

## 중금속 내성균의 세포내 중금속 결합 위치

조주식 · 이홍재<sup>1)</sup> · 이영한<sup>1)</sup> · 손보균 · 정연규 · 허종수<sup>1)</sup>  
순천대학교 농화학과, <sup>1)</sup>경상대학교 농화학과

### Binding Site of Heavy Metals in the Cell of Heavy Metal-Tolerant Microorganisms

Ju-Sik Cho, Hong-Jae Lee<sup>1)</sup>, Young-Han Lee<sup>1)</sup>, Bo-Kyoon Sohn, Yeun-Kyu Jung and Jong-Soo Heo<sup>1)</sup>(Dept. of Agricultural Chemistry, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, <sup>1)</sup>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. The binding sites of heavy metal in the cells were investigated by chemical modification of functional groups the cell walls.

To determine the binding sites of heavy metal in the cells, electrochemical charge of amine and carboxyl groups in the cell walls of heavy metal-tolerant microorganisms were chemically modified. Chemical modifications of amine groups did not affect the heavy metal uptake as compared to native cell walls. In contrast, modifications of carboxyl groups drastically decreased heavy metal uptake as compared to native cell walls, and electron microscopy confirmed that the form and structure of the heavy metal uptake were different from those of native cell walls. The results suggested that the carboxyl groups were the major sites of heavy metal uptake in the heavy metal-tolerant microorganism cell.

## 서 론

미생물이 중금속을 축적하는 기작은 세포내부로 중금속을 흡수하는 과정<sup>1)</sup>과 세포벽의 단백질과 지질, 혹은 세포벽의 peptidoglycan, teichoic acid, 다당류, 단백질 및 지질의 음전하를 띤 phosphoryl, carboxyl, sulfhydryl 혹은 hydroxyl 관능기에 결합 흡착되는 과정<sup>2,3,4)</sup>으로 구분할 수 있으며, 그 중에서도 carboxyl group, phosphoryl group 및 sulfhydryl group이 중요한 중금속 결합 부위들이 것으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup> 그리고 중금속 음이온은 단백질에 존재하는 amine group, imidazole group, 그리고 핵산에 존재하는 purine과 pyrimidine ring의 amine group과 heterocyclic nitrogen에 결합되는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup>

전하를 띠고 있는 관능기를 가진 여러 생체고분자물질중 특히 단백질은 중금속 이온과 비선택적인 결합을 하기도 하지만  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  등의 중금속들과 선택적으로 결합할 수 있는 metal-binding protein이 존재하기도 하며 metal-binding protein의 측쇄에 중금속 이온이 선택적으로 결합되며, 이러한 결합부위들에는 carboxyl group, sulfhydryl group과 같은 전하를 띤 관능기가 존재하는 것

으로 알려지고 있다.<sup>8,9,10)</sup>

최근 미생물 세포내 중금속 이온의 축적 기작을 구명하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, Nakajima 등<sup>11)</sup>은 미생물이 중금속 이온을 흡수하는 기작을 구명하기 위하여 *Chlorella regularis*를 여러가지 물리 화학적인 방법으로 전처리하여 세포 구성성분을 인위적으로 조절한 후 세포내 중금속 이온의 흡수거동을 비교 조사한 결과, 전처리된 세포내에 추출되지 않고 남아있는 crude prtein 함량이 낮을 수록 세포내 중금속 축적능력이 크게 감소되어 세포구성물질 중에서 protein이 중금속 축적에 관여하는 중요한 물질이라고 하였으며, Beveridge 등<sup>12)</sup>과 Doyle 등<sup>13)</sup>은 중금속 이온과 결합하는 관능기를 조사하기 위하여 중금속이 결합할 것으로 예상되는 관능기의 전하를 변형시켜 변형 시키기 전과의 중금속 결합능력을 비교 조사하여 음전하를 띤 carboxyl group이 주요한 중금속 binding site라고 하였다. 또한 Tobin 등<sup>14)</sup>도 *R. arrhizus*가 여러가지 금속이온을 흡수하며 이는 세포의 phosphate, carboxylate 및 다른 functional group 부위와 밀접한 관련이 있다고 하였으며, Mera 등<sup>15)</sup>은 *B. subtilis*가 강한 금속결합능력을 가지는 이유는 세포벽이 phosphate, peptidoglycan 및 glycerol-based

teichoic acid 등으로 이루어져 있어 표면에 강한 음전하를 띄기 때문이라고 하였다. 그리고 Nakajima 등<sup>14,15)</sup>과 Horikoshi 등<sup>16,17)</sup>은 해수중의 uranium과 다른 금속이온들을 미생물을 이용하여 분리 및 회수하는 연구를 하였으며, Strandberg 등<sup>18)</sup>도 원자력 발전소의 폐수중 방사능 물질을 bacteria를 이용하여 생흡착 시키는 연구와 생물흡착 기작을 구명하는 연구를 하였다.

