한다. 플라스미드 혹은 재조합된 DNA를 가진 박테리아의 경우에는 특히 균주 보존 방법의 성패가 적절한 배지와 배양 방법 그리고 보존될 때의 균주 성장 단계 등에 영향을 받는다. 적절한 방법을 선택하는 데는 장비의 이용 가능성, 저장 공간 그리고 숙련된 기술 등이 많은 영향을 끼친다. 균주를 보관하는 방법에는 단기간 방법으로 2차 배양(subculture), 유류 내 침적(immersing in oil), 일반 동결(ordinary freezing), 저온동결(deep-freezing), 건조(drying) 등이 있고, 장기간 방법으로 초저온동결(ultrafreezing) 과 동결건조(freeze-drying, lyophilization)등이 있다(Gherma, 1994). 세포를 축적하거나 고형 지지체에 가두거나 부착시킴으로써 세포의 자유로운 이동을 제한시키는 기술인 고정화(Tyagi and Vembu, 1990) 역시 균주를 보관하는 좋은 방법이 될 수 있다.

본 연구를 위해 발광 유전자 재조합 균주인 *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206를 이용하였다. KG1206 균주는 톨루엔 계열 화합물(톨루엔, 자일렌, MBA) 및 중요 분해 산물(*m*-toluate, benzoate)에 노출되었을 경우, 생분해와 함께 발광을 생산하는 특성을 가지고 있다(Fig. 1; 공인철 등, 2003). 본 연구에서는 균주를 오랜 기간 보관하고 손쉽게 운반하여 현장에 적용하기 위한 동결(freezing) 및 동결건조(freeze-drying; lyophilization) 방법과 보존 후의 활성 회복 및 환경 적용하기 전에 필요한 최적 조건을 정립하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 유전자 재조합균주 배양

연구에 사용된 재조합균주는 *Pseudomonas putida* mt-

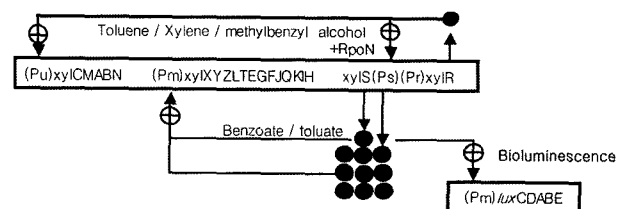


Fig. 1. Regulation of TOL catabolic and recombinated *P_m-lux* genes (⊕: positive control, ●: regulatory protein) (공인철 등, 2003).

Table 1. Components of LB broth and minimum salt medium (MSM)

LB Broth medium	Minimum salt medium (MSM)
Tryptone 10 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.2 g
Yeast extract 5 g	CaCl ₂ 0.1 g
NaCl 5 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.05 mg
2N NaOH 0.5 mL	NaMoO ₄ · 2H ₂ O 0.25 mg
Distilled water 1000 mL	K ₂ HPO ₄ 0.43 g
pH 7.2	KH ₂ PO ₄ 0.23 g
	Distilled water 1000 mL

2 KG1206이며, KG1206은 TOL-plasmid와 재조합된 플라즈미드를 보유하고 있으며 재조합 플라즈미드의 특성은 다음과 같다. TOL-plasmid *xyI*-gene 하부 promoter인 P_m이 벡터 pUCD615 플라즈미드의 *lux*-gene 상부에 조합된 플라즈미드로, 유도제로 작용하는 화합물에 의해 생성되는 조절인자(regulatory factor)가 P_m을 양성적으로 조절하여 발광유전자가 발동하도록 되어 있다(Holtel et al., 1994; Burlage et al., 1994). KG1206은 toluene계열 화합물의 중간산물인 benzoate, toluate 등에 노출될 경우 분해와 동시에 생물발광활성을 가진다(Assinder and Williams, 1990). 초저온(-70°C)에 보관된 KG1206은 필요시 LB고형배지에 계대 배양하여 사용하였다. 균주를 LB배지에 27, 130 rpm 조건으로 overnight 배양 후 LB배지에 OD₆₀₀ = 0.6이 될 때까지 1:20 희석 배양하여 MSM(minimal salt medium)으로 OD₆₀₀ = 0.3으로 조정하여 실험에 이용하였다. KG1206은 kanamycin 저항유전자(K^m)를 보유하고 있으므로 배지에 kanamycin을 50 mg/L 첨가하여 사용하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같다.

