

카드뮴내성균(*Pseudomonas putida*)에 의한 菌體內 카드뮴 蓄積 機作

許鍾秀 · 曹周植 · 韓文圭

Mechanism of Cadmium Accumulation in the Cell of Cadmium-Tolerant Bacterium, *Pseudomonas putida*

Jong-Soo Heo, Ju-Sik Cho, Mun-Gyu Han

Abstract

A mechanistic study by which Cadmium-tolerant *P. Putida* C1 accumulates high conc of Cd in its cell body was performed. Approximately 57% Cd accumulated was distributed on the cell wall and the other 43% portion was in cytoplasm. 84% Cd of the Cd in the cell wall fractions present in the polyphosphate-polysaccharide fractions, but most of Cd in the cytoplasm fraction was in protein and nucleic acid.

Cadmium affected the protein synthesis in *P. Putida*. The intracellular protein content was decreased by cadmium addition, but the soluble protein precipitated by ammonium sulfate(30~75% saturation) was increased as compared to that from the cells grown without cadmium. Furthermore, in the cells grown with of cadmium, high-molecular-weight soluble protein was increased, with of cadmium, high-molecular-weight soluble protein was increased, compared with the cells grown without cadmium, but low-molecular-weight soluble protein was decreased.

These results indicate that Cd inhibited the intracellular protein biosynthesis but enhance biosynthesis of the high-molecular-weight soluble protein precipitate by ammonium sulfate(30~75% saturation).

緒 論

미생물에 의한 중금속의 흡수는 일반적으로 두가지 과정에 의하여 일어나며, 하나는 세포표면에 존재하는 음이온 그룹에 대한 양이온의 결합에 의해

세포표면에 흡착되는 과정이며, 다른 하나는 대사 작용에 의하여 세포내에 축적되는 과정인 것으로 알려져 있다.¹⁾

카드뮴(Cd)이나 수은(Hg)은 ammonia, amine, halide ion 및 cyanide ion과 쉽게 복합체

慶尙大學校 農科大學 農化學科

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Gyeongsang National university,
Chin Ju 660-701, Korea.

를 형성하며 sulfur, phosphorus 및 selenium과도 쉽게 반응하고 phosphate, 단백질의 cytenyl histidyl side group, purine, pteridine 및 porphyrine과 같은 ligand에 대단히 강한 친화력을 지니는 것으로 알려지고 있다.²⁾

이와같이 중금속은 많은 생화학적 경로에 작용함으로써, 기능적인 sulfhydryl기를 지닌 효소를 저해하거나 핵산의 입체구조에 영향을 주기도 하고, oxidative phosphorylation의 경로를 분해시키기도 하며 몇몇 효소에는 오히려 중금속 이온이 catalytic activity를 높여 주기도 하는 것으로 보고되고 있다.²⁾

이상과 같이 세포내 카드뮴의 도입, 축적과정, 적응 및 해독작용은 모두 에너지 의존 기작일 뿐만 아니라 많은 생리, 생화학적 변화가 수반 되어지며 세포내에 흡수된 카드뮴의 세포내 분포에 대하여 조사한 연구에서 *Pseudomonas aeruginosa*에 의해 흡수된 카드뮴은 88%가 cytoplasm에 존재하며,³⁾ *Escherichia coli*에 의해 흡수된 카드뮴은 80%가 cytoplasm에 분포되어 있는 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ 그러나 *Enterobacter cloacae*에 의해 흡수된 카드뮴은 37%만이 cytoplasm에 존재하는 것으로 알려지고 있다.⁵⁾

본인들은 이미 경남 및 부산일대 오염지역의 폐수, sludge 및 토양으로부터 2,000ppm의 카드뮴을 함유한 고체배지에서 생육이 가능한 고도 카드뮴내성균을 분리, 동정하였으며 분리균의 균체내 카드뮴축적에 대해서 이미 보고한 바 있다. 따라서 본보에서는 카드뮴 내성균 *Pseudomonas putida* C1에 의해 세포내에 축적된 카드뮴의 세포 구성성분 중의 분포도를 조사하였으며, 그리고 카드뮴이 세포내 단백질합성에 미치는 영향을 조사한 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 사용 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 본인들이 분리, 동정한 카드뮴 내성균주 *Pseudomonas putida* C1을 사용하였다. 공시균의 배양은 500ml 진탕 플라스크에 Table 1과 같은 조성의 기본배지 100ml를 넣고 고압증기 살균후 냉각시킨 다음, 공시균을 접종하여

30°C에서 진탕배양하였다. 카드뮴첨가 실험에서는 배지를 살균, 냉각후 표준 카드뮴용액 (10,000ppm Cd²⁺)을 사용하여 일정한 카드뮴 농도가 되도록 무균적으로 첨가하여 공시균을 배양하였다.

