

Viability and Luciferase Activity of Freeze-Dried Recombinant Biosensor Cells for Detecting Aromatic Hydrocarbons

Mi Na Kim¹, Hoo Hwi Park¹, Woon Ki Lim¹ and Hae Ja Shin^{2†}

¹Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Environmental Engineering Major, Division of Applied Bioengineering, Dongseo University, Busan 617-716, Korea

Aromatic hydrocarbons are of major concern among genotoxic chemicals due to their toxicity and persistence. Some microorganisms can utilize aromatic hydrocarbons as carbon and energy sources by inducing expression of catabolic operon(s). The XylR regulatory protein activates transcription of the catabolic enzymes to degrade BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene) from its cognate promoters, *Pu* and *Ps* upon exposure of the cells to the aromatic hydrocarbons. The activity of XylR on the promoters was previously monitored using luciferase *luc* reporter system. The *xylR*, its promoter *Pr* and the promoter *Po* for the phenolic compound catabolic operon were introduced upstream of firefly luciferase *luc* in the pGL3b vector to generate about 7.1 kb of pXRBTEX. Here *E. coli* harboring the plasmid was freeze-dried under various conditions to find optimal conditions for storage and transport. The cell viability and luciferase activity were maintained better, when the cells were freeze-dried at -70 °C in the addition of the 10% skim milk or 12% sucrose. However, coaddition of protectants such as 10% skim milk plus 10% glucose or 12% sucrose plus 10% glucose, resulted in much better viability and bioluminescence activity compared with the effect of single addition of each protectant. In addition, it was shown that the freeze-dried cells maintained almost intact bioluminescent activities and cell viability for at least 1 week after freeze-drying. This work demonstrated that the properly freeze-dried recombinant bacterial cells could be utilized as a whole-cell biosensor for simple and rapid monitoring of BTEX in the environment.

Key Words: Freeze-drying, Whole-cell biosensor, XylR, Promoters, BTEX

서 론

BTEX (벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, 자일렌)와 같은 방향족 화합물은 유기용매로 여러 다양한 분야에서 활용되고 있으나 독성과 잔류성이 높아 인간의 건강과 생태계에 심각한 오염물질로 문제시 되고 있다. 이러한 방향족 화합물을 측정하기 위해 GC와 같은 기존 분석방법이 이용되고 있다. 기존 분석 방법은 뛰어난 정확도와 정밀도를 장점으로 가지고 있으나 시료의 전처리과정에서 발생하는 이들 방향족 화합물의 휘발성으로 인한 문제와 현장에서 활용할 수 없는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하고 현장에서 방향족 화합물의 유무를 간단하고 신속하게 확인할 수 있는 바이오센서의 연구가 다

양한 미생물을 이용하여 진행되고 있다.

많은 *Pseudomonas* strains 미생물과 그램 음성 미생물은 방향족 화합물과 같은 xenobiotic 화합물을 에너지원과 탄소 원으로 분해하는 능력을 가지고 있다^{7,9}. 이 능력은 한 개 또는 그 이상의 분해 오페론을 발현하는 낮은 copy수의 큰 플라스미드에 의해 결정된다. 그 예로 *Pseudomonas putida* mt-2의 톨루엔 분해 플라스미드 (TOL)와 *Pseudomonas sp.* strain CF600의 pV1150을 들 수 있다⁷. 이들 플라스미드는 두 개의 오페론을 가지며 그 하나는 톨루엔, 자일렌을 벤조산 및 톨루엔산으로 분해하는 *upper pathway operon*이고 다른 하나는 *meta* 분해를 통해 이들 분해산물을 TCA회로의 대사산물로 더욱 분해하는 *lower pathway operon*이다^{9,15}. 이들 미생물은 탄소원과 에너지원으로 방향족 화합물이 존재할 경우에만 필요한 분해효소들을 발현시키는데 이는 방향족 화합물과 더불어 조절 단백질과 프로모터 유전자와의 정확한 반응에 의해 결정된다. 방향족 화합물들은 조절 단백질의 결합부위와 직접 결합하여 조절 단백질의 구조를 변화시켜 프로모터에 더욱 강하게 결합하게 하거나 프로모터에 이미 결합되어 있는 조절 단백질의 전사를 유도하도록 활성

*논문 접수: 2003년 11월 13일

수정재접수: 2003년 12월 5일

†별책 요청 저자: Hae Ja Shin, Environmental Engineering Major, Division of Applied Bioengineering, Dongseo University, Busan 617-716, Korea.

Tel: 051-320-1791, Fax: 051-320-1791

e-mail: hjshin@dongseo.ac.kr

This work was supported by Ministry of Environmental as "The Eco-technopia 21 project"

화시킨다. XylR은 BTEX 분해 관련 조절 단백질로 2개의 프로모터로부터 기본적으로 전사되나 오직 BTEX와 같은 방향족 화합물의 존재에 반응하여 *upper pathway operon*의 *Pu* 프로모터와 *xylS* 유전자의 *Ps* 프로모터의 전사를 활성화시킨다¹⁾. *Ps* 프로모터의 활성화는 XylS 조절 단백질의 과생산을 유도하고 분해산물을 *meta* 분해로 더욱 분해되도록 한다.