2.2. 동결 및 동결건조 방법

급속 냉각 및 건조과정에서 균주 손상을 최소화하고 물리적·생리학적 특성을 유지해주는 최적의 동결보호시약을 결정하기 위해 OD₆₀₀ = 0.6으로 배양한 균주(20 mL)를 원심분리(3000 rpm, 15분) 하였다. 상등액을 제거한 균주 침전물을 10 mL 인산염 완충액(pH = 7.2)으로 조심스럽게 혼합하고 다시 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 완충액 10 mL와 조사 대상의 동결보호 시약 24% sucrose와 trehalose를 각각 10 mL 씩 넣고 조심스럽게 혼합하여 마지막 동결 보호시약 농도가 12% 되도록 혈청병에 균주 혼합액 5 mL를 분배하고 -70°C 초저온고(일신 기기, 모델 DF9007)에 동결 보관하였다. 상이한 동결보호 시약으로 동결한 균주들의 활성 회복을 비교하기 위해 27°C에서 빠르게 해동한 후 최종 농도 1 mM이 되도록 *m*-toluate을 주입하여 발광활성을 측정하였다.

상이한 동결보호 시약(sucrose와 trehalose)으로 동결한 균주를 동결 건조하였을 때의 발광활성을 비교하였다. -70°C에서 충분히 동결된 균주를 -50°C에서 동결건조(일신 기기, 모델I FD5505)하였다. 용기 플라스크 내에 위치한 동결된 혈청병 안의 시료 중 수분은 10 m torr 이하의 진공으로 흡입되어 -50°C로 유지되는 cold chamber 내 cold trap에 모이게 되는 double-vial 방법을 따라 동결 건조하였다.

또한 동결건조에 소요되는 시간(12시간, 18시간, 24시간)과 동결건조 균주의 활성 회복과 보관을 위해 첨가하는 용액(인산염 완충액과 LB 액체 배지)이 발광 활성에 미치는 영향을 조사하고 최적 시간 및 용액을 결정하였다.

2.3. 동결 및 동결건조 균주 활성 회복 조건

동결 및 동결건조 균주 활성 회복에 필요한 최적 조건을 조사하였다. 동결 균주 활성 회복에 적절한 해동 온도 및 시간을 조사하였다. 동결 균주를 상이한 조건(27°C에서 빠르게, 27°C에서 2시간, 35°C에서 빠르게, 그리고 35°C에서 2시간)에서 해동 후 발광활성을 비교하였다. 또한 동결건조 후 생물발광 특성이 최적으로 회복되도록 하기 위한 해동시간을 조사하였다. 동결건조 과정을 거친 후 보관한 균주에 LB 액체 배지를 첨가하여 재수화(reconstitution) 시간(30분, 1시간~12시간)이 발광활성에 미치는 영향을 비교하였다.

2.4. 균주 농도 및 보관과 운송 조건

동결 및 동결건조에 적절한 균주의 양(농도)을 조사하였다. 동결과정에서 한 실험군은 배양 균주 40 mL(OD = 0.6)를 이용하고, 다른 실험군은 원심분리한 40 mL의 균주 침전물에 재배양 균주 40 mL를 더 첨가(균주 농도 2배)하였다. 각각의 균주 혼합액 9.9 mL를 혈청병에 분배하고 -70°C에서 동결 하고, 해동 후 초기 균주 농도(1배, 2배)에 따른 발광활성을 비교하였다.

