P425

Metallothionein gene(pPMT)와 Manganese Transport Gene mntA (pZH3-5)를 포함한 재조합 *Escherichia coli*를 이용하여 수용액상에서의 Cadmium의 선택적 제거

김세권, 백승학, 김은기
인하대학교 공과대학 생물공학과 생물 환경소재 연구실
전화 (032)872-2978, FAX (032)875-0827

Abstract

Recombinant *E. coli* JM109(pZH3-5/pMT) harboring manganese transport gene(mntA) and metal sequestering protein, metallothionein(MT), was cultivated to accumulate cadmium in aqueous phase. Bioaccumulation followed Michaelis-Menten type kinetics. Equilibrium isotherm showed Langmuir type isotherm. The optimum pH for Cd^{2+} uptake was 7-7.5.

Introduction

Cadmium의 독성은 다른 중금속에 비하여 많이 알려져 있지만 독성이 미치는 기작에 대하여는 아직까지 명확하게 알려진 것이 없다.(1) 지금까지 많은 균주가 cadmium을 upake하는 것으로 알려져 왔고, 이 중 *E. coli*는 Zn^{2+} transport system을 이용하여 cell 내부로 accumulation 시키는 것으로 밝혀졌고, *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*와 같은 gram negative 균주 들은 manganese transport system을 이용하는 것으로 알려져 있다.(2) 이와 같이 유입된 금속들에 대하여 미생물이 대처하는 방법으로는 efflux 작용을 통하여 세포 밖으로 배출이 되던지, 아니면 금속과 결합하는 단백질을 이용하는 방법이 있다. 이 두 방법은 미생물이 주위 독성 환경에 대한 detoxification 과정으로 볼 수 있으며, 이 중 금속과 결합하는 단백질 중 가장 많이 알려진 것이 metallothionein(MT)이다.

Metallothionein(MT)은 분자량이 6000-7000Da의 저 분자량의 cysteine rich protein으로 zinc, copper, cadmium, mercury, silver등의 중금속과 특이적으로 결합을 하여 중금속의 독성에 대하여 detoxification 역할을 하는 것으로 알려져 있다. (3)

본 실험에서는 yeast로부터 얻은 metallothionein gene(pMT)과 manganese transport system을 발현시키는 gene(pZH3-5(mntA))을 삽입한 *E. coli*를 이용하여 수용액상에 존재하는 cadmium을 효과적으로 제거하고, 낮은 농도의 cadmium의 선택적 제거에 대하여 수행하였다.

Materials and Methods

Plasmids 와 Bacterial strain

본 실험에 사용한 plasmids는 metallothionein gene을 포함하는 pMT-GST-pGEX와 manganese transport gene을 포함하는 pZH3-5 두 가지를 사용하였고 host cell로는 *E. coli* JM109를 사용되었다.

세포 배양

pMNT와 pZH3-5 두 가지 plasmids를 포함하는 *E. coli* stock은 ampicillin (50 μg/mL)과 spectinomycin (30 μg/mL)이 포함된 Luria Broth (LB) 20mL에 접종을 한 후 37℃에서 250rpm으로 overnight culture를 한 후 균주를 다시 ampicillin과 spectinomycin이 포함된 LB 배지에 OD_{600} 값이 0.1이 되도록 접종을 해준 후 37℃에서 250rpm으로 배양하였다.

OD_{600}값이 0.5-0.7에 도달하였을 때 isopropyl β-D-thiogalactosidase (IPTG) 1.0mM을 첨가하였다. 이 후 4시간동안 gene을 induction 시킨 후 4℃에서 원심분리하여 세포를 회수하였다.

Batch System을 이용한 Cadmium의 Bioaccumulation Test.

Induction 된 세포는 원심분리를 이용하여 회수하였고, 10mM의 phosphate buffer(pH=7.0)를 이용하여 세척을 한후 다시 OD_{600} 값이 0.5가 되도록 resuspension 시켰다. Cadmium의 시간에 대한 흡착관계에 대하여 알아보기 위하여 44.48 μM의 Cd^{2+} solution을 buffer에 첨가하여 시간별 중금속의 축적량을 알아보았다.

그리고 Cadmium의 농도에 대한 accumulation 량의 변화에 대하여 알아보도록 하기 위하여 서로 다른 농도의 Cd^{2+}를 포함하고 있는 phosphate buffer solution을 이용하여 OD_{600}의 값을 1.0으로 resuspension 시킨 후 1시간 동안 37℃에서 교반 시켰다. 이 후 4℃에서 원심분리를 이용하여 세포를 회수하고 25 μg/mL의 ice-cold LB-chloramphenicol을 이용하여 세척하였다. 그리고 다시 원심분리를 이용하여 상등액은 제거하고 세포를 회수하였다.

