

납의 생물흡착에 미치는 세포외고분자물질의 영향

¹서 정 호 · ²김 동 석 · †송 승 구

¹울산과학기술대학교 공업화학부, ²대구효성가톨릭대학교 환경과학과
부산대학교 화학공학과

(접수 : 1998. 9. 25., 게재승인 : 1999. 1. 16.)

Effect of Extracellular Polymeric Substances(EPS) on the Biosorption of Lead by Microorganisms

Jung Ho Suh¹, Dong Seog Kim², and Seung Koo Song[†]

¹Dept. of Ind. Chem., Ulsan College, Ulsan 680-749, Korea

²Dept. of Environ. Sci., Catholic Univ. of Taegu-Hyosung, Kyungbuk 712-702, Korea

Dept. of Chem. Eng., Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received : 1998. 9. 25., Accepted : 1999. 1. 16.)

Comparison of lead removal characteristics between two strains, *Aureobasidium pullulans* and *Saccharomyces cerevisiae*, and effects of extracellular polymeric substances(EPS) excreted by microorganisms on the removal of lead were investigated. The capacity of lead biosorption to *A. pullulans* which had EPS was increased as the storage time of the cells increased, due to the increased amounts of excreted EPS. When the EPS were removed from *A. pullulans* cells, the amounts of adsorbed lead were very small(10% of the cell with EPS). In the case of *S. cerevisiae* which had no EPS, the lead removal capacity was nearly constant with storage time except early stage, but the spending time to reach an equilibrium state decreased with increasing storage time because of lowering the function of cell membrane. Therefore, it seems that the phenomena of lead biosorption were remarkably affected by the presence of extracellular polymeric substances.

Key Word : biosorption, extracellular polymeric substances, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans*, lead

서 론

중금속 특히, 납, 수은, 카드뮴 등은 여러 경로를 거쳐 인체에 축적되며 장기간 신체에 잔류하면서 치명적인 질병의 원인이 된다는 것은 이미 잘 알려져 있다(1) 따라서 다양한 중금속 제거 기술이 연구되어 왔으며(2), 최근에는 미생물이 중금속을 섭취하는 성질을 이용하여 유기금속 회수와 독성중금속 제거에 미생물흡착(biosorption)이 많이 연구되고 있다(3,4). 미생물이 중금속을 제거하는 방법으로는 다양한 메커니즘이 사용되는데, 크게 물질 대사에 관계없이 음전하를 띠는 세포벽이나 세포질 외벽, 미생물이 분비하는 세포외고분자물질(extracellular polymer substances: EPS)에 흡착되는 단순하고 수동적이며 급격한 물리화학적 흡착과 물질대사 의존적인 이온교환, 단백질에 의한 킬레이트 형성(metallothionein), 세포질 내부로의 이동, 효소에 의한 불용화(산화, 환원, 메틸화, 탈메틸화)등의 능동적이며 느린 미생

물흡착으로 볼 수 있다(5).

중금속의 제거에 가장 많이 이용되는 미생물은 박테리아, 균류, 조류 등이며, 이들 중 특히 균류는 그 생물학적 특성때문에 독성 물질에 대한 저항성이 높으므로 중금속 제거를 위한 미생물흡착에 많이 이용되고 있으며, 이들 미생물을 이용하여 중금속을 제거할 때 온도, pH, 초기 중금속이온의 농도 등과 같이 흡착량에 영향을 미치는 여러 인자들에 대한 고찰과 흡착등온 모델에 적용한 결과들이 최근에 많이 발표되고 있다(6,7,8). 그러나 중금속 흡착에 미치는 미생물의 생물학적 인자에 대한 고찰은 많이 이루어지지 않았으며, 특히 미생물이 분비하는 세포외고분자물질에 의한 중금속 제거에 대한 정량적인 결과는 거의 발표되지 않은 실정이다.