또한 동결건조에 적절한 균주 양(1배, 2배, 4배 농도)을 조사하였다. (1) 재배양 균주 40 mL를 원심분리하고 인산염 완충액으로 세척, 2차 원심분리를 거친 뒤, p-buffer와 24% sucrose를 1:1 비율로 총 40 mL 넣고 혼합하였다(1배). (2) 원심 분리한 재배양 균주 40 mL를 p-buffer로 세척하고 2차 원심분리를 거친 뒤, p-buffer와 24% sucrose를 1:1 비율로 총 20 mL 넣어 혼합하였다(2배). (3) 40 mL 씩 원심 분리한 균주가 들어 있는 2개의 원심분리관에 각각 10 mL p-buffer를 넣어 균주를 재부유 시킨 뒤 2개 혼합물을 합하였다. 2차 원심분리를 거

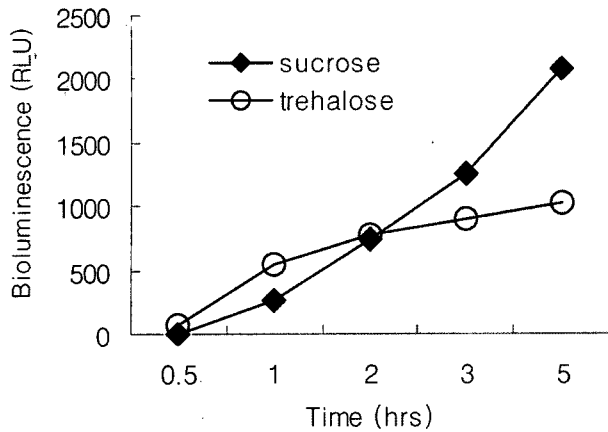


Fig. 2. Effects of sucrose and trehalose on the freezing process of KG1206.

친 뒤, p-buffer와 24% sucrose를 1:1 비율로 총 20 mL가 되게 넣고 혼합하였다(4배). 이들 혼합액을 5 mL 씩 혈청병에 넣고 -70°C에서 동결 후, -50°C에서 동결건조 시켰다. 보관한 동결건조 균주에 5 mL LB 액체 배지를 넣고 27°C, 130 rpm으로 4~5시간 해동한 후 발광 활성을 비교하였다.

또한 동결 균주의 활성 회복 후 현장에 적용을 위해 운송 과정에서의 온도 변화(4°C, 10°C 및 20°C) 및 시간(1시간 및 3시간) 이 균주 발광활성에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주 동결 및 동결 건조

동결 과정 중 급격한 온도 감소로 인한 균주 세포막 손상을 최소화하기 위해 동결보호시약을 동결 전에 첨가한다. 선행 연구에서 sucrose가 다른 시약(glycerol, DMSO, skim milk 및 일반배지와 희석액)에 비해 적절한 것으로 조사되었기(공인철, 2001) 때문에, 동결 보호시약으로 사용되고 있는 sucrose(24%)와 trehalose(24%)를 비교하였다(Fig. 2). 배양한 균주 침적물을 동일 비율의 동결 보호 시약과 인산완충액으로 혼합 후, -70°C에서 동결하고 해동 후 발광 활성을 비교하였다(Fig. 2). 균주 발광 활성이 초기 2시간 정도의 시간 경과 후에는 trehalose 첨가균이 약간 높은 발광 활성을 보였지만, 전체적으로 sucrose 첨가균이 높은 발광 활성을 나타내었다. 따라서 발광 활성 회복 결과에 의하면 희석액과 혼합한 24% trehalose와 sucrose 모두 사용 가능하지만, 더욱 효과적인 동결보호 시약은 sucrose인 것으로 조사되었다. Sucrose가 trehalose보다 우수한 시약에 대한 생화학적 이유는 불명

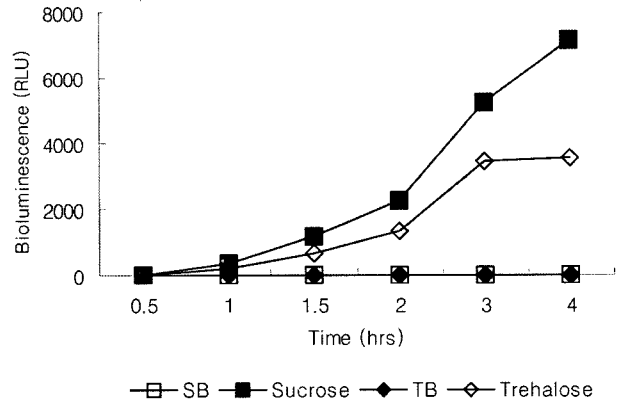


Fig. 3. Effects of sucrose and trehalose on the lyophilization of KG1206.

