

구리흡착 단백질 유전자를 함유하는 재조합 효모의 중금속 흡착

박 상 옥·김 명 동·한 기 철·전 영 석·¹안 장 우·²한 남 수·†서 진 호
서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구센터, ¹청강문화산업대학 건강식품과학과, ²충북대학교 식품공학과
(접수 : 2001. 12. 10., 게재승인 : 2002. 2. 7.)

Heavy-Metal Adsorption by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Harboring Multiple Copies of the *CUP1* Gene

Sang-Ok Park, Myoung-Dong Kim, Ki-Cheol Han, Young-Sok Jeun, Jang-Woo Ahn¹, Nam Soo Han², and Jin-Ho Seo†
Department of Food Science and Technology and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

¹Department of Health Food Science, Chungkang College of Cultural Industries, Icheon 467-810, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received : 2001. 12. 10., Accepted : 2002. 2. 7.)

Characteristics of cell growth and heavymetal adsorption by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains harboring multiple copies of the *CUP1* gene encoding metallothionein (MT) protein were studied in batch cultures. Recombinant *S. cerevisiae* strains harboring multiple copies of the *CUP1* gene were superior to the host and wild-type yeast strains in terms of cell growth and heavy metal removal, indicating that the copy number of the *CUP1* gene for MT expression played an important role in the adsorption of heavy metals. It was suggested that the *CUP1* promoter for the MT expression is induced by manganese and zinc as well as copper. An optimum copper concentration for MT expression and concomitant adsorption of heavy metals by recombinant *S. cerevisiae* was found to be 0.31 mM. A nonionic surfactant Triton X-100 enhanced cell growth by 17.7% and removal of zinc by 6.1% compared with the control case.

Key Words : metallothionein, heavymetal, *CUP1*, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

화학공업의 발전과 더불어 여러 산업에서 배출하는 중금속의 양이 급격하게 증가하고 있는 실정이며, 수질환경의 오염도가 커지고 있을 뿐만 아니라 동시에 고가의 금속을 회수할 필요가 증대되어 적절하게 중금속을 회수 및 제거하기 위한 화학 침전법, 응집, 이온교환, 착염화 등의 여러 기술들이 개발되었으며, 최근에는 생물학적인 방법으로 중금속을 제거하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다(1). 산업 폐기물로서 중금속은 그것이 가지는 독성으로 인해 더욱 관심의 대상이 되고 있는데, 폐미생물 균체 뿐만 아니라 산업적 미생물 발효공정을 통해서 이러한 문제를 해결하려는 시도가 이루어지고 있다. 세균, 곰팡이 및 효모 등의 미생물을 이용하여 폐수로부터 유해한 중금속 물질을 제거하는 방법은 중금속의 무독화뿐만 아니라 적당한 처리를 통하여 금속회수가 가능하여

현재 사용 중인 처리 기술보다 더욱 경제적이 될 수 있다는 지표가 제시되어 있다(2-4). 이 중 효모와 곰팡이에 의한 금속 축적은 세포의 대사와 무관한 세포벽에 의한 표면흡착과 대사과정과 밀접하게 연관된 세포내로의 금속의 유입의 두가지 경우에 의하여 이루어진다. 세포벽에는 ligand로서 phosphate, carboxyl, amine, chitin, chitosan 등과 그외의 색소성분이 있어 금속의 흡착에 관여하며, 금속의 세포내로의 유입기작은 표면흡착보다 속도가 느리지만 더 많은 양의 금속을 축적할 수 있으며, 이 현상은 낮은 온도, 포도당 유사물질, 대사저해제 등에 의하여 저해를 받는다(5-7).

생세포와 사세포가 금속, 방사능 물질을 축적할 수 있지만, 각각의 기작에는 대사의존도의 정도에 따라 차이가 있다. 구리, 아연, 망간, 코발트 등의 많은 금속들이 저(低)농도에서는 미생물 성장에 필수적이지만, 금, 은, 카드뮴, 납, 주석과 같은 다른 여러 금속들은 필수적인 생물학적 기능을 전혀 지니고 있지 않다. 우라늄과 토륨을 포함한 이러한 금속들은 생세포에 다양한 정도의 독성을 보인다. 생세포는 다양한 축적기작과 형태학적, 생리학적 및 유전적 조작의 상대적인 용이함에 있어서 여러 가지 잇점을 지니고 있다(8). 세포벽, 세포외 다당질 및 다른 물질에 중금속이 결합하는 대사과정과 무

†Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744
Tel : +82-31-290-2583, Fax : +82-31-293-4789
E-mail : jhseo94@snu.ac.kr

