

고정화한 유전자 재조합 균주 *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206의 톨루엔 계열 화합물에 대한 생물발광 활성 조사

공인철 · 정홍경 · 고정석^{†,*}

영남대학교 환경공학과 · *한국지질자원연구원 지구환경연구본부

(2008년 9월 5일 접수, 2009년 2월 27일 채택)

Bioluminescence Activity of Toluene Analogs by Alginate-immobilized *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206

In Chul Kong · Hongkyung Jung · Kyung-Seok Ko^{†,*}

Department of Environmental Engineering, Yeungnam University

*Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources (KIGAM)

ABSTRACT : In this study, the applicability of alginate-immobilized *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206 on the environments, contaminated with toluene analogs was conducted. Genetically engineered strain KG1206 produces light by direct (*m*-toluate, benzoate) and indirect (toluene, xylenes) inducers. The protocol for the alginate-immobilization was determined in terms of the cell to alginate ratio, solution, proper number of alginate beads, and other conditions. Maximum bioluminescences of five chemicals by immobilized strain were generally observed in following orders: *m*-toluate > *p*-xylene > toluene > *o*-xylene > *m*-xylene. In relationship between bioluminescence activity and inducer reduction, initial *m*-toluate (5 mM) in solution was removed approximately 48% of initial at 5 h exposure, showing continuous decrease of inducer chemical in solution. These results of study with alginate-immobilized beads would be useful, especially, for biomonitoring of contaminated environments with specific compounds, such as petroleum hydrocarbon compounds including toluene analogs.

Key Words : Alginate, Bioluminescence, Genetically Engineered Strain, Immobilization, Toluene Analogs

요약 : 본 연구에서는 톨루엔 계열 화합물로 오염된 환경에 대해 고정화한 유전자 재조합 균주 KG1206의 적용 가능성에 대해 조사하였다. 재조합 균주 KG1206은 직접 유도제인 *m*-toluate, benzoate 뿐만 아니라 톨루엔, 자일렌 이성질체가 간접 유도제로서 발광 활성을 나타낸다. 연구에 의해 결정된 고정화 프로토콜의 최적 조건은 다음과 같다: 균주 농도(1 : 1 (v/v)), 오염원 용액(인산염 완충액), 발광 측정에 필요한 비드 수(4개), 5가지 오염원에 대한 최대 발광 활성은 일반적으로 *m*-toluate > *p*-xylene > 톨루엔 > *o*-xylene > *m*-xylene 순으로 나타났다. 생물발광과 오염원 감소는 HPLC로 확인하였으며, 고정 균주에 의해 초기 5 mM *m*-toluate는 5시간 배양 후 약 48%의 감소율을 나타내었으며 계속 분해되는 경향이 관찰되었다. 알긴산 균주 고정화에 대한 본 연구 결과는 톨루엔 계열 화합물을 함유한 석유계 탄화수소에 오염된 특정 환경을 생물학적 모니터링에 유용한 방법으로 사용할 수 있을 것이다.

주제어 : 알긴산, 생물발광, 유전자 재조합 균주, 고정화, 톨루엔 계열 화합물

1. 서론

석유계탄화수소(PHCs: petroleum hydrocarbons)의 누출은 유류저장탱크의 부식과 손상 등으로 전 세계적으로 토양 및 지하수의 중요한 오염문제로 대두되고 있다. 미국의 경우 160만개 이상의 지하 유류저장시설이 있으며 이들 중 약 20%가 누출되는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 국내에서도 저장탱크로부터의 누수 및 급증하는 자동차 수요에 대한 휘발유 및 디젤유 사용의 증가, 산업발전 등으로 유류에 의한 토양 및 지하수의 오염이 꾸준히 증가될 것으로 예상된다.²⁾ PHCs에서 방향족 화합물의 구성비는 매우 낮지만,

특히 방향족 화합물인 BTEX(벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, 자일렌 이성질체)는 유기용매, 세정제 등으로 산업에서 널리 사용되며,¹⁾ 산업화에 따라 그 사용량은 증가하고 있다. 또한, 건강과 환경에 대한 유해한 영향 때문에 석유계탄화수소 화합물에 의한 환경오염에 대한 인식이 점차 높아지고 있다.³⁾