확하지만, Miura et al. (1998)에 의하면 sucrose 성분이 TOL 플라즈미드의 *xyl*-promoter에 양성적으로 영향을 미치는 *rpo* 유전자를 활성화하여 *xyl*-유전자 promoter의 발현을 촉진시킨다고 한다.

동결 후 동결건조 과정(lyophilization)을 거친 분말 상태의 균주는 장기간 보관 및 환경 적용에 더욱 용이한 상태이다. 따라서 동결과정에서 조사한 동일한 동결보호 시약(sucrose와 trehalose)로 동결된 균주의 동결 건조 후의 활성회복에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3). 활성 회복을 위해 희석액을 첨가 후 약 2시간의 배양에는 sucrose와 trehalose를 첨가한 조건에 뚜렷한 차이가 없었으나, 이후의 배양시간에서는 sucrose 첨가균에서 뚜렷하게 높은 발광활성이 조사되었으며, 예상한 바와 같이 발광 유도물질을 첨가하지 않는 균(SB, TB)에서는 발광이 모두 관찰되지 않았다. 따라서 동결과 동결건조를 위해 24%의 sucrose를 희석액과 동일 비율로 첨가하는 것이 적당한 것으로 조사되었지만, trehalose 역시 사용 가능한 것으로 조사되었다.

배양균주를 침전 후 희석액과 동결보호시약을 동일 비율로 혼합 후 동결 및 동결건조 과정을 거친다. 희석액(LB 배지와 인산염 완충액)이 동결건조 과정에 미치는 영향에 대해 조사하였다. Sucrose(24%)와 LB 액체 배지를 혼합하여 균주를 동결건조할 경우, 동결건조 과정 중 시료가 녹고 심한 거품이 발생하였으며, 어느 정도 시간이 흐르자 상당량의 시료가 유실되었다. 이는 공융 화합물의 형성(Morris et al., 1988)과 bubbling 혹은 'boiling over' 현상으로 생각되며, 이 경우 시료를 준비하는 데 큰 어려움이 따른다는 보고가 있다(Gu et al., 2001). 본 결과에서도 인산염 완충액을 첨가한 경우에 비해 LB배지를 첨가한 경우에는 거품 현상으로 시료가 유출되는 현상이 빈

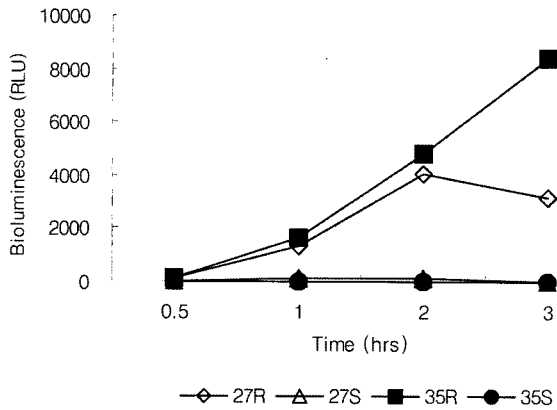


Fig. 4. Effects of temperature and time for the thawing process on the bioluminescence activity of frozen KG1206.

번하게 발생하였다. 따라서 균주 침전물에는 동일 비율의 24% sucrose와 인산염 완충액 첨가가 적절한 방법을 것을 확인하였다.

