

물리화학적 전처리에 의한 중금속 내성세균의 균체내 중금속 축적 변화

조 주 식, 이 홍 재*, 허 종 수*
순천대학교 농화학과, 경상대학교 농화학과*

Heavy Metal Accumulation in Cell of Heavy Metal-Tolerant Bacteria by Some Physical and Chemical Treatments

Ju-Sik Cho, Hong-Jae Lee* and Jong-Soo Heo* (Dept. of Agricultural Chemistry, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea, *Dept. of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chin Ju 660-701, Korea)

Abstract : Heavy metal-tolerant microorganisms, such as *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* and *P. stutzeri* which possessed the ability to accumulate cadmium, lead, zinc and copper, respectively, were isolated from industrial wastewaters and mine wastewaters polluted with various heavy metals. Metal binding sites in the cells were investigated by extracting the components of the cells through pretreatments with hot water, acid, alkali, chloroform-methanol or chloroform-methanol/concentrated alkali.

The heavy metal accumulation was drastically decreased by pretreatment with alkali or chloroform-methanol/concentrated alkali, but the heavy metal accumulation was not changed by pretreatment with chloroform-methanol. The amount of heavy metal accumulation was remarkably decreased by decreasing crude protein remaining in the cell. These results suggested that proteins of cell components played an important role on the heavy metal accumulation.

서 론

미생물에 의한 중금속의 축적은 일반적으로 세포 표면에 존재하는 음이온 그룹에 양이온인 중금속이 결합함으로써 세포표면에 흡착되는 과정과 미생물 대사작용에 의하여 세포내부로 흡수되는 과정에 의하여 일어나며 세포내부로의 중금속 흡수는 온도, 에너지등과 관련된 물질대사에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있다.¹⁾

미생물 세포표면에서의 중금속 흡착은 세포벽의 단백질과 지질, peptidoglycan, teichoic acid, 다당류 등의 음전하를 띠고 있는 관능기에 주로 결합흡착되며 그 중에서도 carboxyl group, phosphoryl group 및 sulfhydryl group이 중요한 중금속 결합 부위들인 것으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 그리고 중금속 음이온은 단백질에 존재하는 amine group, imidazole group과 핵산에 존재하는 purine과 pyrimidine ring의 amine group과 heterocyclic nitrogen에 결합되는 것으로 알려져 있다.⁵⁾

최근 미생물 세포내 중금속 이온의 축적기작을

구명하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, Nakajima등⁶⁾은 미생물이 중금속 이온을 흡수하는 기작을 구명하기 위하여 *Chlorella regularis*를 여러 가지 물리 화학적인 방법으로 전처리하여 세포 구성성분을 인위적으로 조절한 후 세포내 중금속이온의 흡수거동을 비교 조사하기도 하였다. Tobin등⁷⁾도 *R. arrhizus*가 여러가지 금속이온을 흡수하며 이는 세포의 phosphate, carboxylate 및 다른 functional group 부위와 밀접한 관련이 있다고 하였으며, Mera등⁸⁾은 *B. subtilis*가 강한 금속결합능력을 가지는 이유는 세포벽이 phosphate, peptidoglycan 및 glycerol-based teichoic acid 등으로 이루어져 있어 표면에 강한 음전하를 띠기 때문이라고 하였다. 그리고 Kuyucak등⁹⁾은 해조류인 *Ascophyllum nodosum*의 Co 흡수기작을 밝히면서 *Ascophyllum nodosum*의 구성성분중 alginic acid 성분이 Co 흡착에 중요한 역할을 한다고 하였으며, Strandberg등¹⁰⁾은 원자력 발전소의 폐수중 방사능 물질을 세균을 이용하여 생흡착시키는 연구와 생물흡착 기작을 구명하는 연구를 하였으며, 최근에

는 Muraleedharan⁴⁾ 등이 *Ganoderma lucidum*이 Cu^{2+} 을 흡착하는 기작을 체계적으로 구명하였다.

따라서, 본 연구는 본 실험실에서 이미 분리한 중금속내성균의 세포내 중금속 결합위치를 구명하기 위하여 전보¹³⁾에 이어서 여러가지 물리화학적인 방법으로 세포를 전처리하여 세포구성 성분을 인위적으로 조절한 후 세포내 중금속 이온의 흡수거동 및 조단백질함량과 중금속 축적과의 관계를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시 중금속 내성균주 및 배지

본 실험에 사용한 중금속 내성균주는 본인들이 광산폐수 및 산업폐수로부터 이미 분리한 Cd, Pb, Zn 및 Cu 내성균주인 *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* 및 *P. stutzeri*를 사용하였으며¹²⁾, 균주의 배양은 기본배지 (glucose 10g, polypepton 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, D.W. 1000ml, pH 6.0)에 중금속을 필요한 농도로 첨가한 액체배지를 사용하였다.

2. 균체의 중금속처리

균체의 중금속 처리는 각 중금속 화합물(CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 , CuSO_4)을 중금속이온 농도로서 10g/l 이 되게 조제한 표준용액을 다시 일정한 농도가 되도록 멸균증류수로 희석 조제하여 처리하였다.

3. 중금속 분석

균체내에 축적된 중금속 축적량과 용액중에 남아있는 중금속 잔존량은 Cho 등¹³⁾과 같은 방법으로 시료를 atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu AA-680, Japan) 및 inductively coupled plasma spectrometer (ICP, Atomscan25, TJA, U.S.A.)로 정량하였다.

