



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0086304
(43) 공개일자 2010년07월30일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) C12P 1/04 (2006.01)
B01J 20/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0005600

(22) 출원일자 2009년01월22일

심사청구일자 2009년01월22일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤성철

경상남도 진주시 주악동 현대성우트리펠리스 A동 305호

셰이크 쇼켓 자밀

경상남도 진주시 가좌동 900번지 경상대학교 응용 생명과학부 응용미생물전공

최문환

경남 진주시 신안동 426-4

(74) 대리인

김순웅

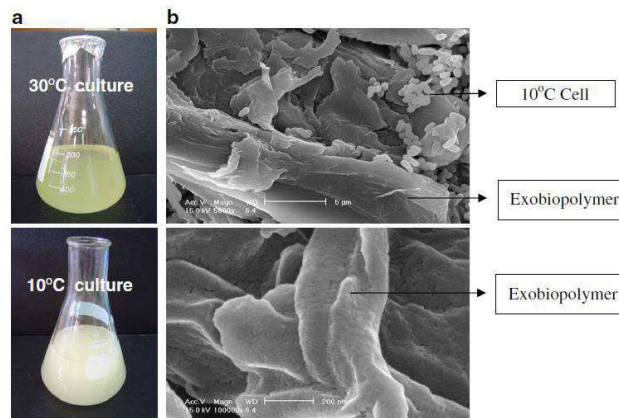
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 슈도모나스 플루오르센스 BM07 균주로부터 획득한 중금속흡착용 조성물

(57) 요약

본 발명은, 슈도모나스 플루오르센스 BM07를 사용하여 중금속을 제거하기 위한 목적으로, 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 불활성화 균주 및 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07 균주로부터 분비된 엑소바이오폴리머 중에서 선택되는 성분을 포함하는 중금속 흡착용 조성물을 제공한다. 또한, 상기 조성물을 처리하고 침전된 중금속을 회수하는 공정으로 중금속을 제거하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R15-2003-012-02001-0

부처명 과학기술부

연구사업명 국가핵심연구센터(목적기초연구)

연구과제명 (NCRC 2-1)예방차원의 친환경 생물소재

주관기관 경상대학교 환경생명과학국가핵심연구센터

연구기간 2003년 12월 01일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 불활성화 균주 및 (ii) 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07로부터 분비된 엑소바이오폴리머 중에서 선택되는 성분을 포함하는 중금속 흡착용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 저온 유도는 슈도모나스 플루오르센스 BM07 배양시 10 내지 30 °C의 온도에서 배양하여 유도한 것인 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 중금속은 카드뮴, 수은, 아연, 셀레늄, 텔루리움, 세슘, 구리, 납, 니켈, 망간, 코발트 및 크롬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 불활성화는 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07을 고압멸균하는 공정으로 획득한 것인 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 엑소바이오폴리머는 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 배지 상층액으로부터 획득한 것인 조성물.

청구항 6

(i) 중금속 오염원에 제1항의 조성물을 첨가하여 처리하는 공정, 및
(ii) 침전된 중금속을 회수하는 공정을 포함하는, 중금속의 제거 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 중금속은 카드뮴, 수은, 아연, 셀레늄, 텔루리움, 세슘, 구리, 납, 니켈, 망간, 코발트 및 크롬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은, 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07 균주로부터 획득한 성분을 이용한 중금속 흡착용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 중금속 제거 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

[0002] 인간의 기술적 활동에 의해 토양, 물 및 지하수로 방출되는 중금속은 장기간 잔존하여 먹이사슬을 통하여 순환하고 결국 축적되어 심각한 환경 문제를 야기한다. 키토산, 울, 피넛 스킨 (peanut skin), 해초 (seaweed), 몰드 (mold), 박테리아, 크랩 셸 (crab shell) 및 효모 등의 다양한 타입의 바이오매스에 의한 유독성 중금속의 생체 흡착에 기반한 생물적 환경정화 (Bioremediation) 공정은 환경학적으로 유용하고 비용면에서도 효율적이다. 미생물은 표면과의 부착, 유해 인자로부터의 보호, 미생물끼리의 응집 (aggregation) 또는 바이오필름(biofilm)의 형성, 보수 (retention of water) 또는 환경으로부터 영양분의 축적을 위한 외인성 유기 화합물의 흡착 등을 위하여 세포 외부로 다량의 점성 슬라임(slime)을 분비한다. 주로 다당류 (polysaccharide)로 이루어져 있으나 드물게 단백질로 구성된 것도 있는 점성의 세포외 폴리머 물질 (extracellular polymeric substances)은 중금속 흡착에 사용되었다.