3.2. 동결 및 동결건조 균주 활성 회복 조건

동결 균주를 이용하기 위한 해동과정에서 온도 및 시간이 발광 활성 회복에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 4). 온도 및 시간에 대한 조건은 다음과 같다. 27°C에서 빠르게 해동(진탕수조 내에서 얼음결정이 모두 사라질 때 까지; 27R), 27°C에서 2시간 해동(27S), 35°C에서 빠르게 해동(35R), 35°C에서 2시간 동안 해동(35S). 온도에 대한 결정은 37°C에서 동결 균주를 해동시킨 결과(Ghera, 1994)와 KG1206 균주 최적 배양 온도 27°C, 그리고 36°C 이상에서 발광활성이 저해된 결과(서혜영, 2002)를 참고로 하여 결정하였다. 발광활성 회복을 위해 희석액에 2시간 동안 노출시킨 경우에는 조사한 온도 조건에서 거의 무시할 정도의 발광활성이 나타났다(< 10 RLU). 그러나 빠르게 해동한 경우에는 27°C보다는 35°C에서 발광활성이 높게 나타났고, 또한 오랜 시간 해동시키는 것보다는 빠르게 해동 시키는 경우에 높은 발광활성이 관찰되었다(Fig 4). 35°C가 27°C보다 높은 활성을 보이는 것은 온도 자체가 균주 활성에 미치는 영향과 또한 27°C보다 해동에 짧은 시간이 소요되었기 때문으로 사료된다. 따라서 균주의 활성을 억제하지 않는 범위 온도 내에서 해동 시간을 가능한 빠르게 하는 것이 효과적이라고 사료되며, 동결 KG1206은 35°C에서 빠르게 해동하여 환경에 적용할 수 있을 것이다. 그러나 27°C에서 빠르게 해동시키는 경우에도 충분한 발광 활성이 관찰되었다.

동결건조 과정에서 완전히 제거되지 않은 수분은 균주 저장 기간 동안 균주 활성 회복에 손상을 초래할 수 있

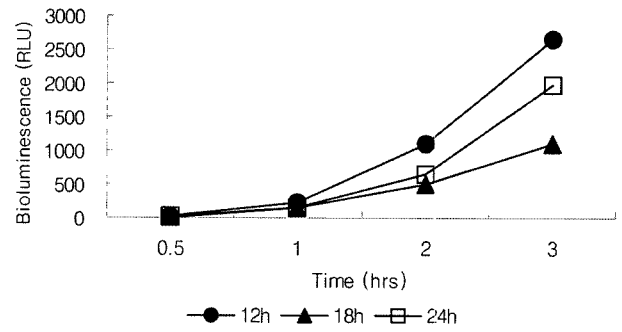


Fig. 5. Effect of freeze-drying time on the bioluminescence activity.

다(Gu et al., 2001). 수분 제거와 연관성이 있는 동결건조 시간(12, 18과 24 hrs)이 발광활성 회복에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). 12시간 동안 동결건조 과정을 거친 균주의 발광 활성이 18시간과 24시간에 비해 가장 높아 세포 손상이 가장 낮았음을 알 수 있었다. Gu (2001)에 따르면, 건조 시간(1일, 2일, 3일)을 길게 할수록 잔류 수분은 감소하였지만, 초기 생물 활성은 감소하였고, 2일, 3일 동안 건조한 경우의 생물 활성이 크게 차이가 나지 않았으며, 10일 저장 기간 후의 생물 활성은 모든 조건에서 비슷하였다. 따라서 최적 동결건조 시간은 12시간 정도가 적당한 것으로 조사되었다.

동결건조 된 균주 활성 회복 과정에 적절한 시간을 조사하기 위해 분말 상태에 LB 액체 배지를 첨가한 후 시간에 따른 발광 정도를 비교하였다(Fig. 6a, b). 활성 회복 시간(rehydration time)은 2회로 나누어 첫 번째는 0.5~5시간에서 조사(Fig. 6a)하였으며, 결과에 근거하여 두 번째 실험은 3~12시간 범위에서 조사하였다(Fig. 6b). Fig. 6a는 LB 배지에 0.5, 1, 2, 3, 그리고 5시간의 활성 회복을 거친 뒤 발광 유도 물질에 1.5시간 노출 후의 발광활성이다. 2시간 정도의 활성 회복 시간으로는 KG1206의 발광 특성이 충분히 재현되지 않았고, 3시간 이상의 활성 회복 시간이 필요한 것으로 조사되었다. 발광유도물질을 주입하지 않은 경우 균주에서는 발광을 관찰할 수 없었으며, 초기 결과에 근거하여 활성 회복 시간을 3~12시간으로 조정 후, 발광 유도 물질을 주입하였을 때, 활성회복 시간이 증가할수록 발광 활성도 증가하였지만, 6시간 이상의 접촉시간은 오히려 발광활성을 감소시켰다(Fig. 6b). 따라서 동결건조 균주의 활성 회복에 필요한 시간은 3~6시간이 적절한 것으로 사료된다.