오염물질을 처리 및 관리하기 위해서는 오염 여부 및 그 정도에 대한 정보가 필요하다. 특히 생태계의 오염상태를 평가 및 관리하는데 적합한 방법으로 생물을 이용한 환경 모니터링(biomonitoring) 방법을 사용할 수 있다. 환경매체 특성에 따라 상이한 방법들을 사용할 수 있지만, 생물학적 모니터링의 대표적인 예는 다음과 같다. 물고기와 같은 척추동물과 물벼룩(*Daphnia magna*)과 같은 무척추 수생생물들의 운동 상태나 사멸 정도에 근거하여 수환경 모니터링

[†] Corresponding author

E-mail: kyungsok@kigam.re.kr

Tel: 042-868-3162

Fax: 042-868-3414

에 사용할 수 있고, 생물발광(bioluminescence) 박테리아인 *Vibrio fischeri*의 활성, *E. coli*나 *Bacillus* 균의 특정 효소 활성 및 생합성 저해 등과 같은 미생물 시험법들을 다양한 오염 환경매체에 사용할 수 있다.⁴⁾ 특히, 생물발광은 자연현상으로 생물 내 화학 반응에 의해 생물로부터 발광하는 빛을 일컬으며 (무)척추 동물(firefly *Photinus pyralis*), 박테리아(*Photobacterium*, *Vibrio*) 등의 매우 소수의 생물에서 관찰할 수 있다.⁵⁾ 이는 특정 생물의 유일한 특성이므로 발광생물 외의 다른 생물에 의한 결과분석의 오차를 방지할 수 있고, 화학적 분석에 의한 관리 및 감시와 비교해 불 때 생태계에 오염된 총량보다는 생물이용(bioavailable) 가능한 양, 즉 생태계에 영향을 미치는 양을 가능할 수 있다. 또한 현장에서 직접 이용이 가능하며, 환경 친화적인 기술이므로 특정 화합물에 오염된 생태계의 관리 및 감시에 적절하게 이용할 수 있을 것이다.⁶⁾

오염 현장 생물학적 모니터링을 수행하기 위해 균주를 고정화(immobilization)하여 사용하는 것이 효과적인 방법이 될 수 있다. 고정화에는 담체결합(carrier-binding), 교차결합(cross-linking), 포괄(entraping) 그리고 혼합(combined)과 같은 네 가지 방법이 있으며 각각 장·단점이 있기 때문에 사용 목적을 고려하여 선택해야 한다. 가장 널리 활용되고 있는 고정화 방법으로는 알긴산(alginate), 카라지난(carrageenan) 또는 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)와 같은 고분자 물질에 세포를 포괄하는 방법이다. 그러나 폴리아크릴아미드를 사용할 경우 세포의 생존 능력에 영향을 미치는 독성과 치명적인 손상 때문에 알긴산, 카라지난 같은 조류의 천연 다당류가 세포 고정화의 중합체로 사용되고 있다.⁷⁾ 세포 유실의 최소화, 지속적인 생산 활동, 균주 재이용의 용이성 등과 같은 장점을 가지는⁸⁾ 고정화 기술은 발광 유전자 재조합 균주의 보관, 이동 및 오염 현장에 적용하는데 용이하다.

본 연구에서는 발광균주를 현장에 용이하게 이용하기 위해, 균주 고정화 최적 조건을 조사하여 고정화 프로토콜을 정립하고자 하였다. 정립된 프로토콜에 근거하여 고정화한 균주의 유도제 오염원(톨루엔, 자일렌 이성질체)에 대한 발광 특성을 조사하였다. 또한 유도제 오염원 용액에서 고정화균주에 의한 생물발광 활성과 용액 내 유도제 오염원 농도 변화 관계를 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 발광 균주 특성 및 배양

발광 유전자 재조합 균주인 *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206은 TOL-plasmid와 재조합된 플라스미드를 보유하고 있다. 재조합된 plasmid는 xyl-gene 하부 promoter인 P_m이 벡터 pUCD615 플라스미드의 lux-gene 상부에 조합된 것으로, 유도제로 작용하는 화합물에 의해 생성되는 조절인자(regulatory factor)가 P_m을 양성적으로 조절하여 발광 유전자가 활동하도록 되어 있다.^{9,10)} KG1206은 톨루엔 계열 화합물(톨루엔, 자일렌 이성질체, m-MBA) 및 중요 분해 산물(m-toluate, benzoate)에 노출되었을 경우, 생분해와 함께 발광을 생산하는 특성을 가지고 있다(Fig. 1).