관한 흡착 (metabolism - independent biosorption)은 생세포와 사세포에서 일어나고 일반적으로 반응이 빠르다. 대사과정에 의존적인 세포 내 유입 또는 수송 (metabolism-dependent intracellular uptake or transport)은 생세포에서 일어나며 독성 징후에 의해 일어난다. 몇몇 경우에 세포 내 유입은 독성 상호관계에서 초래된 막 투과성의 증가에 기인한다. 납, 우라늄 및 토륨과 같은 몇몇 금속의 미생물 균체로의 축적은 확산에 의한 것이 아니라면 대부분 세포 표면에 근거를 둔 것이다. 세포 내에서 금속 이온은 특정 기관 내에 위치하거나 metallothionein (MT)와 같은 금속결합 단백질과 결합해 있다. 미생물 배양에서 금속 흡착과 유입은 배지조성의 변화와 금속 킬레이터로서 작용할 수 있는 대사물질의 분비에 의해 영향을 받을 수 있다. 그래서, 주어진 미생물 시스템에서 금속 유입은 여러 기작에 의해 동시에 또는 연속적으로 영향을 받는 것으로 생각된다(8).

효모의 metallothionein은 *Saccharomyces cerevisiae* *CUP1* 유전자 부위에서 발현되는 단백질로서 분자당 12개의 cysteine에 의하여 8개의 구리 이온과 결합하고 있는 53개의 아미노산으로 이루어진 단백질이다. 구리, 은 등의 1가 이온은 단백질 분자당 8개가 결합하고 있는 반면, 카드뮴이나 아연 등의 2가 이온은 단백질 1분자당 4개가 결합하고 있다(9). MT 단백질은 효모세포에서 배지 중에 고농도 구리의 독성으로부터 세포를 보호할 뿐만 아니라 세포 내 금속저장 및 대사조절 등의 기능을 수행하는데, 정상시에는 낮은 수준으로 발현되지만 구리농도가 일정수준 이상이 되면 발현이 촉진된다. 구리에 대해 내성을 가진 균주는 전형적으로 약 2 kb 크기의 *CUP1* 유전자 부위를 11-15 copy 정도 가진다. 반면에 구리에 대해 내성이 없는 균주는 단지 1 copy만의 *CUP1* 유전자를 지니고 있다. 즉 구리에 대하여 내성을 부여하는 *CUP1* 유전자의 copy number에 크게 의존함을 간접적으로 알 수 있다(10).

본 연구에서는 *CUP1* 유전자를 다중으로 도입한 재조합 효모의 중금속에 대한 내성, 중금속 흡착능 및 중금속 흡착을 위하여 MT 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있는 환경인자에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

유전자 조작을 위하여 사용한 대장균은 *Escherichia coli* DH5 α 였으며, *CUP1* 유전자를 형질전환하기 위하여 사용한 *S. cerevisiae* BZ31-1-7Ba (Mat α , *trp1*, *ura3*)는 0.3 mM CuSO₄를 첨가한 배지에서 성장할 수 없는, 구리에 대하여 내성을 가지지 않는 숙주세포이다. 플라스미드 pJW9(11)은 YRp7 벡터를 모체로 하고 있으며 이중으로 반복된 (two repeated unit) *CUP1* 유전자를 함유하는 벡터로서 캘리포니아 대학 (UC, Berkeley, USA)의 Jack Welch 교수로부터 분양 받았다. 플라스미드 pJW9로 형질전환 된 재조합 효모는 *S. cerevisiae* BZ-pJ로 명명하였다(12). YEp36(13) 플라스미드로부터 *CUP1* 유전자를 분리한 후, YEp352 및 pYPR3831 벡터에 도입하여 YEp352Cup1와 pYPR3831Cup1 벡터를 각각 완성하였다(Figure 1). 숙주효모를 YEp352Cup1 및 pYPR3831Cup1로 형질전환 시킨 균주를 각각 *S. cerevisiae* BZ352 및 *S. cerevisiae* BZ3831로 명명하였다. *S. cerevisiae* 301N(13)은 염색체에 *CUP1*