3.3. 균주 농도 및 보관과 운송 조건

동결건조 균주 농도에 따른 발광 활성 영향을 조사하였

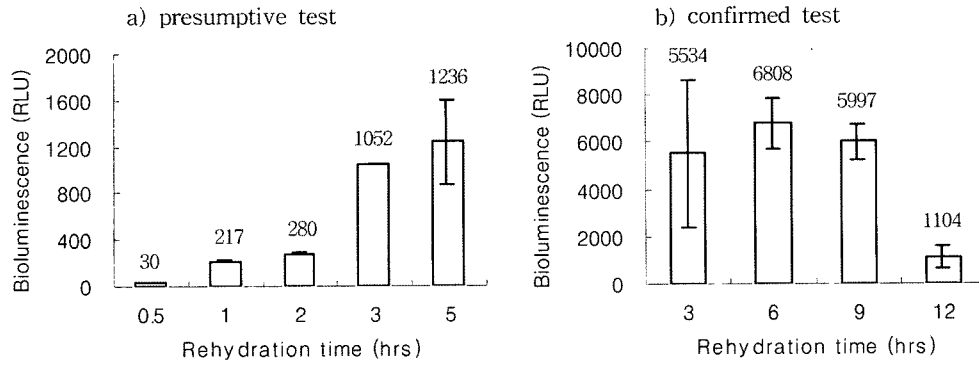


Fig. 6. Effect of rehydration time on the bioluminescence activity of lyophilized KG1206: a) presumptive test, b) confirmed test.

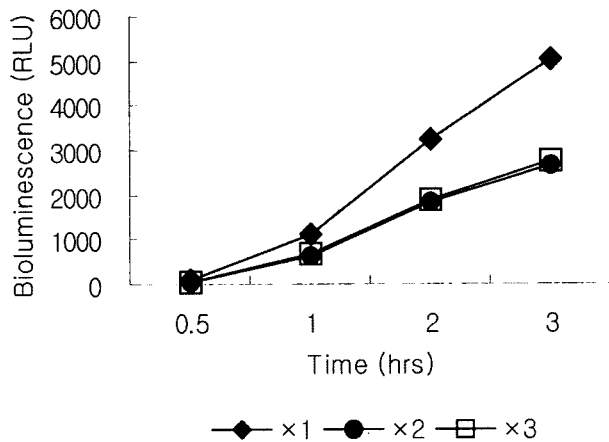


Fig. 7. Comparison of the strain concentration for lyophilization on the bioluminescence activity.

다(Fig. 7). OD₆₀₀ = 0.6까지 배양한 KG1206 균주(1배)와 초기 균주 농도를 2, 3배로 농축한 균주를 동결건조하였다. 동결건조의 경우에는 균주의 농도를 증가 할수록 오히려 발광 활성이 감소하는 현상이 관찰되었다(동결건조 균주의 발광 활성 회복도 동결균주의 발광 회복과 비슷한 결과가 관찰되었다). 따라서 OD₆₀₀ = 0.6 농도를 분별하여 동결건조에 사용하는 것이 적절한 것으로 사료된다. 동결 균주의 활성 회복은 균주의 양보다는 동결에 사용한 균주의 초기 활성에 의해 큰 영향을 받는다고 할 수 있다 (Ghera, 1994).

동결 및 동결건조 균주를 현장에 적용할 때 해동 조건도 발광 활성에 영향을 주지만, 또한 해동 후 이동하는 과정에서의 (운송) 시간 및 (보관) 온도도 발광 활성에 영향을 줄 수 있을 것이다. 이러한 영향을 조사하기 위해 활성 회복한 균주를 상이한 (보관) 온도와 시간의 보관 조건이 발광활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 8). Fig 8은 해동하여 활성을 회복 후, 운송을 가정한 상이한 온도 및 시간조건을 거친 후에 발광 유도화합물을 첨가하고