[0003] “빅쓰리 (big three),” 납, 수은 및 카드뮴은 중금속 생체흡착 연구에서 주목을 받고 있다. 3개의 금속은 광범위한 오염원으로 인하여 유해성 물질에 대한 2003년 포괄적환경처리법(CERCLA, Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act) 우선 명부에서 2, 3 및 7번째로 평가되었다. 담수조 (freshwater algae), 해조 (marine algae), 박테리아, 곰팡이 균사체 (fungal mycelia), 해초 (seaweed), 및 박테리아 펴브리아 (bacterial fimbriae) (단백질로 구성된) 등과 같은 바이오매스로의 중금속의 생체흡착에 대하여 여러 연구들이 보고되었다.

[0004] 생체흡착 현상은 정전기적 상호작용에 기반한 상호교환 기작의 관점에서 설명되었다: 중금속의 흡수량은 이온 반경 (ionic radii)과 관련되어 있는 것으로 제안되었다. 크기가 큰 양이온은 높은 편극도 (polarizability)를 가진다. 높은 독성을 가지는 고도의 분극성 (연질) 금속은 예를 들어, 황- (sulfur-) 또는 질소-(nitrogen-)를 포함하는 리간드와 같은 다양한 연질 (soft)의 리간드와 보다 안정한 결합을 형성한다. 경질-및-연질 이론 (hard-and-soft principle) 에 따르면, 연질금속-리간드 착물 (soft metal-ligand complex)은 보다 공유결합적인 특성을 가지므로 쉽게 해리되지 않는다. 전하 및 이온 크기와 함께, 도너 타입과 리간드 기하학 형태는 수용액에서 중금속의 선택적인 열역학적 흡수에 영향을 준다. 소수성 셸(hydrophobic shell)은 특히 단백질에서 중요한 중금속 결합 부위가 될 수 있다.

[0005] 저온 (0-10 °C)에서 생장하나 20-40 °C에서 최적인 저온세균 (psychrotrophs) (내냉성 (psychrotolerant)으로도 불림)은 생태학적 및 환경학적으로 매우 중요하다. 박테리아는 저온-충격 단백질(cold-shock proteins)과 저온-순응 단백질 (cold-acclimation proteins)을 발현하고 막 지방산 조성의 변화로 (예를 들어, 시스-타입 불포화 정도를 증가하여) 막 유동성을 증가시킴으로써 저온 충격 (cold shock)에 반응하는 것으로 알려졌다. 박테리아에 이런 저온 저항성 기작이 존재함에도 불구하고, 강, 호수, 지하수, 산업 폐기물 등의 오염 문제는 특히 추운 계절에 발생한다고 보고되었다. 따라서, 저온성 박테리아 (psychrotrophic bacteria)는 특히 겨울철에, 다양한 오염 지역의 생물적 환경정화에 핵심 역할을 할 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 수은 및 카드뮴 등과 같은 유해한 중금속을 환경으로부터 제거하기 위하여, 화학적, 물리적 및 생물학적 처리 방법을 사용할 수 있다. 특히, 생물학적 처리방법은 미생물 자체의 생체기작을 이용하는 것으로서, 미생물의 생체축적 (biosorption & bioaccumulation), 산화환원반응 (oxidation & reduction), 금속 유기물질 복합반응 (metal-organic complexation) 및 비용해성 복합체형성 (insoluble complex formation) 등의 기작으로 중금속 오염된 환경을 복원시키는 중요한 기술기반을 제공한다.