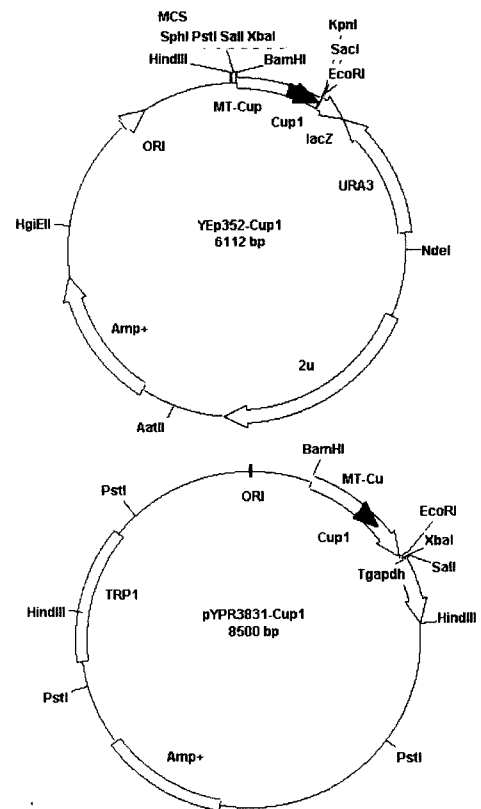


Figure 1. Genetic map of plasmid YEp352Cup1 and pYPR3831Cup1.

유전자를 약 10-15 copy 정도 함유하여 구리에 대한 내성이 있는 균주로서 대조구 실험을 위하여 사용하였다.

배지 및 배양방법

유전자 조작에 사용한 대장균의 배양을 위하여 LB 배지 (0.5 g/L yeast extract, 10 g/L bacto tryptone, 10 g/L NaCl)를 사용하였다. 재조합 효모의 배양을 위하여 10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto peptone 및 20 g/L의 포도당을 함유하는 MES buffer (10 mM, pH 5.2)를 사용하였다. YEp352Cup1, pYPR3831Cup1 및 pJW9 플라스미드로 형질전환 시킨 효모는 선택배지를 사용하여 선별하였다. 탄소원과 기타 성분은 분리하여 멸균한 후 배양전에 혼합하여 사용하였다. *S. cerevisiae* BZ31-1-7a, *S. cerevisiae* 301N은 YEPD 배지를 사용하여 전배양을 수행하였으며, 재조합 효모는 선택배지를 사용하여 전배양을 수행하였다. 접종용 균주의 배양은 본 배양에 사용할 배지 5 mL을 멸균한 후 균을 접종하여 30°C에서 16시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 배지에 사용한 중금속염은 0.5 M CuSO₄, 1 M Cd(NO₃)₂ · 4H₂O, 1 M Cr(NO₃)₃ · 9H₂O, 1 M Zn(NO₃)₂ · 6H₂O, 1 M Pb(NO₃)₂, 1 M MnSO₄ · H₂O stock 용액을 만들어 사용하였다. 금속의 질산염을 사용한 이유는 용액에서 금속이 이온쌍 (ion pair)을 만드는 경향이 적기 때문이다. Stock 용액 제조에는 10 mM Ca(NO₃)₂ 용액을 사용하였는데 이는 이온강도 완충용액 (ion strength buffer)으로 작용한다. 초자 기구는 사용 전 3 N 질산용액에 하룻밤 침지한 후 탈이온수 (deionized water)로 2회 세척하여 사용하였다.

분석방법

균체농도는 배양액의 흡광도 (OD₆₀₀)를 측정 한 후, 미리 결정한 흡광도와 건조 균체농도와의 상관계수를 이용하여 측정하였다. 배지 중의 포도당 농도는 배양액을 적절히 희석한 후 포도당 정량 kit (영동제약, 대한민국)을 이용하여 측정하였다. 에탄올 농도는 Carbowax 20M column이 장착된 gas chromatograph (GC)를 사용하여 측정하였다. GC의 분석조건은 주입구와 검출구의 온도를 각각 200°C로 하였으며, column의 온도는 150°C로 유지하였으며, 부탄올 (2%, w/v)을 내부 표준물질로 사용하였다.

금속농도의 측정

회수한 배양액을 8,000 ×g에서 5분간 원심분리 하여 취한 상등액을 금속농도 측정에 사용하였다. 배지 중의 유기물 성분이 금속원자의 원자화를 저해하는 것을 방지하기 위하여 원심분리한 상등액에 동일 부피의 질산용액을 첨가하여 98°C에서 10시간 동안 유기물을 분해하였다. 동일한 과정을 2회 반복하여 유기물을 분해한 후 염산을 첨가하여 잔류물을 용해 시킨 후 원자 흡광 분광광도계 (Shimadzu, Tokyo, Japan)을 사용하여 금속농도를 측정하였다.