4. 세포 전처리에 따른 균체내 중금속 축적 및 조단백질 함량 변화

세포 전처리에 따른 균체내 중금속 축적변화는 공시균주들을 Nakajima 등의 방법⁶⁾에 따라 다음과 같은 여러가지 물리 화학적인 방법으로 전처리한 다음, 중금속이 100mg/l 의 농도로 첨가된 용액에 처리하여 30℃에서 진탕시키면서 처리시간에 따른 중금속 축적 양상을 비교 조사하였다.

전처리된 균체내의 조단백질 함량은 전처리된 각 균체 50mg에 습식분해 ($\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4 : \text{HClO}_4 = 10 : 1 : 4$) 10ml을 첨가하여 hot plate상에서 완전히 분해시킨 후 kjeldahl법으로 총 질소함량을

로서 측정하였다.

(1) 열수에 의한 전처리

중금속이 첨가되지 않은 기본배지에서 48시간 배양한 균체를 원심분리기로 회수하여 100℃의 멸균 증류수로 1시간 열수처리한 다음, 원심분리하지 않은 상태 그대로 중금속을 100mg/l 농도가 되도록 처리한 균체와 원심분리하여 상등액은 버리고 균체만을 중금속이 100mg/l 첨가된 용액에 처리한 균체의 중금속 축적 양상을 처리 시간별로 조사하였다.

(2) 산 용액에 의한 전처리

중금속이 첨가되지 않은 기본배지에서 48시간 배양한 균체를 원심분리기로 회수하여 0.1N-HCl 용액 50ml을 첨가하여 실온의 shaker에서 1시간 전처리하여 원심분리하여 균체를 회수한 다음, 멸균증류수로 수회 세척하여 균체의 pH를 중성부근으로 중화시킨 후, 중금속이 100mg/l 의 농도로 첨가된 용액에 처리하여 30℃에서 진탕시키면서 처리시간에 따른 균체내 중금속 축적 양상을 조사하였다.

(3) 알칼리 용액에 의한 전처리

중금속이 첨가되지 않은 기본배지에서 48시간 배양한 균체를 원심분리기로 회수하여 0.1N-NaOH 용액 50ml을 첨가하여 shaker에서 실온으로 1시간 전처리하여 원심분리기로 균체를 회수한 다음, 멸균증류수로 수회 세척하여 균체의 pH를 중성부근으로 중화시킨 후, 중금속이 100mg/l 의 농도로 첨가된 용액에 접종하여 30℃에서 진탕시키면서 처리시간에 따른 균체내 중금속 축적 양상을 조사하였다.

(4) 클로로포름-메탄올에 의한 전처리

중금속이 첨가되지 않은 기본배지에서 48시간 배양한 균체를 원심분리기로 회수하여 65℃ 메탄올 10ml을 10분간 처리한 다음 실온에서 냉각시킨 후, 다시 클로로포름 20ml을 재차처리하여 실온에서 20분간 방치한 후 10ml의 클로로포름-메탄올(2:1) 혼합용액을 처리하여 실온에서 20분간 방치한 다음, 원심분리기로 균체를 회수하여 멸균증류수로 수회 세척한 다음 중금속이 100mg/l 농도로 첨가된 용액에 처리하여 30℃에서 진탕시키면서 처리시간에 따른 균체내 중금속 축적 양상을 조사하였다.

(5) 클로로포름-메탄올/고농도 알칼리 용액에 의한 전처리

클로로포름과 메탄올에 의해 전처리된 균체에 24%-KOH용액 10ml을 처리하여 25℃, 질소가스 기류하에서 연속적으로 shaking시키면서 2시간 처

리한 다음 원심분리하여 멸균 증류수로 수회 세척하여 균체의 pH를 중성부근으로 중화시킨 후, 중금속이 100mg/l의 농도로 첨가된 용액에 처리하여 30°C에서 진탕시키면서 처리시간에 따른 균체내 중금속 축적 양상을 조사하였다.

5. 세포 전처리에 따른 균체내 아미노산 조성변화

세포 전처리에 따른 균체중 아미노산 조성분석은 Sparkman 등의 방법¹⁴⁾에 따라 시료를 전처리하여 amino acid analyzer(LKB-Biochrome 20, Pharmacia, England)로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 전처리에 따른 균체량 변화

미생물을 전처리하여 세포내 구성성분을 인위적으로 조절함으로써 세포 구성성분중 중금속 이온이 결합하는 부위를 추정할 수가 있으며, 균체를 열수로 전처리하면 oligo당과 다당류, 단백질 및 기타 저분자 물질들이 추출되어 나오며, 클로로포름과 메탄올로 전처리하면 지질성분이 주로 추출되고, 산과 알칼리로 전처리하면 단백질과 다당류가 추출되는 것으로 알려져 있다. 그리고 클로로포름과 메탄올로 전처리한 다음 다시 고농도의 알칼리 용액으로 재

Table 1. Dry weight of cells treated with physico-chemical reagent. (Unit : mg)

Heavy metal tolerant microorganisms	whole dry cells	Physico-chemical treatment of the cells				
		Hot water	0.1N -HCl	0.1N -NaOH	Chloroform +methanol	Chloroform +methanol /24% KOH
<i>P. putida</i> (Cd)	256 (100)	191 (74.6)	205 (80.1)	107 (41.8)	207 (80.9)	87 (34.0)
<i>P. aeruginosa</i> (Pb)	292 (100)	206 (70.6)	246 (84.3)	136 (46.6)	242 (82.9)	130 (44.5)
<i>P. chlororaphis</i> (Zn)	246 (100)	171 (69.5)	223 (90.7)	98 (39.8)	220 (89.4)	87 (35.4)
<i>P. stutzeri</i> (Cu)	225 (100)	166 (73.8)	198 (88.0)	84 (37.3)	176 (78.2)	69 (30.7)

