

Immobilization of Recombinant Bacterial Biosensors: a Simple Approach for the On-Site Detection of Phenolic Compounds

Hae Ja Shin*

Energy Environmental Engineering Major, Division of Energy Biotechnology, Dongseo University, Busan, 617-716, Korea

Received August 1, 2011 / Revised August 28, 2011 / Accepted September 5, 2011

We herein report the development of an agarose-gel-immobilized recombinant bacterial biosensor simple system for the field monitoring of phenolic compounds. *Escherichia coli* cells harboring the pLZCapR plasmid, which was previously designed to express the β -galactosidase reporter gene in the presence of phenolic compounds, were co-immobilized with a substrate [chlorophenol red β -galactopyranoside (CPRG)] in agarose gel, and dispensed to the wells of a 96-well plate. Field samples were added to the wells and color development was monitored. In the presence of 5 μ M to 10 mM of phenol, the biosensor developed a red (representing hydrolysis of CPRG) color. Other phenolic compounds were also detected by this immobilized system, with the pattern resembling that previously reported for the corresponding non-immobilized biosensor. The immobilized cells showed optimum activity when the gel was simultaneously supplemented with 6% dimethyl formamide (DMF), 0.1% SDS and 10 mM CaCl₂. The immobilized biosensor described herein does not require the addition of a substrate or the use of unwieldy instruments or sample pretreatments that could complicate field studies.

Key words : Immobilization, agarose, recombinant bacterial biosensor, phenolic compounds

서 론

많은 페놀계 화합물들은 위험 화합물로 분류되며 살충제, 살미생물제, 훈증약, 보강제, 염료, 용매, 방오제 등으로 사용되고 있다. 이들의 환경 배출은 인체 접촉 시 눈, 피부, 호흡기, 간, 그리고 방광을 손상할 수 있어 인간의 건강을 위협한다. 현재 페놀계 화합물은 가스 크로마토그래피와 같은 복잡한 기기로 잘 훈련된 사람에 의해 고비용으로 분석되나 현장 활용은 불가능하다[3]. 또한 페놀계 화합물은 방향성으로 인해 실험실로 운반하고 전 처리하는 과정에서 손실이 일어날 수 있다. 그러므로 이러한 방향성 화합물을 현장에서 검출할 수 있는 운반 가능하고 간단한 저비용 접근 방법이 필요하다[23].

바이오센서는 환경 신호를 감지하는 생물적인 부분(효소, 항체, 세포내 구성물질, 세포 등)과 감지된 신호를 발색, 흡광도, 전기 전류 또는 전위 등의 측정할 수 있는 신호로 송출하는 transducer로 이루어진다[6]. 바이오센서는 일상적인 모니터링에서 충분한 정보를 제공할 수 있기 때문에 일차적 모니터링 시스템으로 간주되며 기기분석을 보완할 수 있다[9]. 많은 바이오센서 종류들이 개발되고 있으며 그 중 미생물 유래 바이오센서는 목표 화합물과 생리적 신호를 현장에서 감지하는데 매우 유용함을 보여주고 있다. 이러한 바이오센서는 현장의 다양한 반응조건들에 쉽게 적용할 수 있을 뿐만 아니라 광범위한 화합물을 감지하며 이들의 생이용률과 독성에 관한

정보를 제공할 수 있다[13].

대부분의 바이오센서는 DNA 재조합 기술을 이용하여 조절 관련 유전자들(전사 조절자와 promoter/operator 유전자)과 *lacZ* (β -galactosidase 발현), *lux/luc* (bacterial/firefly luciferase 발현) 또는 *gfp* (green fluorescent protein 발현)와 같은 리포터 유전자를 결합하여 제작한다[21]. 이렇게 만든 재조합 바이오센서들이 다양한 환경 모니터링에 활용되고 있다[3,6,11,12,18,24]. 최근에 바이오센서의 민감도와 특이성을 향상시키기 위해 조절 단백질의 유도자 결합 부위를 변형하거나[8,15,23], 표면 발현 단백질[13]과 주변세포질 결합 단백질들[15]을 활용하는 연구가 보고되고 있다.

그러나 미생물 바이오센서의 개발에서 많은 괄목할 진전이 이루어지고 있지만 여전히 목표인 환경에서의 사용은 미비하다. 그 이유는 많은 미생물 바이오센서가 실험실의 최적조건(수용액 상태와 완충 용액)에서는 잘 실행되지만 이러한 조건들은 실제 현장에서는 좀처럼 발견되지 않기 때문이다. 환경에서 미생물 바이오센서는 스트레스가 되는 pH 수준, 온도, 중금속, 변성제, 그리고 바이오센서 시스템을 비활성화시키거나 심지어 소멸시키는 다른 악조건에 종종 노출된다.