유전자조작 및 형질전환

대장균의 형질전환을 비롯한 일반적인 유전자 조작은 Sambrook(14) 등이 제시한 방법을 이용하여 수행하였다. YEPD 배지에 숙주세포를 접종하여 10시간 동안 배양하고 5 mL YEPD 배지로 옮긴 후 OD₆₀₀ = 1~1.5가 될 때까지 진탕 배양한 후 4°C에서 5분 동안 원심분리 하였다. 회수한 세포를 5 mL의 TE (pH 8.0) 완충액으로 3회 세척한 후 200 mL의 TE와 250 mL의 lithium acetate (0.2 M)을 첨가하여 30°C에서 30분간 배양하였다. 여기에 약 10 μL의 플라스미드와 멸균된 PEG 6000을 첨가하고 30°C에서 1시간 동안 배양한 후 42°C에서 5분간 방치하였다. 멸균수로 현탁한 후 선택배지에 도말하여 30°C에서 2~3일 동안 배양하였다.

결과 및 고찰

숙주효모와 재조합 효모의 구리와 카드뮴에 대한 내성

숙주 효모는 구리농도 0.8, 1.6, 2.0, 3.2 mM에서 재조합 효모인 *S. cerevisiae* BZ3831은 1.6, 3.2, 7.8, 11.8 mM에서 생육 가능 여부와 구리 흡착능을 살펴보았다. 숙주 효모의

Table 1. Effects of cadmium concentration on cell growth and cadmium adsorption by *S. cerevisiae* BZ-pJ at 30°C and initial pH 5.2.

Added Cd (mM)	Final cell concentration (g/L)	Cd removed (mM) (Removal efficiency,%)
0.07	12.3	0.07 (100)
0.15	8.5	0.13 (88.5)
0.21	7.2	0.16 (75.0)
0.28	8.8	0.25 (88.4)
0.41	8.2	0.20 (49.3)
0.49	9.1	0.32 (65.5)
0.56	8.6	0.32 (57.7)
0.61	8.0	0.38 (61.4)

경우는 배지 중의 구리 농도가 증가할수록 최종 균체 농도는 감소하였지만 1.6 mM의 구리를 첨가한 결과, 균체에 의하여 1.2 mM의 구리가 제거되어 약 76%의 제거율을 보였다. 재조합 *S. cerevisiae* BZ3831은 구리 농도가 증가할수록 세포농도도 증가하였고 구리농도 11.8 mM에서 4.72 mM의 구리가 균체에 의하여 흡착되었다. 재조합 *S. cerevisiae* BJ-pJ의 초기 카드뮴 농도에 따른 균체의 성장과 카드뮴 흡착능을 조사하였다. Table 1에 나타난 바와 같이, 첨가한 카드뮴의 양이 0.61 mM까지 세포의 성장에는 영향을 주지 않았고 첨가하는 카드뮴의 양이 증가할수록 흡착되는 카드뮴의 양도 증가하였다. 이러한 결과는 *CUPI* 유전자에 의하여 발현되는 효모의 MT 단백질이 구리 뿐만 아니라 카드뮴과 결합하여 카드뮴의 독성을 억제한다는 보고와 일치하였다(15). 포도당 대사에 의하여 성장한 균체보다, 주입한 포도당의 고갈 후에 에탄올을 소모하면서 균체가 성장할 때보다 많은 카드뮴이 흡착되었다.

중금속 함유 배지에서 균체 성장과 중금속 흡착능 비교

숙주세포 및 재조합 균주를 구리가 1.57 mM 함유된 배지에서 배양하여 균체 성장과 구리 흡착능을 비교하였다. 카드뮴에 강한 내성을 보이는 것으로 알려진 *S. cerevisiae* 301 N은 구리배지에서 성장은 우수하였지만 구리 제거능에 있어서는 가장 저조한 결과를 보였다. 구리를 함유한 배지에서는 *S. cerevisiae* BZ-pJ가 최대 균체 농도 9.4 g/L, 최대 구리 흡착량 1.38 mM 및 구리 제거율 91.4%로서 균체 성장과 구리 흡착능에 있어서 가장 우수하였다(Table 2). 이러한 현상은 서로 다른 플라스미드로 형질전환된 재조합 효모의 *CUPI* 유전자의 발현정도와 이에 따른 중금속에 대한 내성 및 균체성

Table 2. Comparison of cell growth and metal removal efficiencies for host and recombinant *S. cerevisiae* strains at 30°C and initial pH 5.2.