초저온고(-70℃: Ilshin Lab Tech. Co., Model DF9007)에 보관한 균주 KG1206을 필요시 Luria Bertani (LB) 고형배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, 2 N NaOH 0.5 mL per 1L, pH 7.2)에 계대 배양(27℃, 130 rpm)하여 사용하였다. 균주를 LB배지에 약 12시간 이상 배양 후 1:20 희석하여 OD₆₀₀ = 0.6~0.8이 될 때까지 배양하였다. KG1206은 kanamycin 저항유전자(Km^r)을 보유하고 있으므로 배지에 kanamycin을 50 mg/L 첨가하여 사용하였다. KG1206의 생물발광 활성은 Luminometer (Turner Design Model 20/20, USA: 기기측정한계 9999 relative light unit, 이하 RLU)를 이용하여 측정하였다.

2.2. 고정화 및 균주 고정비드 이용 방법 조사

고정화 방법에서 고정화 담체인 알긴산(alginic acid, (C₆H₈O₆)_n, DC chemical Co., Ltd.)과 균주의 적절한 비율을 결정하기 위해 알긴산(2% w/v)에 대해 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0배(v/v)의 균주를 혼합하여 형성한 균주 고정비드의 발광 활성을 조사하였다. 혼합액을 바늘이 없는 주사기(1 mL, Kovax-Syringe, Korea vaccine Co., Ltd.)에 주입하여 냉장 보관 하였던 0.1 M CaCl₂ 용액내로 한방울씩 떨어뜨린 후, 실온에서 2시간 동안 방치하여 균주 고정비드(직경 2~3 mm)를 완성하였다. 남은 균주 혼합액을 멸균한 마이크로 피펫으로 제거한 후, 시험관에 오염 용액 10 mL와 균주 고정비드 100개를 혼합하여 배양하면서(27℃, 130 rpm) 발광 활성을 비교하였다.

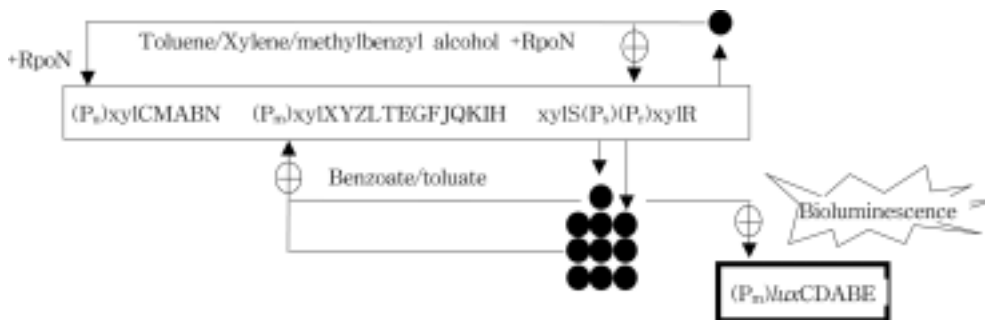


Fig. 1. Regulation of TOL catabolic and recombinated P_m-lux genes (■: positive control, ●: regulatory protein).¹¹⁾

균주 고정비드의 최적 활동도 유지에 적절한 용액을 결정하기 위해 증류수, LB액체 배지, 인산염 완충액(0.2 M KH_2PO_4 140 mL, 0.2 M K_2HPO_4 360 mL per 1 L, pH 7.2), MSM (minimum salt medium: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, K_2HPO_4 0.43 g, KH_2PO_4 0.23 g per 1 L)과 MHW (moderately hard water: NaHCO_3 96 mg, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mg, MgSO_4 60 mg, KCl 4 mg per 1 L) 9.9 mL에 균주 고정비드 100개와 발광 활성 유도제 1 mM *m*-toluate(최종 농도)을 주입하여 시간에 따른 발광 활성을 조사하였다.

균주 고정비드에 발광 유도 물질로 1 mM *m*-toluate 10 mL를 주입한 후 최적의 발광 활성을 측정하기에 적절한 균주 고정비드의 개수를 결정하였다. 측정관(총용적 1.0 mL)에 오염원 함유 시료 400 μL 와 1, 2, 3, 4, 5개의 균주 고정비드를 함께 취하여 발광 활성을 측정하였다.

2.3. 고정 균주의 단일 오염원에 대한 발광 특성

고정화 프로토콜에 근거하여 형성된 균주 고정비드의 순수 단일 유도제 오염원의 종류에 따른 발광 활성을 비교하였다. 균주 고정비드를 시험관에 100개씩 담고 1 mM(최종농도)의 *m*-toluate, 톨루엔, *m*-xylene, *o*-xylene, *p*-xylene을 각 주입하여 시간에 따른 발광 활성을 측정하였다. 발광은 측정관에 시료 400 μL 와 균주 고정비드 4개를 채취한 후 Luminometer를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 3회(triplicate) 반복 수행하였다.