많은 종류의 미생물이 세포외고분자물질을 분비한다는 사실은 오래 전부터 알려져 왔다. 일반적으로 미생물이 분비하는 세포외고분자물질은 단백질과 다당류가 주류를 이룬다고 알려져 있으며, 이들 물질은 화학적 구조가 다르고 물리적 성질도 매우 다양하여, 유화제, 안정제, 결속제, 젤화제, 응고제, 증점제 등으로 사용되기도 한다(9). 미생물들은 환경이 불리할 때 세포외고분자물질을 분비하여 자신을 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 세포벽 주위에 두꺼운 막을 형성하여 박테리오파지, 항생물질 및 살생물질의 침입을 못하게 하기도 한다. 이러한 세

† Corresponding Author ; Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan, 608-735, Korea
Tel : 051-510-2398. Fax : 051-512-8563
e-mail : sksong@hyowon.pusan.ac.kr

포외고분자물질은 carboxylate, hydroxyl 및 phosphate와 같은 이온화된 그룹을 가지고 있으므로 자연조건하에서 음전하를 띄고 있어, 여러 가지 중금속 이온과 선택적으로 잘 결합하는 성질을 가지고 있다(10, 11).

최근에 이러한 세포외고분자물질과 여러 중금속과의 상호작용에 대한 증거가 나오고 있으며, 이를 경제적으로 이용하려는 시도도 행해지고 있다(12) Harvey(13)는 $1\mu\text{g}$ 세포외고분자물질당 $0.13\mu\text{M}$ 의 납이 결합되는 것을 발견하였다. 구리는 $1\mu\text{g}$ 당 22ng 정도의 흡착량을 가진다고 보고하였으며, Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} 이 세포외고분자물질과 착화물을 형성할 때 안정도 계수(stability constants)는 10^5 에서 10^8 범위를 나타낸다고 하였다(14). Carzo 등(15)은 두 종류의 *Bradyrhizobium* 균주에서 분리한 세포외고분자물질을 금속용액에 투입하여 침전을 시켜 침전효율을 검토하였는데, Th^{4+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 는 침전이 아주 잘 일어나 세포외고분자물질과 금속이온과의 상호작용이 있는 것을 확인하였으나, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} 등은 침전, 겔화 또는 탁도가 발생하는 것을 관찰하지 못하였다. 그러나 Dugan과 Pickrum(10)은 폐수로 부터 분리한 8종의 박테리아가 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} 등과 잘 결합한다고 하였다. 그러므로 세포외고분자물질에 따라서 잘 결합하는 중금속의 종류도 달라지며 이러한 차이는 세포외고분자물질을 분비하는 미생물의 종에 기인하는 것으로 판단된다.

본 연구는 세포외고분자물질을 많이 생산한다고 알려진 불안전곰팡이인 *Aureobasidium pullulans*와 발효공정에서 많이 사용되는 효모의 한 종류인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여, 인체에 치명적인 중금속인 납을 흡착할 때, 세포외고분자물질의 역할에 대해 비교 고찰하였다.

재료 및 방법

미생물 및 배양

본 실험에 사용한 미생물은 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC (Korean Collection for Type Cultures) 1199와 *Aureobasidium pullulans* KFCC(Korean Foundation of Culture Collection) 10245이다. 본 연구에서 사용된 두 미생물의 성장배지(growth medium)는 서정호 등(4)과 같으며 300mL 삼각플라스크에 멸균된 배지 100mL를 넣고 호기성 상태를 유지하기 위해 통기성 실리콘 마개로 막아 멸균한 후 접종원(inoculum)을 피펫으로 접종하여 30°C의 shaking incubator에서 150rpm으로 각각 48시간 동안 배양하였다. 미생물을 회수하기 위해 3000rpm으로 20분간 원심 분리한 다음 상등액은 버리고 pellet은 같은 양의 증류수로 재현탁시켜 다시 원심 분리하는 과정을 3차례 실시하였다. 여기서 얻어진 미생물을 이온이 제거된 증류수에 현탁시켜 흡착실험에 사용하기 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