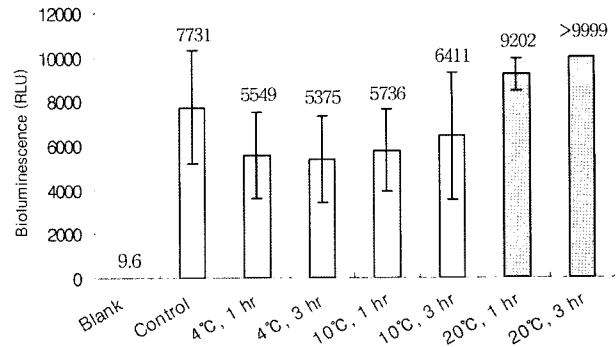


Fig. 8. Effects of different temperature and storage time following rehydration of lyophilized KG1206 on the bioluminescence activity.

3시간 시점에서의 발광활성도이다. Blank는 해동 후 발광 유도물질을 주입하지 않은 것이고, 대조군(control)은 해동 후, 바로 발광 유도물질을 첨가한 것이다. 나머지는 빠르게 해동 후 각각 4°C에서 1시간(4°C, 1시간), 3시간(4°C, 3시간), 10°C에서 1시간(10°C, 1시간), 3시간(10°C, 3시간), 20°C에서 1시간(20°C, 1시간), 3시간(20°C, 3시간) 동안 보관한 다음 발광 유도물질을 첨가하였다. 발광 유도 물질 주입 후 3시간 경과 시의 발광활성을 비교한 결과, 4°C와 10°C에서 보관한 경우 해동 즉시 발광유도물질을 주입한 경우보다 활성이 저해되었지만, 충분히 모니터링 할 수 있을 정도의 활성을 보였다. 20°C에서 보관된 경우는 시간에 따라서 큰 차이를 보이지 않았고(1시간: 9202 ± 721 RLU, 3시간: > 9999 RLU), 해동 즉시 발광유도물질을 주입했을 때(7731 ± 2535 RLU)와 유사한 발광활성을 보였다. 따라서 동결 균주를 해동한 후 실온에서 보관하여 현장으로 운반하고 현장시료에 적용할 수 있다고 사료되며, 또한 저온 상태에서 보관한 경우에도 약 5,000 RLU 정도의 발광이 조사되었으므로 이용 가능하다고 할 수 있다.

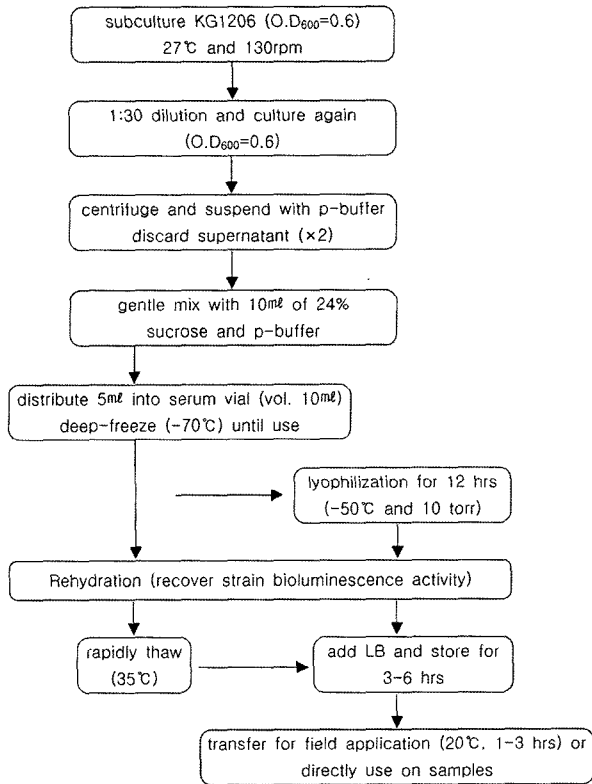


Fig. 9. Protocol for the application of recombinant strain on contaminated environments.