따라서 바이오센서 세포의 내성, 안정성, 및 내구성을 향상시키기 위해 matrix나 transducer에 물리적 또는 화학적으로 고정화하려는 다양한 시도가 이루어지고 있다[1,4]. 고정화는 환경적 스트레스와 독성으로부터 세포를 보호한다[5]. 물리적 고정화(포괄과 흡착)는 살아있는 세포가 필요할 경우, 화학적 고정화(cross-linking과 covalent binding)는 살아있는 세포가 중요하지 않을 경우 선택하는 방법이다[13]. 포괄(entrapment)

*Corresponding author

Tel : +82-51-320-1791, Fax : +82-51-320-1781
E-mail : hjshin@dongseo.ac.kr

고정화는 여과지, 여과막, 화학/생물적 젤(alginate, agarose, collagen, polyacrylamide, polyvinylalcohol 등)을 matrix로, 흡착 고정화는 alumina 또는 glass beads을 matrix로 흡착 결합(ionic-, polar- 그리고 hydrogen-bonding interactions)에 의해 결합된다. 고정화의 문제는 포괄에 사용된 물질에 의해 확산장애가 일어나 시스템의 민감도와 검출한계를 낮게 할 수 있고 흡착의 경우 미생물의 탈착이 제한요인이 될 수 있다[4,13].

폐놀 화합물의 현장 검출용으로 발색을 근거한 냉동 건조된 재조합 박테리아 바이오센서를 본 연구진에 의해 개발하였다[23]. 냉동 건조된 재조합 박테리아 바이오센서는 간편하고 빠르게 폐놀 화합물을 현장에서 검출함으로써 불편한 기기를 탁월하게 대체하지만, β -galactosidase 기질을 현장으로 운반하여 시험관에 넣어야 하는 불편함이 있다. 따라서 본 연구에서는 현장 활용에서 좀 더 간편하고 간단한 바이오센서 시스템을 연구하였다. 기 개발된 바이오센서의 문제점을 해결하기 위해 β -galactosidase 기질과 함께 바이오센서 세포를 agarose gel로 96 well plate에 고정하였다. 고정된 바이오센서는 현장에서 전처리 없이 작은 부피의 현장시료만을 바이오센서 세포가 들어 있는 wells에 첨가하여 발색을 관찰함으로써 폐놀 화합물을 검출할 수 있었다. 따라서 β -galactosidase 기질과 함께 고정된 일회용 바이오센서는 현장에서 폐놀 화합물을 간단하게 검출하는 데 유용하게 활용될 수 있는 일차적 접근 방법임을 검증하였다.

재료 및 방법

세포 배양

Pseudomonas putida KCTC1452은 tryptic soy broth, 25°C에서 진탕 배양하였다. 형질 전환된 *Escherichia coli* DH5a는 30 μ g/ml ampicillin을 포함하는 TYS media (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 그리고 0.5% NaCl), 37°C에서 키웠다.

시약

본 연구에서 사용한 시약은 모두 특급시약을 사용하였으며 대부분 Sigma-Aldrich에서 주문하여 정제 없이 사용하였다.

pLZCapR 바이오센서 plasmid 제작

바이오센서 plasmid (pLZCapR) 제작은 본 연구진의 이전 논문[19]에 언급되었으며 제작된 plasmid를 사용하였다. 간단히, Plasmids는 Qiagen spin column kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 정제하였으며 Cloning과 ligation은 표준 방법[22]을 이용하여 수행하였고 plasmid pLZCapR은 CaCl₂방법으로 *E. coli* DH5a에 형질 전환하였다.