[0007] 본 발명은 중금속을 생물학적 처리 방법으로 제거하기 위한 일환으로, 본 발명자의 이전 연구에서, 저온의 과당 보충된 제한배지 (limited medium)에서 다량의 세포외 중합물질 (extracellular polymeric substance)을 생산하는 것으로 밝혀진 슈도모나스 플루오르센스 BM07 균주 (*Pseudomonas fluorescens* BM07 strain) 또는 이로부터 생산되는 물질의 중금속 흡착능을 조사하여 생체흡착제로서의 적합성을 규명하였다.

과제 해결수단

[0008] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0009] 본 발명은 (i) 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 불활성화 균주 및 (ii) 저온 유도된 슈도

모나스 플루오르센스 BM07로부터 분리된 엑소바이오폴리머 중에서 선택되는 성분을 포함하는 중금속 흡착용 조성물에 관한 것이다.

- [0010] 본 발명에 따른, 중금속 제거용 조성물에 사용되는 미생물은 슈도모나스 플루오르센스 BM07이다. 상기 균주는 슈도모나스 속 균주 미생물의 생장에 사용되는 배지조성과 배양조건에서 배양할 수 있다. 예를 들어, 탄소 및 질소원으로 각각 과당 및 황산암모늄을 사용할 수 있으나, 미생물 배양을 위하여 첨가되는 성분은 특별히 제한되지 않는다. 또한, 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 저온 유도를 위하여 배양 온도를 10 내지 30 °C로 조절하도록 한다. 배양 온도에 따라 배양 시간은 조절될 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 중금속에 대하여 생체흡착제로 사용가능한 성분은 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07 균주, 보다 구체적으로 불활성화 균주 및 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07로부터 분리된 엑소바이오폴리머 성분이다.
- [0012] 구체적으로, 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 불활성화는 고압멸균 공정으로 유도할 수 있다. 고압멸균하여 획득한 대사적으로 불활성화된 세포 현탁액을 그대로 사용하거나, 원심분리하고 탈이온수 등으로 세척하는 공정을 추가할 수도 있다. 또한, 상기 획득한 세포는 동결건조할 수 있다.
- [0013] 또한, 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07 균주가 세포 외로 분리한 엑소바이오폴리머 성분은 배지 상층액으로부터 획득할 수 있으며, 원심분리 공정으로 배지 상층액은 획득 가능하다. 본 연구에 의하면, 엑소바이오폴리머 성분은 표 1에 기재된 바와 같은 성분과 함량을 가진다. 폴리펩타이드가 주 성분이며, 포도당, 글루코사민, 갈락토사민 등을 포함한다. 원심분리 공정은 1 회 이상 수회 반복할 수 있다. 또한, 저분자 대사산물과 염을 제거하기 위하여 획득한 상층액에 대하여 투석 공정을 수행할 수 있다. 엑소바이오폴리머 성분이 포함된 배지 상층액 또는 투석액은 그대로 사용가능하다. 또한, 추가로 동결건조할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 중금속 흡착 조성물에는 상기 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 불활성화 균주와 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07로부터 분리된 엑소바이오폴리머 성분은 각각 단독으로 사용되거나, 일정 성분 비로 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 조성물의 중금속 흡착능을 개선 또는 개량시키기 위한 목적으로, 슈도모나스 플루오르센스 BM07는 통상적인 물리화학적 돌연변이 방법, 또는 당업계에 공지된 미생물 세포 표면의 기능기를 도입/변경시키는 방법 등으로 개선 또는 개량될 수 있음은 당업자라면 충분히 이해될 것이다.
- [0016] 예를 들어, 생체흡착제의 중금속에 대한 친화성은 미생물세포의 표면에 존재하는 기, 인산기, 아미드기 등의 중금속과 킬레이팅을 형성할 수 있는 작용기에 연유한다. 당업자는 생체흡착제의 고유한 성질인 중금속에 대한 선택적 흡착성을 유지하면서 동시에 다양한 종류의 중금속에 착화합물을 만들 수 있는 다양한 기능기를 미생물세포 표면에 도입하여, 여러 가지 중금속을 동시에 제거할 수 있도록 하거나 흡착능을 강화시킬 수도 있다.
- [0017] 상기 본 발명의 조성물로 흡착, 제거 가능한 중금속은 특별히 제한되지 않으나, 카드뮴(Cd), 아연(Zn), 수은(Hg), 셀레늄(Se), 텔루리움(Te), 세슘(Cs), 구리(Cu), 납(Pb), 니켈(Ni), 망간(Mn), 코발트(Co) 및 크롬(Cr) 등을 예시할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 제공하는 불활성화된 슈도모나스 플루오르센스 BM07는 자유로운(free) 형태 또는 담체에 고정화된 형태로 사용될 수 있다. 또한, 슈도모나스 플루오르센스 BM07을 담체에 고정화시켜, 오염원을 제거하기 위하여 엑소바이오폴리머를 계속적으로 분리, 방출되는 시스템으로 구현할 수도 있다. 슈도모나스 플루오르센스 BM07을 담체 등에 고정화시키는 방법은 특별히 제한되지 않으며 다양한 응용이 가능하다. 예를 들어, 흡착법과 포괄법과 같은 물리적인 방법, 공유결합법, 가교연결방법 등의 화학적인 방법을 사용할 수 있다.
- [0019] 상기 미생물 고정화 담체는 셀라이트, 세라믹, 활성탄과 같은 다공성 무기물 재료 등을 사용할 수 있으며, 형태는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 원형 막대 형상, 튜브 형상일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 (i) 중금속 오염원에 본 발명의 중금속 흡착용 조성물을 첨가하여 처리하는 공정 및 (ii) 침전된 중금속을 회수하는 공정을 포함하는, 중금속의 제거 방법에 관한 것이다.
- [0021] 중금속으로 오염된 토양, 물 등의 다양한 오염원에 본 발명의 조성물 또는 상기 고정화된 담체를 처리

