

# Phytochelatin synthase 발현을 통한 효모의 중금속 처리에 관한 연구

## Bioremediation of metal contaminated groundwater by engineered yeasts expressing phytochelatin synthase

강소영, 이원규\*, 김재영\*, Wilfred Chen\*, 김경웅

광주과학기술원 (GIST), \*University of California, Riverside (UCR) (kwkim@gist.ac.kr)

### Abstract

Heavy metal contamination has been increased in aqueous environments near many industrial facilities, such as metal plating facilities, mining operations, and tanneries. The soils in the vicinity of many military bases are also reported to be contaminated and pose a risk of groundwater and surface water contamination with heavy metals. The biological removal of metals through bioaccumulation has distinct advantages over conventional methods; the process rarely produces undesirable or deleterious chemical byproducts, it is highly efficient, easy to operate and cost-effective in the treatment of large volumes of wastewater containing toxic heavy metals. In addition, a recent development of molecular biology shed light on the enhancing the microorganism's natural remediation capability as well as improving the current biological treatment.

In this study, characteristics of the cell growth and heavy metal accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing phytochelatin synthase (PCS) gene were studied in batch cultures. The *AtCRF1* gene was demonstrated to confer substantial increases in metal tolerance in yeast. PCS-expressing cells tolerated more  $Cd^{2+}$  than controls.

**Key word** : *Saccharomyces cerevisiae*, heavy metal, bioremediation, phytochelatin

## 1. 서론

오염 지하수 및 토양 환경으로부터 유해 금속 이온을 처리하는 방법에는 일반적으로 화학적, 물리적 그리고 생물학적 처리방법 등이 있다. 생물학적 처리방법은 미생물 자체의 생체기작을 이용하는 것으로서, 미생물의 생체축적 (biosorption & bioaccumulation), 산화환원반응 (oxidation & reduction), 금속 유기물질 복합반응 (metal-organic complexation)과 비용해성 복합체형성 (insoluble complex formation) 등의 기작은 중금속으로 오염된 환경을 복원시키는 데에 중요한 기술기반을 제공한다 (Valls and de Lorenzo, 2002). 특히, 미생물은 다량으로 수확할 수 있으며, 중금속의 흡수와 탈착이 짧은 시간 안에

이루어지고 중금속의 선택적 분류와 균체의 폐기처리가 간단하므로 기존의 화학적 처리방법인 산화환원 반응 혹은 침전, 여과를 이용하여 분리하거나 이온 교환수지를 이용하는 방법보다 더 효과적이다. 지하수와 같이 중금속 오염도가 1-100 mg/L 정도로 낮을 때는 기존의 처리 공정은 효과적이지 못하다 (Chamarthy *et al.*, 2001; Volesky, 2001). 더욱이 분자생물학의 발전과 더불어 중금속 제거능력을 향상시킨 균주의 최근 개발시도는 기존의 생물학적 처리방법을 개량 발전시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

본 연구에서는 *Arabidopsis thaliana*로부터 추출해 낸 카드뮴결합 단백질 유전자인 PCS 유전자 (*AtPCS1*)를 효모에 함유시켜 균체 성장과 중금속 축적 능력을 파악하고자 하였다.

## 2. 본 론

생체축적 (bioaccumulation)을 통해 미생물들은 세포내외에 중금속 결합단백질을 합성하는데 이들은 중금속을 제거할 뿐만 아니라 세포내 금속이온의 저장이나 농도 조절에 관련된다. 최근 연구들은 납, 수은 그리고 카드뮴과 같은 유해 원소들과 자연적으로 결합해서 무독화시키는 phytochelatin으로 일컫는 펩티드를 중금속에 노출된 곰팡이와 식물이 생산하고 있음을 밝혀내었다. Phytochelatin들은 (gamma-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly (n=2-7)의 구조를 가지고 있으며 펩티드-금속 혼합체 형성을 통해 유해 금속이온을 축적한다 (Cobbett, 2000). 이 밖에 다른 종류의 중금속결합 단백질로써 metallothionein이라는 저분자 단백질도 많이 연구되어 있다. 이 단백질은 cysteine 함량이 많으며 카드뮴, 아연, 구리 등과 결합한다(Hamer, 1986).

본 연구에서는 유전공학적인 기술을 활용하여 식물로부터 추출해낸 PCS 유전자를 효모에 재조합시켜 중금속으로 오염된 지하수 처리를 위한 생물학적 처리 기술을 향상시키고자 하였다. PCS 유전자는 *Arabidopsis thaliana*로부터 분리해낸 것 (pYES4-AtCRF1:FLAG)으로 펜실베이니아 대학의 Rea 교수로부터 분양받아 표 1과 같이 효모균 BY4741 형질에 도입하여 사용하였다. 재조합된 효모는 AHC 배지에서 30 °C, 180 rpm 조건으로 배양시켰으며 PCS 유전자가 함유되지 않은 균과 비교 실험을 실시하였다.