바이오센서 세포 고정화

Plasmid pLZCapR을 포함하는 DH5a 세포는 30 μ g/ml am-

picillin을 포함하는 4 ml of TYS medium, 37°C에서 하룻밤 진탕 배양하여 키운 다음 log phase (OD_{600 nm} 0.6-0.8)가 될 때까지 subculture하였다. 이 subculture 세포(50 μ l; $\sim 1 \times 10^8$ cells/ml)를 녹인 agarose (최종 0.2%(w/w) agarose 농도)와 β -galactosidase 기질(3 mM CPRG)과 함께 총 100 μ l 부피가 되도록 혼합하여 곧바로 96-well plate의 wells에 분주하였다. 굳어진 후, agarose로 고정된 세포 위층을 100 μ l의 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 덮고 뚜껑을 잘 막고 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

실험 조건 최적화

Agarose에 고정시킨 세포를 에탄올에 녹인 다양한 폐놀계 화합물에 노출시킨 후 지시한 기간 동안 유지하였다. β -galactosidase activity는 폐놀 존재 시 CPRG 기질 분해로부터 붉은색을 나타냄으로 확인하였다. CPRG 분해는 Elisa plate reader (Versa Max, VA)을 사용하여 570 nm에서 흡광도로 정량적으로 측정하였다[8]. 실험 조건의 최적화를 결정하기 위해, 다양한 세포수(0.2~1 $\times 10^8$), CPRG 농도(1~8 mM), 및 agarose 농도(0.1~0.5%)를 실험하였다. 확산제한 (diffusion limitation)을 최소화하기 위해, 다양한 세포주기(overnight culture, 그리고 3, 12, 48 시간 subculture 세포)의 세포를 agarose gels에 고정한 후, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 6% DMF/0.1% SDS, 10 mM CaCl₂ 혹은 6% DMF/0.1% SDS/10 mM CaCl₂를 처리하였다. Colony forming units (CFU)은 각 세포를 연속적으로 희석한 후 TYS agar에 접종하여 결정하였다. 상대적 β -galactosidase activity는 OD_{600 nm}에서 측정된 같은 세포 밀도 당 CPRG 분해로 계산하였다. 폐놀 화합물의 현장검출을 위해 agarose로 고정된 바이오센서 세포 plates을 현장으로 운반하여 현장시료만 첨가한 후 폐놀 존재를 나타내는 색깔 변화로 관찰하였다.

시료 측정

체에 거른 모래(토양 시료로 사용)를 씻고, 멸균한 후 100°C 오븐에서 완전히 건조시킨 후 5 g을 취해 phenol (final concentration: 0.5 mM)과 혼합하였다. 오염된 토양은 3 ml 물과 섞고 4,000 \times g에서 20 분간 원심분리 하였다. 1 ml의 상층액을 따서 연속적으로 희석하여 각 희석액(각 100 μ l)을 바이오센서 세포가 있는 wells에 넣고 분석하였다. 결과는 상대 표준 검정선과 비교하여 결정하였다. 또한 인근 병원에서 구한 병원폐수 및 각종 폐수 시료도 바이오센서로 연속적으로 희석하여 전처리 없이 분석하였다.

폐놀의 화학적 분석

바이오센서 데이터를 확증하기 위해 각종 폐수 중 폐놀 화합물을 KEPA (한국환경부)에서 제시하는 표준 화학적 방법으로 분석하여 비교하였다. 폐수는 1 ml이 되게 연속 희석(10¹

또는 10^{-2} 한 다음 25 μ l 0.5 N NH_4OH , 10 μ l 2% 4-aminoantipyrine 그리고 10 μ l 8% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 을 순차적으로 넣어 잘 섞은 뒤 $\text{OD}_{500 \text{ nm}}$ 에서 흡광도를 읽었다.

결과 및 고찰

고정화 최적 조건

장기간의 세포 생존률과 안정한 바이오센서 활동도는 세포의 생리적 상태, 고정화 matrix의 다공질 구조 및 다른 실험 요인들에 의해 영향을 받을 수 있다[1]. 따라서 agarose 농도, 세포 밀도 및 기질 농도가 바이오센서 세포의 고정화에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 본 연구실에서 제작한 pLZCapR plasmid [19]를 포함하는 미생물 바이오센서 세포를 96-well plate에 agarose gel로 고정하였다. Agarose는 비교적 큰 다공질 큰 분자도 확산시키며 agarose 또는 agarose/agaropectin 혼합물은 실험실 세포의 중/단기 보관용으로 사용 많은 고정화 matrix 중에서 agarose를 선택하였다. 다양한 농도의 agarose로 세포를 고정시키고 1 mM phenol에 노출시킨 후 β -galactosidase activity를 $\text{OD}_{570 \text{ nm}}$ 에서 측정하였을 때(Fig. 1A), 0.2% agarose에서 가장 좋은 반응을 보였다. 이는 낮은 농도의 에서 미생물이 성장하는 데 필요한 산소나 다른 기질들이 보다 더 잘 확산되기 때문인 것으로 사료된다. 다른 과정 없이 을 넣은 후 CPRG 기질 분해로부터 붉은 색이 관찰되었다. 비교적 좋은 반응과 견고한 고정화로 인해 이 후 모든 실험에서 0.2% agarose로 바이오센서 세포를 고정하였다.

