

Metallothionein 유전자가 도입된 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 생육과 카드뮴 제거

김 대 옥 · 박 성 식 · †서 진 호
서울대학교 식품공학과, 농업생물신소재연구센터

Growth and Cadmium Removal in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Harboring A Metallothionein Gene

Dae-Ok Kim, Sung-Sik Park, and Jin-Ho Seo[†]

Department of Food Science & Technology and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT

Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* BZ-pJ containing the gene coding for metallothionein, a metal-binding protein was grown in the medium with high cadmium concentrations to study the characteristics of growth and cadmium uptake. High concentrations of cadmium reduced cell growth and final cell density and increased the lag phase periods of the recombinant yeast. Addition of 10 mg Cu²⁺/L to the growth medium remarkably decreased a lag period and enhanced the specific cadmium uptake to 52.6 mg Cd²⁺/g dry cell. The effect of copper addition was further investigated in the medium of 680 mg Cd²⁺/L. An increase in copper concentration from 11.0 to 33.3 mg/L enhanced the specific cadmium uptake from 17.0 to 42.0 mg Cd²⁺/g dry cell.

서 론

산업 활동 결과로 인해 공장 폐수로부터 환경으로 유출되는 다양한 금속들에 의한 중금속 오염문제는 날로 심각해지고 있다. 중금속은 생물학적인 측면에서 이중적 역할을 한다. 우선, 낮은 농도의 구리와 아연은 산화, 전자 전달, 여러 효소 반응에 관여하기 때문에 모든 생물체에 필수적인 영양원이다. 하지만 카드뮴, 수은, 구리, 아연 등이 고농도로 존재할 때 세포 성장에 강력한 억제제로서 작용한다(1). 특히 카드뮴은 진핵 세포 생물에 매우 독성이 강하고 생

물학적 기능도 알려진 바가 없기 때문에 미생물의 생육과 성장을 위해 sequestration 혹은 제거를 통해 카드뮴을 무독화(무해화)하는 것이 필수적이고 미생물이 비정상적인 외부 환경의 자극에 순응하는 경향이 있다. 카드뮴은 지구상에 두루 편재하고 있으며, 사용이 급속히 증가하고 있기 때문에 궁극적으로 먹이사슬을 통해 축적되면 환경, 동물 그리고 인간에게 잠재적으로 매우 해로운 영향을 끼친다. 카드뮴의 주요 배출원은 합금 제작, 전자공업, 전기도금, 플라스틱 제조, 무기안료, 날염, 전지 제작, 광산 유출수 등이다(2).

생물흡착(biosorption)으로 알려진 미생물 균체의 물리·화학적 반응에 의한 용존 금속의 흡착(sorp-

† Corresponding Author

tion)과 complexation은 금속 제거와 회수를 위한 청정기술이다(3). 미생물은 용액상에 존재하는 중금속을 축적하여 제거할 수 있는 능력이 있다. 일반적으로 미생물에 의한 금속 축적은 크게 두 가지 경로로 나뉠 수 있다(4, 5). 첫째는 phosphate, carboxyl, amine, hydroxyl, sulfhydryl group, chitin, chitosan 등과 같은 세포벽을 구성하는 음이온 리간드들이 양이온의 중금속에 결합하는 방법으로 미생물 세포막이 효과적인 양이온 교환수지의 역할을 수행하는 표면 흡착(metabolism-independent surface binding)이다. 세포에 의한 수동적인 표면 흡착은 adsorption, complexation, coordination, metal chelation, ion exchange, inorganic microprecipitation 등과 같은 여러 메커니즘에 의해 일어난다(6). 우라늄, 토륨, 납 등과 같은 원소에 있어서 금속 축적은 단지 표면 흡착으로만 이루어진다. 둘째는 표면 흡착보다 속도는 느리나 더 많은 양의 중금속을 축적할 수 있는 방법으로 대사 과정시 ion transport system, 효소, 에너지 소비 등과 같은 특수화된 세포 기능이 개입하여 세포막을 거쳐 세포내로 중금속이 유입(metabolism-dependent intracellular uptake)되는 것이다.