2.4. 고정 균주에 의한 발광과 오염원 농도 변화 조사

균주 고정비드에 의한 발광 활성과 용액내 오염원 농도 감소와의 관계를 조사하였다. 용액내의 오염원 농도는 HPLC(LC 10AD, Shimadzu, Japan)로 분석하여 정량적으로 확인하였다. 정립된 프로토콜에 따라 시험관에 100개의 균주 고정비드와 최종농도 5 mM의 *m*-toluate 10 mL를 주입하여 시간에 따른 발광 활성을 측정하였다.

HPLC를 이용한 오염원 분석조건은 다음과 같다: 컬럼은 Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μm)을 사용하였고, 이동상 용매로 0.05 M p-buffer (pH 3.2, 35%)와 methanol (65%)의 혼합용액을 1 mL/min의 유속으로 사용하였다. 발광 활성을 측정할 시료 5 mL를 에탄올 5 mL로 추출한 후, 시료 20 μL 를 HPLC로 분석하여 오염원의 농도를 조사하였다. 고정비드(균주를 함유하지 않은 비드)에 흡착되는 *m*-toluate의 양을 조사하기 위해 음성대조군(negative control: NC)을 시행하였으며, 동일한 방법으로 균주를 포함하지 않은 100개의 고정비드에 최종농도 5 mM의 *m*-toluate 10 mL를 주입하여 시간에 따른 *m*-toluate의 농도를 측정하여 실험군과 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 고정화 방법 및 균주 고정비드 이용법 조사

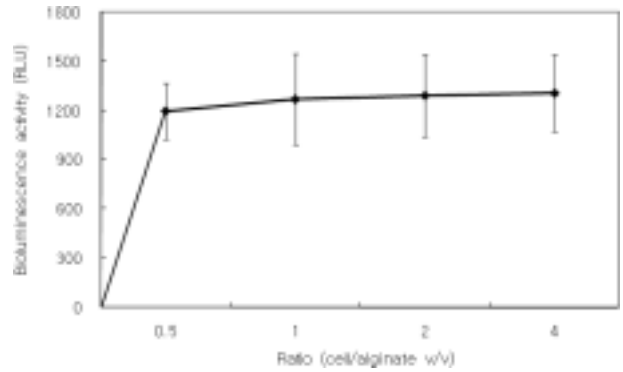


Fig. 2. Comparative bioluminescence activities in the conditions of different ratios of KG1206 to alginate (v/v). Values are the average of 2 and 3 h incubation.

고정 균주가 최적 활성을 나타내는 알긴산과 균주의 혼합 비율을 조사하였다. 균주 용액($\text{OD}_{600} = 0.6 \sim 0.8$)을 알긴산 용적의 0.5, 1, 2, 4배(v/v)로 혼합하여 고정화한 후, 발광 활성을 비교하였다(Fig. 2). KG1206 균주를 알긴산 용적의 0.5 및 1배로 혼합한 경우 1 mM의 *m*-toluate에 노출된 KG1206은 초기 30분에 32 ± 5 , 44 ± 7 RLU의 저조한 초기 발광 활성을 나타내지만 시간에 따라 점진적으로 증가하여 3시간 경과시 1319 ± 176 , 1465 ± 241 RLU의 최대 발광 활성을 나타내었다. 알긴산 용적의 2배와 4배의 경우에는 초기 30분에 645 ± 11 , 622 ± 41 RLU의 발광 활성을 나타내었고 3시간 경과 후 1470 ± 305 , 1473 ± 301 RLU의 최대 발광 활성을 나타내었으며, 실험 기간 동안 0.5 및 1배의 약 60%의 발광 활성 증가율을 나타내었다. 균주의 비율이 증가하더라도 발광 활성의 뚜렷한 증가를 나타내지 않았으며, 혼합하는 균주의 양을 2배로 증가시키더라도 발광 활성이 두 배 증가하는 상관관계는 조사되지 않았다. 균주의 비율이 증가할수록 유도제 오염원과 접촉하는 비드 표면의 균주 농도가 높아 초기 발광 활성은 높게 나타나지만, 일정 시간이 지나면 지지체 내부에서 확산되어 유도제 오염원과 접촉하는 균주의 양은 일정하여 최대 발광 활성이 뚜렷한 차이를 나타내지 않는 것으로 사료된다. 따라서 알긴산과 KG1206의 적절한 비율은 1:1 (v/v)로 결정하고, 향후 실험 조건으로 이용하였다.