하여 수은, 카드뮴 등의 다양한 중금속을 효과적으로 흡착함으로써, 오염원으로부터 중금속을 제거할 수 있다. 본 발명의 생체흡착제에 흡착된 중금속은 여러가지 탈착제를 이용하는 등의 다양한 방법으로 회수할 수 있다. 중금속의 탈착효율은 탈착제의 종류와 탈착시의 농도 등에 영향을 받을 수 있으며, 예를 들어, NH_3 , NTA(Nituitrotriactic acid), EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid) 등을 탈착제로 사용할 수 있다.

효 과

본 발명에서 제공하는 저온 유도된 불활성화된 슈도모나스 플루오르센스 BM07 및 저온 유도된 슈도모나스 플루오르센스 BM07로부터 분리된 엑소바이오폴리머는 수은, 카드뮴 등의 중금속에 대하여 우수한 생체흡착능을 보였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 재료 및 방법

1-1 미생물, 배양 조건 및 미생물 바이오매스의 준비

슈도모나스 플루오르센스 BM07 (기탁번호 KCTC 10005BP, 기탁일자 2001.07.03)는 1% 효모 추출물, 1.5% 뉴트리언트 브로스 (nutrient broth), 0.2% 황산암모늄 (ammonium sulfate) 및 1.8% 한천을 포함하는 NR (nutrient-rich) 한천 배지에서 30 °C로 유지하였다. 슈도모나스 플루오르센스 BM07 단일 클로니를 5mL NR 브로스 배지에 접종하고 종균 배양으로 30 °C, 180 rpm에서 12 시간 배양하고 예전 보고와 (Choi MH, Yoon SC (1994) Appl Environ Microbiol 60:3245-3254) 동일 조성을 가지는 500 mL 의 modified M1 최소 배지(minimal medium)를 포함한 2-L 플라스크로 옮겼다. 과당 (70 mM) 및 황산암모늄 (1 g/L)을 M1 배지의 탄소 및 질소원으로 사용하였으며, 배지의 초기 pH를 7.0 으로 조절하였다. 성장 온도는 Jeio Tech IS971R 저온 배양기 (Taegu, Korea)를 이용하여 설정 온도의 ± 1 °C 내에서 조절하였다. 세포 성장은 배양 배지의 일정량을 적절한 시간 간격에서 채취하여 660 nm (OD_{660})에서 광학 밀도를 측정하여 모니터하였다. 후기 지수기(late exponential growth phase, 10 및 30 °C에서 각각 144 및 72 시간 생장한) 에서 박테리아 배양액을 121 °C에서 15분간 고압 멸균하여 대사적으로 불활성화된 세포를 준비하였다. 다음, 10 및 30 °C 생장 세포의 미생물 세포 바이오매스 현탁액을 원심분리 (10,000 × g, 20 분) 로 수집하고, 250 ml 의 탈이온수로 2번 세척하고 동결건조하고 생체 흡착실험에 사용하였다.

