Journal of Radiation Industry 8(2) : 105~109(2014)

극지미생물 *Arthrobacter* sp. PAMC 25486의 돌연변이 유발 물질에 대한 감수성 평가

김 상 근 · 최 종 일* · 한 세 종[1]

전남대학교 생물공학과, [1]극지연구소 극지생명과학연구부

Investigation of the Susceptibility of Arctic *Arthrobacter* sp. PAMC 25486 to Mutagens

Sang-geun Kim, Jong-il Choi* and Se Jong Han[1]

Department of Biotechnology and Bioengineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[1]Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 406-840, Korea

Abstract - This study was conducted to investigate the sensitivity of *Arthrobacter* sp. PAMC 25486 to various mutagens. γ-ray, UV-ray, Ethyl methane sulfonate (EMS) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were used as mutagen, and the survival rate of *Arthrobacter* sp. was measured at various doses of γ-ray and UV-ray, and concentrations of EMS and H_2O_2. Decimal reduction dose (D_{10} value) of *Arthrobacter* sp. was determined 370 Gy for a gamma irradiation treatment, 0.019 J for a UV ray, 2.5 mM for EMS, and 230 mM for H_2O_2. This result will be applied for the development of superior mutant strain of Arctic bacteria producing valuable compounds.

Key words : *Arthrobacter* sp., Sensitivity, γ-ray, UV, EMS, Hydrogen peroxide

서 론

Carotenoids는 동식물 조직부터 미생물까지 광범위하게 분포하는 황색, 주황색, 홍색의 색소체로 다양한 생리적 기능을 가진 물질이다. 먼저, 구조적 특징으로 인해 효과적인 자유라디칼(free-radical) 안정화 물질인 carotenoids는 척추동물의 면역력을 증진시켜주고, 체내에서 뛰어난 항산화 물질 및 비타민 A의 전구체로 알려져 carotenoids를 이용한 의약품 및 건강보조식품, 식품첨가물 등 이용가치가 인정되어 최근 많은 관심을 받고 있다(Chance *et al*. 1979; Cerutti 1985; Sies 1985, 1986; Ames 1987; Halliwell *et al*. 1989). 하지만 인간 및 대부분 동물은 carotenoids를 생합성 하지 못하기 때문에 섭취만을 통하여 흡수가 가능하다. 그리하여 사료, 의약품, 건강보조식품 및 식품 등에 이용가치가 클 것으로 예상하며 산업적 측면에서 그 수요가 증가하고 있다.

최근 *Arabidopsis*(Ruiz-Sola *et al*. 2012), *Phaffia rhodozyma*(Chumpolkulwong *et al*. 1997)와 같이 식물 및 여러 미생물을 이용하여 carotenoids의 생합성이 이루어지고 있다(Pfander *et al*. 1997; Ernst 2002; Lu *et al*. 2008). 본 연구에 이용된 *Arthrobacter* sp. PAMC 25486는 극지에서 발견된 미생물로 낮은 온도에서 생장이 가능하며,

* Corresponding author: Jong-il Choi, Tel. +82-62-530-1846, Fax. +82-62-530-1949, E-mail. choiji01@chonnam.ac.kr

carotenoids를 생산한다고 알려져 있다(Britton 1995a, b; Fong *et al*. 2001; Kim *et al*. 2010). 그러나, 생합성을 통한 유용물질의 생산은 산업적으로 이용되기에 낮은 수율을 가지고 있다(Lee 2001).

따라서, 본 논문은 저온에서 생장하며 carotenoids를 생산하는 극지 미생물인 *Arthrobacter* sp. PAMC 25486의 carotenoids 생산량이 증대된 균주 개발의 가능성을 보기 위해 다양한 돌연변이 유발물질에 대한 감수성을 조사하여, 돌연변이가 가장 잘 나타나는 생존율인 1～10%을 탐지하는 데 중점을 두었다(Sweet *et al*. 1976). 돌연변이 유발물질로서 γ-ray, Ultra Violet-ray, Ethyl methanesulfonate (EMS), Hydrogen Peroxide (H_2O_2)를 이용하여 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