효모와 곰팡이에서는 Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} 등의 세포내 유입이 알려져 있고 정확한 기작은 알려지지 않았으나 2가 금속의 유입에는 막전위가 구동력 역할을 하는 것으로 여겨진다(7). *Aureobasidium pullulans*에서는 한 분자의 Cd^{2+} 유입과 동시에 2개의 K^+ 가 방출되어 적절한 이온 평형을 유지하고(8), *Saccharomyces cerevisiae*는 배지에 Cd^{2+} 를 첨가한 후 처음 5분 동안에 1개의 Cd^{2+} 유입에 의해 22개의 K^+ 가 방출되고 Ca^{2+} 가 Cd^{2+} 에 의해 유도되는 K^+ 의 방출을 격감시키고 세포의 카드뮴 흡착을 감소시켜 효모 성장에 대한 카드뮴의 독성 효과를 완화시킨다(9). *S. cerevisiae*에서 카드뮴은 대사 작용에 의해 세포 내부로 들어간 후 불용성 cadmium phosphate deposits 형태로 액포 안에 축적되고 카드뮴 용액에 노출된 시간이 길어질수록 deposits이 점차 커진다(10). 반면에 액포가 없을 경우 cytoplasmic granule 또는 전자 밀집체 형태이거나 metallothionein 단백질과 결합하여 존재하게 된다.

Cd^{2+} 은 Gram 음성균인 *Escherichia coli* K-12에서 Zn^{2+} transport system을 매개로 하여 세포로 들어간다(11). 반면에 Gram 양성 구균인 *Staphylococcus aureus*에서 Cd^{2+} 은 Mn^{2+} transport system

을 매개로하여 세포내로 들어간다(12, 13). *E. coli*의 경우 대부분의 Cd^{2+} 의 축적은 cell envelope이 관여하거나 세포질 내에서 일어나고 세포질 내의 Cd^{2+} 는 포유류의 metallothionein과 유사한 카드뮴 결합 단백질에 결합되어 존재한다(14, 15).

*S. cerevisiae*에서 금속 결합 단백질인 metallothionein 단백질은 Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 등과 결합하여 금속 저장·제독, metalloenzyme의 활성, free radical 독성으로부터 보호, 세포 대사의 조절, 세포내 금속이온농도의 조절 등의 중요한 역할을 수행한다(16, 17). 포유류 metallothionein 유전자는 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^+ , Zn^{2+} 등의 중금속 이온들에 의해 유도되는데 반해 효모 metallothionein 유전자의 전사는 Cu^{2+} 에 의해서만 유도된다(1, 18, 19). 효모의 metallothionein 단백질은 53개의 아미노산으로 구성되어 있으며 12개의 cysteine에 8개의 Cu^+ 가 결합되어 존재 한다(20). Lys-Lys-Ser-Cys-Cys-Ser의 6개 펩타이드를 제외하고는 효모 metallothionein과 포유류 metallothionein의 단백질 1차 구조 또는 cysteine 위치가 명확하게 보존되어 있지 않다. 이 효모 단백질은 또한 *in vitro*에서 4개의 Cd^{2+} 또는 Zn^{2+} 그리고 8개 Ag^+ 와 결합할 수 있다.

본 논문에서는 고농도 카드뮴 배지에서 metallothionein 단백질 유전자를 가진 plasmid pJW9로 형질전환된 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 생육 특성과 카드뮴 제거 및 구리 첨가에 의한 카드뮴 제거 효율에 대하여 살펴 보았다.

재료 및 방법

균주

형질전환에 사용한 숙주효모는 반수체인 *S. cerevisiae* BZ31-1-7Ba (*trp1-289*, *ura3-52*, *ade8-18*, *arg4-16*, *cup1^S*)로서 표현형은 구리에 저항성이 없으며 (0.3 mM $CuSO_4$ 를 첨가한 합성배지에서 생육이 저해), tryptophan, adenine, arginine, uracil 등을 생합성할 수 없는 영양 요구성 균주이다. 숙주효모에 *CUP1* 유전자를 함유한 plasmid pJW9로 형질전환된 재조합 효모를 *S. cerevisiae* BZ-pJ로 명명하고 표현형으로는 구리에 내성을 갖으며 (0.3 mM $CuSO_4$ 를 첨가한 합성배지에서 생육이 가능), adenine과 arginine 요구성 균주이다 숙주효모의 염색체에 plasmid pJW9가 삽입된 균주를 *S. cerevisiae* YJW9라 명명하고 표현형은 *S. cerevisiae* BZ-pJ와

동일하다(21). 사용한 숙주효모와 plasmid pJW9 그리고 염색체에 *CUP1* 유전자가 삽입된 *S. cerevisiae* YJW9는 미국의 Welch 박사(University of California, Berkeley)로부터 기증받은 것이다.