발색되기 위해 β -galactosidase 기질과 페놀 화합물들이 세포 안으로 들어가야 하며 분해된 부산물이 세포 밖으로 배출되어야 한다. 그러므로, 바이오센서 시스템으로부터의 결과는 세포의 생리적 상태와 다른 실험 조건들에 의해 또한 영향을 받을 수 있다[1,16]. 세포 밀도와 기질 농도가 고정된 바이오센서 시스템에 미치는 영향을 실험하였다(Fig. 1B & 1C). 발색에 미치는 바이오센서 세포 수 실험에서 최대 발색은 0.8×10^8 cells/ml 세포의 수를 사용할 때 보여주었다(Fig. 1B). β -galactosidase 기질의 경우, 5 mM CPRG에서 흡광도가 최대로 증가되었다(Fig. 1C). 기질 CPRG는 그 자체가 노란색을 띄며 흡광도에 영향을 미칠 수 있으므로 모든 데이터는 각 조건(다양한 농도의 CPRG 및 그 외 조건)에서 그리고 아직 CPRG의 분해가 되지 않은 0 시간대에서의 흡광도 값을 가감 없이 그대로 나타내어 이를 관찰하도록 하였다. 눈으로 확인되는 좋은 발색과 570 nm에서 직선적인 정량 관계를 보여주는 3 mM CPRG을 이 후 모든 실험에서 사용하였다.

고정된 바이오센서의 민감도

Agarose 고정된 기질이 세포로 자유롭게 확산되어 가는 것을 막아 바이오센서의 민감도에 영향을 줄 수 있다[4]. 이러한

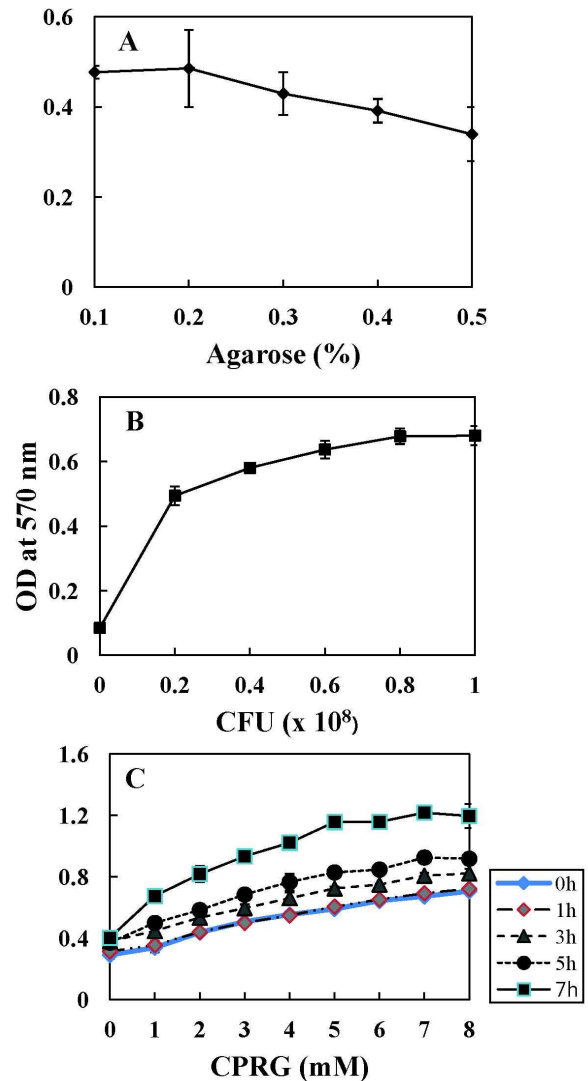


Fig. 1. Effects of agarose concentration, cell number and CPRG concentration on the activity of the immobilized biosensor. *E. coli* DH5 α cells harboring plasmid pLZCapR were immobilized and β -galactosidase activity was quantified at $\text{OD}_{570 \text{ nm}}$ as described in Materials and Methods. (A) Activity was measured 5 hr after the addition of 3 mM CPRG with various agarose concentrations (0.1~0.5%). (B) Activity was measured 5 hr after addition of 3 mM CPRG to biosensor cells immobilized at various densities ($0.2 \sim 1 \times 10^8$) in 0.2% agarose. (C) Activity was measured 1~7 hr after the addition of various concentrations (1~8 mM) of CPRG to immobilized cells in 0.2% agarose. The data represent the average of two to four independent experiments, and are given with standard deviations. CFU, colony forming units.