중금속 흡착

본 연구에 사용된 납은 특급시약인 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 를 탈이온화된 증류수에 용해시켜 원하는 농도로 희석하여 제조하였으며 흡착 실험은 미생물 현탁액(50mL)과 중금속 용액(50mL)을 각각 원하는 농도의 2배가 되도록 준비하여 300mL 삼각플라스크에서 1대1로 섞은 후 shaking incubator에서 30°C, 150rpm으로 교반하였다. 일정한 시간 간격으로 15mL 시료를 채취하여 10000rpm에

서 10분간 원심분리한 후 상등액을 희석하여 중금속의 농도를 측정하였다.

중금속 및 미생물 농도 측정

수용액내 납과 칼륨이온의 농도는 atomic absorption spectrophotometer(AAS, model PERKIN ELMER-3300)를 사용하여 측정하였으며, 미생물 농도는 분광광도계(Spectronic 20, Milton Inc., USA)를 이용 파장 660nm에서 흡광도를 측정하여 먼저 구한 흡광도와 세포조건 무게의 검량선(calibration curve)을 이용하여 미생물 농도를 환산하였다.

세포외고분자물질의 정량 분석

세포외고분자물질의 량과 중금속의 흡착량의 관계를 규명하기 위해 세포외고분자물질의 량 측정을 다음과 같이 시행하였다

- 1) culture broth(5mL)를 채취한다 증류수로 5배 희석한다.
- 2) 5M NaCl 0.2mL와 5M tetrasodium ethylenediamine tetraacetate 0.2mL를 투입한다
- 3) 고속원심분리기를 사용하여 36000×g에서 4°C, 40분간 원심분리한다.
- 4) 상등액 20mL를 채취한후 isopropyl alcohol 60mL를 가한다.
- 5) 5분간 정지시킨 후 침전물을 미리 무게를 단 Whatman GF/A filter disk를 사용하여 여과한다
- 6) vacuum dry oven에서 45°C, 24시간 건조시키고 항량이 되었을 때 무게를 잰다.

전자현미경 관찰

균체내 축적된 중금속의 관찰 및 세포외고분자물질의 역할을 파악하기 위하여 투과전자현미경에 의한 관찰을 Suh et al.(7)의 방법에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

Figure 1은 납의 생물흡착 시험에 사용하기 위하여 *A. pullulans*와 *S. cerevisiae* 두 미생물을 배양하여 회수한 후 냉장보관하였을 때, 보관시간에 따라 분비된 세포외고분자물질의 량을 측정 한 것이다. *A. pullulans*의 경우에는 보관시간이 증가할수록 세포외고분자물질의 분비량이 계속 증가하였으나, *S. cerevisiae*는 세포외고분자물질을 거의 분비하지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 두 미생물에 의한 납 흡착시에 세포외고분자물질의 유무에 따라 다른 흡착 특성을 보일 것으로 예측할 수 있었다.

세포외고분자물질을 많이 분비하는 *A. pullulans*를 사용하여 보관시간에 따른 세포외고분자물질의 분비량과 납 흡착량의 관계를 Figure 2에 나타내었다. 일부 미생물에서 외부 자극에 대해 세포자신을 보호하기 위하여 세포외고분자물질을 분비한다고 보고되어 있는 데(16), Figure 2에 나타난 것과 같이 에너지원의 결핍과 온도에 대한 영향에 의해 40일 정도까지는 세포외고분자물질의 양이 증가하였지만, 40일 이후에는 정량적 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 보존기간에 따른 납 흡착량의 변화와 비교해 보면, 세포외고분자물질의 양이 증가함에 따라 *A. pullulans*의 납 흡착량도 증가하고 세포외고분자물질의 양이 일정해졌을 때 납의 흡착량도 일정해지는 경향을 볼 수 있다. 따라서 *A. pullulans*의 납 흡착에서는 *A. pullulans*가 분비하는