		<i>S. cerevisiae</i>				
		BZ31-1-7Ba	301N	BZ-pJ	BZ352	BZ3831
Cu (1.57 mM)	Final cell concentration (g/L)	3.30	7.64	9.02	7.22	7.03
	Cu removed (mM)	0.27	0.14	1.38	0.41	0.24
Cd ¹⁾ (0.89 mM)	Final cell concentration (g/L)	0.16	4.10	2.15	2.56	3.09
	Cd removed (mM)	0.01	0.10	0.09	0.08	0.10
Zn ¹⁾ (1.53 mM)	Final cell concentration (g/L)	5.22	6.68	8.71	10.4	6.95
	Zn removed (mM)	0.21	0.43	0.59	0.72	0.41
Mn ¹⁾ (3.64 mM)	Final cell concentration (g/L)	1.84	2.45	6.76	7.58	7.2
	Mn removed (mM)	0.15	0.36	1.44	1.56	1.63

1) Cu (0.31 mM) was also added.

장이 구리를 함유하는 배지에서 *CUP1* 유전자의 copy number에 상당히 의존하는 것으로 판단되었다. 즉, 플라스미드 pJW9에는 *CUP1* 유전자가 2개의 반복된 형태 (two repeated unit)로 존재하지만(10), 그 외의 벡터에는 1개의 *CUP1* 유전자만이 존재하기 때문에 동일한 농도의 구리농도를 함유하는 배지에서 *S. cerevisiae* BZ-pJ의 균체 성장과 구리 제거능이 우수한 것으로 사료되었다. 효모 세포 내에서 *CUP1* 유전자의 copy number를 증가시켜 카드뮴과 구리에 대한 내성을 증가시킨 사례도 보고된 사례가 있다(13). 한 등은(12) MT 유전자를 다중으로 함유하는 플라스미드를 이용하여 숙주 효모의 구리 저항능을 4배 향상시켰고, 8배의 비성장속도 향상을 유도하였다. 정 등은 (16) copper-binding protein 유전자를 대량발현시켜 구리뿐만 아니라 크롬, 아연, 납에 대해서도 저항성을 보였음을 보고하였다. 김 등은(17) MT 단백질을 포함한 재조합 효모를 이용하여 세포 g당 카드뮴 제거량을 52.6 mg 까지 높였다고 보고하였다.

카드뮴이 0.89 mM 함유된 배지에서의 균체 성장과 카드뮴 흡착능을 회분식 배양을 통하여 조사하였다. 숙주효모는 카드뮴이 함유된 배지에서 전혀 성장하지 못하였으며, 카드뮴 내성 균주인 *S. cerevisiae* 301 N은 36시간의 정체를 거쳐 최대 균체농도 4.1 g/L를 나타내었지만 카드뮴 제거능에 있어서는 다른 재조합 균주와 별다른 차이를 발견할 수 없었다. 결과적으로 *CUP1* 유전자를 multi-copy로 함유하는 재조합 효모와 야생효모의 카드뮴 흡착능은 차이가 없었다. 이러한 결과는 metallothionein 단백질이 *CUP1* 유전자의 발현을 위해 배양 초기에 주입한 구리와 주로 흡착되어 있는 것으로 추정되었으며, 염색체의 *CUP1* 유전자가 결손된 숙주세포에 플라스미드를 이용하여 *CUP1* 유전자를 multiple copy로 도입한 경우 숙주 세포의 구리에 대한 내성은 증가시킬 수 있었지만 카드뮴 흡착이나 내성은 증가시킬 수 없었다는 보고(18)와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

아연이 1.53 mM 함유된 YEPD 배지에서 각 균주의 성장과 아연 흡착능을 비교하였다. 아연이 함유된 배지에서는 플라스미드 YEp352CUP1으로 형질전환 된 *S. cerevisiae* BZ352가 균체 성장과 아연 흡착능에서 가장 우수하였다. 배지 중 아연의 제거는 growth associated type으로 이루어졌으며, 포도당이 완전히 소모된 이후에는 더 이상 아연이 흡착되지 않는 것으로 보아 재조합 균주에 의한 아연의 흡착은 균체의 포도당 대사과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되었다. 이러한 결과는 포도당 유사체를 사용하였을 때 배지 중의 아연이 거의 제거되지 않았다는 보고와도(19) 상통하는 결과로 판단되었다.

망간 (3.64 mM)이 함유된 배지에서는 카드뮴에 대하여 내성을 지니고 있는 *S. cerevisiae* 301 N이 거의 성장을 하지 못하였으며 망간의 흡착도 거의 관찰할 수 없었다. 또한 다른 금속을 사용했을 경우와는 다르게, 포도당 대사에서 부산물로 생성되는 에탄올을 균체가 거의 이용하지 못하였기 때문에 최종 균체농도가 다른 금속을 사용한 경우에 비하여 상대적으로 낮은 값을 나타내었다. 이상과 같이 사용한 금속의 종류에 따라 효모세포에 흡착되는 양에 차이가 발생하는 것은 효모의 세포벽 성분이 각각의 금속과 특이한 결합특성(20)을 가지고 있을 뿐만 아니라 MT 단백질의 발현효율이