가능성과 현장에서 기질을 넣어야 하는 수고를 피하기 위하여 기질과 바이오센서 세포를 동시에 agarose gels로 96-well plates에 고정하여 0.1 μ M~10 mM phenol에 노출시키고 그

결과를 고정되지 않은 세포와 비교하였다(Fig. 2). 비록 고정되지 않은 바이오센서에 비해 전반적으로 다소 낮은 강도의 반응을 보여주었지만, 기질과 동시에 고정된 바이오센서 세포는 그렇지 않은 세포와 비슷한 반응 양상을 보여주었다. 두 바이오센서 모두 약 5 μ M~10 mM phenol에서 흡광도가 증가하였다. 이전 논문[19]에서 bioluminescence reporter를 가지는 CapR 바이오센서 시스템으로 1 mM phenol에서 최고의 값을 나타내며 그 이후 감소하는 것을 보고하였다. 이는 세포를 깨어 bioluminescence을 측정할 반면 이 실험에서 사용한 두 바이오센서 시스템(β -galactosidase reporter 근거 고정 및 고정되지 않은 자유 바이오센서[23]) 모두 세포를 깨지 않고 β -galactosidase의 활성을 측정하여 10 mM의 높은 농도에서도 반응을 보였다. 페놀 100 μ M부터 10 mM까지의 β -galactosidase 활성 흡광도를 이용하여 검정선($y=0.0577x+0.495$, $R^2=0.8706$)을 정하고 같은 세포를 사용하여 측정하는 미지시료의 표준으로 사용하였다. 96-well plate에 기질과 동시에 고정할 경우 약간의 민감도는 떨어지는 단점은 있으나 훨씬 간단하고 한꺼번에 96개의 시료를 측정할 수 있는 장점이 있다. 또한, 1 ml 이상의 측정 부피를 필요로 하는 고정되지 않은 바이오센서와 비교해 100 μ l 보다 적은 시료를 측정하므로 사용되는 시약과 시료 및 발생하는 폐수가 감소되어 환경적으로 경제적으로 이득이 될 것으로 사료된다.

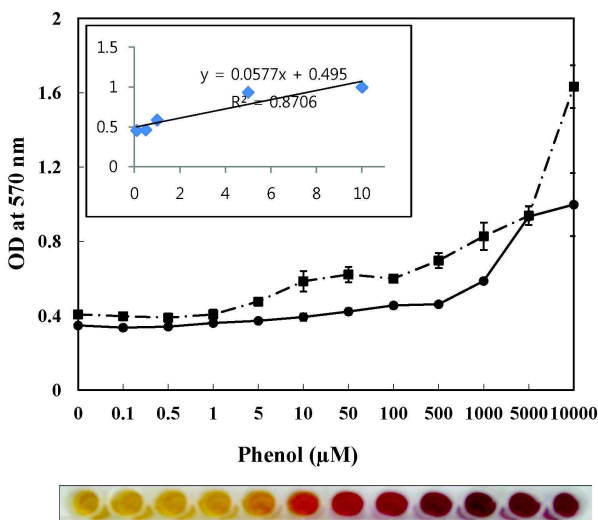


Fig. 2. The β -galactosidase activities of the biosensor system in response to various phenol concentrations. Free biosensor cells (■) and co-immobilized biosensor cells with 3 mM CPRG in 0.2% agarose (●) were treated with various concentrations of phenol (0.1 μ M to 10 mM). After 5 hr, the β -galactosidase activities were measured at OD_{570 nm}. The regression curve ($y=0.0577x+0.495$, $R^2=0.8706$) from immobilized cells is shown in the inset. Similar regression curve or color standards using immobilized cells (see Table 1) could be used for field assays.