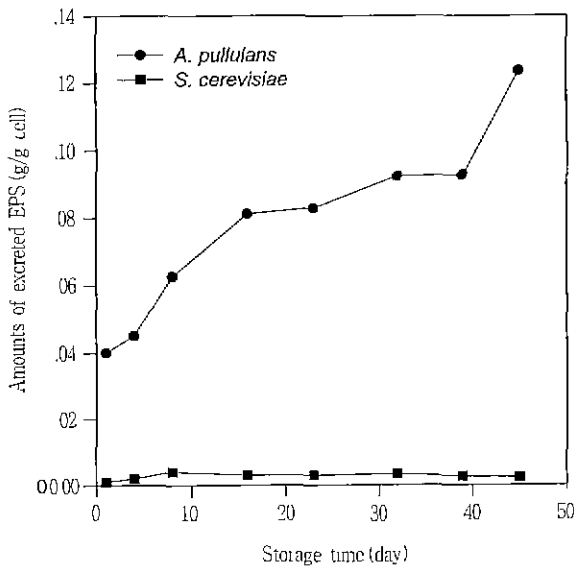


Figure 1. Excreted EPS of *A. pullulans* and *S. cerevisiae* with storage time

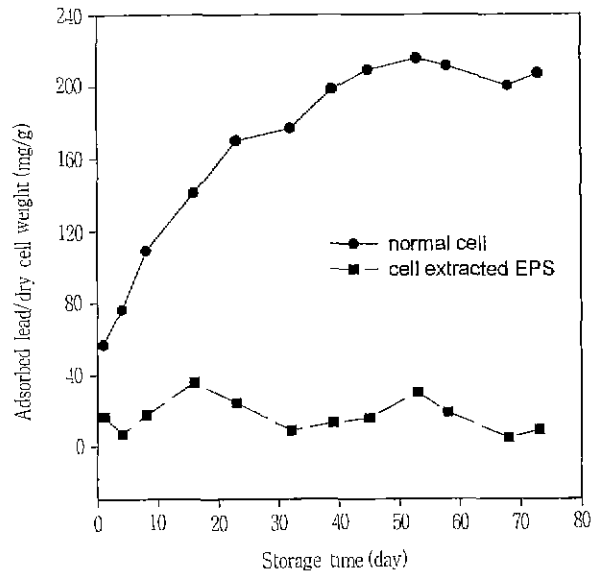


Figure 3. The difference of adsorbed lead between the cell with and without EPS of *A. pullulans*.

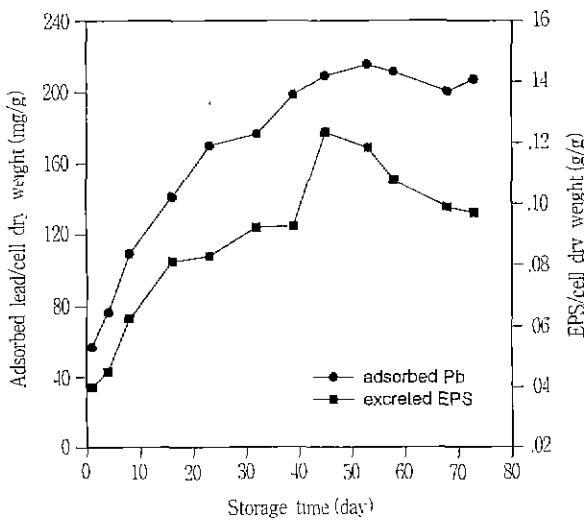


Figure 2. The relationship between adsorbed lead and excreted EPS in the case of *A. pullulans*.

