

제조합 *Escherichia coli*를 이용한 수용액상에서의 Cadmium의 선택적 제거

김세권, 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. IPTG induction cell showed fast Cd^{2+} uptake and had higher uptake rate than wild type and no-induced cell. The optimum pH and temperature for Cd^{2+} uptake was 7 and 37°C, respectively. Manganese (0.01M) inhibited the Cd^{2+} accumulation. However, Cu^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} did not affect the Cd^{2+} bioaccumulation.

Introduction

Cadmium은 자연계에 토양, 대기 및 물 속에 다양한 형태로 존재하며, 주로 광산폐수나 금속처리, 도금, 제련공장 및 화학공장 폐수로부터 많이 발생된다.(1) 따라서 지금까지 수중에 존재하는 cadmium을 제거하기 위하여 많은 연구가 진행되어 왔고, ion exchange resin을 이용한 방법이나, precipitation, adsorption, 전기분해, 중화법, 추출 등 주로 물리 화학적 방법을 이용하여 오고 있다. 하지만 이러한 방법들은 에너지소비가 많고, 처리 효율이 떨어지며, 부산물로 다량의 sludge가 발생하여 2차 적인 처리 공정이 필요하다.(2) 또한 기존의 방법을 통해 1차 처리된 후 잔류하는 극미량의 중금속의 경우는 처리할 수 없다는 단점이 있다. (3) 하지만 중금속의 경우 극미량이라고 하더라도 먹이 사슬을 통하여 축적되게 되면 최종적으로 인간에게 심각한 영향을 줄 수 있기 때문에 미량이라 하더라도 제거해야할 필요가 있다. 이러한 이유로 이와 같은 문제를 해결하고자 미생물을 이용하여 수중의 독성 중금속을 제거하려는 연구가 많이 진행되어 오고 있고, 이 중 수중에 존재하는 중금속의 흡착(adsorption) 또는 축적(accumulation)의 방법에 대한 관심이 점차 커지고 있다. (4)(5)(6)

Metallothionein은 6000-7000 Da의 저 분자량을 가진 금속 binding protein으로 동물, 식물뿐만 아니라 진핵세포 및 몇몇의 원핵 세포에도 다양하게 존재한다. 이 단백질은 세포 내에서 Zn^{2+} 과 Cu^{2+} 등의 필수적인 중금속의 농도의 항상성을 유지하게 하는 역할과 Cd^{2+} 와 같이 독성이 있는 중금속의 detoxification의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(7)

지금까지 수용액상에 존재하는 독성중금속의 제거를 위하여 metal transport system을 단독으로 이용하거나, metallothionein을 이용한 보고가 많이 되어있다. 하지만 이 두 가지 방법을 모두 포함한 recombinant를 이용한 예는 드문 편이다.(7) 따라서 본 실험에서는 yeast로부터 얻은 metallothionein gene(pMT)과 manganese transport system을 발현시키는 gene(pZH3-5(mntA))을 삽입한 *E. coli*를 이용하여 수용액상에 중금속 축적 특성 및 극미량의 cadmium의 선택적 제거에 대한실험을 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 ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$)과 spectinomycin ($30 \mu\text{g}/\text{mL}$)이 포함된 Luria broth (LB) 20mL에 접종을 한 후 37°C 에서 250rpm으로 overnight culture를 한 후 균주를 다시 ampicillin과 spectinomycin이 포함된 LB 배지에 OD_{600} 값이 0.1이 되도록 접종을 해준 후 37°C 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°C 에서 원심 분리하여 세포를 회수하였다.

Batch System을 이용한 Cadmium의 Bioaccumulation Test.

Induction 된 세포는 원심분리를 이용하여 회수하였고, 10mM의 phosphate buffer(pH=7.0)를 이용하여 세척을 한 후 다시 OD_{600} 값이 0.5가 되도록 resuspension 시켰다. Cadmium의 시간에 대한 흡착관계에 대하여 알아보기 위하여 $44.48 \mu\text{M}$ 의 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°C 에서 교반 시켰다. 이 후 4°C 에서 원심 분리를 이용하여 세포를 회수하고 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ice-cold LB-chloramphenicol을 이용하여 세척하였다. 그리고 다시 원심분리를 이용하여 상등 액은 제거하고 세포를 회수하였다.