() : Index

차 처리하면 단백질과 지질이 추출되어 나오는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

세포 전처리 방법에 따른 균체량의 변화를 조사한 결과는 Table 1에서 보는바와 같이 전처리하지 않은 균체에 비하여 열수, 0.1N-HCl 및 클로로포름과 메탄올로 전처리한 균체의 경우 공시균주의 균체량은 약 10~30%가 감소되었고, 0.1N-NaOH 및 클로로포름과 메탄올로 전처리한 다음 다시 24%-KOH로 전처리한 균체의 경우에는 균체량이 약 55~70%가 감소되어 알칼리로 전처리 하였을 경우

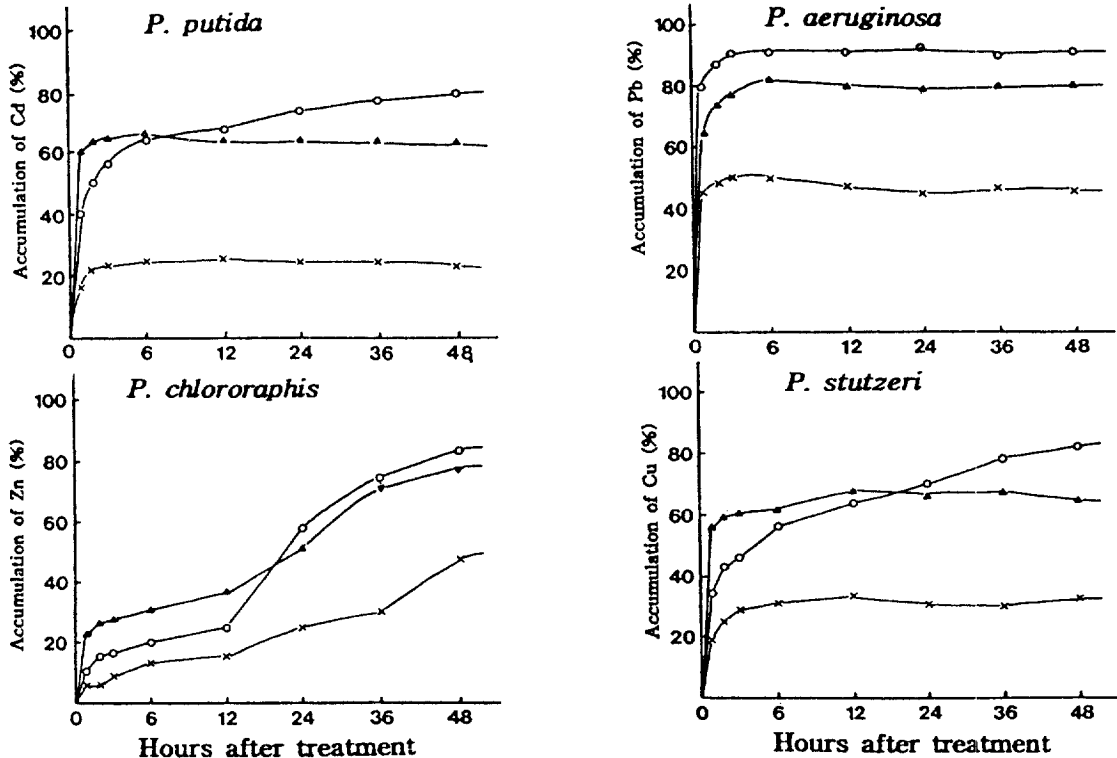


Fig. 1. The effect of pretreatment of the cells with hot water on accumulation of heavy metals. ○ : Control Δ : Hot water X : Hot water and centrifugation

와 클로로포름과 메탄올로 전처리한 다음 다시 고농도의 알칼리로 재차 처리하였을 경우에 균체량이 매우 크게 감소되었다. 이러한 결과는 Nakajima등⁶⁾이 *Chlorella regularis*를 여러가지 물리화학적 방법으로 전처리 하였을 경우 알칼리로 처리하였을때 초기 균체량의 약 51%가 남아있었으며, 클로로포름과 메탄올로 전처리한 다음 다시 알칼리로 전처리 하였을 경우에는 약 23%가 남아있었다는 보고와 거의 유사한 경향이었다.

2. 세포 전처리에 따른 중금속 축적 변화

중금속이 첨가되지 않은 기본배지에서 배양한 균체를 열수처리하지 않은 균체와 열수로 1시간 전처리하여 원심분리하지 않고 그대로 중금속을 100mg/l 되도록 처리한 균체, 그리고 열수처리 후 원심분리하여 상등액은 버리고 균체만 중금속이 100mg/l 첨가된 용액에 처리한 균체들의 중금속 축적 변화를 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는바와 같이 열수처리하지 않은 Cd, Pb, Zn 및 Cu 내성균주의 처리 48시간 후 Cd, Pb, Zn 및 Cu 축적율은 각각 약 82%, 89%, 84% 및 80%였으며, 열수처리 후 원심분리하지 않은 균체의 중금속 축적율은 각각 약 63%,