이러한 조절 단백질의 특성을 이용한 많은 미생물 유래 바이오센서가 연구되고 있다^{6,10)}. 미생물 유래 바이오센서는 특이적 화합물이 존재하면 작동되어지는 조절 단백질 유전자와 프로모터 유전자의 영향 아래 reporter 유전자가 발현이 되도록 구축되어 특이적 화합물에 의한 리포터 유전자의 발현을 발광이나 형광등의 신호로 측정할 수 있는 시스템이다^{2,10,11)}. 리포터로 주로 발광을 내는 luciferase 유전자와 발색의 β -galactosidase, 그리고 형광을 내는 green fluorescence protein 등을 활용하여 독성 물질의 검출에 활용되어지고 있다¹¹⁾.

본 실험실에서는 BTEX (벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, 자일렌)에 반응하는 조절 단백질 XylR을 클로닝하여 firefly luciferase를 리포터로 미생물 유래 바이오센서를 구축하였다. 이를 위해 XylR 유전자를 발현 프로모터 *P_r*과 작동 프로모터 *P_u*와 결합하고 이를 firefly luciferase *luc* 유전자 앞에 위치하도록 하였으나 높은 background 활성을 보여주었다. 조절 단백질의 특이적 반응을 증가시키기 위해 다양한 프로모터 유전자 (*Ps*, *Po*)를 결합하였으며 그 중 조절 단백질 결합부위 (UAS) 자리가 제거된 변형된 페놀 분해 관련 작동 프로모터 *Po* 유전자와 가장 강한 BTEX 특이적 반응이 유도되는 것이 관찰되어 본 연구에서 사용하였다.

BTEX 측정용 미생물 유래 바이오센서를 현장에서 활용하기 위하여 본 연구에서는 다양한 동결건조 실험조건과 활성을 조사하였다. 바이오센서의 활성을 오랫동안 계속적으로 유지하기 위해 동결온도 및 동결보호제의 최적화를 연구하였다. 본 연구 결과는 미생물 유래 바이오센서를 현장에서 시료의 전처리 없이 간편하게 조작될 수 있음을 시사하여 동결건조된 미생물 유래 바이오센서 세포의 독성 물질 측정에 현장 활용 가능성을 보여주고 있다.

재료 및 방법

1. 박테리아 균주

대장균 균주 DH5 α 는 pXRBTEX의 luciferase 단백질을 발현하는데 사용하였다.

2. pXRBTEX 벡터의 구축

BTEX와 같은 화합물을 분해할 수 있는 *Pseudomonas putida* KCTC1643과 페놀계 방향족 화합물을 분해할 수 있는

Pseudomonas putida KCTC1452를 한국유전자은행에서 구입하여 이로부터 *xylR/Pr*과 *Po* 유전자를 각각 PCR로 클로닝하였다. 각각 양끝에 *KpnI*과 *XhoI*의 제한효소 자리를 지닌 5'-CGGGGTACCTATCGGCCCATGCTTTCAC-3, 5'-CCGCTC-GAGATTTTAATGTGGGCTGCTTGG-3' 프라이머를 이용하여 *xylR/Pr*을 PCR 증폭시키고 각각 양끝에 *XhoI*과 *HindIII*의 제한효소 자리를 가진 5'-CCGCTCGAGAATTGATCAAATGCT-TAAAAA-3', 5'-CGGGGTACCAAGCTTTAACGAGTGAGCTG-ATCGAAA-3' 프라이머를 이용하여 *Po*를 증폭시켰다. Luciferase *luc* 발현 벡터인 pGL3 basic 벡터는 Promega (USA)에서 구입하였다. 먼저 *Po*를 *XhoI*과 *HindIII*로 자르고, 이것을 *XhoI*과 *HindIII*로 자른 pGL3b에 넣어 CaCl₂ 방법을 이용하여 대장균 DH5 α 에 형질전환 시켰다. pGL3b-*Po* 플라스미드는 Qiagen (USA)의 spin column kit을 이용하여 분리하였다. *xylR/Pr*을 *KpnI*과 *XhoI*로 자르고 이것을 *KpnI*과 *XhoI*로 자른 pGL3b-*Po* 플라스미드에 넣어 pXRBTEX 벡터를 완성시켰다. 이것을 CaCl₂ 방법을 이용하여 대장균 DH5 α 에 형질전환시켰다.

3. pXRBTEX를 포함한 균주의 동결건조

pXRBTEX를 가진 대장균을 LB (trypton 1%, yeast extract 0.5%, sodium chloride 0.5%) 배지에서 약 16시간 배양한 후, 이를 20 ml의 새로운 배지에 옮겨서 OD₆₀₀에서 0.6~0.8이 되도록 2~3시간 키웠다. 5,000 x g에서 15분간 원심분리하여 세포를 수확한 뒤 10%, 5%, 2.5% skim milk, 12%, 6%, 3% sucrose, 10%, 5%, 2.5% skim milk + 10% glucose, 10%, 5%, 2.5% skim milk + 0.2% Tween 80, 12%, 6%, 3% sucrose + 10% glucose, 12%, 6%, 3% sucrose + 0.2% Tween 80을 각각 2 ml 첨가하여 500 μ l씩 1.5 ml tube에 나누어 -70°C와 -20°C에서 24시간 동결하였다. 24시간 동결 후 동결건조기를 가동시켜 온도가 -70°C로 떨어지는 것을 확인한 후 동결된 세포를 넣고 진공을 걸어 건조하였다.