배지 및 중금속

재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 배양에 사용된 배지는 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L 포도당의 조성을 갖는 YEPD 배지를 사용하였다. YEPD 배지에 여러 농도의 금속염을 첨가하여 사용하였고 금속과 chelation 작용이 약하여 금속을 함유한 배지에서 완충용액으로 주로 사용되는 MES[2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid]로 초기 pH를 5.2로 맞추어 pH 상승에 의한 금속의 침전을 방지하였다. 배지중에 사용된 중금속염은 $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 와 $CuSO_4$ 이었으며 각각을 1 M stock solution을 제조하여 사용하였다. 금속의 질산염을 사용한 이유는 용액에서 금속이 이온쌍(ion pair)을 만드는 경향이 적기 때문이다. 10 mM $Ca(NO_3)_2$ 용액을 stock solution 제조시에 사용하였는데 이는 이온강도 완충용액으로 작용한다. 실험에 사용된 모든 초자기구는 외부 오염원에 의한 간섭을 막기 위해서 사용 전 2.0 N HNO_3 용액에 15시간 담궈다가 증류수(distilled water)로 3회 그리고 탈이온수(deionized water)로 2회 세척한 후에 사용하였다.

균체 배양

포도당은 아미노산과 고온에서 Maillard 반응을 일으켜 미생물의 성장을 저해하고, 살균시 MES의 일부를 분해시키는 작용을 하며, 많은 금속들도 고온에서 반응성이 증가하므로 각각 다른 배지 성분과 분리하여 살균하였다. 플라스크 배양은 500 mL baffled flask에 150 mL의 배양액을 만들어 초기 pH 5.2, 온도 30°C, 교반속도 200 rpm의 조건하에서 진탕배양기(HK-SI25C, 한국중합기기제작소)를 이용하여 균체 배양 실험을 하였다.

분석

미생물의 균체농도는 배양액을 주기적으로 채취한 후 회석하여 분광광도계(Hitachi U1100, Japan)로 600 nm에서 측정하였다. 배양액을 원심분리기에서 $4500 \times g$ 로 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 포도당 및 중금속 농도 분석에 사용하였다. 포도당 농도는 glucose oxidase와 peroxidase를 이용한 Glucose Kit No. 510-A(Sigma Chemical Co., USA)

를 사용하여 측정하였다. 배지중의 유기물 성분이 금속원자의 원자화를 저해하는 것을 방지하기 위하여 원심분리한 상층액에 6.7 N 질산을 첨가한 후 98°C oven에서 5시간 동안 유기물을 분해·증발시키는 과정을 두번 반복 수행하여 최대한 유기물을 분해한 후 6.0 N 염산으로 잔류물을 다시 녹인 후 atomic absorption spectrophotometer (Pye Unicam SP9 Series)를 이용하여 카드뮴 농도 및 구리 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

카드뮴 농도의 영향

Plasmid pJW9를 가진 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ를 여러 농도의 카드뮴 함유 배지에서 생육과 배지중 카드뮴 제거에 대한 실험을 수행하였다. 재조합 효모가 카드뮴이 없는 대조구에서 대수증식기의 비성장속도가 6.05 day^{-1} 인데 반해 카드뮴이 첨가될 경우는 $0.38 \sim 0.50 \text{ day}^{-1}$ 로 상당히 낮아졌다. 이는 카드뮴이 재조합 효모의 성장에 대한 강력한 저해제로 작용한다는 것을 알 수 있다. 카드뮴 농도가 높아짐에 따라 재조합 효모의 비성장속도도 비례적으로 감소하였다(Table 1). 또한 배지중 초기 카드뮴 농도가 220, 350, 450, 630 mg/L로 점점 높아짐에 따라 각각의 경우에 재조합 효모의 lag phase는 4.75, 6, 7, 9일로 점차 늘어났다. 이처럼 카드뮴 농도 증가에 의한 lag phase가 길어지는 현상은 *Zoogloea ramigera*를 카드뮴이 첨가된 배지에서 배양시에도 관찰되었다. 성장속도가 감소하는 것은 배지에 첨가된 카드뮴이 *Z. ramigera*의 대사를 변화시켜 배지중 환경의 변화에 반응하는 현상이라고 보고하였다(22).