Table 1. Composition of Basal Medium

Glucose	10g
Poly peptone	10g
Yeast extract	5g
NaCl	5g
D.W	1000ml
Agar	17g
pH	6.0

2. 균의 성장 및 카드뮴 측정

균의 성장은 균 배양액을 6,000rpm으로 10분간 원심분리로 균체를 회수하여 3회 세척한 후, 도가니에 넣어 105°C에서 48시간 건조시켜 건조균체량으로 나타내었다. 카드뮴의 정량은 전보에서와 같은 방법으로 하였다.

3. 세포 구성성분내 카드뮴의 분포조사

세포 구성성분내 카드뮴의 분포도를 조사하기 위하여 세포를 Fig. 1(Hiroyuki Horitsu et al., 1979)의 방법으로 분획하여 각 세포구성성분중의 카드뮴함량을 정량하였다.

즉 카드뮴을 100ppm의 농도로 첨가한 기본배지에 균체를 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 원심분리로 균체를 회수하여 증류수로 3회 세척한 다음, 22kHz로 20분간 초음파 파쇄한 후 8,000rpm의 속도로 원심분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리하였다. Insoluble fraction은 Fig. 2의 방법으로 6가지 성분으로 분류하였고, soluble fraction은 다시 40,000rpm의 속도로 120분간 원심분리하여 microsomal fraction과 supernatant fraction으로 분류하였으며, supernatant fraction은 NaCl을 농도 0.14M로 첨가하고 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 0.14%로 첨가한 다음 동량의 phenol을 가하여 30분간 stirring시킨 후 1,000rpm으로 10분간 원심분리하여 phenol layer와 water layer로 분리하였다.

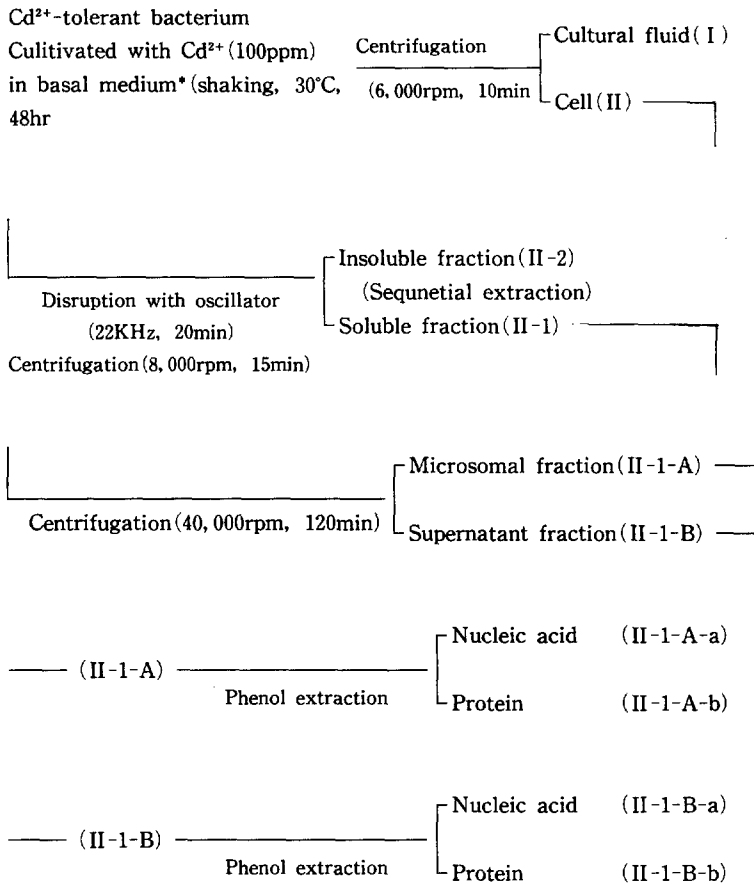


Fig. 1. Fractionation of bacterial components

* ; Basal medium : 1% Glucose, 1% Polypeptone, 0.5% Yeast extract
0.5% NaCl, pH 7.0

Water layer는 ethyl ether을 가하여 잔류 phenol 을 제거한 후 진공하에서 농축시켰다. Phenol layer는 동량의 ethanol을 가하여 1시간 동안 stirring 시킨 후에 8,000rpm의 속도로 10분간 원심분리하였다. Microsomal fraction은 증류수에 용해시킨 후 supernatant fraction과 같은 방법으로 phenol-SDS 처리를 하였다.