78%, 77% 및 62%로서 열수처리하지 않은 균체와 비교해 볼때 각 중금속 축적율이 약 20%정도 감소되었는데, 이러한 차이는 열수처리로 인하여 세포내 중금속 결합능력이 있는 물질들이 용출되었기 때문에 순간적인 흡착은 높게 일어나지만, 균체가 사멸되었기 때문에 대사작용에 의하여 세포내로 흡수되는 과정은 일어나지 않았기 때문인 것으로 생각되었다. 그리고 oligo당과 단백질, 다당류 및 기타 저분자 물질등 세포 내용물의 25~30%가 추출된 열수처리 후 원심분리한 균체(Table 1)는 처리 48시간 후 Cd, Pb, Zn 및 Cu의 축적율은 각각 약 21%, 45%, 47% 및 29%로서 열수처리하지 않은 균체와 열수처리 후 원심분리하지 않은 균체에 비하여 상당히 감소되었으며, 이러한 결과는 열수처리에 의하여 균체에서 용출되는 물질이 중금속 축적과 상당히 관련이 있는 것으로 생각이 되었으며, Nakajima등⁶⁾이 *Chlorella regularis*를 이용하여 9종류의 이온들이 혼재된 수계로부터 UO_2^{2+} 이온을 분리하는 과정에서 열수처리한 세균체의 UO_2^{2+} 흡수량이 열수처리하지 않은 세균체보다 2배정도 많았다는 연구결과와는 상반된 결과를 나타내었다.

균체를 0.1N-HCl용액과 0.1N-NaOH용액으로 전

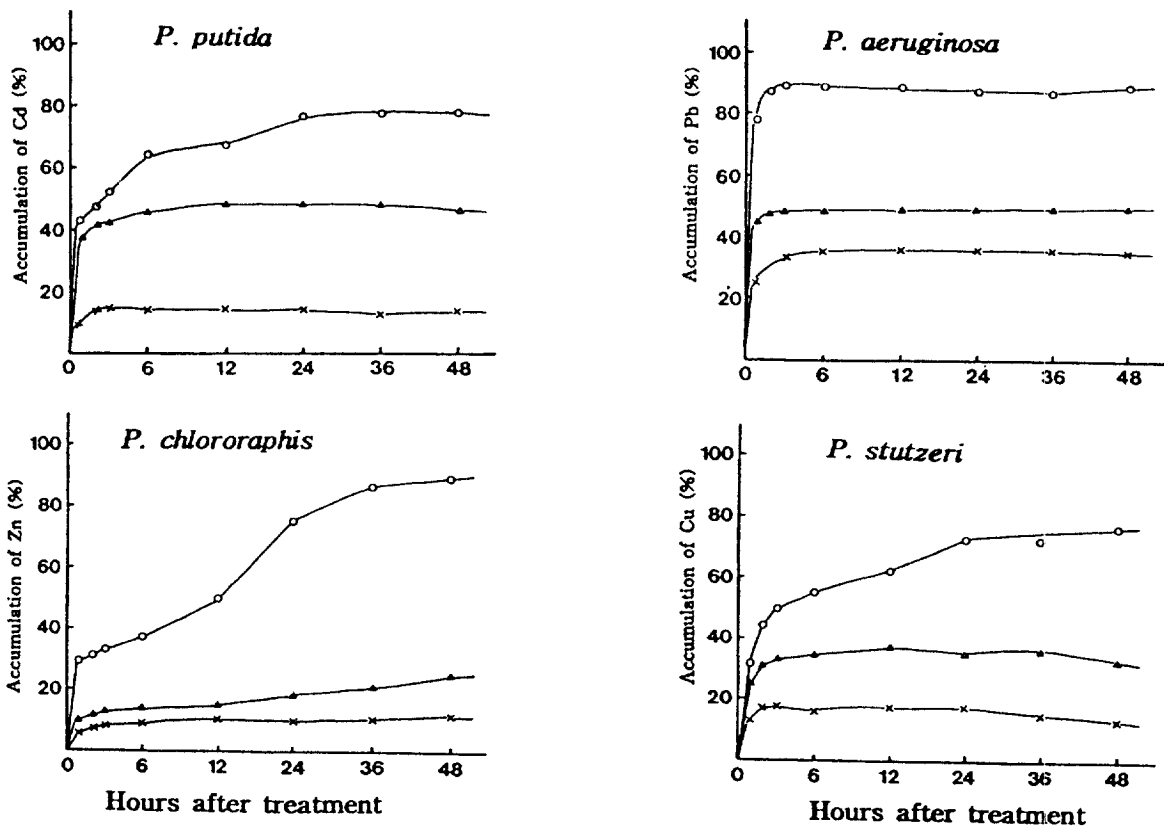


Fig. 2. The effect of pretreatment of the cells with acid or alkali solution on accumulation of heavy metals. ○ : Control Δ : 0.1N-HCl X : 0.1N- NaOH

처리 하였을 경우, 처리 시간에 따른 중금속 축적 양상은 Fig. 2에서 보는바와 같이 단백질과 다당류 등 10~20%의 세포 내용물이 추출된(Table 1) 0.1N-HCl용액으로 전처리한 Cd, Pb, Zn 및 Cu 내성균체의 처리 48시간 후 Cd, Pb, Zn 및 Cu 축적율은 각각 약 40%, 48%, 25% 및 38%였으며, 0.1N-NaOH용액에 의하여 단백질등 37~46%의 세포 내용물이 추출된 균체(Table 1)의 중금속 축적율은 각각 약 15%, 32%, 13% 및 16%로서 전처리하지 않은 균체에 비하여 크게 감소되었으며, 0.1N-HCl용액으로 전처리하였을 경우에 비하여 0.1N-NaOH용액으로 전처리 하였을 경우 더 크게 감소되었다.