재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 카드뮴 독성에 대한 적응은 카드뮴 농도에 따라 4 내지 9일 정도에 걸쳐 지속되는 장기간의 lag phase를 필요로 한다. 카드뮴 첨가로 인한 독성때문에 재조합 효모의 성장은 전반적으로 감소하였으나 흥미로운 사실은 lag phase에서 초기 균체 접종량의 생세포(living cells) 수는 점차적으로 감소하면서 장시간 동안 카드뮴 함유 배지에 재조합 효모의 적응 과정 이후에 세포 성장이 이루어졌다는 것이다. 이는 yeast extract와 peptone과 같은 배지 성분에 함유된 구리에 의해서 metallothionein 단백질이 발현되었지만 장시간 소요되었다는 것을 알 수 있었다.

카드뮴의 흡착은 주로 재조합 효모의 대사가 왕성

Table 1. Growth and cadmium uptake of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in YEPD medium with various concentrations of Cd(NO₃)₂·4H₂O

Initial Cadmium Concentration(mg/L)	0	220	350	450	630
Dry Cell Weight(g/L)	11.02	7.51	6.40	4.09	3.60
Specific Cadmium Uptake (mg Cd ²⁺ /g dry cells)	N.A	17.2	23.8	20.0	24.7
Removal Efficiency ^a (%)	N.A	58.6	43.0	18.2	14.0
Specific Growth Rate ^b (day ⁻¹)	6.05	0.49	0.50	0.45	0.38

N.A : not available

a) Removal Efficiency(%) = $\frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$

C_i is an initial concentration of cadmium in the medium
C_f is a final concentration of cadmium in the medium

b) specific growth rate determined at the exponential phase

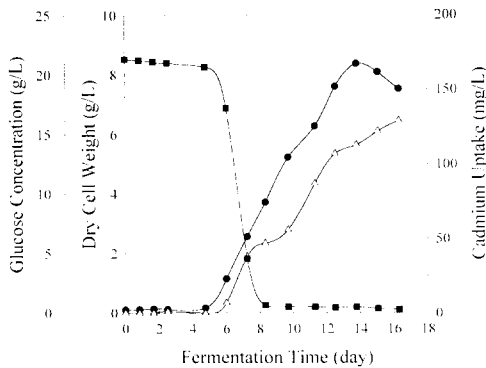


Fig. 1. Profiles of cell growth and cadmium uptake of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in 220 mg/L cadmium-containing medium (●:dry cell weight, △:cadmium uptake, ■:glucose concentration).

한 대수증식기에서 활발히 이루어졌다(Fig. 1). 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ를 8mM CuSO₄ 함유 배지에서 배양시 구리 흡착이 주로 대수증식기에서 이루어진 경향과 비슷하다(23). 또한 대사적으로 매우 왕성한 *Citrobacter* sp.가 대수증식기 중반부에서 카드뮴 축적이 급격히 이루어지며 이때 phosphatase가

Table 2. Effect of copper supplementation on growth and cadmium uptake of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in YEPD medium with various concentrations of Cd(NO₃)₂·4H₂O

Initial Cadmium Concentration(mg/L)	220	350	450	630
Dry Cell Weight(g/L)	6.49	5.30	3.48	3.69
Specific Cadmium Uptake (mg Cd ²⁺ /g dry cells)	15.9	35.1	35.3	52.6
Removal Efficiency(%)	46.8	51.1	26.9	30.8
Specific Growth Rate ^b (day ⁻¹)	0.59	0.48	0.38	0.41

카드뮴의 결합과 착물 형성에 중요한 역할을 한다고 보고하였다(24). 이러한 경향의 중금속 축적(bioaccumulation)은 재조합 효모가 세포벽에 의한 단순한 표면 흡착(biosorption)보다는 주로 포도당 대사를 통한 증식과 더불어 세포 대사에 의해 이루어지는 것으로 사료된다.