Table 1 *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Genotype	Source
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Open Biosystem, USA
<i>Δycf1</i>	<i>like BY4741 except ycf1::KanMX4</i>	Open Biosystem, USA

재조합 효모 내부에서의 카드뮴 결합 단백질인 phytochelatin의 발현여부를 확인하고자, 배양된 효모에 anti-FLAG M2 antibody (Sigma)를 이용하여 Western blotting을 수행하였다. 그 결과, phytochelatin이 효모 내에서 분자량 약 58 KDa으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

한편, 유해 금속이온 용액에서의 효모균의 성장 특성을 파악하고자 각각 다른 농도의 카드뮴 이온 용액이 들어있는 AHC 배지에 효모균을 OD<sub>600nm</sub> 0.1로 접종한 후, 30°C, 180 rpm으로 반응시켰다. 24시간 후의 OD를 측정된 결과, 그림 1과 같은 결과를 얻었다. YCF1 유전자를 가지고 있는 효모의 경우, phytochelatin의 발현 여부와 상관없이 카드뮴에 대한 균체 성장의 성향이 유사하였는데, 이는 카드뮴 축적에 있어서 필요로 되어지는 glutathion의 함량이 제한요소로 작용한 것으로 사료된다. YCF1 유전자의 기능을 억제한 효모는 저농도에서는 물론 400 μM CdCl<sub>2</sub> 용액에서도 균체 성장이 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 PCS 유전자 발현에 의해 카드뮴에 대한 내성이 본래 효모가 갖고 있는 것보다 급격히 향상되었음을 의미한다.

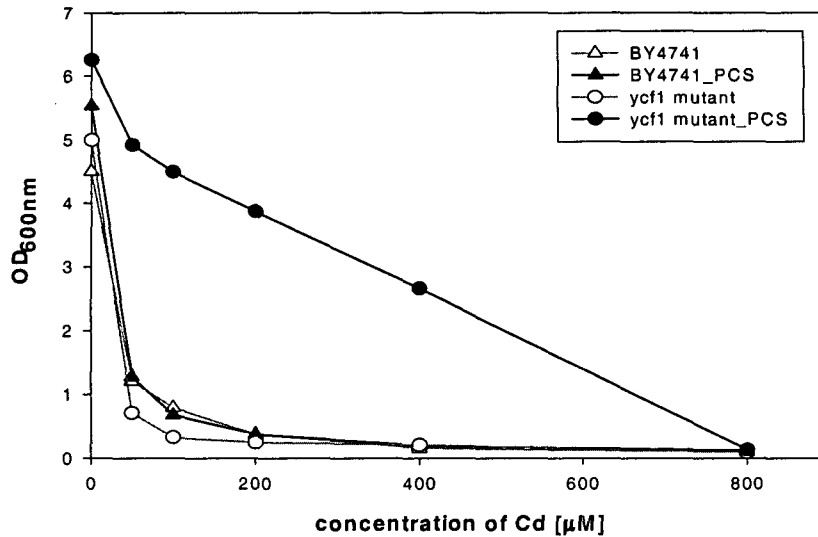


Fig. 1. Cd<sup>2+</sup> tolerance of *S. cerevisiae* BY4741 and *ycf1*Δ mutant strain with or without *AtPCS1*.

### 3. 결론

미생물을 이용한 중금속의 제거 및 처리기술은 미생물이 지닌 중금속 제거 기작을 이용하는 방법이 대부분이다. 이런 중금속에 대한 생물학적 기작들은 중금속으로 오염된 환경을 복원시키는 데에 중요한 기술기반을 제공한다. 최근 금속의 종류와 미생물균주의 종류와 조건 그리고 오염 환경에 따른 다양한 방법의 중금속 처리들이 제시되었고, 특히 분자생물학적 기술의 적용은 미생물들의 중금속 제거 및 처리기작 능력을 배가시키고 새로운 처리 기작 개발을 가능하게 한다. 또한, 미생물에 의한 중금속 처리 공정은 단일공정만으로도 효과적으로 지하수내 유해금속이온을 처리할 수 있을 뿐만 아니라, 기존 공정과 연계하여 실용적인 기술로서 활용이 가능하다. 재조합된 미생물들은 아직까지 환경에 미칠 부정적인 잠재성 때문에 실제적 처리 기술 적용이 이루어지지 않은 상태이나 유해 원소들의 독성 수준을 극적으로 낮출 수 있으므로, 오염 지하수 지역에서 EPA가 선정한 위험수준 아래로 인간의 건강과 환경 위험성들을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

### 4. 참고문헌

- Chamarthy, S., Seo, C.W., and Marshall, W.E. Adsorption of selected toxic metals by modified peanut shells, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76: 593-597, 2001.
- Cobbett, C.S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin Plant Biol.* 2000, 3: 211-216.
- Hamer, D.H. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55:913-951, 1986.
- Valls, M. and de Lorenzo, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution, *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 327-338, 2002.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P. and Rea, P.A. AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: Isolation and *in vitro* reconstitution, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7110-7115, 1999.
- Volesky, B., 2001. Detoxication of metal-bearing effluents: biosorption for the next century, *Hydrometallurgy*, 59: 203-216.