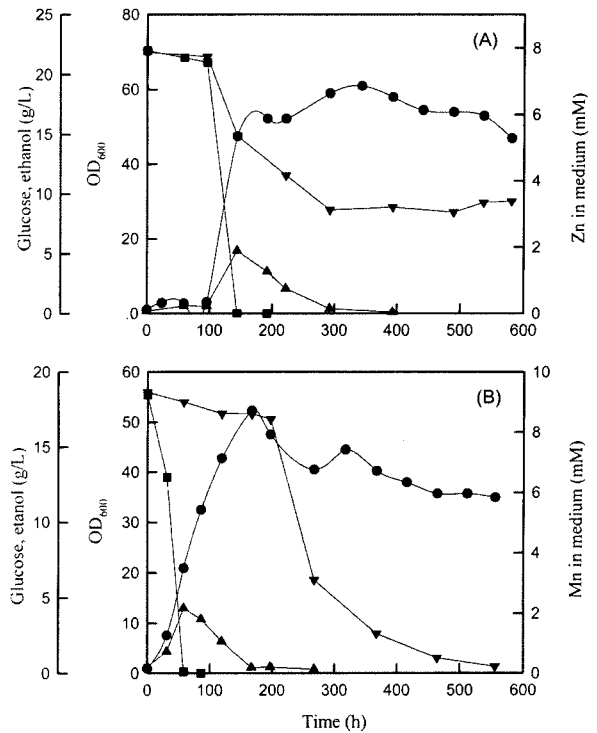


Figure 2. Fermentation profiles of *S. cerevisiae* BZ3831 in 7.65 mM Zn and 0.63 mM Cu (A) and 9.10 mM Mn and 0.31 mM Cu (B) at 30°C and initial pH 5.2. ● : optical density, ■ : glucose, ▲ : ethanol, ▼ : Zn in medium.

상이하기 때문인 것으로 사료되었다.

중금속 흡착에 미치는 구리 농도의 영향

균체 성장을 저해하지 않는 범위에서 *CUP1* 유전자의 발현을 효과적으로 유도하여 중금속의 흡착을 최대로 하는 구리 농도를 결정하고자 하였다. 아연이 7.65 mM 함유된 배지에 다양한 농도의 구리를 첨가한 후 재조합 *S. cerevisiae* BZ3831의 균체 성장과 아연 흡착능을 살펴보았다. 균체의 성장과 동시에 아연과 구리가 흡착되었으며, 정지기 이후에는 세포벽에 대한 아연과 구리의 경쟁관계 때문에 구리의 탈착이 일어났다. 아연 흡착량은 구리농도가 0.31, 0.63 mM일 때 5.6 mM로서 가장 높게 나타났지만 구리농도에 따른 아연 흡착량에는 큰 차이가 없었다(Figure 2). 또한 효모의 *CUP1* 유전자 promoter는 구리와 은에 의하여 효과적으로 발현되는 것으로 알려져 있지만(11,13), *S. cerevisiae* BZ3831은 구리가 존재하지 않고 아연이 7.65 mM 함유된 배지에서 최대 13.1 g/L까지 성장하였으며, 아연 흡착량은 4.97 mM이었다. 이러한 실험결과로부터 효모의 *CUP1* 유전자는 아연에 대해서도 효과적으로 발현이 유도됨을 알 수 있었다.

망간이 9.10 mM 함유된 배지에 0~4.72 mM의 구리를 배양초기에 주입하여 *S. cerevisiae* BZ3831의 균체 성장과 망간 흡착능을 살펴보았다. 주입한 구리농도에 관계없이 최종 균체농도는 거의 일정하였지만 구리농도 0.31 mM에서 최대 망간 흡착량 9.10 mM을 보였다. 재조합 *S. cerevisiae* BZ3831은 구리가 존재하지 않는 9.10 mM 망간배지에서 9.65 g/L까지 성장하였으며 망간 흡착량도 8.20 mM이었다. 이러한 결