4. Luciferase 활성의 측정

동결건조된 세포를 LB 배지 500 μ l에 재현탁 시킨 후, 이를 4 ml의 새로운 배지에 300 μ l을 첨가하여 3시간 키웠다. 또한 동결건조하지 않은 세포를 LB 배지에서 약 16시간 배양한 후, 이를 4 ml의 새로운 배지에 100 μ l을 첨가하여 2시간 키웠다. 여기에 1 mM 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, α -자일렌, m-자일렌, p-자일렌 등을 처리하고, 2시간 후 5 μ l의 0.5 M KPO₄/10 mM EDTA가 들어 있는 1.5 ml tube에 50 μ l의 세포를 섞은 즉시 -70°C에 얼렸다. 얼려진 상태의 세포를 꺼낸 후 25°C 물에 넣고 녹인 후 얼음에 막아 두었다. 활성 측정은 Promega사의 Luciferase assay system을 사용하였다. 녹여둔 샘플에 150 μ l 세포 용해 용액을 첨가하고 25°C에서 10분간

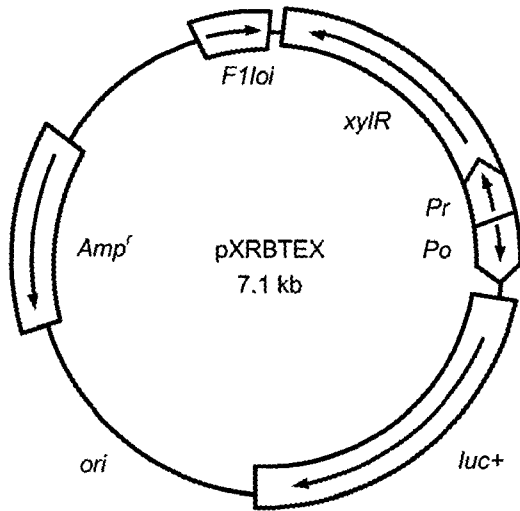


Fig. 1. Schematic map of plasmid pXRBTEX. An activator gene, *xylR* for BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene) compound degradation, its promoter *Pr*, and the promoter *Po* for DmpR activator for phenolic compound degradation were introduced upstream of firefly luciferase *luc* in the pGL3b vector to generate about 7.1 kb of pXRBTEX. Arrows indicate the direction of transcription.

방치하여 세포가 lysozyme에 의해 완전히 용해되도록 하였다. 세포 추출액과 기질인 luciferin 용액을 1:5의 비율인 4 μ l와 20 μ l 비율로 섞고 10초간 vortex한 후 이를 Turner design사의 Luminometer TD20/20을 이용하여 20초 동안 발광하는 값을 읽었다.

5. 세포의 생존수 측정

동결건조된 세포를 LB 배지 500 μ l에 재현탁 시킨 후, 이를 1000배 희석하여 50 μ g/ml의 ampicillin이 포함된 LB plate에 도말하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에 하룻밤 배양하여 나타나는 colony를 세어 세포의 생존수를 측정하였다.

결 과

1. BTEX 검출 미생물 유래 바이오센서의 활성 측정

BTEX (벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, 자일렌) 방향족 화합물을 검출하기 위한 다양한 리포터의 미생물 유래 바이오센서가 연구되고 있고 또한 대체로 높은 background 활성을 보여주었다. 주로 *XylR*과 프로모터 *Pr* 및 작동 프로모터 *Pu*를 luciferase *lux*나 β -galactosidase를 리포터로 활용하여 만든 미생물 유래 바이오센서의 경우 이러한 현상이 발견되었다^{61,62}. 따라서 본 연구에서는 *XylR* 단백질과 발현 유전자 *Pr*, 그리고 *XylR* 결합부위 (2 UAS)를 제거한 폐놀계 화합물 분해 작동 유전자 *Po*를 luciferase *luc* 발현 벡터인 pGL3b 벡터에 클로닝하여 BTEX 검출용 바이오센서 pXRBTEX를 제작하였다

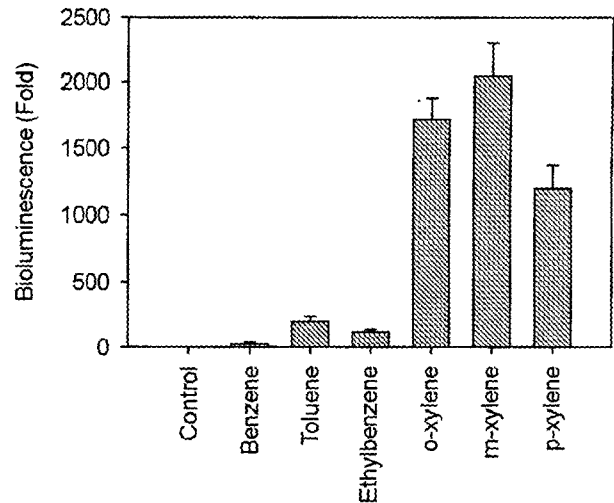


Fig. 2. Responses in bioluminescence of *E. coli* cells containing pXRBTEX to BTEX. Fresh cells harboring pXRBTEX were grown in the presence of 1 mM BTEX for 120 min, and then luciferase activities were measured. The activities were shown as the ratio of induced to noninduced activities.