Cadmium analysis

Cadmium bioaccumulation test를 거친 후 원심 분리하여 상등액은 분석이 가능한 Cd^{2+} 농도까지 희석한 후 바로 atomic absorption spectrophotometer (AA-Scan1(Thermo Jarrell Ash Corporation, U.S.A.)를 이용하여 cadmium 양을 측정 하였다. 그리고 세포내로 accumulation된 Cd^{2+}양을 측정하기 위하여 원심분리하여 얻어진 cell pellet을 chloramphenicol이 포함된 phosphate buffer 를 이용하여 washing 하고, lysis 시킨 후 잔기 및 파쇄된 cell을 제거하고 AAS를 이용하여 측정하였다. Cell lysis 방법은 먼저 회수된 pellet을 drying 시킨 후 무게를 측정하고, 이후 60% HNO_3를 이용하여 12시간 동안 45℃에서 lysis를 시키고, 측정가능한 Cd^{2+} 농도까지 증류수를 이용하여 희석한 후 solution 내의 Cd^{2+} 양을 AAS를 이용하여 분석하였다.

pH titration

Cd^{2+}의 제거 능력에서의 pH에 대한 영향을 알기 위해서 재조합된 biomass를 첨가하기 전에 pH의 범위를 3에서 9까지 조정하였다. pH의 조정은 0.1 M HNO_3와 0.1 M NaOH를 사용하였다. 초기 cadmium의 농도는 5 mg/L 였으며, 37℃에서 수행 하였다. (4)

Results

Cd^{2+} Bioaccumulation Kinetics

E. coli JM109와 pMT와 pZH3-5를 포함하는 JM109에 대하여 시간에 대한 Cd^{2+} uptake를 측정하기 위하여 Cd^{2+} 44.48 μM을 이용하여 bioaccumulation test를 수행하였다. Recombinant의 경우 약 20분 가량이 경과하였을 때 거의 maximum accumulation이 일어나는 것을 관찰할 수 있었지만, JM109의 경우 maximum은 관찰 할 수 없었다.

Batch System에서 Bioaccumulation Equilibrium

Recombinant *E. coli* JM109의 평형상태에서의 흡착 특성을 알아보기 위하여 다양한 농도의 cadmium이 포함되어 있는 phosphate buffer에 OD_{600}값이 1.0이 되도록 cell 농도를 맞춘 후 60분간 반응을 시켰다. 한가지 물질에 대한 흡착에 대하여 가장 널리 사용되고, linearize하기 쉬운 것이 Langmuir isotherm이며, linearized한 형태는 다음과 같다.

$$\frac{[Me]}{q} = \frac{K_d}{q_{max}} + \frac{[Me]}{q_{max}}$$

여기에서 $[Me]$는 평형 상태에서 supernatant의 cadmium 농도(μmol Cd^{2+}/ L)이고, q는 bioaccumulation된 Cd^{2+}의 농도(μmol Cd^{2+}/g dry cell weight), q_m은 maximum bioaccumulation capacity (μmol Cd^{2+}/g dry cell weight), 그리고 K_d는 dissociation constant(μmol Cd^{2+}/L)이다. fig.3 에서 보는 바와 같이 JM109를 이용한 Cd^{2+} bioaccumulation은 Langmuir equation을 잘 따르는 것으로 보인다. 여기에서 q_m는 1.855 (μmol Cd^{2+}/g dry cell weight)이고, K_d는 8.21 (μmol Cd^{2+}/L)이다.

Effect of pH on cadmium bioaccumulation

pH의 의 영향을 알아보기 위해서 pH의 농도의 범위를 3에서 9까지 변화 시켜면서, Cd^{2+}의 초기 농도를 44.48 μM로 고정한후 재조합 *E. coli*의 생육과 Cd^{2+}의 제거 능력을 측정하였다. Fig.4는 Cd^{2+}의 제거 능력과 pH간에 영향이 있음을 보여 주고 있다. 낮은 pH에서는 Cd^{2+}의 제거 능력이 감소하는 반면에 pH가 높을수록 Cd^{2+}의 제거 능력이 증가하고 있다. 하지만, pH 7.5이상이 되면, 알칼리 상태에서의 메탈 이온쌍 형성에 의하여 Cd^{2+}의 제거 능력이 감소하는 것을 볼수가 있다. 따라서 Cd^{2+}의 제거가 증가하는 시기는 각각의 pH가 3과 4 사이 그리고 6과 7.5사이이다. 또한 가장 최적의 Cd^{2+}의 제거 효율의 pH 범위는 7에서 7.5이다.