따라서, 본 연구는 본 실험실에서 이미 분리한 중금속내성균의 세포내 중금속 binding site를 구명하기 위하여 전보<sup>19)</sup>에 이어서 화학적인 방법으로 세포내 functional group의 전하를 변형시켜 변형시키기 전과의 중금속 결합능력을 비교 조사하였다.

**재료 및 방법**

**공시 중금속 내성균주 및 배지**

본 실험에 사용한 중금속 내성균주는 광산폐수 및 산업폐수로부터 이미 분리한 Cd, Pb, Zn 및 Cu 내성균주인 *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* 및 *P. stutzeri*를 사용하였으며<sup>20)</sup>, 균주의 배양은 basal medium (glucose 10g, polypepton 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, D.W. 1000ml, pH 6.0)에 중금속을 필요한 농도로 첨가한 액체배지를 사용하였다.

**균체의 중금속처리**

균체의 중금속 처리는 각 중금속 화합물(CdCl<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>)을 중금속 이온 농도로서 10,000 mg/l 이 되게 조제한 표준용액을 다시 일정한 농도가 되도록 멸균중류수로 희석 조제하여 처리하였다.

**중금속 분석**

균체내에 축적된 중금속 축적량과 용액중에 남아있는 중금속 잔존량은 Cho 등<sup>21)</sup>과 같은 방법으로 시료를 전처리하여 Atomic absorption spectrophotometer(Shimadzu AA-680, Japan) 및 Inductively coupled plasma spectrometer(ICP, Atomscan25, TJA, U.S.A.)로 정량하였다.

**Cell wall내 functional group 변형에 따른 중금속 축적 변화**

중금속이 첨가되지 않은 기본배지에 공시균주들을 접종하여 48시간 배양한 균체를 원심분리로 회수하여 French press(French press, SLM AMINCO, U. S. A.)로 1,800 PSI에서 파쇄하여 Cho 등<sup>22)</sup>과 같은 방법으로 cell wall fraction을 분리하여 동결건조(Lyophilizer christ LMC-1, Germany)시킨 다음, cell wall내에 존재하는 functional group들을 변형시킨 후, 중금속이 100mg/l 농도로 첨가된

용액(pH 6.0) 10ml에 functional group이 변형된 cell wall 10mg을 처리하여 30℃에서 진탕시키면서 처리시간에 따른 중금속 축적양상을 조사하였다. Cell wall중 functional group들의 변형은 Beveridge등의 방법<sup>12,23,25)</sup>, Sonnenfeld 등의 방법<sup>26)</sup> 및 Doyle등의 방법<sup>11)</sup>을 병행하여 다음과 같이 하였다.

**(1) Amine group의 변형**

Amine group의 변형은 s-acetylmercaptosuccinic anhydride와 sodium iodoacetate를 이용하여 변형시켰다.

S-acetylmercaptosuccinic anhydride에 의한 변형은 s-acetylmercaptosuccinic anhydride를 ethanol에 용해시켜 20mM이 되도록 만든 다음, 멸균중류수 45ml에 cell wall 50mg을 현탁시킨 현탁액에 20mM s-acetylmercaptosuccinic anhydride용액 5ml을 첨가하여 s-acetylmercaptosuccinic anhydride의 최종 농도가 2mM이 되도록하여 pH를 6.8로 조정 한 다음, 질소가스를 충전하여 22℃에서 6시간 교반시켜 amine기를 음전하화 시켰다.

Sodium iodoacetate에 의한 변형은 cell wall 50mg을 0.05M-sodium iodoacetate 용액 50ml에 현탁시킨 후 pH를 8.0으로 조절하여 22℃에서 6시간 교반시켜 amine기를 음전하화시켰다.

변형된 cell wall은 원심분리로 회수하여 멸균중류수로 수회 세척하여 동결건조시킨 다음 중금속 흡착실험에 사용하였다.