Cadmium analysis

Cadmium bioaccumulation test를 거친 후 원심 분리하여 상등 액은 분석이 가능한 Cd^{2+} 농도까지 희석한 후 바로 AAS(AA-Scan1(Thermo Jarrell Ash Corporation, U.S.A.))를 이용하여 cadmium 양을 측정하였다. 그리고 세포 내로 accumulation된 Cd^{2+} 양을 측정하기 위하여 원심 분리하여 얻어진 cell pellet을 chloramphenicol이 포함된 phosphate buffer를 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_3 을 이용하여 12시간 동안 45°C 에서 lysis를 시키고, 측정 가능한 Cd^{2+} 농도까지 증류수를 이용하여 희석한 후 solution 내의 Cd^{2+} 양을 AAS를 이용하여 분석하였다.

Results and Discussions

Kinetics of cadmium bioaccumulation

Genetically modified *E. coli*를 이용한 Cd^{2+} bioaccumulation의 초기 accumulation rate를 알아보기 위하여 다양한 농도의 Cd^{2+} 가 포함된 cell-phosphate buffer solution에서 5분간 uptake test를 수행하였다. Fig.1에서 보면 재조합된 *E. coli*의 metal uptake는 Michaelis-Menten kinetics를 따르는 것으로 보인다. 이 식에서 $S(\mu\text{M})$ 는 초기 Cd^{2+} 의 농도이고, $K_m(\mu\text{M})$ 은 Michaelis constant이며 $V_m(\mu\text{mol Cd}^{2+} / (\text{min} \cdot \text{g dry cell weight}))$ 은 maximum accumulation 속도이다. 본 실험에서 Cd^{2+} uptake의 V_m 값은 $2.26 \mu\text{mol Cd}^{2+} / (\text{min} \cdot \text{g dry cell weight})$ 이고, K_m 값은 $0.667 \mu\text{M}$ 이다.

Cadmium bioaccumulation isotherm

미생물에 의한 중금속의 흡착은 비선형모델로 설명할 수 있다. Fig.2는 recombinant *E. coli*를 이용하여 Cd^{2+} uptake에 대한 Langmuir isotherm을 나타낸 것으로 affinity를 나타내는 상

수 b 값은 0.1742 (μM) 이며, q max 값은 22.37 ($\mu\text{mol/g dry cell weight}$) 이다.

Effect of pH and Temperature

Living cell의 active transport를 이용한 metal uptake는 cell의 activity에 영향을 받을 것이다. 온도가 bioaccumulation capacity에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4-37°C의 범위에서 시간에 대한 cadmium uptake test를 수행하였다. Fig.3에서 보면 37°C에서 18°C로 감소하였을 때 cadmium uptake 능력이 약 47% 정도 감소하는 것을 볼 수 있었고, 18°C 이하에서는 37°C에 비하여 약 12% 그리고 4°C에서는 6%로 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있었다.

그리고 pH가 미치는 영향에 대하여 보았을 때 pH 3에서 4로 증가할 때 소량 증가하는 것을 보이지만 pH 4부터 6.6사이에서는 거의 유사한 값의 accumulation을 보여주며, pH 7에서 급격하게 증가하고, 그 이상의 염기조건에서는 pH 9까지 감소하는 것을 볼 수 있었다.(Fig.4)

The Expression of MT and Manganese transport genes

Recombinant *E. coli*에 삽입된 metallothionein gene(pMT)과 manganese transport system을 발현시키는 gene(pZH3-5(mntA))의 발현여부를 알아보기 위하여 IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) induction cell과 induction 하지 않은 cell 그리고 wild type *E. coli* JM109에 대하여 시간에 대한 Cd^{2+} uptake test를 수행하였다. IPTG를 이용하여 gene을 induction cell과 비교하였을 때 induction 하지 않은 cell의 경우는 Cd^{2+} uptake량이 82% 감소하였고, wild type의 경우는 약 induction 한 경우의 15% 밖에 uptake를 못하는 것을 관찰하였다.

Cadmium selectivity

낮은 농도의 cadmium에서는 Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 모두 uptake가 되는 것을 관찰하였다.(Fig.5) 하지만 cadmium의 농도가 증가할 수록 점차 감소하는 것을 관찰하였고, 3mg/L에서는 다른 중금속이 포함되지 않은 경우와 비교하였을 때 98% 정도의 uptake 양을 보였다. 따라서 다른 중금속이 존재하는 경우라 하더라도, Cd^{2+} uptake가 크게 영향을 받지 않는다. 하지만 Cd^{2+} uptake가 Mn^{2+} transport system을 이용하여 uptake 하기 때문에 Mn^{2+} 에 대하여 Cd^{2+} uptake가 영향을 받는다. (Fig.6)