Table 1에서 알 수 있듯이 카드뮴 농도가 높아짐에 따라 재조합 효모의 건조균체농도는 점차적으로 감소하였으며 제거 효율(removal efficiency) 역시 감소하였다. 특히 제거 효율은 카드뮴 농도가 고농도로 갈수록 카드뮴에 의한 열악한 환경이 재조합 효모 생육을 억제함으로써 카드뮴의 제거가 제대로 이루어지지 않은 것으로 여겨진다.

구리 농도의 영향

배지에 카드뮴과 함께 10 mg/L 구리를 첨가하여 metallothionein 유전자를 multicopy로 함유하고 있는 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 metallothionein 단백질의 발현을 꾀하며 카드뮴 흡착에 관한 실험을 수행하였다. 10 mg/L 구리가 첨가됨으로써 첨가되지 않은 실험구에 비해서 lag phase가 2일에서 4일 정도 짧아졌다. 10 mg/L 구리가 첨가된 경우 specific cadmium uptake는 구리가 첨가되지 않은 실험구에 비하여 전반적인 향상을 보여 카드뮴 농도가 350, 450, 630 mg/L인 경우 각각 1.5배, 1.8배, 2.1배의 증가를 가져왔다. 특히 재조합 효모가 카드뮴 630 mg/L 함유 배지에서 생육했을 때 균체 g당 카드뮴 흡착량이 52.6 mg Cd²⁺/g dry cells이라는 고무적인 수치를 나타내었다(Table 2). 이 수치를 *Penicillium chrysogenum*의 11 mg Cd²⁺/g dry

Table 3. Effect of various concentrations of copper on growth and cadmium uptake of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in 680 mg/L cadmium-containing medium

Initial Copper Concentration(mg/L)	11.0	20.1	33.3
Dry Cell Weight(g/L)	4.80	5.05	5.84
Specific Cadmium Uptake (mg Cd ²⁺ /g dry cells)	17.0	23.2	42.0
Specific Metals Uptake (mg Cd ²⁺ +Cu ²⁺ /g dry cells)	17.0	23.2	42.0
Removal Efficiency(%)	12.4	19.3	37.6
Cadmium Uptake Rate (mg Cd ²⁺ /L·day)	5.22	7.34	8.33

biomass(25), 10 mM 카드뮴 용액에서 흡착실험한 *S. cerevisiae* S6/1의 6.0 mg Cd²⁺/g dry cell(26), packed-bed column에서 고정화 *S. cerevisiae* slurry의 약 4.2 mg Cd²⁺/g(27), 500 mg/L의 카드뮴 배지에서 배양한 *Hansenula anomala* B-7의 34.2 mg Cd²⁺/g dried cells(28), 1 mM 카드뮴 배지에서 7일간 액침 배양한 *Pleurotus ostreatus* Tohoku H67의 약 33 mg Cd²⁺/g cells(29) 등의 경우와 비교해 보면 metallothionein 유전자를 가진 재조합 효모는 카드뮴 흡착 능력이 다른 미생물에 비하여 아주 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

카드뮴 농도가 220 mg/L와 350 mg/L인 경우에는 재조합 효모는 대수증식기에서 카드뮴 제거가 지속적으로 이루어졌으며 재조합 효모의 카드뮴 흡착은 거의 1차적으로 증가하는 등온흡착곡선을 형성하였다. 반면에 카드뮴 농도가 460 mg/L과 630 mg/L인 경우에는 발효 후반기에서 급속히 카드뮴 제거가 이루어졌다. 제거 효율에서도 구리가 첨가되지 않은 경우와 비교해서 전반적인 향상을 이루었다. 구리가 첨가되었을 경우 재조합 효모의 건조균체농도와 비성장속도는 구리가 무첨가된 배지에서와 비교하면 별 차이가 없었다.