4. 세포내 단백질함량 측정

세포내 단백질함수에 카드뮴이 미치는 영향을 조사하기 위하여 카드뮴 무첨가 배지와 카드뮴을 100 ppm의 농도로 첨가한 배지에 균체를 접종하여 48

시간 진탕배양한 후, 원심분리로 균체를 회수하여 22kHz로 20분간 초음파 파쇄한 다음 6,000rpm의 속도로 20분간 원심분리하여 supernatant fraction에 30% ammonium sulfate를 가하여 포화시켜 4°C에서 3시간 동안 정치시킨 후, 6,000rpm의 속도로 20분간 원심분리하여 침전물을 제거한 다음 ammonium sulfate를 가하여 75%의 농도까지 포화시켜 5시간 정치시킨 후 8,000rpm의 속도로 30분간 원심분리하여 0.01M phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시켜 Beckman DU-70 Spectrophotometer를 사용하여 단백질함량을 정량하였다.

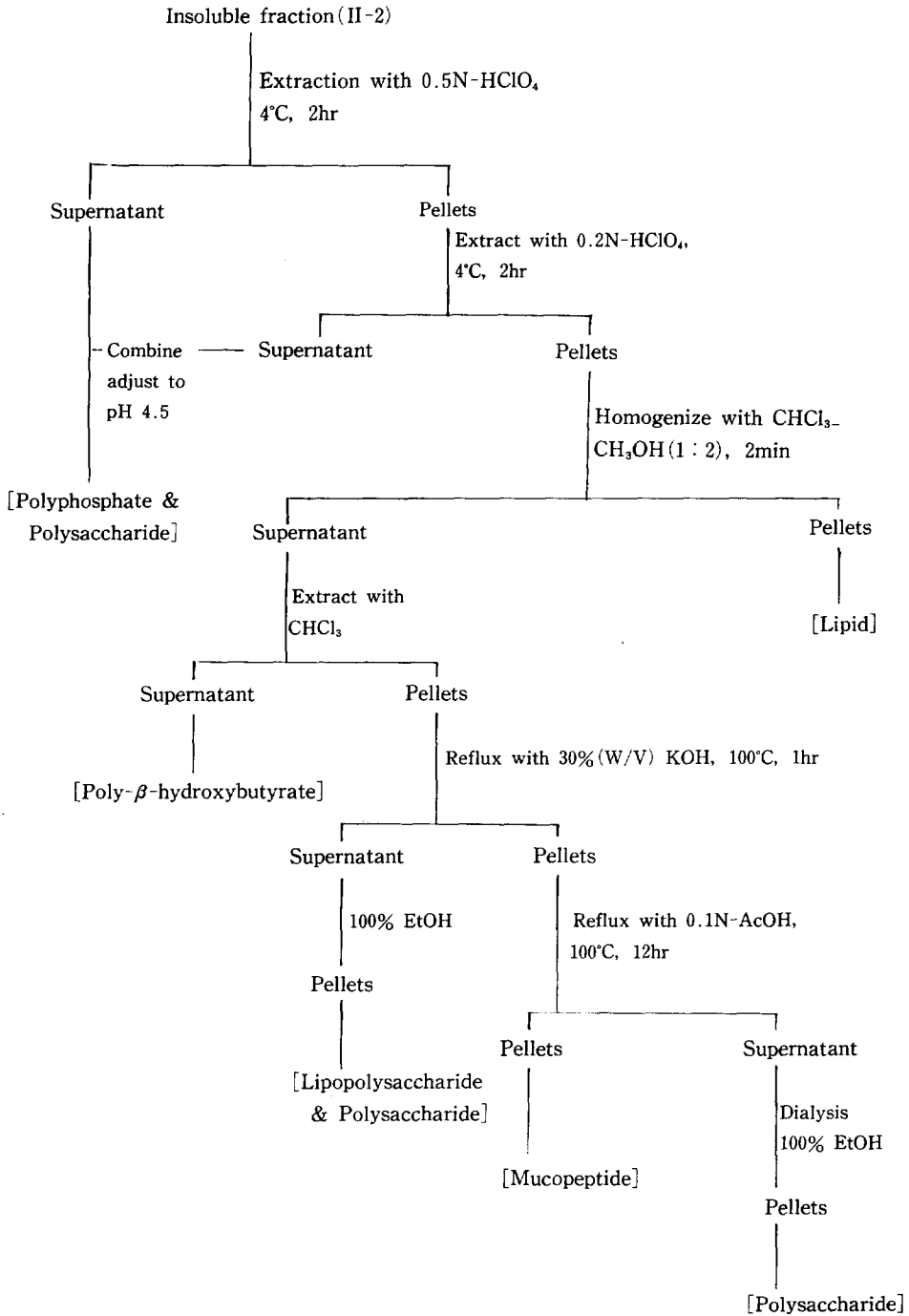


Fig. 2. Sequential extraction method for insoluble fraction.

5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

카드뮴 무첨가 배지와 카드뮴(100ppm)을 첨가한 배지에서 자란 균체의 protein pattern을 비교하기 위하여 균체 400mg에 대하여 4.6%(W/V) SDS (sodium dodecyl sulfate), 10% β-mercapto ethanol, 2% glycerol, 1.5% tris buffer and bromophenol blue 0.0001%가 포함된 sample solvent를 4mg넣고 22kHz로 20분 동안 초음파 파쇄한 다음 8,000rpm의 속도로 20분간 원심분리하여 supernatant fraction을 취하여 100°C에서 1분간 heating한 후 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동은 10%(W/V) acrylamide gel을 사용하여 각 lane당 50μl의 sample을 주입하여 stacking gel에서 100V로 40분간, resolving gel에서 160V로 6시간 전기영동시켰다. 전기영동 후 Coomassie