S-acetylmercaptosuccinic anhydride에 의해서는 Fig.1(a)에서 보는바와 같이 amine group들은 화학적으로 중성화되어지고, 여기에 음전하를 띄고 있는 carboxyl group과 sulfhydryl group이 부착되어지며, sodium iodoacetate는 Fig.1(b)에서 보는바와 같이 중성 이하의 pH 범위에서는 음전하를 띤 carboxyl group이 cell wall중에 있는 amine group들에 부착이 되지만 높은 pH 범위에서는 hydroxyl group이나 phenolic group에 부착되어 질 수도 있다.

**(2) Carboxyl group의 변형**

Carboxyl group의 변형은 glycine ethyl ester,

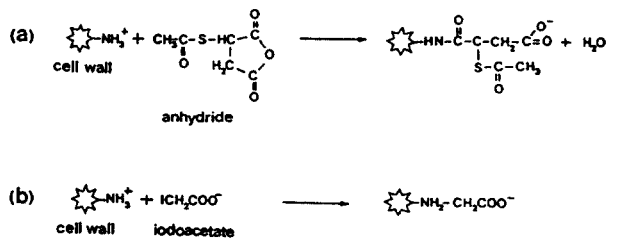


Fig. 1. Chemical modification of amine group in the cell walls by s-acetylmercaptosuccinic anhydride(a) and sodium iodoacetate(b).

glycinamide 및 ethylenediamine을 각각 이용하여 변형시켰다. 즉, 멸균증류수 50ml에 cell wall 50mg을 현탁시킨 현탁액에 각 chemical ligand(glycine ethyl ester, glycinamide, ethylenediamine)의 농도가 0.5M이 되게 각각 첨가한 다음, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide를 carbodiimide 농도로서 0.2M이 되도록 첨가한 후 pH를 4.75로 조정하여 22℃에서 6시간 교반시켜 carboxyl기를 양전하화시킨 다음, 변형된 cell wall을 원심분리로 회수하여 멸균증류수로 수회 세척하여 동결건조시킨 다음 중금속 흡착실험에 사용하였다.

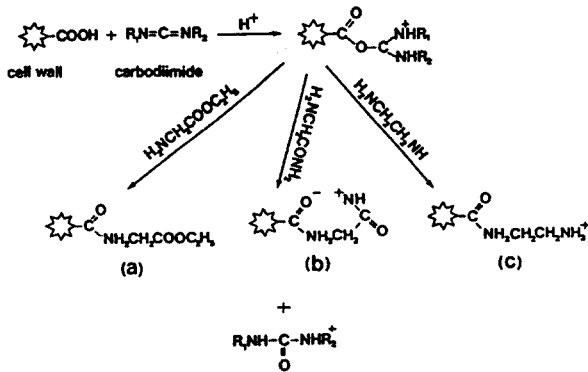


Fig. 2. Chemical modification of carboxyl group in the cell walls by carbodiimide. (a) Glycine ethyl ester (b) Glycinamide (c) Ethylenediamine

상기 세가지 chemical ligand들은 Fig. 2에서 보는바와 같이 carbodiimide 반응에 의하여 서로 다른 electrochemical charge로서 carboxyl group에 각각 부착이 되며, glycine ethyl ester는 carboxyl기의 charge를 중성화 시키고, glycinamide는 carboxyl기의 charge를 약하게 electropositive하게 만들며, ethylenediamine은 매우 강하게 electropositive하게 만드는 것으로 알려지고 있다.<sup>4,11,23,24,25,26)</sup>

### 결과 및 고찰

#### Cell wall내 functional group 변형에 따른 중금속 축적 변화

중금속이 첨가되지 않은 배지에서 배양한 균체를 파쇄하여 분리한 cell wall을 Fig. 1 및 Fig. 2와 같은 방법으로 cell wall중에 존재하는 functional group중 amine group과 carboxyl group의 전하를 화학적으로 변형시킨 cell wall들의 중금속 축적 변화를 조사한 결과는 다음과 같다.