(Fig. 1). 이는 신호전달이 효율적인 진핵 luciferase를 활용하여 신호를 증폭할 뿐만 아니라 *XylR* 결합부위의 수를 낮추어 줌으로 인해 background 활성을 제거하여 leakage 문제를 해결하고자 하였다. 이 플라스미드를 대장균에 형질전환한 후 세포에 1 mM의 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, o-자일렌, m-자일렌, p-자일렌을 처리하고, 2시간 후 발광을 측정한 결과 이들 화합물에 특이적으로 높은 반응을 보임을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 화합물을 처리하지 않았을 경우 나타나는 luciferase 활성도를 1로 하였을 때, 벤젠은 약 19배, 톨루엔 195배, 에틸벤젠 114배, o-자일렌 1719배, m-자일렌 2047배, p-자일렌 1200배 증가하였다. 본 연구에서 제작된 pXRBTEX는 자일렌류에 좋은 반응을 보이며 이에 비해 톨루엔과 에틸벤젠 그리고 벤젠에서는 상대적으로 낮은 반응을 볼 수 있었다.

2. BTEX 검출용 바이오센서 균주의 동결건조 조건 연구

pXRBTEX를 포함한 균주의 최적의 동결건조 조건을 연구하기 위해 pXRBTEX를 가진 대장균을 다양한 조건의 동결보호제를 첨가하여 각각 -70 $^{\circ}$ C와 -20 $^{\circ}$ C에서 동결건조 후 세포의 발광을 확인하였다. 먼저 단일 동결보호제로 5%와 10% skim milk 그리고 6%와 12% sucrose를 넣고 각각을 -70 $^{\circ}$ C와 -20 $^{\circ}$ C에서 24시간 동결한 후 24시간 진공 건조시켰다. 동결건조된 세포를 LB 배지에 재현탁 시켜 pXRBTEX에 가장 높은 반응을 보이는 1 mM m-자일렌을 첨가한 후 발광을 측정하여 보았다. 이들 값은 m-자일렌을 처리하지 않았을 때 나타나는 luciferase 활성도를 1로 하여 그에 대한 증가율로 표시하였다 (Fig. 3). 그 결과 10% skim milk, 12% sucrose의 경우 비교적 높은 활성을 보였다. -70 $^{\circ}$ C에서 10% skim milk,

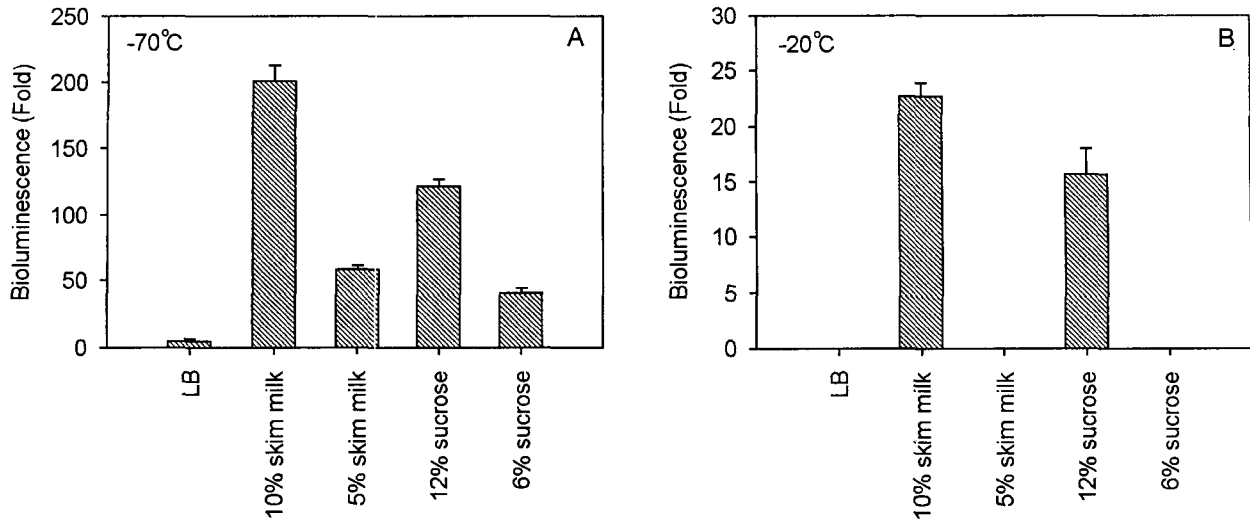


Fig. 3. Effects of several protectants for freeze-drying at -70°C (A) or -20°C (B) on bioluminescence response. Skim milk or sucrose was added to *E. coli* cells containing pXRBTEx. The samples were then frozen at -70 or -20°C and then freeze-dried. Freeze-dried cells were grown in presence of 1 mM m-xylene for 120 min, and then luciferase activities were measured.