brilliant blue R-250(Sigma Co.)로서 2시간 염색시킨 후 methanol : water : acetate(30 : 63 : 7 v/v)의 용액에서 탈색시켰다.

結果 및 考察

1. 세포 구성성분내의 카드뮴분포

카드뮴이 함유된 배지에서 성장한 균체와 카드뮴이 함유되지 않은 배지에서 완전히 성장한 후 카드뮴을 처리한 균체의 세포내 카드뮴 축적양상을 조사하기 위하여 카드뮴이 함유되지 않은 배지에서 24시간 배양한 균체를 100ppm의 카드뮴을 첨가한 0.9% NaCl 용액에 가하여 30°C에서 48시간 진탕하였을 경우 균체내의 카드뮴 축적양상을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Cadmium distribution in cells.

Culture condition	Fraction	Amount of Cd ²⁺ (mg)	Distribution index (%)
Grown in medium containing 100 ppm Cd ²⁺ for 2 days	Whole cell	3.95	100.0
	Cell wall	2.24	56.7
	Cytoplasm	1.71	43.3
Grown in Cd ²⁺ free medium for 1 day and after that incubated in salian with 100ppm Cd ²⁺ for 2 days	Whole cell	2.96	100.0
	Cell wall	2.03	68.6
	Cytoplasm	0.93	31.4

카드뮴이 함유된 배지에서 자란 균체는 배지중 총 카드뮴함량의 약 40%가 균체내에 축적되었으며 축적된 카드뮴의 약 57%는 cell wall에, 약 43%는 cytoplasm에 존재하였다. 그러나 완전히 성장한 후 카드뮴을 처리한 균체는 배지중 총 카드뮴함량의 약 30%가 균체내에 축적되었으며 축적된 카드뮴의 약 69%가 cell wall에 존재하였고, 약 31%는 cytoplasm에 축적되어 있었다.

이와같은 결과를 미루어 볼때 분리균은 배지에 함유된 카드뮴을 증식하면서 흡수할 뿐만 아니라 완전히 성장한 균체도 카드뮴용액에 노출되면 카드뮴을 흡수하여 균체내에 축적하는 것으로 생각되었다.

균체내에 흡수된 카드뮴의 세포 구성성분내의 분포도를 조사하기 위하여 카드뮴이 함유된 배지에서 2일간 배양한 균체를 원심분리하여 회수한 뒤 Fig. 1의 방법에 따라 분류하여 카드뮴함량을 정량한 결과는 Table 3과 같다.