모든 단백질은 말단에 유리된 carboxyl기와 amine기를 가지고 있으며 peptide 결합을 하고 있는 아미노산의 종류에 따라 단백질의 극성이 달라지며, 중성 pH에서 음전하를 띠는 아미노산은 잔기에 carboxyl기를 가지고 있는 산성 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid가 있으며, 중성 pH

에서 양전하를 띠는 아미노산은 잔기에 amine기를 가지고 있는 염기성 아미노산인 lysine, arginine, histidine등이 있는 것으로 알려져 있다. 이 밖에도 중성 pH에서 극성은 나타내지만 하전되어 있지 않은 아미노산들이 있는데 이들은 주로 hydroxyl기와 sulfhydryl기 등을 가지고 있는 것으로 알려지고 있다.<sup>27,28)</sup> 본 실험에서는 중금속 처리 용액내의 pH를 6.0으로 조절하였으므로 carboxyl기는 강한 음전하를 띠고 amine기는 강한 양전하를 띠게 될 것으로 생각되었으나 hydroxyl기와 sulfhydryl기는 중성 pH에서도 극성만 나타내고 전하를 띠지 않으므로 pH 6.0에서 양이온인 중금속의 흡착에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각되어 cell wall 중의 carboxyl기와 amine기 만을 변형시켜 중금속 축적변화를 조사하였다.

#### (1) Amine group의 변형에 따른 중금속 축적 변화

S-acetylmercaptosuccinic anhydride와 sodium iodoacetate를 이용하여 양전하를 띠고 있는 cell wall중의 amine기를 음전하화시켜 중금속 축적 양상을 조사한 결과는 Table 1 및 Photo. 1, 2에서 보는 바와 같다.

양전하를 띠고 있는 amine기는 s-acetylmercaptosuccinic anhydride에 의해서 화학적으로 중성화되어지며, 여기에

Table 1. Heavy metal uptake of the cell walls after chemical modification of amine groups of the cells.

Microorganism (Accumulative heavy metal)	Native cell walls	Modification of amine groups (mg/g cell walls)	
		S-acetylmercapto succinic anhydride	Sodium iodoacetate
<i>P. putida</i> (Cd)	54.6 (100)	60.7 (111.2)	57.1 (104.6)
<i>P. aeruginosa</i> (Pb)	78.2 (100)	89.7 (114.7)	82.5 (105.5)
<i>P. chlororaphis</i> (Zn)	49.5 (100)	47.0 (94.9)	52.9 (106.9)
<i>P. stutzeri</i> (Cu)	43.1 (100)	46.2 (107.2)	50.7 (117.6)

( ): Index

10mg of the cell walls modified by chemical reagent were suspended in 10ml of solution (pH 6.0) treated with 100mg/l of each heavy metal.

음전하를 띠고 있는 carboxyl기와 sulfhydryl기가 부착되어 화학적으로 양전하화 되는 것으로 알려져 있으며[Fig. 1(a)], 또한 iodoacetate에 의해서도 중성 이하의 pH범위에서 음전하를 띠고 있는 carboxyl기가 cell wall중의 amine기에 부착되어 화학적으로 음전하화되며[Fig. 1(b)], 높은 pH범위에서는 hydroxyl group이나 phenolic group에 부착

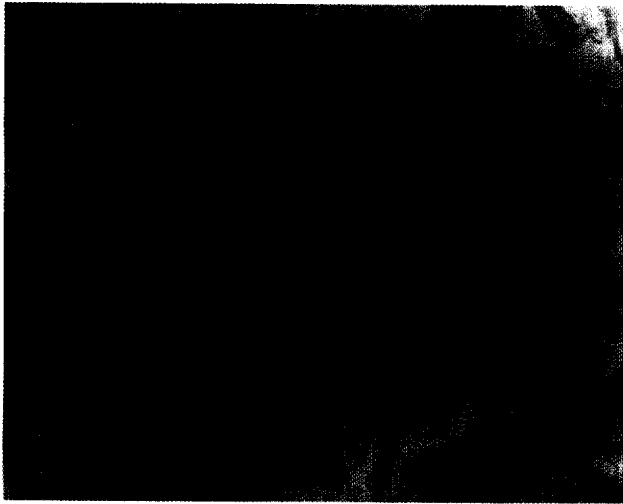


Photo. 1. Electron microphotographs of *P. putida* cell walls accumulating Cd after chemical modification of amine groups in the cell walls by Acetylmercaptosuccinic anhydride(A) or Sodium iodoacetate(B).(40,000×)

Photo. 2. Electron microphotographs of *P. aeruginosa* cell walls accumulating Pb after chemical modification of amine groups in the cell walls by Acetylmercaptosuccinic anhydride(A) or Sodium iodoacetate(B).(40,000×)