1. 미생물 균주 및 배양 방법

실험에 사용된 극지 미생물 *Arthrobacter* sp. PAMC 25486은 남극 해양 바이오 필름(biofilm)에서 분리되었고, 한국 극지연구소(KOPRI)에서 분양 받았다. 균주는 20°C, pH 7.2인 Yeast extract (Becton, Dickinson and Company, USA) 0.5 g l^{-1}, protease peptone NO.3 (Becton, Dickinson and Company) 0.5 g l^{-1}, casamino acids (Becton, Dickinson and Company) 0.5 g l^{-1}, $C_6H_{12}O_6$ (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 0.5 g l^{-1}, soluble starch (Becton, Dickinson and Company) 0.5 g l^{-1}, $C_3H_3NaO_3$ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.3 g l^{-1}, HK_2O_4P (Sigma-Aldrich, Co.) 0.3 g l^{-1}, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Daejung Chemical &Metal Co., Ltd, Seoul, South Korea) 0.05 g l^{-1}, agar (Becton, Dickinson and Company) 15 g l^{-1} 조성의 배지(R2A)에서 계대 배양하였다. 본 배양(50 ml)은 pH 7.2인 R2A 배지를 3배수로 하여 250 ml 삼각 플라스크에서 20°C, 150 rpm으로 진탕 배양하였다.

2. 미생물 동정

분양받은 미생물은 universal primer인 1492R (5′-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3′)과 27F (5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′) 를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. PCR 결과물은 QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Nethrelands)를 이용하여 정제한 후 ㈜마크로젠 (Seoul, South Korea)에 의뢰하여 16S rDNA 염기서열을 확인한 후 NCBI blast를 통하여 동정하였다.

3. 성장률 측정

성장률 측정으로는 UV/vis spectrophotometer (Mecasys Co. Optizen POP. Seoul, South Korea)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 균 배양액을 1 ml 취하여 멸균된 R2A medium 2 ml에 넣어 3배 희석하여 흡광도를 측정하였고, 멸균된 R2A medium을 blank로 사용하였다.

4. 화학 약품

Ethyl methanesulfonate는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)를 이용하였고, Hydrogen Peroxide (H_2O_2)는 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd. (Kyungkido, South Korea)를 이용하였다.

5. 돌연변이 처리

γ-ray와 UV (Ultra violet), EMS (Ethyl methanesulfonate), Hydrogen Peroxide (H_2O_2)를 사용하였고, 그 적용 방법은 다음과 같다. 모든 실험에서 균주는 R2A배지에 배양하여 균체수가 1×10^9 ml^{-1}이 될 때까지 키운, 대략 흡광도 값이 OD_{600}=1.0인 것을 사용하였다. 모든 실험은 돌연변이 처리하지 않은 control을 포함하였다.

1) γ-ray

배양한 균주를 1 ml씩 취하여 1.5 ml Micro centrifuge tube에 넣은 상태로 γ-ray를 조사하였다. γ-ray는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에 비치된 Co-60를 이용하여 각각 200, 400, 600, 1,000 Gy씩 조사하였다. 방사선 조사의 선량은 1,000 Gy h^{-1} 였으며, 4°C에서 조사되었다. 조사 직후 균주 현탁액을 1×10^{-6}까지 희석하였고, 100 μl를 R2A agar배지에 도말하여 20°C에서 4일간 배양하였다. 돌연변이 처리하지 않은 대조군과 실험군의 colony 수를 비교하여 생존율을 확인하였다.

2) UV

배양한 균주 현탁액을 희석하지 않은 원 균주 액 100 μl를 R2A agar배지에 도말하고, UV-B (321 nm) 처리를 하였다. UV는 VILBER LOURMAT사의 BIO- LINK® (fi.: 0.120 J cm^{-2})를 이용하여 각각 0.03, 0.1, 1.0, 10.0, 20.0J씩 조사하였다. 광 회복에 의한 DNA 복구를 최소화하기 위해, UV 조사 직후 차광하여 20°C에서 4일간 배양하였다. 돌연변이 처리하지 않은 대조군과 실험군의 colony 수를 비교하여 생존율을 확인하였다.

3) EMS

EMS 처리는 기존의 방법을 개량하여 실시하였다(Cid *et al*. 1994). Ethyl methanesulfonate (EMS)는 Sigma-Al-

drich Co. (St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. 먼저, 적당히 배양한 균주를 증류수로 세척하고 처음 균주배양액의 양과 동일한 0.1 M Sodium Phosphate buffer (pH7.0)으로 재현탁하였다. 이중 배양액 1 ml씩을 취하여 EMS의 최종 농도가 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mM이 되도록 처리하였다. EMS 처리는 30°C에서 빛이 통하지 않는 상태로 60분간 진행되었다. 그 후 돌연변이 효과를 멈추기 위해 0.5 ml의 sodium thiosulfate (5% wt/vol)를 넣어 10분간 반응시켰고, 원심 분리하여 상등액 제거 후, 차례로 증류수와 R2A배지로 세척하였다. 이 균주 현탁액을 1×10^{-6}까지 희석하였고, 이것의 100 µl를 R2A agar배지에 도말하여 20°C에서 4일간 배양하였다. 돌연변이 물질을 처리하지 않은 대조군과 실험군의 colony수를 비교하여 생존율을 확인하였다.