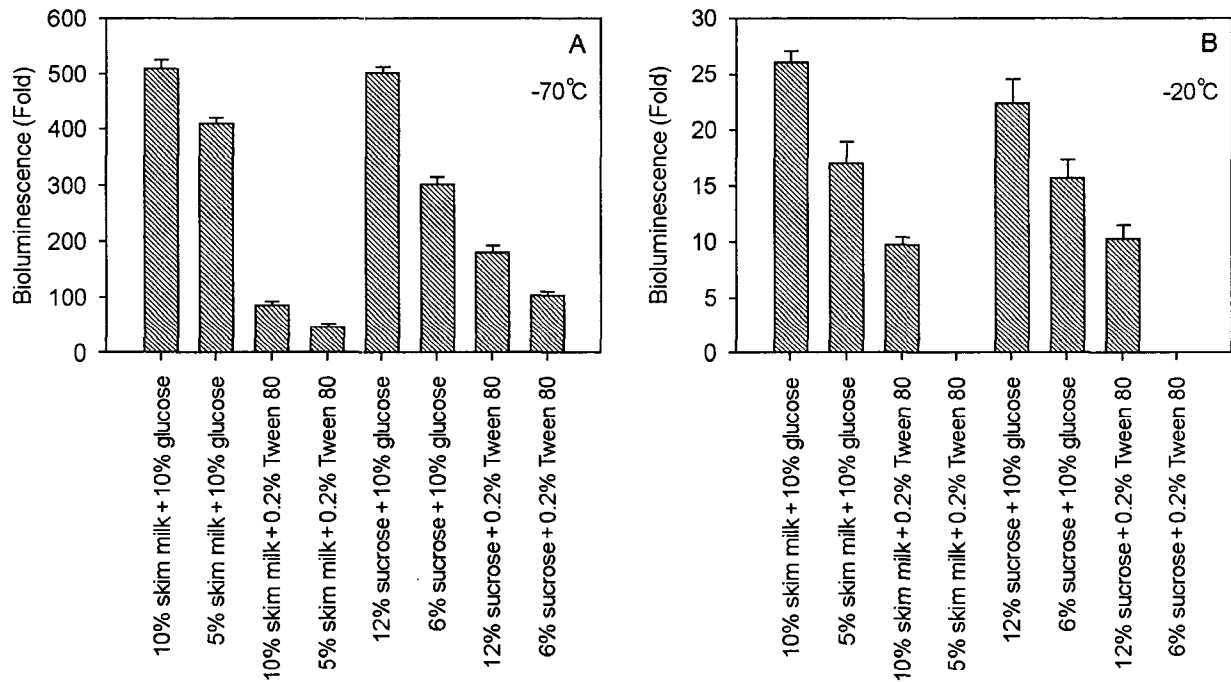


Fig. 4. Effects of mixture protectants for freeze-drying at -70°C (A) or -20°C (B) on bioluminescence response. Various mixtures of skim milk + 10% glucose, skim milk + 0.2% tween 80, sucrose + 10% glucose, and sucrose + 0.2% tween 80 were added to *E. coli* cells containing pXRBTEx. The samples were then frozen at -70 or -20°C and then freeze-dried. Freeze-dried cells were grown in presence of 1 mM m-xylene for 120 min, and then luciferase activities were measured.

12% sucrose를 첨가한 동결건조 후 세포의 발광은 각각 약 202배, 120배 증가하여 -20°C 에 비해 약 10배 정도 높게 나타났다. -20°C 에서는 오직 10% skim milk와 12% sucrose에서만 동결건조 후 세포의 활성이 22배, 14배 나타내는데 반해, -70°C 에서는 5% skim milk와 6% sucrose와 같은 낮은 농도

의 동결보호제에서도 59배, 41배의 활성을 보여주었다.

그 다음으로 다양한 농도의 동결보호제를 혼합하여 첨가할 경우 상승작용이 나타나는지 조사하였다. Skim milk 및 sucrose, glucose 그리고 Tween 80을 동결보호제로 다양한 농도로 첨가하여 -70°C 에서 그리고 -20°C 에서 24시간 동결한