다음 단계로 고정화된 발광 유전자 재조합 균주의 활동도에 다양한 용액이 미치는 영향에 대해 조사하였다(Fig. 3). 최대 발광 활성이 증류수, MSM (minimum salt medium), MHW (moderate hard water)의 경우는 초기 2~3시간에 나타났고, LB액체 배지와 인산염 완충액은 4시간이 경과한 후에 측정되었다. 증류수, MSM, MHW는 인산염 완충액의 약 65%, 47%, 40%의 최대 발광 활성을 나타내었다. 위의 세 용액은 발광 활성 지속 시간이 짧고, 나머지 두 용액에 비해 최대 발광 활성이 현저히 낮아 본 연구에는 적합하지 않은 것으로 조사되었다. LB액체 배지와 인산염 완충액은 측정 기간 동안 지속적으로 발광 활성이 증가하였고, 약 5,000~6,000 RLU의 최대 발광 활성을 나타내었다. 같은 배지임에도 불구하고 MSM에 비해 LB액체 배

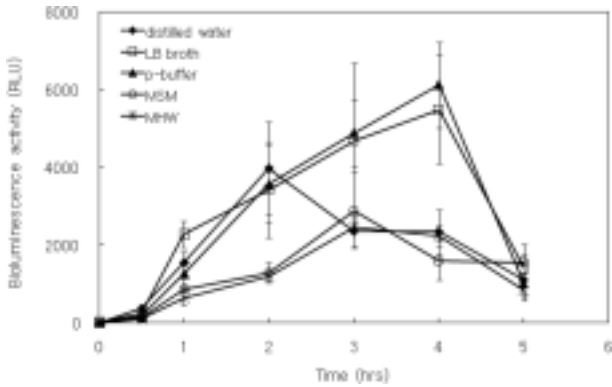


Fig. 3. Effects of different solutions on the bioluminescence activity of alginate immobilized KG1206.

지의 발광 활성이 높은 것은 배지에 함유된 균주의 생장에 필요한 영양분이 발광 활성을 촉진시킨 것으로 사료된다. 긴 발광 지속 시간, 높은 최대 발광 활성, 추후 고정화된 균주를 이용하여 현장 지하수 오염 시료에 적용하는 방법 등을 고려하면 인산염 완충액이 발광 유전자 재조합 균주를 고정화하여 실험에 이용할 때 단일 오염원의 용액으로 적합할 것으로 판단된다. 따라서 향후 고정화 실험에서 인산염 완충액을 용액으로 사용하였다.

균주 고정비드를 이용하여 오염원에 의한 발광 현상을 관찰하기 위해서는 발광측정기(luminometer)의 측정관에 적당한 고정비드 수(number)에 대한 정보가 필요하다. 균주 고정비드를 오염원(1mM *m*-toluate) 용액 10 mL에 노출시킨 후 노출 시간에 따른 발광 활성을 측정할 때, 측정관에 400 μL 수시료와 상이한 개수의 균주 고정비드(1, 2, 3, 4, 5개)를 주입하여 발광 활성을 측정하였다(Fig. 4). 경과시간에 따른 측정치의 평균값이 균주 고정비드 1, 2, 3, 4, 5개 각각에 대해 368±34, 609±115, 669±52, 932±148, 903±104 RLU로 나타났다. 고정비드의 수가 많을수록 균주 농도가 높아 발광 활성이 높게 나타났다. 1개의 균주 고정비드에 의한 발광 활성은 4개를 주입한 경우의 약 39% 정도로 낮은 발광 활성을 보였고, 2개의 균주 고정비드 조건에서는 약 65%의 발광 활성을 발광 활성을 관찰

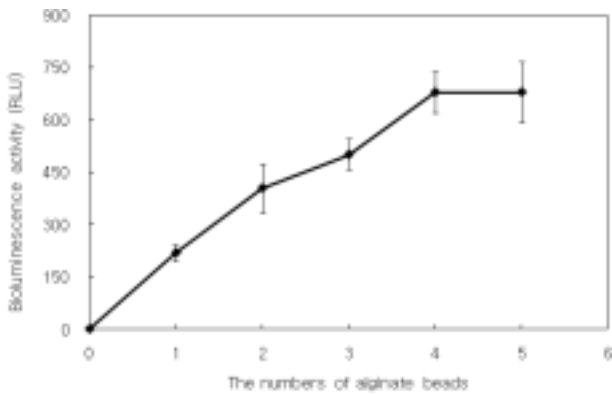


Fig. 4. Bioluminescence activity of immobilized KG1206 with different numbers of alginate beads.