References

- (1) Nies D. H. (1999). Microbial Heavy-Metal Resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:730-750.
- (2) Ju-Sik Cho, Y.-S. L., Jong-Soo Heo (1997). Cadmium Accumulation in the Cell of Cadmium-Tolerant Bacteria, *Pseudomonas putida*, and Recovery of Cadmium from the Cells Accumulating Cadmium. J. KSWQ 13(1): 101-109.
- (3) Stillman, M. J. (1995). Metallothioneins. Coordination Chemistry Reviews 144: 461-511.
- (4) Hong, J.-S. C. a. J. (1994). Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64). Biotechnology and Bioengineering 44: 999-1006.
- (5) B. Volesky, H. M., and Z.R. Holan (1993). Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and bioengineering 41: 826-829.
- (6) D. Brady, J. R. D. (1994). Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(149-154).
- (7) ShaoLin Chen, EunKi Kim, Michael L. Shuler, and David B. Wilson. (1998). Hg^{2+} Removal by Genetically Engineered *Escherichia coli* in a Hollow Fiber Bioreactor. Biotechnol. Prog. 14:667-671

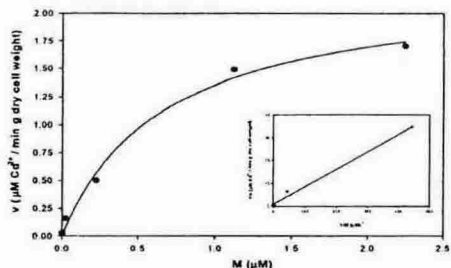


Fig1. Initial Cd^{2+} uptake rate by induced JM109 (pZH3-5/pMNT) And Double-reciprocal plot for initial uptake rate (Small box).

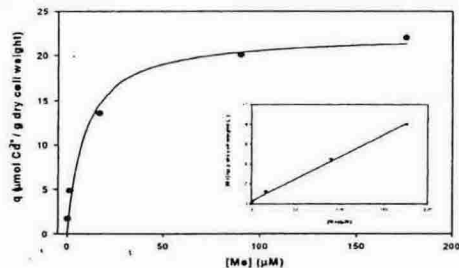


Fig2. Langmuir isotherm plot for Cd^{2+} bioaccumulation by induced JM109 (pZH3-5/pMT).

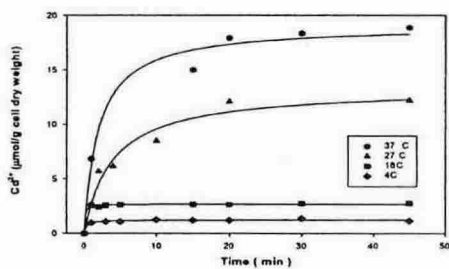


Fig.3 Temperature effect on Cd^{2+} bioaccumulation by induced Recombinant *E.coli* cells which expressed an Mn^{2+} transport system and MT.

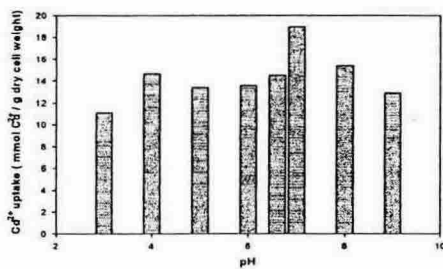


Fig.4 pH effect on Cd^{2+} bioaccumulation by induced Recombinant *E.coli* cells which expressed an Mn^{2+} transport system and MT.

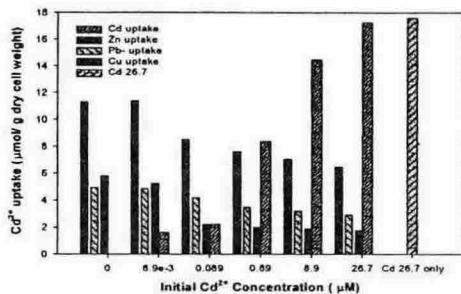


Fig.5 Cadmium selectivity test for genetically modified *E. coli* JM109. Several concentrations of Cd^{2+} were added to 3mg/L of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} .

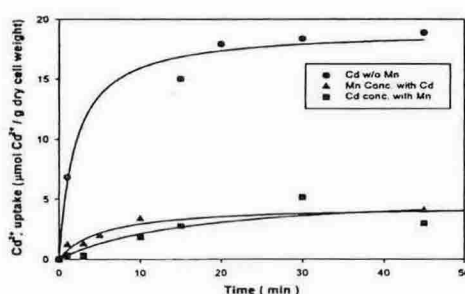


Fig.6 Effect of Mn^{2+} on Cd^{2+} uptake by induced JM109 (pZH3-5/pMT).