4) Hydrogen Peroxide

Hydrogen peroxide의 균주에 대한 처리 역시 기존의 방법을 변형시켜 실험을 진행하였다 (Han 1997). Hydrogen peroxide는 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd. (Kyungkido, South Korea)를 이용하였고, R2A배지에 희석하여 적정 농도로 준비한다. 배양한 균주 배양액 900 µl에 hydrogen peroxide 100 µl를 넣어 최종 부피를 1 ml로 맞추고 최종농도가 각각 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mM이 되도록 하였다. Hydrogen peroxide 처리는 30°C에서 빛이 통하지 않는 상태로 30분간 진행되었다. 그 후, 증류수와 R2A배지로 세척하고 R2A배지로 최종 1 ml 부피를 맞추어 돌연변이 처리가 완료된 균주를 얻었다. 이 균주 현탁액을 1×10^{-6}까지 희석하였고, 100 µl를 R2A agar배지에 도말하여 20°C에서 4일간 배양하였다. 돌연변이 처리하지 않은 대조군과 실험군의 colony수를 비교하여 생존율을 확인하였다.

결 과

1. 미생물 동정

Protease 생산 균주들의 16S rDNA 유전자 정보의 염기서열을 확인한 후, NCBI blast를 통하여 동정해본 결과 *Arthrobacter* sp. PAMC 25486은 *Arthrobacter* sp. TSBY-27 등과 95% 유사성을 보였다.

2. γ-ray에 대한 감수성 평가

γ-ray는 광선의 세기에 따른 *Arthrobacter*의 감수성을 조사하였다. γ-ray를 조사한 균주 배양액을 R2A agar배지에 도말하고 4일 후 배지에 나온 colony의 수를 아무처리도 하지 않은 control그룹과 비교하여 그 생존율을 구하여 백분율로 나타내었다. OD_{600}=1.2인 균주배양액에 γ-ray를 조사한 결과, 200 Gy에서 26.75%, 400 Gy에서 7.99%, 600 Gy에서 2.15%의 생존율을 확인하였다. 최종 1,000 Gy는 0.18%의 생존율로 거의 사멸함을 확인하였다 (Fig. 1). 이 중 400 Gy에서 돌연변이가 가장 잘 일어나는 생존율인 약 10%의 생존율이 확인되었다.

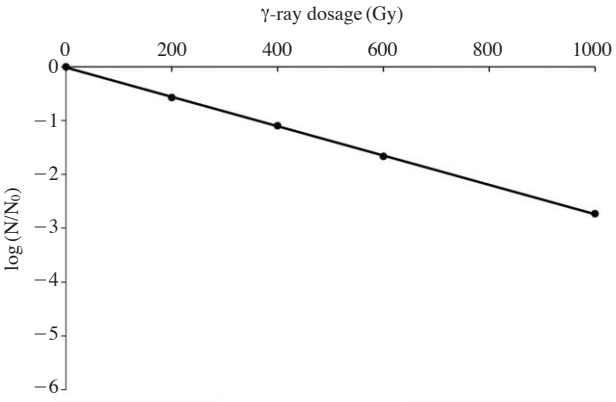

Fig. 1. Survival rate of *Arthrobacter* sp. PAMC 25486 at various doses of γ-ray.

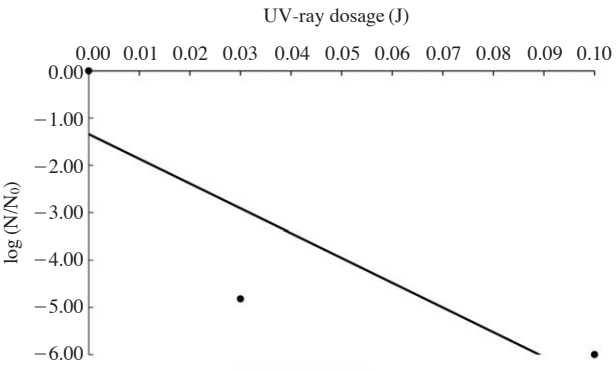

Fig. 2. Survival rate of *Arthrobacter* sp. PAMC 25486 at various doses of UV-ray.