1-2 반복된 원심분리를 통한 엑소바이오폴리머 (exobiopolymer, EBP) 분리

저온 생장한 배양배지를 원심분리 (Beckman JA10, 8,700 × g, 15 분)하면 원심분리 튜브에 세포 침전된 하층과 많은 세포가 포함된 EBP-포함 뮤코이드(mucooid)된 상층의 2개의 층이 생긴다. 세포 펠렛의 상부 뮤코이드 층을 파이펫으로 조심스럽게 분리하고, 탈이온수로 반복적으로 현탁시키고 뮤코이드 분획에서 세포를 제거하고자 원심분리하고(Beckman JA20, 27,200 × g, 10 분) SEM(scanning electron microscope)으로 최종 확인하였다. 회수된 세포를 수집하고 세포 매스를 측정하기 위하여 50 °C 진공 오븐에서 밤새 건조하였다. 세포-제거된 EBP 포함 분획은 저분자 대사산물과 염을 제거하기 위하여 3.5 kDa 컷오프 셀룰로즈 아세테이트 막을 이용하여 초과량의 탈이온수로 3 번 투석하고 동결건조하였다.

1-3 EBP의 조성 및 구조 분석

EBP의 아미노산 조성을 밀로포어 워터스 피코-태그 아미노산 분석 시스템(Millipore Waters Pico-Tag amino acid analysis system)에서 RP-HPLC (reverse-phase high-pressure liquid chromatography)를 이용하여 측정하였다. 정제된 EBP 10 mg을 1 mL의 6 N HCl로 100 °C에서 24 시간 가수분해하였다. 아미노산을 PITC (phenylisothiocyanate)를 이용하여 전치컬럼 유도체화하였고 RP-HPLC를 이용하여 분리하였다. 분리된 아미노산 유도체의 흡광도를 254nm에서 검출하였으며, 아미노산 농도를 측정하고자 각 아미노산 피크 영역을 사용하였

다.

[0031] 산 가수분해 후에 EBP에 함유된 당의 조성을 측정하였다. 건조 EBP 10 mg을 1 mL의 6 N HCl로 100 ℃에서 4 시간 가수분해하였다. 방출된 당을 GP50 농도구배 펌프와 ED40 전기화학적 디텍터를 가지는 Dionex DX-300 BioLC system을 이용하여 HPAEC-PAD (high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection)로 분석하였다. 25 μ l 가수분해물(hydrolysate)을 붕산염 트랩 (Dionex) 이 앞에 있는 CarboPac PA1 가드 컬럼 (4.6 x 50 mm) 이 장착된 CarboPac PA1 컬럼 (4.6 x 250 mm)으로 주입하고, 16 mM NaOH를 이용하여 1 mL/min에서 등용매 용출(isocratic elution)로 당을 분리하였다.

[0032] 1-4 전자현미경 분석

[0033] EBP의 구조를 관찰하기 위하여 0.2 M 인산나트륨 버퍼 (pH 7.2)와 최종 농도가 2.5% 되게 희석한 글루타알데하이드 (glutaraldehyde; Electron Microscopy Sciences) 용액에 시료를 4 ℃에서 3 시간 동안 고정하고 글루타알데하이드-고정된 시료를 인산염 버퍼로 2 번 세척하고, 1% 오스뮴 테트라옥사이드 (osmium tetroxide) 용액으로 4 ℃에서 2 시간 동안 2차 고정하였다. 오스뮴 테트라옥사이드-고정 시료를 농도별 에탄올 시리즈 (graded ethanol series) (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 및 100%에서 각 5분간)에서 탈수시켰다. 시료를 금으로 코팅 (fine coat sputter JFC-1100, JEOL)하고 전계방출주사전자현미경 (field emission scanning electron microscope; Philips XL30 S FEG) 을 이용하여 관찰하였다.