그리고 클로로포름과 메탄올로 전처리한 균체와 클로로포름과 메탄올로 전처리한 다음 다시 24%-KOH용액으로 처리한 균체의 중금속 축적율은 Fig. 3에서 보는바와 같이 지질등 10~22%의 세포 내용물이 추출된 것으로 추정되는(Table 1) 클로로포름과 메탄올로 전처리한 Cd, Pb, Zn 및 Cu 내성균체의 처리 48시간 후 Cd, Pb, Zn 및 Cu 축적율은 각각 약 60%, 77%, 79% 및 53%로서 전처리하지 않은 균체에 비하여 큰 차이가 나지 않았으나, 클

Table 2. Change of crude protein contents in the cells by physico-chemical treatment. (Unit : mg)

Heavy metal tolerant microorganisms	whole dry cells	Physico-chemical treatment of the cells				
		Hot water	0.1N -HCl	0.1N -NaOH	Chloroform +methanol	Chloroform +methanol /24% KOH
<i>P.putida</i> (Cd)	42.9 (100)	24.5 (57.1)	29.8 (69.5)	15.5 (36.1)	35.5 (82.8)	12.7 (29.6)
<i>P.aeruginosa</i> (Pb)	41.5 (100)	30.2 (72.8)	31.4 (75.7)	19.2 (46.3)	40.1 (96.6)	15.7 (37.8)
<i>P.chlororaphis</i> (Zn)	47.5 (100)	35.4 (74.5)	14.7 (31.0)	13.1 (27.6)	42.8 (90.1)	14.9 (31.4)
<i>P.stutzeri</i> (Cu)	43.7 (100)	30.2 (69.1)	26.4 (60.4)	16.4 (37.5)	35.3 (80.8)	15.4 (35.2)

() : Index

로로포름과 메탄올로 지질을 추출한 다음 다시 고농도의 알칼리 처리로 단백질이 추출되어 56~70%의 세포 내용물이 추출된 Cd, Pb, Zn 및 Cu 내성균체(Table 1)의 Cd, Pb, Zn 및 Cu 축적율은 각각 약 8%, 21%, 19% 및 17%로서 전처리하지 않은 균체와 메탄올과 클로로포름처리에 의하여 지질이

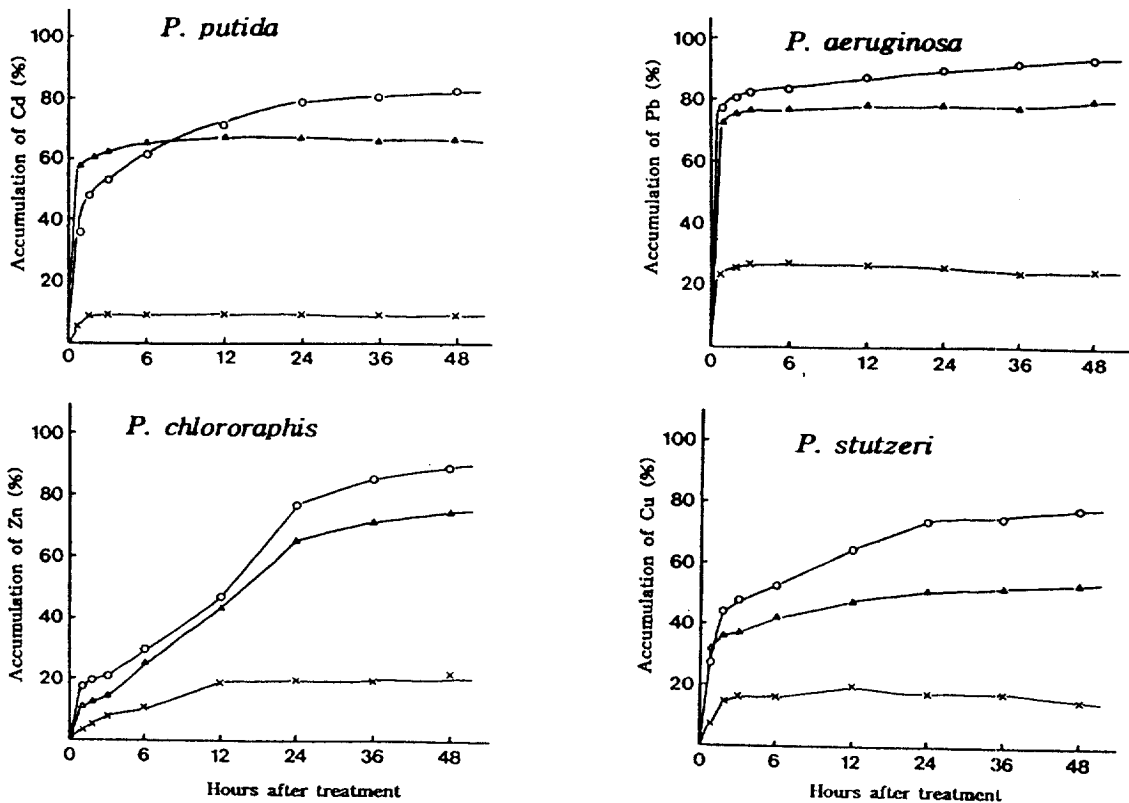


Fig. 3. The effect of pretreatment of the cells with chloroform+methanol or chloroform + methanol / concentrated alkali on accumulation of heavy metals.