이 되어질 수도 있는 것으로 알려지고 있다.<sup>4,11,23,24,25,26)</sup>

Amine기를 변형시킨 cell wall들의 중금속 축적 양상을 조사한 결과, Table 1에서 보는바와 같이 amine기가 변형된 cell wall들에 의한 중금속 축적은 변형되지 않은 cell wall들에 비하여 비슷하거나 약간 더 높은 축적량을 나타내었다. 이것은 변형된 amine기가 음전하를 띠고 있기 때문인 것으로 생각되었으며, amine기를 변형시킨 *P. putida*와 *P. aeruginosa* cell wall들의 중금속 축적형태를 전자현미경으로 관찰한 결과 Photo. 1 및 2에서 보는 바와 같이 많은 금속 복합체가 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

Beveridge등<sup>4)</sup>은 *Bacillus subtilis* cell wall중의 amine기를 변형시켜 여러가지 중금속 축적 변화를 조사한 결과, 변형시키지 않은 cell wall과 거의 비슷하거나 높은 축적능력을 나타내었으며, 이것은 cell wall중의 양전하를 띠고 있는

amine기가 음전하화되었기 때문이라고 설명하였다. 본 실험에서도 amine기가 변형된 cell wall들에 의한 중금속 축적은 전보<sup>22)</sup>에서 확인한 변형시키지 않은 cell wall과 거의 비슷하거나 약간 더 높은 축적능력을 나타내었으며, 수용액 내에서  $M(OH)_3^{3-}$  또는  $M(OH)_4^{2-}$  등으로 존재하는 중금속 음이온들은 세포중의 amine기와 결합하여 음이온적인 금속 복합체를 형성한다는 보고<sup>7,29)</sup>도 있지만, 본 실험의 결과로 미루어 볼때 양전하를 띠고 있는 amine group들은 중금속 축적에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되었다.

(2) Carboxyl group의 변형에 따른 중금속 축적변화

Glycine ethyl ester, glycinamide 및 ethylenediamine을 이용하여 음전하를 띠고 있는 cell wall중의 carboxyl기를 양전하화시킨 cell wall들의 중금속 축적 양상을 조사한 결

Table 2. Heavy metal uptake of the cell walls after chemical modification of carboxyl groups of the cells. (mg/g cell walls)

Microorganism (Accumulative heavy metal)	Native cell walls	Modification of carboxyl groups		
		Glycine ethyl ester <sup>a)</sup>	Glycinamide <sup>b)</sup>	Ethylene diamine <sup>c)</sup>
<i>P. putida</i> (Cd)	57.8 (100)	36.5 (63.2)	22.6 (39.1)	14.2 (24.6)
<i>P. aeruginosa</i> (Pb)	69.3 (100)	43.6 (62.9)	19.1 (27.6)	3.5 (5.1)
<i>P. chlororaphis</i> (Zn)	43.2 (100)	39.6 (68.5)	16.6 (38.4)	10.7 (24.8)
<i>P. stutzeri</i> (Cu)	36.7 (100)	22.5 (61.3)	14.3 (39.0)	3.6 (9.8)

( ): Index  
 10mg of cell walls modified by chemical reagent were suspended in 10ml of solution (pH 6.0) treated with 100mg/l of each heavy metal.  
 a) : COO is neutralized.  
 b) : COO is slightly electropositive  
 c) : COO is electropositive

과는 Table 2 및 Photo. 3 및 4와 같다.  
 Cell wall중의 carboxyl기는 Fig. 2에서 보는바와 같이 glycine ethyl ester에 의하여 중성화되며, glycinamide에 의하여 약하게 electropositive하게 된다. 그리고 ethylenediamine에 의해서는 매우 강하게 electropositive하게 변형된다.<sup>4,11,23,24,25,26)</sup>