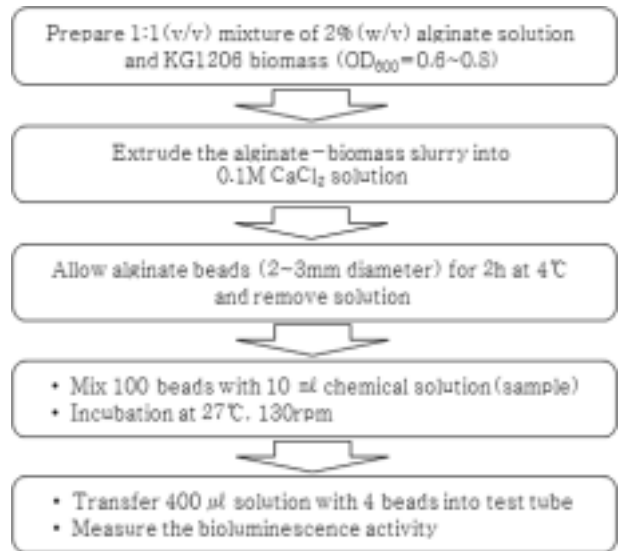


Fig. 5. Protocol for the immobilization and application of the bioluminescence recombinant strain.

할 수 있었다. 특히, 4개의 균주 고정비드 조건에서 가장 높은 발광 활성을 관찰할 수 있었다. 5개의 균주 고정비드에서도 높은 발광 활성을 나타냈지만, 4개를 사용했을 때와 약 3% 정도의 차이를 보여 4개의 균주 고정비드를 사용하는 것이 적절한 것으로 조사되었다. 하지만 균주 종류와 농도 등의 조건에 따라 상이할 수 있기 때문에 향후 정량적 연구가 필요하다. 연구 결과를 바탕으로 고분자 발광 유전자 재조합균주를 특정 오염원에 노출된 환경에 용이하게 사용하기 위한 고정화 프로토콜을 Fig. 5에 나타내었다.

3.2. 톨루엔 계열 유도제 오염원에 대한 고정 균주의 발광 특성

단일 유도제 오염원의 종류에 따른 균주 고정비드의 발광 특성을 관찰하였다(Fig. 6). 오염원에 따라 대략 1~3시간의 지체기를 나타내었다. 고정하지 않은 균주를 사용한 경우와 같이 고정 균주 역시 유도제 오염원 종류에 따라 시간에 따른 발광 특성이 상이하게 조사되었으며, 일반적으로 최대 발광 활성은 2~4시간 오염원 노출 후에 나타났다. 오염원별 최대 발광 활성은 *m*-toluate (5,665±452.3 RLU) > *p*-xylene (4,096±309.2 RLU) > 톨루엔 (3,574±1,641.6 RLU) > *o*-xylene (1,983±613.6 RLU) > *m*-xylene (1,770±640.0 RLU) 순으로 발광 활성이 높게 나타났다. 최대 발광도가 가장 낮은 *m*-xylene은 가장 높은 *m*-toluate의 약 31% 발광 활성을 나타내었다. 선행 연구에서 고정화하지 않은 일반 균주의 발광 활성은 *m*-toluate > 톨루엔 > *m*-xylene > *p*-xylene > *o*-xylene의 순으로 나타났다. 일반 균주와 마찬가지로 고정 균주 역시 직접 유도제인 *m*-toluate가 가장 높은 발광 활성을 나타내었지만, 톨루엔과 자일렌 이성질체는 최대 발광 활성을 나타내는 순서가 일반균주와 다른 양상을 보였다. 또한 고정 균주의 발광 활성 감소 경향은

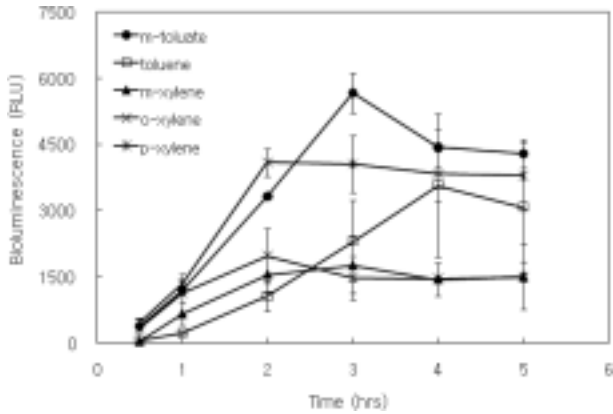


Fig. 6. Bioluminescence activity of KG1206 with various pure inducer chemicals (initial concentration = 1 mM).