- : Control
- △ : Chloroform+methanol
- × : Chloroform+methanol / 24% KOH

Table 3. Change of amino acid compositions in heavy metal-tolerant microorganisms by physico-chemical treatment.

(Unit : mg/g)

Amino acid	Physico-chemical treatment of the cells											
	<i>P. putida</i>						<i>P. aeruginosa</i>					
	Control	Hot water	0.1N -HCl	0.1N -NaOH	Chloroform +methanol	Chloroform +methanol /24% KOH	Control	Hot water	0.1N -HCl	0.1N -NaOH	Chloroform +methanol	Chloroform +methanol /24% KOH
Asx.	27.2	31.1	29.8	20.9	24.1	20.5	45.2	39.6	44.1	33.6	48.2	28.7
Thr.	9.7	13.8	13.2	10.3	10.9	9.1	16.6	15.4	17.2	15.4	14.2	13.6
Ser.	7.4	9.9	9.4	7.9	8.3	7.5	12.6	11.7	9.4	8.2	16.7	13.5
Glx.	29.4	36.5	31.5	25.2	20.6	17.5	50.8	47.8	43.6	39.5	60.5	36.7
Pro.	7.5	10.2	9.6	8.5	3.2	3.0	4.7	6.9	5.3	6.4	8.9	4.3
Gly.	14.5	20.6	21.7	16.1	16.1	13.3	14.3	14.8	17.8	14.3	15.6	11.6
Ala.	33.9	49.4	47.3	46.2	48.1	32.7	60.8	65.7	68.6	45.6	63.6	33.4
Cys.	4.6	4.3	3.9	2.1	4.5	1.8	8.3	7.5	6.3	4.3	7.8	3.8
Val.	14.8	22.6	21.6	19.5	16.4	13.6	20.8	24.7	25.5	18.7	24.9	21.9
Met.	0.1	1.2	1.3	0.1	0.6	0.5	10.8	8.8	9.7	9.7	11.7	6.2
Ile.	9.2	14.2	13.6	11.1	10.3	8.6	25.5	26.7	23.7	22.6	27.6	18.4
Leu.	18.0	27.2	26.5	23.5	20.5	17.5	23.7	25.7	26.3	25.7	28.9	21.9
Tyr.	6.3	8.3	7.8	6.7	6.8	7.2	7.8	8.5	9.6	12.6	8.6	7.6
Phe	9.2	12.8	12.4	11.2	9.7	9.8	15.7	17.5	18.6	11.5	11.7	9.9
His.	4.0	6.1	5.9	5.1	4.6	3.8	10.6	11.6	11.4	9.7	11.8	13.6
Lys.	17.9	19.5	18.1	13.5	13.9	1.2	27.1	23.5	24.3	17.8	29.6	4.8
Arg.	18.9	19.4	19.2	16.4	15.6	1.4	19.9	22.7	23.6	21.9	18.7	14.5

Amino acid	Physico-chemical treatment of the cells											
	<i>P. chlororaphis</i>						<i>P. stutzeri</i>					
	Control	Hot water	0.1N -HCl	0.1N -NaOH	Chloroform +methanol	Chloroform +methanol /24% KOH	Control	Hot water	0.1N -HCl	0.1N -NaOH	Chloroform +methanol	Chloroform +methanol /24% KOH
Asx.	43.5	39.7	45.1	33.6	48.2	28.6	37.2	39.5	35.3	28.6	34.6	29.7
Thr.	15.5	14.6	16.5	14.6	13.8	12.1	13.6	15.8	16.9	13.8	14.5	12.7
Ser.	10.9	9.4	7.9	8.2	17.8	14.3	16.0	19.7	18.5	16.1	20.3	18.7
Glx.	46.1	45.6	39.2	35.5	55.7	31.3	44.0	40.5	31.8	33.6	47.9	38.6
Pro.	13.7	15.8	13.1	14.3	21.6	12.9	19.4	11.4	21.6	13.2	29.7	14.6
Gly.	23.3	24.6	27.5	21.6	26.7	19.4	19.6	24.7	22.6	14.5	31.8	11.8
Ala.	51.5	59.3	63.5	39.8	62.8	31.7	47.1	53.1	49.6	34.1	60.7	40.6
Cys.	7.3	5.2	6.3	4.2	7.5	3.2	6.3	5.8	4.2	3.0	4.8	3.7
Val.	20.6	24.7	25.6	19.8	25.1	19.4	19.6	17.2	21.8	14.6	24.7	18.1
Met.	9.5	8.9	10.2	10.2	11.7	6.2	10.4	13.6	14.7	8.7	7.8	5.4
Ile.	17.7	18.8	15.4	14.1	21.6	13.7	17.6	21.5	18.6	13.6	24.9	8.6
Leu.	20.5	22.4	23.1	22.7	25.9	17.1	23.0	24.6	23.1	15.6	20.5	17.5
Tyr.	10.4	10.7	12.3	15.7	13.2	9.7	8.8	10.8	9.3	9.7	9.8	7.2
Phe	16.7	17.7	19.2	11.6	22.7	9.9	16.7	18.7	18.4	17.2	16.9	16.5
His.	10.7	11.8	14.9	10.8	13.5	9.5	7.6	9.6	7.9	6.3	8.3	3.8
Lys.	30.8	26.5	27.7	20.4	33.1	16.2	24.7	26.7	24.8	13.5	27.8	12.2
Arg.	18.6	19.5	22.1	21.9	25.6	14.5	30.2	27.1	28.4	28.2	34.6	24.4

Asx. : Asp. + Asn.