균체내에 축적된 총 카드뮴함량의 약 57%가 insoluble fraction(II-2)에 분포되어 있었고 약 43%는 Soluble fraction(II-1)에 분포되어 있었으며, soluble fraction(II-1)을 다시 Microsomal fraction(II-1-a)과 supernatant fraction(II-1-b)으로 분류하였을 때 microsomal fraction(II-1-a)에 약 65%가 분포되어 있었고 supernatant fraction(II-1-b)에 약 35%가 분포되어 있었다.

Table 3. Distribution of cadmium, protein and nucleic acid in cells.

Fraction	Cadmium(Index)		Components	
	(mg)	(%)	Protein(mg)	Nucleic acid(mg)
Culture Fluid (I)	5.90		-	-
Cells (II)	3.95(100)		-	-
Insoluble (II-2)	2.24(57.7)		-	-
Soluble (II-1)	1.71(43.3)		98.5	52.1
Microsomal (II-1-A)	1.12 (65)		42.8	31.2
Nucleic acid (II-1-A-a)	0.28		6.2	28.4
Protein (II-1-A-b)	0.84		36.6	3.8
Supernatant (II-1-B)	0.59 (35)		55.7	19.9
Nucleic acid (II-1-B-a)	0.13		6.4	17.8
Protein (II-1-B-b)	0.46		49.3	2.1

Table 4. Distribution of cadmium in insoluble(2 II-2)fraction.

Fraction	Cd ²⁺ (mg)	Index(%)
Insoluble(II-2)	2.24	100
Polyphosphate & Polysaccharide	1.89	84
Lipid	0.04	2
Poly-β-hydroxy-butyrate	-	-
Mucopeptide	-	-
Polysaccharide	0.24	11
Lipopolysaccharide & Polysaccharide	0.07	3

Microsomal fraction과 supernatant fraction을 phenol extraction 방법에 의하여 nucleic acid와 protein으로 구분하여 측정된 결과 두 성분 모두에 카드뮴이 분포되어 있는 것으로 나타났다.

그리고 insoluble fraction(II-2)에 축적된 카드뮴함량을 Fig. 2의 방법에 따라 분류하여 측정된 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 insoluble fraction에 축적된 카드뮴의 약 84%가 polyphosphate-polysaccharide fraction에 분포되어 있었다.

카드뮴을 첨가한 배지와 카드뮴을 첨가하지 않은 배지에서 성장한 균체의 세포구성성분의 변화를 비교한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같이 세포내 protein 함량은 카드뮴을 첨가한 배지에서 자란 균체가 카드뮴을 첨가하지 않았을때 보다 약 35% 정도 감소하였으며, nucleic acid는 약 39% 감소되었다.

Table 5. Cadmium, protein and nucleic acid in soluble fraction of cells. (mg)

Fraction	With cadmium ¹⁾			Without cadmium ²⁾	
	Cd ²⁺	Protein	Nucleic acid	Protein	Nucleic acid
Soluble (II-1)	1.71	98.5	52.1	152.8	83.4
Microsomal (II-1-A)	1.12	42.8	32.2	74.5	52.7
Supernatant (II-1-B)	0.59	65.7	19.9	78.3	30.7

1) : Cell dry weight 384mg/100ml-culture

2) : Cell dry weight 518mg/100ml-culture

2. Protein 합성에 미치는 카드뮴의 영향

세포내 protein 합성에 미치는 카드뮴의 영향을 검토하기 위하여 카드뮴을 첨가하지 않은 배지와 카드뮴(100ppm)만 첨가한 배지 그리고 카드뮴(100ppm)과 0.1% Triton X-100을 첨가한 배지에서 배양한 균체의 protein 함량을 분석 비교한 결과는 Table 6과 같다.

세포내 protein 함량은 카드뮴을 첨가함으로써 감소되었으며 카드뮴과 Triton X-100을 첨가하였을 경우 protein 함량은 카드뮴만 첨가한 경우에 비하여 더 감소되었다. 이와같은 결과는 세포내 protein 합성은 카드뮴에 의하여 저해되며 Triton X-100을 처리함으로써 protein 합성이 더 강하게 저해된다는 것을 알 수 있었다.

Table 6. Protein content in the cells grown in medium with or without cadmium.