세포외고분자물질이 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었고, 이를 확인하기 위해서 Figure 3에 배양된 *A. pullulans*에서 세포외고분자물질을 분리하고 남은 미생물 pellet으로 납 흡착 실험을 시행한 결과를 나타내었다. Figure 3에 나타난 것과 같이 세포외고분자물질이 제거된 *A. pullulans*의 납 흡착량은 단위 미생물 건조 무게당 약 20mg 정도로 보존기간에 관계없이 거의 일정한 것으로 나타났다. 따라서 *A. pullulans*에 의한 납 흡착에서 세포외고분자물질이 차지하는 비율은 최대흡착량을 기준으로 대략 90% 정도로 대부분을 차지하는 것을 알 수 있었으며, 나머지는 세포막과 세포벽, 일부 분리되지 않은 세포외고분자물질에 의해 흡착되는 것으로 생각되었다.

Figure 4는 세포외고분자물질을 분리하지 않은 *A. pullulans* (4a)와 분리시킨 *A. pullulans*(4b)를 이용하여 납을 흡착한 것을 TEM으로 관찰한 것이다. Figure 4(a)의 경우, 세포벽 주위에 존

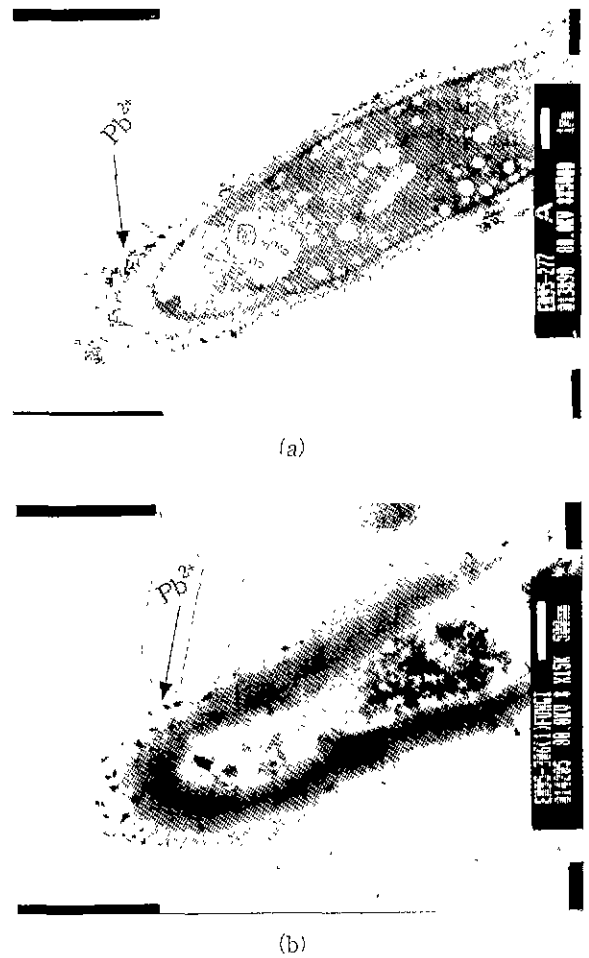


Figure 4. Transmission Electron Microphotographs of lead-loaded *A. pullulans* cells with (a) and without (b) extracellular polymeric substances