Glx. : Glu. + Gln.

추출된 균체에 비하여 현저하게 감소되었다. 메탄올과 클로로포름 처리에 의하여 대부분의 지질이 추출된 균체의 중금속 축적율은 전처리하지 않은 균체에 비하여 큰 차이가 나지않아(Fig. 3) 세포 구

성성분중 지질은 중금속 축적에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었으나, 메탄올과 클로로포름으로 지질을 추출한 다음 다시 알칼리 용액으로 단백질을 추출한 균체의 중금속 축적율은(Fig. 3) 알칼

리로 전처리하였을 경우(Fig. 2)와 마찬가지로 전처리하지 않은 균체와 지질만 추출된 균체에 비하여 현저하게 감소되었으며, 이러한 결과는 중금속의 중요한 결합위치로 알려진 단백질이 용출 또는 변성되었기 때문인 것으로 생각되며, 따라서 세포 구성물질중에서 단백질은 중요한 중금속 결합물질인 것으로 생각되었다.

3. 조단백질 함량과 중금속 축적과의 관계

여러가지 물리 화학적인 방법으로 전처리된 중금속 내성균체중의 조단백질 함량 변화를 조사한 결과, Table 2에서 보는바와 같이 전처리 방법에 따라 균체내 조단백질 함량은 큰 차이가 나는 것을 알수 있었다. 클로로포름과 메탄올로 전처리한 균체의 조단백질 함량은 전처리하지 않은 균체에 비하여 약 10~20%정도 감소되었으나 클로로포름과 메탄올로

전처리한 다음 다시 고농도의 알칼리 용액으로 전처리 하였을 경우에는 약 65~70%가 감소되어 조단백질 함량이 현저하게 줄어드는 것을 알수 있었으며, 전처리 방법에 따른 균체중 조단백질 함량은 chloroform+methanol < 0.1N-HCl ≤ Hot water < 0.1N-NaOH < chloroform+methanol / 24% KOH 처리 순으로 감소되었다. 그리고 전처리 방법에 따라 세포내 아미노산 조성에 차이가 있을 것으로 예상되어 전처리된 균체중의 아미노산 조성을 분석한 결과 Table 3에서 보는바와 같이 전처리 방법에 따라 아미노산 함량은 차이가 있었으나 아미노산의 조성에는 변화가 없는 것으로 나타났으며, Nakajima등⁶⁾도 여러가지 물리화학적 방법으로 전처리된 *Chlorella regularis* 세포내의 crude protein 함량과 아미노산 조성을 분석한 결과 전처리 방법에 따라 균체중의 조단백질 함량은 상당한 차이가

Table 4. Heavy metal accumulation of heavy metal-tolerant microorganism cells by physico-chemical treatment.

Treatment	<i>P. putida</i>				<i>P. aeruginosa</i>			
	Crude protein of initial cells		Accumulation of Cd		Crude protein of initial cells		Accumulation of Pb	
	%	(Index)	mg/g	(Index)	%	(Index)	mg/g	(Index)
Control	42.9	(100)	84.5	(100)	41.5	(100)	96.7	(100)
Hot water	24.5	(57.1)	34.8	(41.2)	30.2	(72.8)	52.1	(53.4)
0.1N-HCl	29.8	(69.5)	47.4	(56.1)	31.4	(75.7)	58.4	(60.4)
0.1N-NaOH	15.5	(36.1)	26.5	(31.4)	19.2	(46.3)	39.7	(41.1)
Chloroform	35.5	(82.8)	70.2	(83.1)	40.1	(96.6)	93.4	(96.6)
+methanol								
Chloroform+	12.7	(29.6)	17.8	(21.1)	15.7	(37.8)	36.6	(37.9)
methanol/24%KOH								
Treatment	<i>P. chlororaphis</i>				<i>P. stutzeri</i>			
	Crude protein of initial cells		Accumulation of Zn		Crude protein of initial cells		Accumulation of Cu	
	%	(Index)	mg/g	(Index)	%	(Index)	mg/g	(Index)
Control	47.5	(100)	91.5	(100)	43.7	(100)	86.1	(100)
Hot water	35.4	(74.5)	52.9	(57.8)	30.2	(69.1)	43.6	(50.6)
0.1N-HCl	14.7	(31.0)	30.8	(33.7)	26.4	(60.4)	47.3	(54.9)
0.1N-NaOH	13.1	(27.6)	20.6	(22.5)	16.4	(37.5)	21.2	(24.6)
Chloroform	42.8	(90.1)	84.9	(92.8)	35.3	(80.8)	65.9	(76.5)
+methanol								
Chloroform+	14.9	(31.4)	22.1	(24.2)	15.4	(35.2)	17.2	(20.0)
methanol/24%KOH								

100mg of the cells were suspended in 100ml of a solution(pH 6.0) treated with 100mg/l of heavy metals. The suspension was stirred continuously at 30°C for 48 hours.

있었으나 아미노산 조성에는 변화가 없었다고 보고 하였다.