다양한 페놀계 화합물에 대한 반응

고정된 바이오센서의 특이성을 1 mM의 다양한 페놀계 화합물로 시험하고 그 결과를 고정되지 않은 바이오센서 결과와 비교하였다(Fig. 3). 고정 또는 고정되지 않은 바이오센서 세포는 2-methylphenol, 2-chlorophenol, catechol에 강하게, 2-nitrophenol과 m-cresol에 중간 정도 반응하며, 4-nitrophenol에 반응하지 않았으며 이는 우리의 이전 보고와 일치 된다[23]. 그러나 고정된 바이오센서의 강도가 고정되지 않은 바이오센서보다 약함을 보여주었으며 화합물에 따라 다소 반응성의 차이 또한 나타난다. 이는 페놀과 비슷한 구조와 크기를 가지는 화합물은 페놀 인지 조절 단백질 CapR과 반응할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 이를 정확하게 설명하기 위해서는 조절 단백질 구조와 기능에 대한 보다 정밀한 실험이 요구된다. 이 결과는 agarose gels의 다공구조가 페놀계 화합물을 세포로 확산되는 데 충분히 큼을 보여준다. 그럼에도 불구하고, 고정된 바이오센서의 반응이 고정되지 않은 자유 바이오센서보다 조금 느리고 약함은 페놀계 화합물이 agarose로 인해 세포로 확산되는 속도가 어느 정도 감소됨을 나타내고 있다[4].

고정된 바이오센서의 발색 향상

고정된 세포의 문제점인 투과성을 높이기 위해 소수성 물질로 세포의 운반과정을 변하게 하여 기질의 투과성을 증가시킬 수 있다는 보고가 있다[2,20]. 이에 세포막 투과성을 증가시키고 확산 저항을 감소시킨다고 알려진 다양한 시약들을 시험하여 이들이 β -galactosidase 발색 속도와 밝기에 영향을 미치는지를 검사하였다(Fig. 4). pLZCapR을 포함하는 세포를 하룻밤 배양한 후 3, 24 or 48 시간 동안 subculture하고 CPRG와 함께

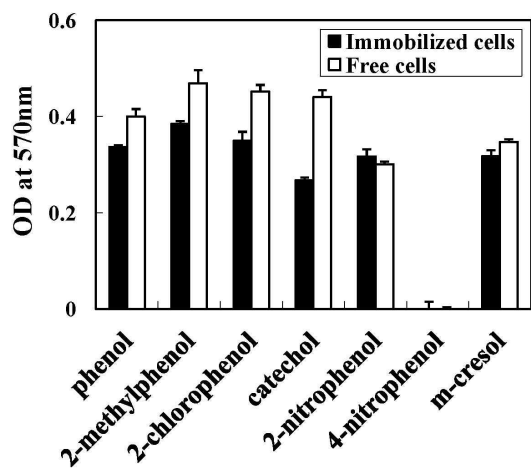


Fig. 3. The β -galactosidase activities of the biosensors in the presence of various phenolic compounds. Biosensor cells were prepared as described in Materials and Methods, and then separately incubated for 5 hr in the presence of various phenolic compounds (1 mM each) and the β -galactosidase activities were measured at OD_{570 nm}.

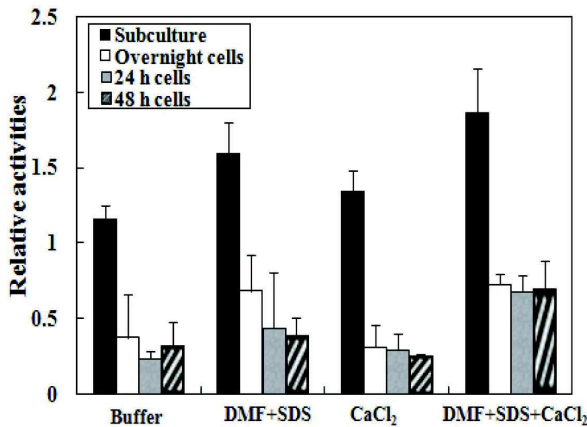


Fig. 4. Optimum conditions for color development by the immobilized biosensors. The cells were co-immobilized with 3 mM CPRG in 0.2% agarose and treated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 6% DMF/0.1% SDS, 10 mM CaCl₂, or 6% DMF/0.1% SDS/10 mM CaCl₂. Phenol was added (1 mM), and after 5 hr, activities were measured at OD_{570 nm} and the results were normalized with respect to cell density, which was measured at OD_{600 nm}.