제하는 세포외고분자물질에 의해 납이 세포 내부로 전혀 침투하지 못하고 세포의 바깥에만 부착되어 있는 것을 볼 수 있다. 이 현상은 세포외고분자물질이 세포에 독성 영향을 주는 외부 물질에 대해 보호작용을 하고, 세포외고분자물질 내에 존재하는 음이온성 그룹들과 납이 잘 결합하기 때문으로 판단된다. 세포외고분자물질을 제거시킨 *A. pullulans*를 사용하여 납을 흡착한 Figure 4(b)의 세포벽 부분을 자세히 보면, 세포외고분자물질이 있을 때는 세포벽 바깥에 많은 양의 납이 부착되어도 세포벽 내부로는 납이 침투하지 못하였으나, 세포외고분자물질이 제거된 후에는 부착된 납의 양이 현저히 감소하였으며 납이 세포벽 내부로 침투해 들어간 것을 관찰할 수 있었다 따라서 Figure 3에 나타난 것과 같이, 세포외고분자물질의 유무가 납 흡착에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Figure 5(a)는 *S. cerevisiae*를 수확한 후 증류수에 현탁시켜 4°C에서 냉장 보관하면서 보관시간에 따른 납 용액의 흡착변화를 살펴본 것이다. 수확 직후부터 5일 이내에 사용한 미생물 시료를 제외하고는 보관시간에 따른 최대 납 흡착량의 변화는 거의 없었으나, 미생물의 보관시간이 경과함에 따라 흡착평형에 도달하는 데 걸리는 시간이 점차 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 Figure 5(b)에서 용액내에 존재하는 K⁺의 농도가 보관시간에 따라 증가하는 것을 알 수 있다. 따라서 Figure 1과 Figure 5(a)(b)의 결과로부터, *S. cerevisiae*는 세포외고분자물질을 분비하지 않으므로 보관시간에 따른 납 흡착량의 변화는 거의 없으며, 보관시간이 경과함에 따라 배지의 부족과 냉장보관에 의한 외부 자극에 의해 세포막의 기능이 서서히 저하되는 것으로 판단되었다 이것은 세포막을 통해서 이동이 일어나는 Na⁺와 K⁺ 중 비

생물 내부에 포함되어 있는 K⁺의 양이 외부로 많이 배출되기 때문으로, 보관시간이 길어지면 용액중의 납 이온이 기능이 저하된 세포막을 통해 이동하므로, Suh *et al.*(7)의 결과와 같이 *S. cerevisiae*를 이용하여 납 이온을 제거할 때는 용액중의 납 이온이 미생물 세포 내부로 이동하여 제거되는 현상을 보이므로, 평형에 도달하는 시간이 빨라지는 것으로 추측할 수 있었다

따라서 *A. pullulans*와 *S. cerevisiae* 두 미생물을 사용하여 납을 제거할 때 두 미생물에 의한 납의 제거 기작은 현저하게 다르다는 것을 알 수 있으며, *A. pullulans*는 세포 외부에 존재하는 세포외고분자물질에 의해 납이 제거되며, *S. cerevisiae*의 경우에는 세포외고분자물질의 분비량도 거의 없으며, 납 제거에 거의 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다

요 약

*A. pullulans*와 *S. cerevisiae*의 납 제거 특성을 비교하고, 미생물이 분비하는 세포외고분자물질의 영향에 대해 고찰하였다. *A. pullulans*의 경우에 미생물의 보관시간이 증가할수록 미생물이 분비하는 세포외고분자물질의 양도 증가하였으며, 납 제거는 도 우수해졌다. 그러나 세포외고분자물질을 제거한 *A. pullulans* 세포에서는 납 흡착량이 약 10%로 매우 적었다. *S. cerevisiae*의 경우에는 세포외고분자물질은 거의 분비되지 않았으며, 보관시간에 따른 납 흡착량의 변화는 거의 없었다. 또한 보관시간이 경과할수록 흡착 평형에 도달하는 시간은 점점 짧아졌다. 따라서 *A. pullulans*와 *S. cerevisiae*의 납 제거 기작은 세포외고분자물질의 유무에 따라 매우 달라짐을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 1997년도 교육부지원 생물화학공학 학술연구조성(F-7)에 의하여 연구되었으며, 일부 부산대학교 연구비에 의해 지원되었기에, 이에 감사드립니다

참 고 문 헌

- Hoffman, D. J., B A Rattner, G. A. Bruton Jr., and J. Cairns Jr (1995), Handbook of Ecotoxicology, CRC Press, Inc.
- EPA/600/s2-91/041 (1991), "Recovery of Metals from Sludge and Wastewaters", Scpt EPA
- Volesky, B. and Z R Holan (1995), "Biosorption of heavy metals", *Biotechnol Prog*, 11, 235-250.
- 서정호, 오상진, 박영식, 김동석, 송승구 (1997), *Saccharomyces cerevisiae*와 *Aureobasidium pullulans*의 납 흡착, *대한환경공학회지*, 19, 745-754.
- Volesky, B (1990), Biosorption of heavy metals, Boca Raton, Fla CRC Press.
- Suh, J H, D. S. Kim, S J Oh, Y S Park and S K Song (1997), The biosorption rate of lead by *Aureobasidium pullulans*. *Environmental Engineering Research*, 2, 287-290
- Suh, J. H, D. S. Kim, J. W. Yun and S. K. Song (1998),