Culture condition	Protein content	
	in the cells (mg/g of dry cells)	Index
Cadmium free	146.9	100
With cadmium (100ppm)	85.9	58
With cadmium (100ppm) +0.1% Triton X-100	82.7	56

따라서 Triton X-100을 처리함으로써 균체내의 카드뮴 축적량이 증가되는 것은 Triton X-100이 세포막 투과성의 활성을 증진시키기 때문이라 생각되었다.

Ammonium sulfate((NH₄)₂SO₄)을 포화시킨 soluble protein의 pattern을 조사하기 위하여 카드뮴이 100ppm 농도로 함유된 기본배지에서 성장한 균체로부터 분리한 soluble protein을 각각 4 mg/ml로 조정된 후 ammonium sulfate saturation한 결과는 Table 7과 같다.

Ammonium sulfate(0-30% saturation)로 포화시켜 얻어진 침전물과 ammonium sulfate(30-75% saturation)로 포화시켜 얻어진 supernatant의 soluble protein의 함량은 카드뮴이 함유된 배지에서 성장한 균체가 카드뮴이 첨가되지 않은 배지에서 성장한 균체보다 더 감소하였다. 그러나 ammonium sulfate(30-75% saturation)에 의하여 침전되는 soluble protein의 함량은 카드뮴이 함유된 배지에서 성장한 균체가 더 증가되었다. 세포내 총 protein 함량은 Table 5에서 보는 바와 같이 카드뮴(100ppm)에 의하여 감소되었으나, ammonium sulfate(30-75% saturation)에 의하여 침전되는 soluble protein의 함량은 증가되었다. 따라서 카드뮴 첨가배지에서 배양된 세포에는 고분자 soluble protein이 카드뮴 무첨가배지에서 성장한 균체에서 보다 증가되었으나 저분자 protein은 감소되는 것으로 추측되었다.

Table 7. Ammonium sulfate fractionation of soluble protein. (mg)

Culture condition	0-30% (NH ₄) ₂ SO ₄		30-75% (NH ₄) ₂ SO ₄		Total protein
	Precipitate		Precipitate	Supernatant	
Cells grown without cadmium	18.91 (18.0)		43.54 (41.5)	42.38 (40.4)	104.83 (100)
Cells grown 100ppm of cadmium	17.25 (16.2)		49.68 (46.9)	39.26 (36.9)	106.19 (100)

() : Index

3. Soluble protein의 electrophoretic pattern

카드뮴이 함유된 배지에서 성장한 균체와 카드뮴 무첨가배지에서 성장한 균체에서 분리한 soluble protein을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 protein pattern은 거의 비슷했으나 약 34KD 부근의 protein pattern이 약간 더 증가하는 것으로 나타났으며, 따라서 이 부근의 protein은 cadmium-binding protein이거나, 카드뮴 존재하에서 생존을 위한 대사작용에 중요한 역할을 하는 protein으로 생각되었다.

摘 要

카드뮴내성균인 *Pseudomonas putida* C1의 세포내 카드뮴 축적기작을 구명하기 위하여 균체내 축적된 카드뮴의 세포 구성성분별 분포도, 단백질 함량변화 및 세포구성물질의 변화를 조사한 결과, 세포내에 축적된 카드뮴의 약 57%는 cell wall에 분포되어 있었으며 약 43%는 cytoplasm에 분포되어 있었다. Cytoplasm에 축적된 카드뮴은 protein과 nucleic acid 두 성분 모두에 분포되어 있었으며, cell wall에 축적된 카드뮴의 약 84% 이상이 polyphosphate-polysaccharide fraction에 분포되어 있는 것으로 나타났다.

세포내 protein 합성에 미치는 카드뮴의 영향을 조사한 결과, 카드뮴 무첨가배지에서 성장한 균체와 카드뮴이 함유된 배지에서 성장한 균체의 세포내 protein 함량은 카드뮴을 첨가함으로써 감소되

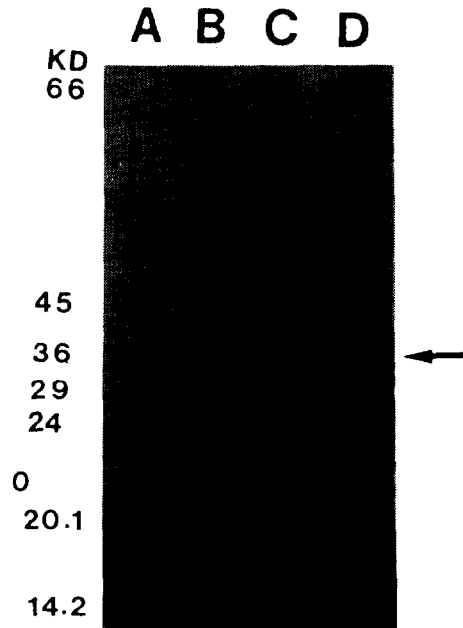


Fig. 3. Gel electrophoresis soluble protein of prepared cells cultivated with or without Cd²⁺.