3. UV에 대한 감수성 평가

UV는 광선의 세기에 따라 *Arthrobacter*의 감수성을 조사하였다. R2A agar배지에 도말하고 UV-ray를 조사한 배지를 4일간 배양하였다. 배지에 생긴 colony의 수를 아무 처리도 하지 않은 control그룹과 비교하여 그 생존율을 구하여 백분율로 나타내었다. OD_{600}=1.0인 균주 배양액에 UV를 조사한 결과, 0.03 J과 0.1 J에서 매우 적은 colony수를 확인할 수 있었고, 이후 1.0, 10.0, 20.0 J에서는 균주가 사멸됨을 확인하였다 (Fig. 2).

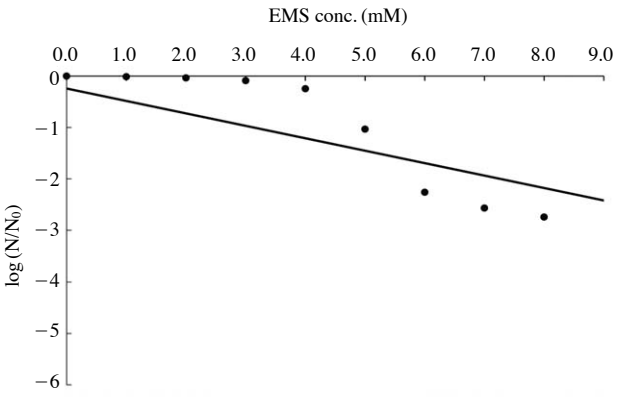

Fig. 3. Survival rate of *Arthrobacter* sp. PAMC 25486 at various concentration of EMS.

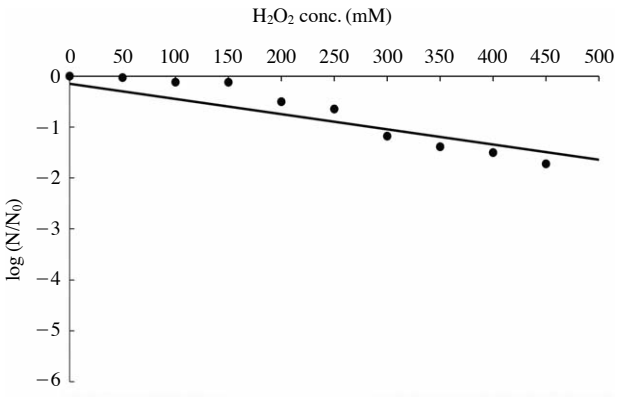

Fig. 4. Survival rate of *Arthrobacter* sp. PAMC 25486 at various concentration of H_2O_2.

4. EMS에 대한 감수성 평가

EMS에 대한 *Arthrobacter*의 감수성은 다양한 농도에 동일한 시간 동안 반응시켜 R2A agar배지에 도말하고 4일 후 배지에 나온 colony의 수를 아무 처리도 하지 않은 control그룹과 비교하여 그 생존율을 구하여 백분율로 나타내었다. EMS 처리농도가 증가함에 따라 생존율은 유의성 있는 추세를 보이며 감소하였다. OD_{600}=1.0인 지수성장기의 세포에 농도별로 EMS를 1시간 동안 처리시, 1 mM일 때 97.3%, 2 mM일 때 92.1%, 3 mM일 때 81.5%, 4 mM일 때 56.7%, 5 mM일 때 9.3%, 6 mM일 때 0.5%, 7 mM일 때 0.3%, 8 mM일 때 0.2%의 생존율을 보였고, 9 mM일 때 균주가 사멸하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이 중 5 mM의 농도로 1시간 동안 반응했을 때 돌연변이가 가장 잘 일어나는 생존율인 10%의 생존율을 확인하였다.

5. Hydrogen Peroxide에 대한 감수성 평가

Hydrogen peroxide는 산화적 스트레스에 의해 돌연변이가 유발되는 물질이다. EMS와 마찬가지로, Hydrogen peroxide에 대한 *Arthrobacter*의 감수성은 다양한 Hydrogen peroxide의 농도에 동일한 시간 동안 반응시켜 R2A agar배지에 도말하고 4일 후 배지에 나온 colony의 수를 아무 처리도 하지 않은 control그룹과 비교하여 그 생존율을 구하여 백분율로 나타내었다. Hydrogen peroxide의 농도가 증가함에 따라 생존율은 유의성 있는 감소세를 보였다. OD_{600}=1.0인 지수성장기의 세포에 30분 동안 30°C에서 반응시킨 결과, 농도가 50 mM일 때 93.73%, 100 mM일 때 76.17%, 150 mM일 때 65.86%, 200 mM일 때 31.34%, 250 mM일 때 22.57%, 300 mM일 때 6.58%, 350 mM일 때 4.07%, 450 mM일 때 1.88%, 500 mM일 때 0%의 생존율을 확인하였다(Fig. 4). 이 중 300 mM에서 30분 동안 반응했을 때 돌연변이가 가장 잘 일어나는 생존율인 약 10%의 생존율을 확인하였다.