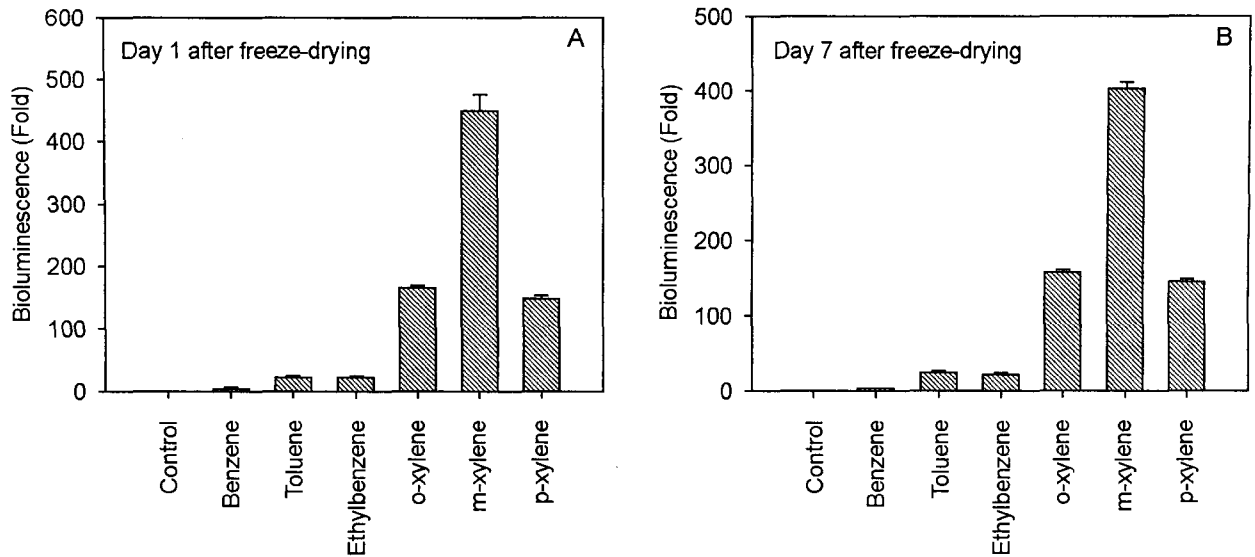


Fig. 5. Bioluminescence activities at day 1 or 7 after freeze-drying at -70°C . Mixture of 10% skim milk plus 10% glucose was added to *E. coli* cells containing pXRBTEX and then freeze-dried at -70°C . The freeze-dried cells were grown in presence of 1 mM BTEX for 120 min at day 1 or 7 after freeze-drying, and then luciferase activities were measured.

후 24시간 동안 진공상태에서 건조시켰다. 동결건조된 세포를 LB 배지에 재현탁 시켜 1 mM m-자일렌을 첨가한 후 발광을 측정하였다. 단일 동결보호제에 비해 혼합 동결보호제가 세포를 동결로부터 더욱 잘 보호하는 것으로 나타났다. 혼합 동결보호제 10% skim milk + 10% glucose 그리고 12% sucrose + 10% glucose를 첨가한 경우 각각 510배, 503배의 매우 높은 활성을 -70°C 에서 보여주었다 (Fig. 4A). 이는 단일 동결보호제를 사용하였을 때 (Fig. 3A) 보다도 약 2배 이상 증가되어 혼합 동결보호제의 상승작용이 있음을 보여주었다. 그러나 -20°C 에서는 이러한 혼합 동결보호제의 큰 상승작용을 관찰할 수 없었으나 단일 동결보호제에서 관찰되지 않았던 5% skim milk, 6% sucrose와 같은 낮은 농도에서 혼합하였을 경우 안정하게 세포의 발광을 관찰할 수 있었다. 세포막 성분과 유사한 Tween 80은 그렇게 큰 효과를 보여주지 않았다. 이 결과는 동결 온도가 낮을수록 그리고 동결보호제의 농도가 높고 혼합될수록 세포를 동결로부터 안전하게 보호함을 보여주었다.

3. 동결건조 바이오센서의 시간에 따른 활성연구

pXRBTEX를 포함한 바이오센서 균주를 동결건조 시킨 후 이들이 방향족 화합물에 대한 활성을 잃지 않고 상온에서 장시간 보관할 수 있는지 확인하기 위해 동결건조된 바이오센서의 활성을 건조 직후 그리고 건조 후 1주일 지난 후에 관찰하였다. 10% skim milk와 10% glucose를 혼합 동결제로 첨가하여 -70°C 에서 동결건조한 세포에 동결건조한 직후 그리고 1주일 후 1 mM의 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, o-자일렌, m-

자일렌, p-자일렌을 첨가하여 발광을 측정하였다. 이들 값은 m-자일렌을 처리하지 않았을 때 나타나는 luciferase 활성도를 1로 하여 그에 대한 증가율로 표시하였다 (Fig. 5). 그 결과 동결건조 직후 벤젠은 약 4배, 톨루엔 24배, 에틸벤젠 23배, o-자일렌 167배, m-자일렌 451배, p-자일렌 149배 증가하였다. 7일 후에도 약간 낮아지거나 비슷한 수준의 세포 활성을 보여주어 방향족 화합물과 특이적 반응 활성은 크게 변함 없는 것을 관찰하였다. 이는 동결건조한 바이오센서를 반영구적으로 보관하고 필요할 때에 언제든지 방향족 화합물의 검출에 활용할 수 있음을 보여주었다.