고정하지 않은 균주에 비해 일반적으로 완만하게 나타났다. 이는 오염원의 확산에 영향을 줄 수 있는 고정균주의 포괄 상태 등에 의한 현상 때문이라 사료된다. 알려진 바와 같이 간접 유도제는 TOL plasmid *xylR* 유전자로부터 생성된 XylR 단백질을 활성화하며, 활성화된 단백질은 P_s 와 P_u 의 전사(transcription)와 함께 P_m 의 전사를 유도하기 때문에 발광 활성을 관찰할 수 있었다. 비록 P_m promoter의 직접 유도제인 toluate보다는 간접 유도제인 톨루엔, 자일렌 이성질체의 최대 발광 활성이 낮게 관찰되었지만, 모두 수천 RLU의 높은 발광 활성을 나타내었다. 따라서 유전자 재조합 균주인 KG1206은 일반 상태뿐만 아니라 고정 상태의 조건에서도 톨루엔 계열 화합물을 함유하고 있는 토양이나 지하수의 오염 정도를 감시·복원하기 위한 기초 평가 단계에서 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

3.3. 고정 균주에 의한 발광과 오염원 농도 변화 조사

유전자 재조합 균주 KG1206의 발광 활성은 유도제로 작용하는 오염 화합물이 *xyl*-gene 하부 분해경로 P_m promoter를 조절하는 XylS 단백질을 양성적으로 활성화시켜 P_m -*lux* 조합유전자에 작용하여 나타나는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ KG1206은 톨루엔 계열 모화합물(parent compounds: 톨루엔, 자일렌 이성질체, *m*-MBA) 뿐만 아니라 주요 중간분해물인 *m*-toluate, benzoate 등에 대해서도 발광을 생산하는 특성을 보유하고 있다. 따라서 오염원에 노출된 고정균주의 발광 활성에 의한 용액내의 오염원농도(5 mM *m*-toluate) 변화에 대한 조사를 하였다(Fig. 7).

고정 균주의 발광은 발광 유도 물질 노출 후 시간에 따라 증가하여, 4시간 경과했을 때 최대 발광(7810±1204 RLU_{max})을 나타내었고, 그 이후로는 감소하였다. 음성 대조군(균주 포함하지 않는 알긴산 자체 비드)에 흡착되는 *m*-toluate의 농도는 시간이 지남에 따라 조금씩 증가하여 5시간 후에 초기 농도의 28% 정도가 흡착되었다. 오염원에 노출 후 약 2시간 정도까지는 고정균주에 의한 유도제 감소가 미미한 지체기를 나타내었고, 2시간 이후로는 발광 활성

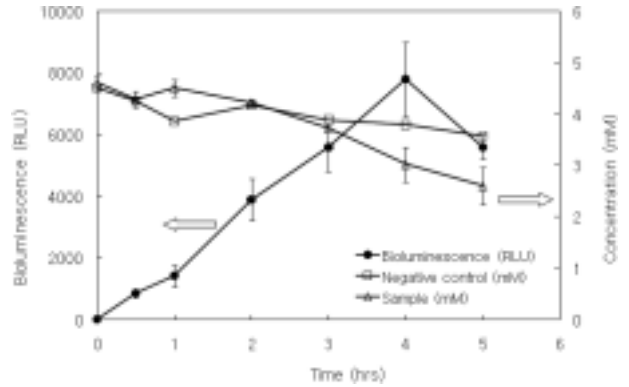


Fig. 7. Comparison of biodegradation patterns with bioluminescence activity by immobilized KG1206 with *m*-toluate as single substrate.

증가와 함께 시간당 *m*-toluate 0.2~0.6 mg/L 감소율을 나타내었다. 고정 균주비드 실험에서 5시간이 경과한 후 용액내의 *m*-toluate의 농도는 약 2.61 mM로 초기 농도의 약 48% 감소율을 나타내었다. 다른 유전자 재조합 균주 RB1401 (P_u -*lux*)의 생물발광과 오염원(*m*-xylene 2~30 mg/L) 분해에 대한 선행 연구에서, 균주 최대 발광 활성 후, 발광 활성은 12시간 정도에 완전 소멸되었다.¹³⁾ 급격한 오염원 감소는 생물발광 소멸 후 발생하였으며, T_{80} (초기 농도의 80%가 제거되는데 소요되는 시간)은 각 13~42시간으로 조사되었다. 따라서 상이한 promoter에 재조합된 균주의 생물발광과 오염원분해 관계에 대한 연구에서, 고정 균주비드의 발광이 소멸 후, 일정 시간이 지난 다음 모물질의 제거가 이루어짐을 예측할 수 있다.