카드뮴의 초기 농도를 680 mg/L로 고정된 후 구리의 농도를 11 mg/L에서 33 mg/L까지 변화시켜 가며 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 생육과 배지중 중금속 흡착 능력을 측정하였다. 카드뮴의 흡착은 대수증식기에서 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 생육과 더불어 이루어지기 시작했다. 구리 농도가 증가됨에 따라 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 건조균체 농도는 점차 증가되는 경향을 보였으며 lag phase

의 차이를 제외하고는 성장형태는 별다른 차이가 없었다(Table 3). 배지중 구리 농도가 11 mg/L에서 33 mg/L로 상승했을 때 재조합 효모의 lag phase는 6일 정도 줄어들었는데 이와 같은 lag phase의 감소는 카드뮴 배지에 구리가 10 mg/L 첨가될 때에 lag phase가 감소되는 경우와 비슷한 현상을 나타내었으며, 특히 발효 후반기에 배지중 구리 농도가 증가하는 것은 이 기간에 상당량의 카드뮴이 집중적으로 재조합 효모에 흡착되면서 흡착 부위에 대해 경쟁적 관계에 있던 구리를 탈착시키는 것으로 생각된다(Fig. 2, 3). 구리 농도가 2배, 3배 증가됨에 따라 균체 g당 카드뮴 흡착량은 각각 1.4배, 2.5배 증가하였고 배지중 카드뮴 회수 효율 역시 각각 1.6배, 3.0배의 증가를 보였다. 또한 대수증식기에서 재조합 효모의 카드뮴 흡착 속도도 배지 중에 첨가된 구리 농도가 11, 20, 33 mg/L로 상승함에 따라 각각 5.22, 7.34, 8.33 mg Cd²⁺/L·day로 증가하는 추세를 보였다. 이러한 결과는 Table 2에 나타난 결과와 다소 차이를 보이는 것은 카드뮴 농도가 달라짐에 따라 재조합 효모의 생리적 활성이 달라졌기 때문일 것으로 여겨진다.

결론적으로 고농도의 카드뮴 함유 배지에 구리를 첨가함으로써 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 생육이 빨라지고 구리 농도가 증가됨에 따라 lag phase가 상당 기간 감소하게 되어 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 생육과 배지중 카드뮴 흡착과 흡착속도에서 훨씬 효과적이었다. 이러한 전반적인 상승효과는 배지중 구리 농도가 증가하여 세포질로 도입된 구리량이 높아져 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 autoregulation에 의해 효모 metallothionein의 높은 발현이 유도되고 이 단백질이 세포 내로 유입된 카드뮴의 흡착에 관여함으로써 카드뮴의 독성에 대한 제독(detoxification) 작용이 일어나 구리 농도 33 mg/L에서 건조균체농도 5.84 g dry cell/L, 균체 g당 카드뮴 흡착량 42.0 mg Cd²⁺/g dry cell, 37.6 %의 제거 효율을 기록하였다. Lerch(17)는 *Neurospora crassa*에서 구리흡착량은 합성된 구리 결합 단백질량과 비례하고 세포 내로 흡수된 전체 구리중 40% 이상이 합성된 metallothionein과 결합하여 존재한다고 보고하였다.

카드뮴 배지에서 전배양의 영향

100 mg/L의 카드뮴 함유 배지에서 전배양한 재조합 효모를 10 mg/L의 구리가 첨가된 카드뮴을

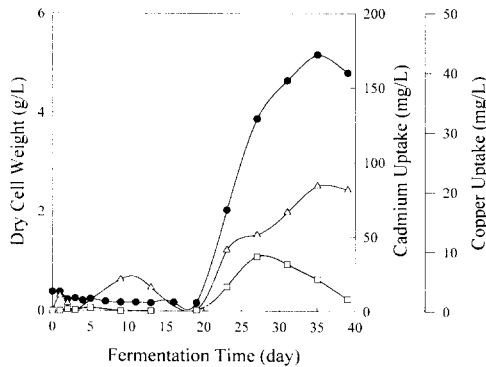


Fig. 2. Profiles of cell growth and cadmium uptake of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in 680 mg/L cadmium-containing medium supplemented with 10 mg/L copper (●:dry cell weight, △:cadmium uptake, □:copper uptake).