4. 동결건조 바이오센서 세포의 생존수 연구

대부분의 경우 동결에 따른 세포의 사멸이 관찰되어지고 있다. 따라서 pXRBTEX를 포함한 균주를 -70°C 와 -20°C 에서 동결보호제를 다양한 농도로 첨가하여 동결건조한 후 세포의 생존 수를 측정하기 위해 이들 세포를 LB 배지에 현탁시킨 후 희석 배양하였다. 이 희석된 세포를 ampicillin이 포함된 LB plate에 도말하여 37°C 배양기에 하룻밤 배양한 후 나타나는 colony를 세어 세포의 생존수를 측정하였다 (Table 1). 그 결과 세포의 생존수는 세포의 활성에 비례하였다. 동결보호제가 들어간 세포의 생존수가 높았으며 동결 시 온도가 낮을수록 훨씬 많은 수의 세포가 생존하였다. 그 중 10% skim milk, 12% sucrose, 10% skim milk + 10% glucose, 12% sucrose + 10% glucose의 동결보호제를 첨가한 후 -70°C 에서 동결건조한 세포의 경우 높은 생존수를 보여 주었다. 세포의 활성 결

Table 1. Cell viability after freeze-drying at -70°C or -20°C

protectant	×10 ³ CFU/ml		protectant	×10 ³ CFU/ml	
	-70°C	-20°C		-70°C	-20°C
10% skim milk	992	56	12% sucrose	736	75
5% skim milk	554	32	12% sucrose	452	39
10% skim milk + 10% glucose	4168	326	12% sucrose + 10% glucose	3020	415
5% skim milk + 10% glucose	2532	123	12% sucrose + 10% glucose	1808	136
10% skim milk + 0.2% Tween 80	614	63	12% sucrose + 0.2% Tween 80	923	86
5% skim milk + 0.2% Tween 80	534	36	12% sucrose + 0.2% Tween 80	715	45
LB	58	0			

The cells were frozen at -70 or -20°C with the addition of various protectants, and then freeze-dried. Freeze-dried cells were resuspended in TYS medium and then the number of colony forming units (CFU) for each sample was determined by plating serially diluted samples on LB agar plates

과와 같이 단일 동결보호제보다도 혼합 동결보호제가 세포의 생존에 더욱 효과적임이 관찰되었다.

고 찰

XylR 단백질은 BTEX 화합물을 분해하는 오페론의 전사 조절 인자로 σ^{54} 와 함께 RNA 중합효소와 복합체를 형성하여 전사를 유도한다. 많은 연구자들이 이 XylR 단백질과 *Pr* 프로모터, *Pu* 프로모터를 이용하여 BTEX를 검출할 수 있는 미생물 유래 바이오센서를 제작하였으며, 이들 바이오센서는 대체로 유도물질 없이도 높은 활성을 보여주고 있다^{6,18}. 이를 설명할 수 있는 XylR의 작용 메커니즘과 구조해석이 정확히 밝혀지지 않고 있다. BTEX 존재 하에서 XylR은 *upper operon*의 작동 프로모터 *Pu*의 upstream activator sequence (UAS)에 결합하여 전사를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 또한 XylS의 생산을 유도하는 프로모터 *Ps*의 UAS에 결합하여 전사를 활성화 시켜 XylS의 과생산을 유도한다^{9,15,16}. XylR의 생산을 유도하는 프로모터 *Pr*은 두개의 UAS를 가지고 있으며 XylR에 의해 자가조절되며 XylS의 *Ps* 프로모터와 UAS를 포함한 많은 부분을 공유한다. 따라서 이 두개의 UAS에 XylR이 결합하면 *Ps* 프로모터의 전사를 활성화 시킴과 동시에 *Pr* 프로모터의 활성을 억제시킨다고 보고되었다³. 세포내 XylR의 활성을 위해 아마도 두개의 UAS를 필요로 하며 하나의 XylR 결합은 다른 XylR의 결합을 유도하여 다중체 XylR을 형성함으로써 RNA Polymerase의 전사를 유도할 것이라고 추측되어진다. 높은 background 활성을 가지는 바이오센서의 경우 XylR이 결합할 수 있는 UAS부분이 *Pu* 프로모터와 *Pr* 프로모터에 각각 2개씩 존재하며 재조합에 의해 *Pu* 프로모터와 *Pr* 프로모터가 이웃하게 된다. 따라서 이 이웃한 4개의 UAS에 XylR이 결합하게 되어 다중체의

XylR을 구조적으로 쉽게 형성하여 BTEX의 유도물질 없이도 높은 활성을 보이는 것으로 사료된다.

본 실험실에서는 유도물질 없이도 높은 활성을 보이는 점을 개선하기 위해 *Pu* 프로모터 대신 UAS를 제거한 페놀 분해 관련 작동 유전자 *Po* 프로모터를 사용하여 firefly luciferase *luc*을 리포터로 BTEX 검출용 바이오센서를 제작하였다. Firefly luciferase *luc*은 진핵 luciferase로 다른 리포터 유전자들에 비해 신호전달이 효율적이어서 감도가 높으며 *E. coli*에서도 안정적으로 발현된다¹⁴. *xylR/Pr/Po* 유전자와 luciferase *luc*을 리포터로 사용하여 제작한 바이오센서는 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, 자일렌에 특이적으로 높은 반응을 보이며 특히 자일렌에 반응성이 좋음을 확인하였다.