4. 결론

특정 오염원에 생물발광 활성을 나타내는 특성을 보유한 유전자 재조합 균주를 고정화하여 생물학적 모니터링에 사용하기 위한 기본 실험을 하여 다음과 같은 결론을 도출할 수 있었다.

- 1) 2% (w/v) 알긴산과 균주를 1:1 (v/v)로 혼합한 균주 고정비드를 인산염 완충액에 주입하여 배양하고, 발광 측정을 위해서는 고정균주비드 4개 정도를 400 μL 용액과 함께 측정관에 이용하는 것이 적당한 것으로 조사되었다.
- 2) 고정 균주비드의 톨루엔 계열 화합물에 대한 최대 발광 활성 순서는 다음과 같이 조사되었다: *m*-toluate > *p*-xylene > 톨루엔 > *o*-xylene > *m*-xylene
- 3) 고정 균주비드에 노출된 오염원은 발광 활성이 소멸된 후, 일정 시간까지 용액내에 분해되지 않고 존재하였다. 따라서 토양 및 지하수와 같은 환경매체의 복잡성에 대해 해결해야 하는 부분은 남아있지만, 특정한 오염원에 대해 발광을 생성하는 유전자 조합균주를 고정하여 모니터링, 오염원의 탐지 및 분해 여부 등에 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 한국지질자원연구원 기관목적사업인 ‘지구환경변화 대응 지하수 확보 통합솔루션 개발(09-3414)’과제의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Shim, H. J., Shin, E. B., and Yang, S. T., “A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*,” *Adv. Environ. Res.*, **7**, 203~216(2002).
2. 하상안, 엄혜경, “저온 열 탈착에 의한 유류 오염토의 처리 조건의 연구,” *대한환경공학회지*, **29**(8), 956~960(2007).
3. Li, Y. F., Li, F., Y., Ho, C. L., and Liao, V. H. C., “Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds,” *Env. Pollut.*, **152**(1), 123~129(2008).
4. 이상민, 배희경, “재조합 발광대장균과 해양 발광 미생물을 이용한 중금속 급성독성평가,” *대한환경공학회지*, **27**(8), 900~906(2005).
5. Nealson, K. H. and Hastings, J. W., “Bacterial bioluminescence : Its control and ecological significance,” *Microbiol. Rev.*, December, 496~518(1979).
6. Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Rand, T. A., Schupp, J. M., Hill, K. K., Keim, P., and Jackson, P. J., “Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(3), 1006~1012(1998).
7. Cheetham, P. S. J. and Bucke, C., “Immobilization of microbial cells and their use in waste water treatment,” *Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*, Grainger, J. M. and Lynch, J. M.(Eds.), Academic Press Inc, London, UK, pp. 219~235(1984).
8. Xi, W. W. and Xu, J. H., “Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor,” *Process Biochem.*, **40**(6), 2161~2166(2005).
9. Kong, I. C., Kim, M., Ko, K. S., Kim, J. G., Jeon, C. W., and Bhandari, A., “Use of recombinant bioluminescence bacteria for on-site monitoring of toluene analogs at petroleum contaminated sites,” *J. Environ. Eng.*, **133**(7), 772~776(2007).
10. Hotel, A., Marques, S., Mohler, I., Jakubzik, U., and Timmis, K. N., “Carbon source-dependent inhibition of xyl operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid,” *J. Bacteriol.*, **176**(6), 1773~1776(1994).
11. 공인철, 서혜영, 이건우, 김승현, 백성옥, “토양에 오염된 휘발성 유기화합물의 모니터링을 위한 발광 유전자 재조합 균주 이용 가능성,” *대한환경공학회지*, **25**(4), 440~445(2003).
12. Assinder, S. J. and Willams, P. A., “The TOL Plasmid : Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes,” *Adv. Microbiol. Phys.*, **31**, 2~69(1990).
13. Kong, I. C., Park, T. H. and Ahn, T. B., “Bioluminescence activity and degradation kinetics of genetically engineered strain *P. putida* mt-2 RB1401 in soil system with *m*-xylene,” *Soil. Sediment Contam.*, **14**, 135~142(2005).