결 론

본 실험에서 Carotenoid를 생산한다고 알려진 극지미생물인 *Arthrobacter* sp.의 네 가지 돌연변이 유발물질(γ-ray, UV, EMS, Hydrogen peroxide)에 대한 감수성을 알아보았다. γ-ray로 돌연변이를 유도한 경우 400 Gy에서 약 10% 정도의 생존율을 보였고, EMS의 경우 5 mM, Hydrogen peroxide는 300 mM에서 약 10%의 생존율을 보였다. 반면 *Arthrobacter* sp.는 다른 처리군에 비하여 UV에 매우 민감하다는 것을 확인하였다. Bacteria에서 돌연변이 유발을 하기에 가장 적절한 생존율은 10%라고 보고되어있다(Sweet *et al*. 1976). 본 연구로 *Arthrobacter* sp.의 돌연변이 유발에 적합한 각 돌연변이 유발물질에 대한 감수성이 확인됨에 따라 돌연변이 처리에 의한 유용 균주 획득에 이용될 것으로 판단된다. 특히 본 실험에 이용된 균주는 색소체이자 항산화제인 carotenoid를 생산하는 것으로 알려져 있어, 앞으로 연구를 통하여 carotenoids의 생산이 증대된 균주를 개발하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부 · 해양수산부 · 농촌진흥청 · 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업지원, 전남대학교 UROP 프로그램, 그리고 극지연구소 과제(PE14070)지원

으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Ames BN. 1987. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **221**:1256-1264.

Britton G. 1995a. History: 175 years of carotenoid chemistry. In: Britton G, Pfander H, Liaaen-Jensen S (eds) Carotenoids. Brikhauser, Basel. **1a**:13-26.

Britton G. 1995b. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. **9**:1551-1558.

Cerutti PA. 1985 Prooxidant states and tumor production. *Science* **227**:375-381.

Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev*. **59**:527-605.

Chumpolkulwong N, Kakizono T, Nagai S and Nishio N. 1997. Increased astaxanthin production by Phaffia rhodozyma mutants isolated as resistant to diphenylamine. *J. Ferment. Bioeng*. **83**:429-434.

Cid VJ, Miguel S and Cesar N. 1994. Characterization of thermosensitive autolytic mutants from diploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**:559-568

Ernst H. 2002. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Appl. Chem*. **74**:8.

Fong NJC, Burgess ML, Barrow KD and Glenn DR. 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium Arthrobacter agilis in response to thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **56**:750-756.

Halliwell B and Gutteridge JMC, eds. 1989. Freeradicals in biology and medicine. Oxford, UK : Clarendon Press.

Han JS. 1997. Mutagenic activity and specificity of hydrogen peroxide in the ad-3 forward-mutation test in two-component heterokaryons of neurospora crassa. *Mutat Res*. **374**(2):169-184.

Kim EH, Cho KH, Lee YM, Yim JH, Lee HK, Cho JC and Hong SG. 2010. Diversity of Cold-Active Protease-Producing Bacteria from Arctic Terrestrial and) Marine Environments Revealed by Enrichment Culture. *J. Microbiol*. **48**(4):426-432.

Lee YK. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J. Appl. Phycol*. **13**:307-315.

Lu S and Li L. 2008. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J. Intergr. Plant Biol*. **50**(7):778-785.

Pfander H, Traber B and Lanz M. 1997. Carotenoid synthesis: A progress report. *Pure & Appl. Chem*. **69**(10):2047-2060.

Ruiz-Sola MÁ and Rodríguez-Concepción M. 2012. Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. Arabidopsis Book. **10**:e0158

Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, ed. Oxidative stress. London: Academic Press 1-8.

Sies H. 1986. Biochemistry of oxdative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **25**:1058-1071.

Sweet DM and Moseley BEB. 1976. The resistance of Micrococcus radiodurans to killing and mutation by agents which damage DNA. *Mutat. Res*. **34**:175-186.

Manuscript Received: September 3, 2014
Revised: September 25, 2014
Revision Accepted: September 26, 2014