Carboxyl기를 변형시킨 cell wall들에 의한 중금속 축적양상은 Table 2에서 보는바와 같이 변형되지 않은 cell wall에 의한 중금속 축적량에 비하여 carboxyl group이 변형된 3가지 cell wall 모두에서 현저하게 감소되었으며, 그 감소되는 정도는 glycine ethyl ester < glycinamide < ethylenediamine 순으로서 carboxyl기의 음전하가 양전하화되는 정도에 따라서 더 큰 폭으로 감소되었다. 이러한 결과는 carboxyl기를 변형시킨 *P. putida* 및 *P. aeruginosa* cell wall들의 외형적인 Cd 및 Pb 축적형태를 관찰한 결과 (Photo. 3, 4)에서도 명확하게 나타났으며, glycine ethyl ester에 의해 carboxyl기가 중성화된 cell wall의 경우 전보 22)에서 확인한 변형 시키지않은 cell wall과 amine기를 변형시킨 cell wall(Photo. 1, 2) 보다는 적었지만 어느정도 금속복합체가 cell wall 주위에 형성되어 있었으나[Photo. 3(A), 4(A)], ethylenediamine으로 carboxyl기의 음전하를 강하게 양전하화시킨 cell wall의 경우에는 금속복합체가 거의 관찰되지 않았으며[Photo. 3(C), 4(C)], carboxyl기를 양전하화 시키는 정도에 따라서 관찰되는 금속복합체도 크게 감소되는 것으로 나타났다.

따라서 amine기를 변형시킨 cell wall에 의한 중금속 축



Photo. 3. Electron microphotographs of *P. putida* cell walls accumulating Cd after chemical modification of carboxyl groups in the cell walls by Glycine ethylester(A), Glycinamide(B) or Ethylenediamine(C).(40,000×)

적능력은 변형시키지 않은 cell wall에 비하여 거의 비슷하거나 약간 더 높은 축적 능력을 나타내었으며(Table 1),



Photo. 4. Electron microphotographs of *P. aeruginosa* cell walls accumulating Pb after chemical modification of carboxyl groups in the cell walls by Glycine ethylester(A), Glycinamide(B) or Ethylenediamine(C).(40,000×)

이것은 변형된 amine기가 음전하를 띠었기 때문인 것으로 생각되었으며, carboxyl기를 변형시킨 cell wall에 의한 각

중금속 축적능력은 변형시키지 않은 cell wall에 비하여 현저하게 감소되었으며(Table 2), 이것은 변형된 carboxyl기가 양전하를 띠었기 때문인 것으로 생각되었다. 이러한 결과들로 미루어 볼때 세포내 functional group들 중 amine group은 중금속 축적에 큰 영향을 미치지 않으나 carboxyl group은 중요한 중금속 binding site인 것으로 생각되었다.<sup>4,30)</sup> Cell wall중의 carboxyl기와 중금속의 결합형태는 본 실험에 사용한 중금속(Cd, Pb, Zn, Cu)이 모두 2가 양이온이므로 2개의 carboxyl기와 1개의 중금속 이온이 결합할 것으로 예상되지만 정확한 결합 형태를 밝히기 위해서는 세포내 단백질을 구성하고 있는 아미노산을 분석하여 잔기에 carboxyl기를 가지고 있는 아미노산의 종류와 carboxyl기의 수를 계산하여 축적된 중금속의 양을 비교해 보는 실험이 금후 필요하리라고 생각되었다.

### 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*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* 및 *P. stutzeri*를 각각 분리하여, 화학적인 방법으로 세포내 functional group들의 전하를 인위적으로 변형시켜 변형시키기 전과의 중금속 결합능력을 비교 조사한 결과는 다음과 같다.

화학적인 방법으로 functional group의 charge를 변형시킨 cell wall들에 의한 중금속 축적변화를 조사한 결과, cell wall중 amine group을 변형시켰을 경우에는 중금속 축적율이 변형시키지 않은 cell wall에 비하여 약간 증가되었거나 거의 비슷한 축적율을 나타내었으나, carboxyl group을 변형시켰을 경우에는 매우 크게 감소되었다. 이와같은 결과는 functional group을 변형시킨 cell wall의 외형적인 중금속 축적형태를 전자현미경으로 관찰하였을 경우에도 명확하게 나타났으며, 따라서, carboxyl기는 중요한 중금속 binding site인 것으로 판단되었다.

### 참 고 문 헌

1. Nakajima, A. Horikoshi, T. and Sakaguchi, T. (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.
2. Olafson, R. W. Abel, K. and Sim, R.G. (1979). Prokaryotic methallothionein : preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89:36~43.

3. Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E. and Sofer, S. S. (1990). Comparison of cadmium biosorption by gram-positive and gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnol. Lett.* 12(11):839~842.
4. Beveridge, T. J. and Murray, R. G. E. (1980). Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141(2):876~887.
5. Muraleedharan, T. R. and Venkobachar, C. (1990). Mechanism of biosorption of copper(II) by *Gonoderma iucidum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35:320~325.
6. Tobin, J. M., Cooper, D. G. and Neufeld, R. G. (1990). Investigation of the mechanism of metal uptake by denatured *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme. Microbiol. Technol.* 12:591~595.
7. 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 biosorption*, society of chemical industry, Ellis Horwood Ltd., London.
8. Sears, V. H. and Gordon, A. S. (1990). Copper-induced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibro alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5) : 1327~1332.
9. Jeremy, M. B., 1990. Zincfingers and other metal-binding domains. *J. Biol. Chem.* 265(12) : 6513~6516.
10. Lee, K. S., Yoo, S.A., Kwak, I. Y., Park Y. S. and Choi, Y. K. (1990). Cadmium detoxification mechanism in *Klebsiella aerogenesa*. ATCC 10031, *Kor. J. Microbiol.* 28(2):134~144.
11. Doyle, R. J., Matthews, T. H. and Streips, U.N. (1980). Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *J. Bacteriol.* 143(1):471~480.
12. Tobin, J. M., Cooper, D. G. and Neufeld, R. J. (1984). Uptake of metal ions by *Rhizopus arrizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(4) : 821~824
13. Mera, M. V., Kemper, M., Doyle R. and Beveridge, T. J. (1992). The membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(12): 3837~3844.
14. Nakajima, A., Horikoshi, T. and Sakaguchi, (1979). Ion effects on the uptake of uranium by *Chlorella regularis*. *Agric. Biol. Chem.* 43(3) : 625~629.
15. Horikoshi, T., Nakajima A. and Sakaguchi, T. (1981). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XIX. Accumulation of uranium by microorganisms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12:90~96.
16. Horikoshi, T., Nakajima, A., and Sakaguchi, T. (1981). Accumulation of uranium by *Chlorella* cells grown under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic culture conditions. *Agric. Biol. Chem.* 45:781~783.
17. Horikoshi, T., Nakajima, A. and Sakaguchi, T. (1979). Uptake of uranium from sea water by *Synechococcus elongatus*. *J. Ferment. Technol.* 57(3):191~194.
18. Standberg, G. W., Shumate II S. E. and 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.
19. Cho, J. S., Lee H. J. and Heo, J. S. 1997. Heavy metal accumulation in cell of heavy metal-tolerant bacteria by some physical and chemical treatment. *Kor. J. Environ. Agric.*, 16(4):311~319.
20. 허종수. 1995. 난분해성 독성오염물질 분해 미생물의 수처리 이용에 관한 연구. 농촌진흥청 연구보고서.
21. Cho, J.S., Han, M. G., Lee, H. J. and Heo, J. S. (1996). Zinc accumulation in cell of zinc -tolerant bacteria, *Pseudomonas chloroaphis*, and recovery of zinc from the cells accumulating zinc. *J. Korean Environ. Sci. Soc.*, 5(3):317~327
22. Cho, J.S., Lee, W. K., Choi, H. S., and Heo, J. S. (1997). Distribution of heavy metal in the cell components heavy metal-microorganisms. *Kor. J. Environ. Agric.*, 16(1):55~60.
23. Beveridge, T. J. and Murry, R. G. E. 1976, Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 127 (3):1502~1518.
24. Beveridge, T. J., Forsberg, C. W. and Doyle, R. G. (1982). Major site of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls. *J. Bacteriol.* 150(3):1438~1448.
25. Beveridge, T. J. and Jack, T. (1982). Binding of an inert, cationic osmium probe to walls of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 149(3):1120~1123.
26. Sonnenfeld, E. M., Beveridge, T. J., Koch, A. L. and Doyle, R. J. (1985). Asymmetric distribution of charge on the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 163(3):1167~1171.
27. Lehninger, A.L., (1982). Principles of biochemistry.

- p.101, Worth Publishers, Inc., New York.
28. Stryer, L. (1980). Biochemistry. p.15~45. W.H. Freeman Publishers, Inc., New York.
29. Hughes, M. N. (1974). The inorganic chemistry of biological processes, p.63~104. John Wiley and sons, New York.
30. Nakamura, Y., Katayama, S., Okada, Y., Suzuki, F. and Y. Nagata. (1981). The isolation and characterization of a cadmium and zinc-binding protein from *Tetrahymena pyriformis*. *Agric. Biol. Chem.* 45(5):1167~1172.