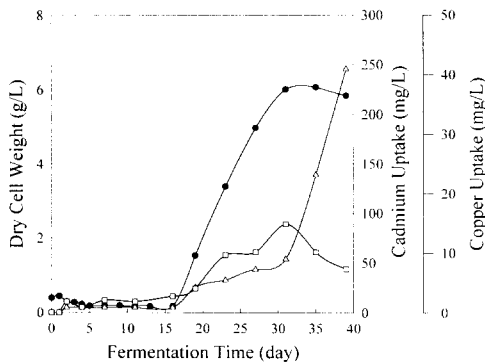


Fig. 3. Profiles of cell growth and cadmium uptake of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in 680 mg/L cadmium-containing medium supplemented with 30 mg/L copper (●:dry cell weight, △:cadmium uptake, □:copper uptake).

함유하는 본배양 배지로 옮겨졌을 때 재조합 효모의 생육과 카드뮴 흡착 능력을 살펴보았다. 카드뮴에 적응된 재조합 효모는 카드뮴 600, 700, 800 mg/L를 함유하는 배지에 구리가 첨가되지 않았을 때 자라지 못한 반면에 10 mg/L의 구리가 첨가된 450, 600, 800 mg/L의 카드뮴 함유 배지에서는 재조합 효모의 성장이 이루어졌다(data not shown). 100 mg/L의 카드뮴 함유 배지에서 적응한 재조합 효모

가 구리가 첨가된 450, 600 mg/L의 카드뮴 함유 배지에서 생육한 경우에 적응하지 않은 재조합 효모에 비하여 lag phase가 더욱 더 짧아졌다. 그러나 적응한 재조합 효모가 800 mg/L 카드뮴 함유 배지에서는 대수증식기로 접어들기 이전에 lag phase가 20일 이상이 필요하였다.

카드뮴 100 mg/L에서 적응한 재조합 효모의 대수증식기에서 비성장속도가 적응하지 않은 효모보다 비성장속도가 느렸는데 이는 *Hansenula anomala* B-7을 1000 mg/L의 카드뮴에서 배양할 경우 세포벽이 심하게 손상(30)되는 경우로 미루어 보아 전배양 과정에서 이미 재조합 효모가 카드뮴으로 인한 악화된 환경에 적응하는 과정에서 세포벽이 상당히 파괴되고 카드뮴의 독성 때문에 대사과정의 변화가 일어나 본배양으로 옮겨졌을 때 전반적으로 낮은 비성장속도를 갖는 것으로 추정된다.

카드뮴에 적응한 재조합 효모의 specific cadmium uptake는 10 mg/L 구리가 첨가되었지만 카드뮴에 적응하지 않은 실험구의 경우에 비해 38 % 내지 57 % 정도 밖에 되지 않았다. 이처럼 카드뮴 함유 배지에서 적응한 재조합 효모가 낮은 specific cadmium uptake값을 갖는 것은 카드뮴 배지에 적응하는 과정에서 재조합 효모의 카드뮴 표면 흡착 능력과 세포질 내로의 수송하는 능력이 어느 정도 소실이 있었던 것으로 여겨진다.

요 약

고농도 카드뮴이 함유된 배지에서 금속 결합 단백질인 metallothionein 유전자로 형질전환된 재조합 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 생육과 카드뮴 흡착에 미치는 영향을 살펴보았다. 카드뮴 농도가 높아짐에 따라 재조합 효모의 lag phase가 비례적으로 길어졌으며 성장은 전반적으로 느려졌고 건조균체농도도 감소하는 경향을 보였다. 카드뮴 220 mg/L인 배지에서 카드뮴 제거 효율이 58.6 %로서 최고치를 보였다. 카드뮴 배지에 구리가 10 mg/L의 구리가 첨가될 경우 첨가되지 않은 경우보다 재조합 효모의 specific cadmium uptake는 더 높아졌고, lag phase가 2 내지 4일 정도 더 짧아졌다. 10 mg/L의 구리가 첨가된 카드뮴 630 mg/L 배지에서 자란 재조합 효모는 52.6 mg Cd²⁺/g dry cell을 축적하였다. 카드뮴 680 mg/L 배지에 구리의 첨가량이 11에서 33 mg/L로 증가됨에 따라 specific cadmium uptake가 17.0에서 42.0 mg Cd²⁺/L dry cell로 증가