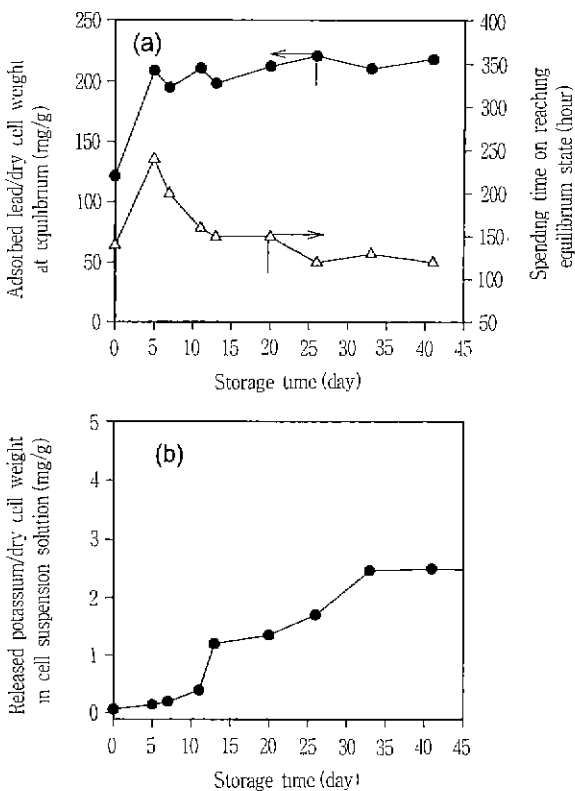


Figure 5. Effects of storage time on the lead adsorption (a) and the release of potassium (b) to *S. cerevisiae* stored at 4°C.

- Progress of Pb^{2+} bioaccumulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters*, **20**, 153-156.
8. Leusch, A., Z. R. Holan and B. Volesky (1997), Solution and particle effects on the biosorption of heavy metals by seaweed biomass, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **61**, 231-249.
 9. Kosaric, M., Cairns, W. L. and Gray, Neil C. C. (1987), *Biosurfactants and Biotechnology*(ed), Marcel Dekker, Inc
 10. Dugan, P. R. and Pickrum, H. M. (1972), Removal of mineral ions from water by microbially produced polymers, Proc. 27th Ind. Waste Conf., Purdue Univ., Eng. Ext. Ser. No. 141, 1019-1038.
 11. Bitton, G. and Freihof, V. (1978), Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*, *Microb Ecol*, **4**, 119-125.
 12. Geesey, G. and Jang, L. (1990), Extracellular polymers for metal binding, In: *Microbial Mineral Recovery*, McGraw-Hill, New York, 223-247
 13. Harvey, R. W. and S. N. Luoma (1985), Effects of adherent bacteria and bacterial extracellular polymers upon assimilation by *Macoma balthica* of sediment bound Cd, Zn, and Ag, *Mar. Ecol., Ser.*, **22**, 281-287
 14. Kaplan, D., D. Christaen and A. Shoshana (1987), Chelation properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp, *Appl Environ. Microbiol.*, **53**, 2953-2956.
 15. Carzo, J., M. Leon-Barrros, V. Hernando-Rico and A.M. Gutierrez-Mavarro, Precipitation of metallic cations by the acidic exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium(Chamaecytisus)* strain BGA-1, *Appl Environ. Microbiol.*, **60**, 4531-4536.
 16. Bushell, M. E., *Progress in industrial microbiology volume (18) : microbial polysaccharides* (1983), Elsevier.