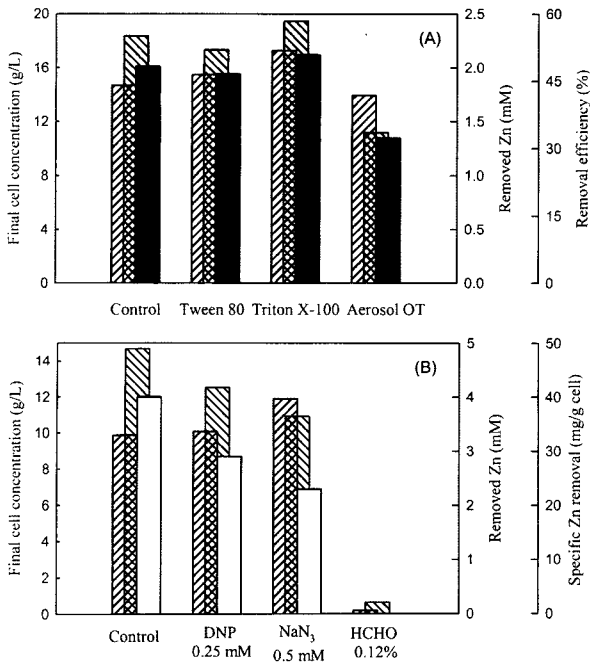


Figure 3. Effects of surfactant (A) and respiratory inhibitor (B) on growth and zinc adsorption of *S. cerevisiae* BZ3831 in 0.31 mM Cu and 4.59 mM (6.12 mM for B) Zn at 30°C with an initial pH 5.2. Each surfactant solution was added at final concentration of 0.10% (v/v) in pannel (A). ▨ : dry cell weight, ▩ : Zn removed, ■ : removal efficiency, □ : specific Zn removal.

과는 *CUPI* 유전자가 아연과 마찬가지로 망간에 의해서도 발현이 유도됨을 알 수 있었다. 배지 중 구리농도가 1.57 mM 이상이 되면 망간의 흡착에 경쟁적으로 작용하였으며, 세포의 대수 증식기에 흡착된 구리는 정지기 이후에 모두 탈착되었다. 또한 정지기 후반에 일어나는 망간의 세포벽에의 흡착은 아연의 경우와는 다른 현상으로서 배양 시간의 경과에 따른 균체의 세포벽 조성의 변화와 금속의 특이성에 기인하는 것으로 판단되었다(20).

계면활성제 및 대사 저해제 첨가가 중금속 흡착에 미치는 영향

재조합 *S. cerevisiae* BZ3831의 아연흡착에 미치는 계면활성제의 영향을 살펴보기 위하여 아연 4.59 mM, 구리 0.31 mM을 함유하는 배지에 Tween 80, Triton X-100 및 Aerosol OT solution을 각각 0.1% 첨가하여 발효를 수행하였다. 비이온계 계면활성제인 Triton X-100은 균체생육 뿐만 아니라 효모 균체에 의한 아연의 흡착을 다소 촉진시키는 효과를 나타내었으나, Tween 80은 균체생육과 아연흡착에 별다른 영향을 미치지 못하였다(Figure 3A). 그러나 음이온계 계면활성제인 Aerosol OT는 균체생육과 아연흡착을 모두 크게 저해하였다. Triton X-100의 첨가에 의한 균체성장 및 아연흡착의 증가는 비이온계 계면활성제의 첨가가 효모세포의 물질흡수를 촉진시키는 유용한 수단이라는 보고와 같이(21) Triton X-100이 효모세포막의 투과성에 영향을 미쳤을 것으로 사료되었다. 또한 음이온계 계면활성제인 Aerosol OT의 첨가에 의한 균체생육 저하는 효모세포막의 파괴나 이에 따른 세포 내 효소

단백질의 변화에 기인한 것으로 판단되었다.

대사 저해제인 dinitrophenol (DNP) 0.25 mM, sodium azide (NaN₃) 0.5 mM, formaldehyde (HCHO) 0.12%를 YEPD 배지에 첨가하여 이들이 균체의 생육과 아연흡착에 미치는 영향을 조사하였다. 대사 저해제는 세포 내 에너지 대사와 관련된 효소의 작용을 저해하거나 물질전달을 저해하는 것으로 알려져 있다. 최종 균체농도는 NaN₃를 첨가한 것이 11.9 g/L로서 가장 높은 값을 나타내었지만 흡착된 아연의 양은 대사 저해제가 첨가되지 않은 대조구가 4.90 mM로서 가장 우수하였다(Figure 3B). 이러한 결과는 KCN과 DNP 등이 아연의 세포 내 유입에 강력한 저해를 일으킨다는 보고와 일치하였다(19). *Chlorella vulgaris*의 경우 아연축적에 광합성 저해제인 NaN₃가 카드뮴 축적에는 DNP와 NaN₃가 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다(22).