중금속이 100mg/l의 농도로 첨가된 용액(pH 6.0) 100ml에 전처리된 중금속 내성균체를 100mg씩 처리하여 처리 48시간 후의 중금속 축적양상을 조사하여 균체내에 용출되지 않고 남아있는 조단백질 함량과 중금속 축적과의 관계를 검토한 결과, Table 4에서 보는바와 같이 전처리된 균체중에 남아있는 조단백질의 함량에 따라 중금속 축적량도 상당한 차이가 났으며, Cd 내성균주의 경우 전처리하지 않은 균체는 균체 단위 g당 약 84.5mg의 Cd를 축적하였으며, 열수에 의해 약 43%의 단백질이 추출된 균체는 약 34.8mg, 산처리에 의해 30%의 단백질이 추출된 균체는 약 47.4mg의 Cd를 축적하는 것으로 나타났다. 그리고 대부분의 지질은 추출되었지만 단백질의 82.8%를 함유하고 있는 클로로포름과 메탄올로 전처리한 균체는 약 70.2mg의 Cd를 축적하여 전처리하지 않은 균체와 거의 비슷한 Cd축적율을 나타내었으나, 단백질의 약 64%가 추출된 알칼리 용액으로 전처리한 균체 및 단백질의 약 70%가 추출된 클로로포름과 메탄올로 처리한 후 다시 고농도의 알칼리 용액으로 전처리한 균체는 각각 약 26.5mg 및 17.8mg의 Cd를 축적하여 전처리하지 않은 균체에 비하여 현저하게 감소되었다.

이러한 결과는 전처리된 Pb, Zn 및 Cu내성균체(Table 4)에서도 Cd 내성균체와 유사한 경향을 나타내었으며, 특히 전처리된 균체속에 추출되지 않고 남아있는 조단백질 함량이 낮을수록 중금속 축적능력이 크게 감소되는 것을 볼수 있었으며, 이러한 결과로 미루어 볼때 단백질은 중금속을 축적하는 유력한 결합부위인 것으로 판단되었다.¹³⁾

적 요

광산폐수, 산업폐수등으로 부터 Cd, Pb, Zn 및 Cu등의 중금속에 강한 내성을 지니고 있을 뿐만 아니라 균체내 중금속 축적능력이 우수한 중금속 내성 미생물 균주 *Pseudomonas putida*(Cd), *Pseudomonas aeruginosa*(Pb), *Pseudomonas chlororaphis*(Zn) 및 *Pseudomonas stutzeri*(Cu)를 각각 분리하여, 여러가지 물리화학적 방법으로 세포를 전처리하여 세포구성성분을 인위적으로 조절 한 후 세포내 중금속이온의 흡수 거동 및 조단백질 함량과 중금속 축적관계를 조사한 결과는 다음과 같다.

세포를 알카리로 전처리하였을 경우 세포내 중금속 축적은 매우 감소되었으며, 메탄올과 클로포름으로 전처리하였을 경우에는 중금속 축적에 큰 영향

을 미치지 않았으나, 메탄올과 클로로포름으로 전처리한 후 다시 알카리로 재차 처리하였을 경우에는 중금속 축적이 매우 감소되었다.

전처리된 세포내 중금속 축적은 용출되지 않고 남아있는 조단백질 함량이 감소됨에 따라 더 얼마나 크게 감소되었으므로 세포 구성물질중 단백질이 중금속 축적에 중요한 역할을 하는 물질인 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Bucheder, F. and E.Broda, 1974. Energy-dependent zinc transport by *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 45 : 555~559.
2. Gourdon, R., S.Bhende, E.Rus and S.S.Sofer, 1990. Comparison of cadmium biosorption by gram-positive and gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnol. Lett.* 12(11) : 839~842.
3. Beveridge, T.J. and R.G.E.Murray. 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141 (2) : 876~887.
4. Muraleedharan, T.R. and C.Venkobachar, 1990. Mechanism of biosorption of copper(II) by *Gonoderma iucidum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35 : 320~325.
5. Hunt, S., 1986. Diversity of biopolymer structure and its potential for ion binding application, p.15~46. In H. Eccles and S. Hunt (ed), Immobilization of ions by bio-sorption, society of chemical industry, Ellis Horwood Ltd., London.
6. Nakajima, A., T.Horikoshi, and T. Sakaguchi. 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12 : 76~83.
7. Tobin, J.M., D.G. Cooper and R.J. Neufeld, 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(4) : 821~824.
8. Mera, M.V., M. Kemper, R. Doyle and T.J. Beveridge, 1992. The membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(12) : 3837~3844.
9. Kuyucak, N. and B. Volesky, 1989. The

- mechanism of cobalt biosorption. *Biotech. Bioeng.* 33(7) : 823~831.
10. Standberg, G.W., S.E. Shumate II and J.R. Parrott, JR. 1981. Microbial cell as biosorbents for heavy metals : Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(1) : 237~245.
 11. Cho, J.S., W.K. Lee, H.S. Choi and J.S. Heo, 1997. Distribution of heavy metal in the cell components of heavy metal-tolerant microorganisms. *Kor. J. Environ. Agric.*, 16(1) : 55~60.
 12. 조주식, 이홍재, 허종수. 1992. 난분해성 독성 오염물질 분해 미생물의 수처리 이용에 관한 연구 (I). 농촌진흥청 보고서.
 13. Cho, J.S., M.G. Han, H.J. Lee and J.S. Heo, 1996. Zinc accumulation in the cell of zinc-tolerant bacteria, *Pseudomonas chlororaphis*, and recovery of zinc from the cells accumulating zinc. *J. Korean Environ. Sci. Soc.*, 5(3) : 317~327.
 14. Spackman, D.H., W.H. Stein, and S. Moore. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30 : 1190-1197.