고정하여 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 6% DMF/0.1% SDS, 10 mM CaCl₂ 또는 6% DMF/0.1% SDS/10 mM CaCl₂를 처리하였다(Fig. 4). 상대 활동도는 OD_{600 nm}에서 측정된 같은 세포 밀도당 CPRG 분해 또는 β-galactosidase 활동도로 나타내었다. 가장 높은 상대 β-galactosidase 활동도는 3 시간 subculture 한 세포를 6% DMF/0.1% SDS/10 mM CaCl₂로 처리하였을 때 나타났다. 모든 실험 조건에서 지수기 세포(3 시간 subculture 한 세포)가 agarose gels의 고정에서 가장 좋은 상대 활성도와 발색의 밝기 및 속도의 향상을 보여주었다(Fig. 4). Agarose로 고정된 바이오센서 세포는 일반 미생물 agar 보존과 같이 TYS medium에서 몇 개월간 4°C 보관이 가능하며 활동도의 손실 없이 현장으로 운반하여 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 비교할 만한 생존율(45 days)이 sol-gel-derived silica matrices에 LB medium 공급과 함께 고정된 *E. coli*에서 보고되고 있다[1].

오염된 토양과 폐수에서의 페놀 화합물 검출

마지막으로, 현장 시료 중 페놀 화합물을 검출하여 고정된 바이오센서를 검증하고자 하였다(Table 1). 고정된 바이오센서는 실험실 토양 추출물과 전처리 하지 않은 병원폐수와 혼합하여 상대적인 발색을 통해 또는 같은 세포를 사용하여 만든 검정선을 근거로 페놀농도를 추정하였다. Table 1이 보여주는 것처럼, 고정된 바이오센서를 통해 측정된 농도는 화학적 분석으로 얻은 값과 유사하였다. 예를 들면, 오염토양 시료를 분석하였을 때 바이오센서로 0.38 mM, 화학적 분석으로 0.45 mM의 페놀 화합물을 검출하였다. 병원 폐수에서는 바이오센

Table 1. Comparison of the immobilized biosensor and chemical based methods for measuring phenolic compounds in soil and wastewater

Soil or wastewater ^a source	Concentration (mM)	
	Biosensor ^a	Chemical analysis
Laboratory soil ^b	0.38±0.01	0.45±0.01
Hospital waste A	0.51±0.03	0.70±0.05
Hospital waste B	1.37±0.12	0.93±0.14
Hospital waste C	0.52±0.05	0.71±0.02

^aConcentrations were estimated using a regression curve (y=0.0577x + 0.495, R²=0.8706) from standard curve using phenol or approximated by comparison to a color standard prepared with the same cells.

^bLaboratory soil was prepared as described in the Materials and Methods section.

서로 0.51 mM, 1.37 mM, 0.52 mM을 측정하였고 화학적 방법으로 0.70 mM, 0.93 mM, 0.71 mM을 검출하였다. 바이오센서 결과는 오염물질의 농도뿐만 아니라 세포에 미치는 오염물질의 독성까지 나타낸다고 보고되었다[15]. 또한 본 바이오센서가 다른 폐물계 화합물도 검출 가능하므로 폐수에서의 페놀 화합물의 더 자세한 농도와 구성을 결정하기 위해 추후 기기적 분석이 필요할 것이다. 결론적으로, 이 결과들은 pLZCapR을 함유하는 고정된 *E. coli* 바이오센서 세포는 간편하게 전처리 없이 현장의 오염된 토양과 폐수 중 페놀 화합물의 일차적 검출에 사용될 수 있음을 검증하였다.

감사의 글

본 연구는 동서대학교 2010년 교내특별연구과제 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Alvarez, G. S., M. L. Foglia, G. J. Copello, M. F. Desimone, and L. E. Diaz. 2009. Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 639-646.
- Angelova, B. and H. Schmauder. 1999. Lipophilic compounds in biotechnology-interactions with cells and technological problems. *J. Biotechnol.* **67**, 13-32.
- Belkin, S. 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 206-212.
- Bettaieb, F., L. Ponsionnet, P. Lejeune, H. Ben Ouada, C. Martelet, A. Bakhrouf, N. Jaffrézic-Renault, and A. Othmane. 2007. Immobilization of *E. coli* bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design. *Bioelectrochemistry* **71**, 118-125.
- Desimone, M. F., M. C. De Marzi, G. J. Copello, M. M. Fernández, F. L. Pieckenstain, E. L. Malchiodi, and L. E. Diaz. 2006. Production of recombinant proteins by sol-gel