하였다. 건조균체농도, specific cadmium uptake rate, 카드뮴 제거 효율 등이 전반적으로 향상되었다. 카드뮴 100 mg/L에서 적응한 재조합 효모가 본배양 배지로 옮겨질 때 최단기간의 lag phase를 보였지만 가장 낮은 비성장속도를 나타내었다.

감 사

본 연구는 교육부 유전공학 학술조성비에 의해 수행되었으며 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

1. D. H. Hamer, D. J. Thiele, and J. E. Lemontt (1985), *Science*, **228**, 685.
2. K. A. Matis and A. I. Zouboulis(1994), *Biotechnol. and Bioeng.*, **44**, 354.
3. B. Volesky and Z. R. Holan(1995), *Biotechnol. Prog.*, **11**, 235.
4. S. E. Shumat II and G. W. Strandberg (1985), *Comprehensive biotechnology*(M. Y. Murray, C. W. Robinson, and J. A. Howell, eds), Vol. 4, 1st ed., p. 235, Pergamon Press Ltd., Oxford, England.
5. G. M. Gadd(1986), *Immobilisation of ions by bio-sorption*(H. Eccles and S. Hunt, eds), 1st ed., p. 136, Ellis Horwood Limited, Chichester, England.
6. B. C. Jeong and L. E. Macaskie(1993), *The Microorganisms & Industry*, **19**, 2.
7. L. P. Lichko, L. A. Okorokov, and I. S. Kulaev(1980), *J. Bacteriol.*, **144**, 666.
8. J. L. Mowll and G. M. Gadd(1984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 279.
9. B. G. F. Kessels, P. J. M. Belde, and G. W. F. H. Borst-Pauwels(1985), *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 2533.
10. B. Volesky, H. May, and Z. R. Holan(1993), *Biotechnol. and Bioeng.*, **41**, 826.
11. R. A. Laddaga and S. Silver(1995), *J. Bacteriol.*, **162**, 1100.
12. Z. Tynecka, Z. Gos, and J. Zajac(1981), *J. Bacteriol.*, **147**, 313.
13. R. D. Perry and S. Silver(1982), *J. Bacteriol.*, **150**, 973.
14. R. S. Mitra and I. A. Bernstein(1978), *J. Bacteriol.*, **133**, 75.
15. M. B. Khazaeli and R. S. Mitra(1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 46.
16. M. Karin(1985), *Cell*, **41**, 9.
17. K. Lerch(1980), *Nature*, **284**, 368.
18. D. H. Hamer(1986), *Ann. Rev. Bioche.*, **55**, 913.
19. D. J. Ecker, T. R. Butt, E. J. Sternberg, M. P. Neeper, C. Debouck, J. A. Gorman, and S. T. Crooke(1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 16895.
20. D. R. Winge, K. B. Nielson, W. R. Gray, and D. H. Hamer(1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 14464.
21. S. Forgel and J. W. Welch(1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5342.
22. A. B. Norberg and N. Molin(1983), *Water Res.*, **17**, 1333.
23. D. H. Chung, D. O. Kim, and J. H. Seo(1995), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 475.
24. L. E. Macaskie and A. C. R. Dean(1984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 53.
25. H. Niu, X. S. Xu, J. H. Wang, and B. Bolesky (1993), *Biotechnol. and Bioeng.*, **42**, 785.
26. J. Gabriel, J. Vosáňlo, and P. Baldrian (1996), *Biotechnol. Techniques*, **10**, 345.
27. B. S. Wilhelmi and J. R. Duncan(1996), *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1007.
28. T. S. Yu and H. I. Song(1981), *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **9**, 59.
29. S. Sanglimsuwan, N. Yoshida, T. Morinaga, and Y. Murooka(1993), *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 112.
30. H. E. Huh, N. S. Choi, Y. K. Seo, T. S. Yu, and H. S. Lee(1994), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 30.