[0034] 1-5 수은(II) 및 카드뮴(II) 흡착 실험

[0035] 비생물 슈도모나스 플루오르센스 BM07 바이오매스와 EBP에 의한 수은(II) 및 카드뮴(II)의 흡착을 측정하고자 배치 평형법 (batch equilibrium method)을 사용하였다. Hg(II) 또는 Cd(II) (HgCl_2 또는 CdCl_2)로 용액 300 mL을 초기농도(C_i)를 다양하게 하여 3개씩 1-L 코니컬플라스크에 두었다. 2가지 금속 용액에 대하여 8 또는 9 가지 농도별로 ($\sim 3 - 530$ mg 금속이온/L 탈이온수) 준비하고 pH를 최적수준(Hg(II)는 7 및 Cd(II)는 6)으로 조절하였다. 정확하게 무게 측정된 바이오매스 또는 EBP 시료 (100 mg)을 용액에 첨가하여 현탁액을 얻었다. 코니컬 플라스크 시리즈를 30 ℃에서 170 rpm의 일정 속도로 교반하였다. 플라스크를 2시간 (평형 시간) 교반한 후에, 현탁액을 $12,000 \times g$ 에서 10 분간 원심분리하였다. 상등액만을 각각의 깨끗한 시험관에 모아 상등액 잔여 금속 함량 (C_f) 을 유도결합플라즈마분광계 (inductively coupled plasma atomic emission spectrometer) (Perkin Elmer, Optima 4300 DV)를 이용하여 측정하였다. 세포 바이오매스 또는 EBP에 의해 흡착된 중금속의 각 양 (mg 금속이온 /g 건조 세포 바이오매스 또는 EBP) 을 볼스키 및 메이-필립스 (Volesky and May-Phillips) 방법에 따라 계산하였다 (Volesky B, Holan Z (1995) Prog 11:235-250). 죽은 세포 또는 EBP의 금속 흡착 효율은 따로 언급하지 않는 경우, 하기 식으로 측정하였다.

수학식 1

[0036] $Q = V (C_i - C_f) / 1,000M$

[0037] (여기서, Q 는 특이적 금속 흡수 (mg 금속/g 생체흡착제), V 는 금속 용액의 부피 (mL), C_i 는 용액내 금속의 초기 농도 (mg/L), C_f 는 용액내 금속의 최종 농도 (mg/L), M은 건조 생체흡착제의 양 (g)이다.)

[0038] 평형 흡착 데이터 비교를 위한 흡착 모델로서, 별개 균일 결합 부위에 대한 화학적 흡착을 가정하는, 랭뮤어 흡착등온식 (Langmuir adsorption isotherm)을 선택하였다.

수학식 2

[0039] $Q_{eq} = Q_{max}C_{eq} / (K_d + C_{eq})$

[0040] (여기서, Q_{eq} 는 평형상태에서 무게 바이오매스 유닛 당 결합한 금속량, C_{eq} 는 평형상태에서 용액에 잔존하는 유리 금속 농도, Q_{max} (mg 금속/g 생체흡착제) 는 주어진 조건하에서 최대 금속 흡수, K_d 는 해리 상수, Q_{max} 와 K_d

는 $1/Q_{eq}$ 대 $1/C_{eq}$ 의 선형 플랏으로부터 측정한다.)

[0041] 2개의 모델을 비교하기 위하여 흡착 데이터는 친화도 분포와 이중 표면에너지 (Adamson AW (1982) New York, p 373, 607)를 가지는 결합 부위로의 다층 흡착을 가정하는 프로인틀리히 (Freundlich) 모델을 이용하여 분석하였다. 경험적 프로인틀리히 모델은 하기와 같이 나타내었다.

수학식 3

[0042]
$$Q_{eq} = K_F C_{eq}^{1/n}$$

[0043] (여기서, $K_F(1g^{-1})$ 과 n 은 실험 데이터에 기반한 $\ln Q_{eq}$ 대 $\ln C_{eq}$ 의 선형 플랏의 절편과 기울기에서 각각 얻은 프로인틀리히 상수들이다.)