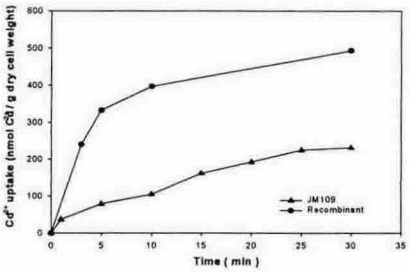

fig1. Cadmium bioaccumulation test of JM109 and recombinant JM109 which contains pZH3-5 and pMNT. (▲ : JM109, ●: Recombinant)

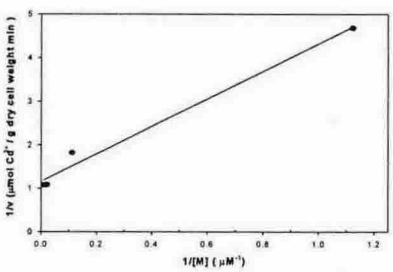

fig2. Double-reciprocal plot of initial Cd^{2+} uptake rate by induced JM109(pZH3-5/pMNT)

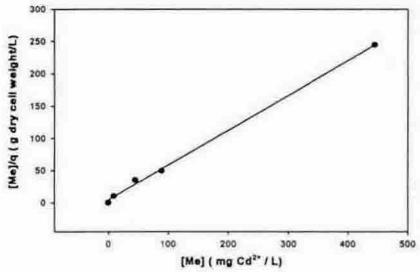

fig3. Linearized Langmuir isotherm plot for Cd^{2+} bioaccumulation by induced JM109 (pZH3-5/ pMT)

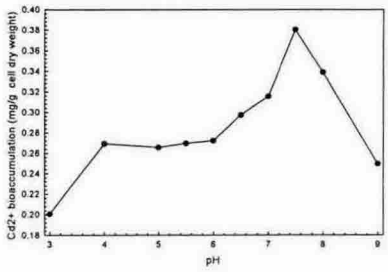

fig4. Cd^{2+} bioaccumulation by induced Recombinant *E. coli* cells which expressed an Mn^{2+} transport system and MT.

Conclusions

Recombinant *E. coli*를 이용하여 Cd^{2+} bioaccumulation test를 수행하였다. pMT와 pZH3-5 gene의 발현에 의하여 Cd^{2+}는 선택적으로 cell 내부로 accumulation 되고, 유입된 cadmium은 metallothionein의 작용으로 cell 내부에 존재하게 된다. Cadmium의 bioaccumulation의 최적 pH는 7-7.5 이며, initial uptake rate은 Michaelis-Menten kinetics를 따르며, 평형상태에서는 Langmuir isotherm을 따른다. 일반적으로 batch system에서는 비록 affinity가 좋은 균주라 하더라도 cell 외부와 중금속의 농도에 대한 평형이 존재하기 때문에 batch 상태에서는 중금속을 완전히 제거할 수 없다. 따라서 수용액상에서 중금속의 완전한 제거에 대한 실험을 수행하기 위하여 앞으로 pZH3-5와 pMT gene이 포함된 recombinant *E. coli* JM109를 대량 배양하여 반응기 운전을 실시하고 Cd^{2+}의 선택적인 제거 실험을 수행할 예정이다.

Reference

(1) Nies D. H. (1999). Microbial Heavy-Metal Resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:730-750.

(2) Zhiqi Hao, Heinz R. Reiske, and David B. Wilson. (1999). Characterization of Cadmium Uptake in *Lactobacillus plantarum* and Isolation of Cadmium and Manganese Uptake Mutants. 65(11):4741-4745.

(3) ShaoLin Chen, EunKi Kim, Michael L. Shuler, and David B. Wilson. (1998). Hg^{2+} Removel by Genetically Engineered *Escherichia coli* in a Hollow Fiber Bioreactor. Biotechnol. Prog. 14:667-671

(4) E. Salinas, M. Elorza de Orellano, I. Rezza, L. Martinez, E. Marchesvky, M. Sanz de Tosetti.(2000). Removal of Cadmium and Lead from Dilute Aqueous Solutions by *Rhodotorula rubra*. Bioresource Technology 72:107-112