4. 결 론

본 연구에서는 유전자 재조합 발광균주를 이용한 오염원 탐지 및 관리를 위해 필요한 과정들의 일부인 동결 및 동결건조 과정과 적용 전의 활성 회복에 필요한 조건들에 대해 조사하였다. Fig. 9에 상세하게 표기한 바와 같이 동결 및 동결 건조된 균주를 환경에 적용하기 위해 균주 준비에 필요한 조건들에 대한 프로토콜을 완성하였으며, 신속히 오염된 토양 및 지하수의 생물학적 모니터링에 유전자 재조합 균주의 발광특성을 이용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

사 사

이 논문은 2006년도 환경부 토양오염확산방지 연구과제인 “탐사식 조사기법을 이용한 오염부지 평가 프로토콜 개발”에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

공인철, 서혜영, 이진우, 김승현, 백성욱, 2003, 토양에 오염된 휘

발성 유기화합물의 모니터링을 위한 발광 유전자 재조합 균주 이용 가능성, 대한환경공학회지, 25(4), 440-445.

공인철, 2001, 생물발광 유전자 재조합 균주의 동결건조와 사용 방법 연구, 대한환경공학회지, 23(5), 789-796.

서혜영, 2002, 토양에 오염된 휘발성유기화합물의 모니터링을 위한 발광 유전자 재조합 균주 이용, 영남대학교 석사학위논문, p. 62.

신창섭, 김기환, 원정일, 2001, PCB 제조공정에서 발생하는 VOC를 처리하기 위한 흡착제의 흡착특성, 한국대기환경학회지, 17(1), 67-74.

이영재, 신대윤, 이학성, 강병욱, 한종수, 2001, 광주지역 여름철 대기 중 주야간 VOC 농도 특성, 한국대기환경학회지, 17(2), 169-177.

이진홍, 김윤신, 류영태, 유인식, 1997, 석유화학단지의 휘발성 유기화합물로 인한 인체 위해도 평가에 관한 연구, 한국대기보전학회지, 13(4), 257-267.

Assinder, S.J. and Williams, P.A., 1990, The TOL Plasmid: Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes, Adv. Microbiol. Phys., 31, 2-69.

Burlage, R.S., Palumbo, A.V., Heitzer, A., and Sayler, G., 1994, Bioluminescent reporter bacteria detect contaminants in soil samples, Appl. Biochem. Biotech., 45/46, 731-740.

Chatterjee, J. and Meighen, E.A., 1995, Biotechnological application of bacterial bioluminescence (*lux*) genes, Photochem. Photobiol., 62(4), 641-650.

Ghera, R.L., 1994, Culture Preservation, In: P. Gerhardt et al.(ed), Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 278-292.

Gu, M.B., Choi, S.H., and Kim, S.W., 2001, Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity monitoring, J. Biotechnol., 88, 95-105.

Holtel, A., Marques, S., Mohler, I., Jakubzik, U., and Timmis, K.N., 1994, Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL Plasmid, J. Bacteriol., 176(6), 1773-1776.

King, J.M.H., Digrazia, P.M., Burlage, B., Sanseverino, J., Dunbar, P., Larimer, F., and Sayler, G.S., 1990, Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation, Science, 249, 778-781.

Miura, K., Inouye, S., and Nakazawa, A., 1998, The *rpoS* gene regulates OP2, an operon for the lower pathway of xylene catabolism on the TOL plasmid, and the stress response in *Pseudomonas putida* mt-2, Mol. Gen. Genet., 259, 72-78.

Morris, G.J., Coulson, G.E., and Clarke, K.J., 1988, Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of growth conditions, Cryobiology, 25, 471-482.

Nealson, K.H. and Hastings, J.W., 1979, Bacterial biolumines-

cence: Its control and ecological significance, *Microbiol. Rev.*, December, 496-518.

Selifonova, O.S., Burlage, R.S., and Barkay, T., 1993, Bioluminescence sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(9), 3038-3090.

Steinberg, S.M. and Poziomek, E.J., 1995, A review of environmental application of bioluminescence measurements, *Chemo-*

sphere, **30**(11), 2155-2197.

Tyagi, R.D. and Vembu K., 1990, Wastewater Treatment by Immobilized Cells, CRC Press, Boca Raton, p. 281.

Willardson, B.M., Wilkins, J.F., Rand, T.A., Schupp, J.M., Hill, K.K., Keim, P., and Jackson, P.J., 1998, Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(3), 1006-1012.