본 연구에서는 이러한 BTEX 검출용 바이오센서를 현장에서 활용하기 위하여 다양한 동결건조 실험조건과 활성을 조사하였다. 동결보호제 sucrose, glucose 등과 같은 당 종류와 skim milk, 그리고 세포막 성분과 유사한 계면활성제인 Tween 80 등을 활용하였다. 이들 보호제들은 동결건조 과정 중 세포들을 감싸 이들의 손상을 최소한으로 줄여준다^{4,5,8,12,13}. 이들 보호제 중 10% skim milk, 12% sucrose를 단일 동결보호제로 사용한 경우 비교적 높은 활성을 보였으며, 이보다 skim milk + 10% glucose, sucrose + 10% glucose의 혼합 동결보호제를 첨가한 세포의 경우 상승작용이 일어나 더욱 높은 활성을 보임을 확인할 수 있었다. -70°C와 -20°C에서 세포를 동결건조한 후 활성도를 측정하여 비교한 결과 -20°C 보다 -70°C에서 동결시킨 세포의 활성도가 현저하게 높았으며, -70°C에서는 저농도의 동결보호제에서도 활성을 보였다. 이는 -20°C에서 세포의 동결은 비교적 천천히 이루어지므로 동결되는 동안 손상을 입기 때문이라고 보고되고 있다⁹. 세포의 생존수 역시 활성도에 비례하여 10% skim milk, 12% sucrose, 10%, 5% skim milk + 10% glucose, 12%, 6% sucrose + 10% glucose를 첨

가하여 -70℃에서 동결건조한 경우 높은 생존수를 보여주었다. 또한 단일 동결보호제 보다는 혼합 동결보호제가 세포의 생존에도 더욱 효과적임이 관찰되었다. 보호제를 첨가하여 -70℃에서 동결건조한 BTEX 검출용 미생물 유래 바이오센서는 여러 방향족 화합물에 특이적으로 반응하였으며, 7일 후에도 이들의 활성이 계속 유지됨을 확인할 수 있었다.

본 연구 결과는 미생물 유래 바이오센서 세포를 최적의 조건에서 동결건조할 경우 세포가 오랜 기간 생존할 뿐만 아니라 방향족 화합물에 의한 높은 발광반응을 여전히 보여주므로 언제 어디서나 필요할 때에 간단하게 미생물 유래 바이오센서를 현장에서 활용할 수 있음을 시사하고 있다.

참 고 문 헌

- 1) Abril MA, Michan C, Timmis KN and Ramos JL (1989): Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol*, **171**(12): 6782-6790.
- 2) Alexander M (2000): Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol*, **34**: 4259-4265.
- 3) Bertoni G, Marques S and De Lorenzo V (1998): Activation of the toluene-responsive regulator XylR causes a transcriptional switch between σ^{54} and σ^{70} promoters at the divergent *Pr/Ps* region of the TOL plasmid. *Mol Microbiol*, **27**(3): 651-965.
- 4) Chio SH and Gu MB (2000): Enhancement in the viability and biosensing activity of freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biotechnol Bioprocess Eng*, **5**: 202-206.
- 5) Chio SH and Gu MB (2002): A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*, **17**: 433-440.
- 6) Delgado A and Ramos J (1994): Genetic evidence for activation of the positive transcriptional regulator XylR, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding. *J Biol Chem*, **269**: 8059-8062.
- 7) Diaz E and Prieto MA (2000): Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**: 467-475.
- 8) Gu MB, Choi SH and Kim SW (2001): Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *E. coli* for toxicity monitoring. *J Biotechnol*, **88**: 95-105.
- 9) Harayama S, Leppik RA, Rekik M, Mermod N, Lehrbach PR, Reineke W and Timmis KN (1986): Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA* product. *J Bacteriol*, **167**(2): 455-461.
- 10) Hill PJ, Rees CED, Winson MK and Stewart GSAB (1993): The application of *lux* gene. *Biotechnol Appl Biochem*, **17**: 3-14.
- 11) Keane A, Phoenix P, Ghoshal S and Lau PC (2002): Exposing culprit organic pollutants: A review. *J Microbiol Methods*, **49**: 103-119.
- 12) Kerwin BA, Heller MC, Levin SH and Randolph TW (1998): Effect of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20℃ of recombinant hemoglobin. *J Pharm Sci*, **87**: 1062-1068.
- 13) Leslie S, Israeli B, lighthart B, Crowe JH and Crowe LM (1995): Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol*, **61**: 3592-3597.
- 14) Park SM, Park HH, Lim WK and Shin HJ (2003): A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology*, **103**(3): 227-236.
- 15) Ramos JL, Stolz A, Reineke W and Timmis KN (1986): Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc Natl Acad Sci*, **83**(22): 8467-8471.
- 16) Shingler V (1996): Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: depression as a control mechanism. *Mol Microbiol*, **19**: 409-416.
- 17) Shingler V, Franklin FC, Tsuda M, Holroyd D and Bagdasarian M (1989): Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *J Gen Microbiol*, **135**(5): 1083-1092.
- 18) Willardson BM, Wilkins JF, Rand TA, Schupp JM, Hill KK, Keim P and Jackson PJ (1998): Development and testing of bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 1006-1012.