요 약

중금속 결합 단백질인 metallothionein (MT)를 발현하는 *CUPI* 유전자를 다중으로 함유하는 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 균체성장과 중금속 제거특성을 조사하였다. *CUPI* 유전자를 다중으로 함유하는 재조합 효모는 중금속을 포함한 배지에서의 균체성장과 중금속 흡착능이 중금속에 대하여 내성을 가지고 있는 야생효모나 숙주세포에 비하여 우수하였다. 서로 다른 플라스미드를 함유하는 중금속을 함유하는 배지에서의 균체성장과 중금속 흡착능의 차이는 중금속에 대한 내성과 중금속 흡착에 MT 단백질의 발현 수준이 중요한 영향을 미치는 것으로 추정되었다. 구리를 함유하지 않고 고농도의 아연과 망간을 함유하는 배지에서 재조합 효모는 높은 균체 농도와 중금속 제거능을 나타내었는데, 이는 MT 단백질을 발현하는 *CUPI* promoter가 아연과 망간에 의해서도 발현이 유도된다는 것을 알 수 있었다. MT 단백질을 효율적으로 발현하여 재조합 효모에 의한 중금속 흡착을 최대화 할 수 있는 최적의 구리농도는 0.31 mM로 결정되었으며, 비이온계 계면활성제인 Triton X-100은 재조합 효모의 균체성장과 중금속 흡착을 증가시켰지만, 대사 저해제는 균체성장과 중금속 흡착을 모두 저해하였다.

감 사

본 연구는 교육부의 BK21 program의 지원을 받았으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

1. Feng X., G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, J. Liu, and K. M. Kemner (1997), Functionalized monolayers on ordered mesoporous supports, *Science*, **276**, 923-926.
2. Volesky, B. and H. A. May-Phillips (1995), Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 797-806.
3. Belliveau, B. H., M. E. Starodub, C. Cotter, and J. T. Trevors (1987), Metal resistance and accumulation in bacteria. *Biotechnol. Adv.* **5**, 101-127.

4. Gadd, G. M. (1986), Fungal responses towards heavy metals, in microbes in extreme environments, 83-110, Academic Press, London.
5. Kelly, D. P., P. R. Norris, and C. L. Brierley (1979), Microbiological methods for the extraction and recovery of metals, in *Microbial Technology*, current state, future prospects, 263-308, Cambridge University Press, Cambridge.
6. Brierley, J. A., G. M. Goyak, and C. L. Brierley (1986), Considerations for commercial use of natural products for metals recovery, in *Immobilization of Ions by Biosorption*, 105-117, Ellis Horwood, Chichester.
7. Hurikoshi, T., M. S. Nakajima, J. A. Brierley, and C. L. Brierley (1986), Microorganism in reclamation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 311-336.
8. Gadd, G. M. (1988), Accumulation of metals by microorganisms and algae, in *Biotechnology - a comprehensive treatise*, 6b. 401-433. VCH, Verlagsgesellschaft, Weinheim.
9. Hamer, D., D. Thiele, and J. Lemontt (1985), Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science*, **228**, 685-690.
10. Fogel, S. and J. W. Welch (1982), Tandem gene amplification mediates copper-resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 5342-5346.
11. Welch, J. W., S. Fogel, C. Buchman, and M. Karin, (1989), The *CUP2* gene product regulates the expression of the *CUP1* gene, coding for yeast metallothionein. *EMBO*, **8**, 225-260.
12. Han, N. S. and J. H. Seo (1992), Growth and copper resistance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing a metallothionein gene, *Biotechnol. Lett.* **14**, 7-11.
13. Tohyama, H., T. Tomoyasu, M. Inoue, M. Joho, and T. Murayama (1992), The gene for cadmium metallothionein from a cadmium-resistant yeast appears to be identical to *CUP1* in a copper-resistant strain. *Curr. Genet.*, **21**, 275-280.
14. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
15. Dennis, R. W., K. B. Nielson, R. G. William, and D. H. Hamer (1985), Yeast metallothionein, sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 14464-14470.
16. Chung, D. H., D. O. Kim, and J. H. Seo (1995), Characteristics of growth and metal removal in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harboring a metallothionein gene. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 475-481.
17. Kim, D. O., S. S. Park, and J. H. Seo (1996), Growth and cadmium removal in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harboring a metallothionein gene. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 543-549.
18. Jeyaprakash, A. and J. W. Welch (1991), Multicopy *CUP1* plasmids enhance cadmium and copper resistance levels in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 363-368.
19. Christopher, W. and M. G. Geoffrey (1987), The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. General Microbiol.* **133**, 727-737.
20. Brady, D. and A. D. Stoll (1994), Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **44**, 297-302.
21. 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.
22. Maeda, S. and M. Mizoguchi (1990), Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater algae, *Chlorella vulgaris*, part I, toxicity and accumulation. *Chemosphere*, **21**, 953-963.