- immobilized *Escherichia coli*. *Enz. Microb. Technol.* **40**, 168-171.
6. D'Souza, S. F. 2001. Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 337-353.
 7. Eustice, D. C., P. A. Feldman, A. M. Colberg-Poley, R. M. Buckery, and R. H. Neubaue. 1991. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase transfected mammalian cells. *Biotechniques* **6**, 739-743.
 8. Galvão, T. C. and V. de Lorenzo. 2006. Transcriptional regulators à la carte: engineering new effector specificities in bacterial regulatory proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 34-42.
 9. Harms, H., M. C. Wells, and J. R. van der Meer. 2006. Whole-cell living biosensors-are they ready for environmental application? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 273-280.
 10. Kelsey, J. W., B. D. Kottler, and M. Alexander. 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 214-217.
 11. Kim, M. N., H. H. Park, W. K. Lim, and H. J. Shin. 2003. Viability and luciferase activity of freeze-dried recombinant biosensor cells for detecting aromatic hydrocarbons. *J. Biomed. Lab. Sci.* **9**, 195-201.
 12. Kim, M. N., H. H. Park, W. K. Lim, and H. J. Shin. 2005. Construction and comparison of *Escherichia coli* whole-cell biosensors capable of detecting aromatic compounds. *J. Microbiol. Methods* **60**, 235-245.
 13. Lei, Y., W. Chen, and A. Mulchandani. 2006. Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta* **568**, 200-210.
 14. Matsui, N., T. Kaya, K. Nagamine, T. Yasukawa, H. Shiku, and T. Matsue. 2006. Electrochemical mutagen screening using microbial chip. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1201-1209.
 15. Medintz, I. L. and J. R. Deschamps. 2006. Maltose-binding protein: a versatile platform for prototyping biosensing. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 17-27.
 16. Moat, A. G. and J. W. Foster. 1995. *Microbial Physiology*. Wiley/Liss, New York.
 17. Park, H. H., H. Y. Lee, W. K. Lim, and H. J. Shin. 2005b. NahR: effects of replacements at Asn 169 and Arg 248 on promoter binding and inducer recognition. *Arch. Biochem. Biophys.* **434**, 67-74.
 18. Park, H. H., W. K. Lim, and H. J. Shin. 2005a. *In vitro* binding of purified NahR regulatory protein with promoter P_{sal}. *Biochim. Biophys. Acta* **1725**, 247-255.
 19. Park, S. M., H. H. Park, W. K. Lim, and H. J. Shin. 2003. A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*. *J. Biotechnol.* **103**, 227-236.
 20. Rapoport, N., A. I. Smirnov, A. Timoshin, A. M. Pratt, and W. G. Pitt. 1997. Factors affecting the permeability of *Pseudomonas aeruginosa* cell walls toward lipophilic compounds: Effects of ultrasound and cell age. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**, 114-124.
 21. Ron, E. Z. 2007. Biosensing environmental pollution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 252-256.
 22. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 23. Shin, H. J., H. H. Park, and W. K. Lim. 2005. Freeze-dried recombinant bacteria for on-site detection of phenolic compounds by color change. *J. Biotechnol.* **119**, 36-43.
 24. Shin, H. J. 2011. Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 867-877.
 25. Shin, H. J. 2010. Development of highly-sensitive microbial biosensor by mutation of the nahR regulatory gene. *J. Biotechnol.* **150**, 246-250.

초록 : 재조합 박테리아 바이오센서의 고정화: 페놀계 화합물의 현장 검출을 위한 간단한 접근 방법

신혜자*

(동서대학교 에너지생명공학부 에너지환경공학전공)

본 연구에서는 페놀 화합물들을 현장에서 검출하기 위해 간단하고 간편한 일회용 재조합 박테리아 바이오센서 시스템을 개발하였다. 플라즈미드 pLZCapR을 함유하는 *E. coli* 세포를 β -galactosidase 기질인 CPRG와 함께 96-well plate의 wells에 agarose로 고정하였다. 이 바이오센서는 현장에서 발색을 위한 별도의 기질을 추가하거나 불편한 기기 사용 또는 시료의 전 처리를 필요로 하지 않는다. 시료의 측정은 간단히 적은 부피(<100 μ l)의 현장 시료를 바이오센서를 포함하는 wells에 넣고 발색을 관찰하여 측정하였다. 또한 6% DMF, 0.1% SDS 그리고 10 mM CaCl₂를 첨가하여 agarose 고정에 의한 화합물의 세포내 확산 제한을 감소시켜 보다 더 나은 발색을 얻을 수 있었다. 따라서 이 고정된 미생물 유래 재조합 바이오센서 시스템은 현장에서 환경오염물질들을 간단하게 확인하고 정량 하는 유용한 접근 방법이 될 것으로 사료된다.