A ; standard B ; without cadmium
 C ; with cadmium(100ppm)
 D ; with cadmium(100ppm)+0.1% Triton X-100
 → ; Cd²⁺ affected protein
 Protein was stained 0.2% Coomassie brilliant blue R-250

었으나, ammonium sulfate(30~75% saturation)에 의하여 침전되는 soluble protein의 함량은 카드뮴을 첨가한 배지에서 성장한 균체에서 더 증가되었다. 고분자 가용성 단백질은 카드뮴 첨가배지에서 배양된 세포가 카드뮴 무첨가 배지에서 배양된 세포에 비하여 증가되었으나, 저분자 단백질은 감소되었다. 따라서 세포내 protein의 합성은 카드뮴에 의하여 감소되었으나 ammonium sulfate (30-75% saturation)에 의하여 침전되는 고분자 단백질의 합성은 카드뮴에 의하여 촉진되는 것으로 나타났다.

參考文獻

1. Oda, M., and K. Minami. 1978. Isolation and identification of cadmium ion-tolerant microorganisms and accumulation of cadmium ion by the cells. J. Ferment. Technol. 46, 1046~1055.
2. Vallee, B., and D.D. Ulmer, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead, Ann. Rev. Biochem. 41, 91~128.
3. Horitsu, H., H. Kato and M. Tomoyeda, 1979. Uptake of cadmium by a cadmium chloride-tolerant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. J. Ferment. Technol. 57, 273~279.
4. Khazaeli, M.B. and R.S. Mitra, 1981. Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion. Appl. Environ. Microbiol. 41, 46~50.
5. Kim, Y.B. and S.R. Lee, 1976. Isolation of cadmium-tolerant bacteria and accumulation of cadmium into the bacterial cell. Korean. J. Appl. Microbiol. Bioeng, 4, 111~115.
6. Nagayma, T. and T. Kurechi, 1979. The effects of heavy metals on the microorganisms in river water. Eisei Kagaku. 25, 289~294.
7. Gadd, G.M. and A.J. Griffiths, 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. Microbial Ecol. 4, 303~317.
8. Yu, T.S. and H.I. Song 1990. Effect of cadmium on protein synthesis of cadmium-ion tolerant *Hansenula anomala B-7*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech. 18, 239~243.
9. Macaskie, L.E., and A.C.R. Dean, 1984. Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.*, J. Gen. Microbiol. 130, 53~62.
10. Komura, I., and K. Izaki, 1971. Mechanism of mercuric chloride resistance in microorganism. J. Biochem. 70, 885~893.
11. Kimura, I., T. Funaba, and K. Izaki, 1971. Mechanism of mercuric chloride resistance in microorganisms. J. Biochem. 70, 895~901.
12. Kimura, A., K. Arima and K. Murata, 1981. Biofunctional change in yeast cell surface on treatment with Triton X-100. Agric. Biol. Chem. 45, 2627~2629.
13. Mitra, R.S., R.H. Gray, B. Chin and I. A. Bernstein, 1975. Molecular mechanisms of accommodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd²⁺. J. Bacteriol. 121, 1180~1188.
14. Lee, K.S., I.G. Song., Y.S. Park and Y.K. Choi, 1990. Physio-biochemical changes correlated with cadmium adaptation and detoxification mechanisms in *Klebsiella aerogenes*. Kor. Jour. Microbiol. 28, 249~257.
15. Andrews, P., 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a side range. Biochem. J. 96, 595~606.
16. Kaneta, M., H. Hikichi, S. Endo and N. Sugiyama, 1983. Isolation of a

cadmium-binding protein from cadmium-treated rice plants (*Oryza sativa*). Agric. Biol. Chem., 47, 417~418.

17. Yoshida, S., 1986. Isolation and partial

characterization of a cadmium-binding protein in soybeans from a cadmium-polluted field. Agric. Biol. Chem. 50, 2273~2278.