[0044] 1-6 수은(II) 및 카드뮴(II) 흡착에 대한 분광학적 분석

[0045] EBP 시료 (금속 흡착 전과 후) 에 대한 고 해상 (0.1 cm^{-1}) FTIR (Fourier transform infrared) 분석을 진공에서 DTGS (with KBr window) 디텍터가 장착된 VERTEX 80v (Bruker Optics) FTIR 분광계로 수행하였다. 냉동 건조된 EBP를 KBr 파우더와 실온에서 혼합하고 얇은 펠렛으로 압착하였다.

[0046] 금속 흡착 전과 후의 세포 바이오매스를 동결건조하여 얻은 파우더의 EDX (Energy dispersive X-ray) 마이크로분석은 Philips XL30 S FEG 전계방출주사전자현미경에 부착된 OXFORD Link ISIS microanalytical system을 이용하였다.

[0047] 금속이 흡착되지 않은 대조구 및 수은- 또는 카드뮴-흡착된 EBP의 동결-건조 시료의 WAXD(Wide-angle X-ray diffraction) 패턴은 0.05° 의 스텝 렉스(step length) 와 스텝당 29.8 s 의 시간으로 0-100 (2θ) 범위에 걸쳐 cosource radiation ($\lambda=1.79\text{ \AA}$)을 이용하여 2차원 면적검출 X-선회절분석기 (General Area Detector X-ray Diffraction System) (D8 DISCOVER with GADDS, Bruker AXS (Germany))에서 기록하였다.

[0048] 1-7 금속 비적재 또는 적재된 EBP의 열적 분석

[0049] 다양한 EBP 시료의 열적 분석을 DSC(differential scanning calorimetry)를 이용하여 수행하였으며 데이터 수집은 TA instruments model DSC Q200 V23.4로 하였다. EBP 시료 10 mg을 알루미늄 팬위에 놓고 봉입한 후, 건식질소 퍼지(dry nitrogen purge)(50 mL/min) 하에 -100에서 250 $^\circ\text{C}$ 까지 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 가열하였다. 엔탈피 (enthalpy), 온셋 (onset) 온도, 흡열전이피크 (endothermic transition peak) 온도는 Universal V4.3A TA instruments software를 이용하여 분석하였다.

[0050] 1-8 화학적 변형

[0051] (1)카르복실기의 에스테르화: 카푸어와 비라라가반 (Kapoor and Viraraghavan)의 방법에 따라, 1 g 바이오매스를 60 ml 무수 메탄올에 현탁시키고 0.6 ml 진한 염산(concentrated hydrochloric acid)을 현탁액에 첨가하였다. 반응은 실온에서 150 rpm 으로 6시간 동안 진탕배양기에서 수행하였다. 현탁액을 원심분리로 회수하여, 증류수-0.2 M 탄산나트륨-증류수 순서로 세척하였다. 그리고 나서 바이오매스는 동결건조된 후 흡착 실험에 이용되었다.

[0052]

[0053] (2)아미도 그룹 메틸화: 바이오매스 1 g을 15 ml 포름알데하이드와 30 ml 포름산으로 6시간 환류하고 증류수-0.2 M 탄산나트륨-증류수 순서로 세척하였다 (Kapoor A, Viraraghavan T (1997) Bioresour Technol 70:221-227). 바이오매스를 동결건조하고 흡착 실험에 사용하였다.

[0054] 실시예 2: 온도-의존적 EBP 생성

[0055] 슈도모나스 플루오르센스 BM07은 저온성 균주(psychrotrophic strain)이다. 균주는 4 °C 이하 플레이트에서도 잘 성장하며 콜로니 주변에 반투명 슬라임(slime)을 형성한다. 또한, BM07 균주는 탄소원으로 과당을 포함하는 M1 배지에서 성장할 때 저온에서만 다량의 슬라임을 분비한다. 도 1b에서 볼 수 있는 바와 같이, 10 °C, M1 배지에서, EBP 분비는 중간지수기 (midexponential phase)에서 시작하여 후기 로그기 (late log phase)에서 최대가 되었다. 10 °C에서는 세포 생장이 너무 느려 배양 6일 후에 약 1.7 g L⁻¹의 최종 건조 세포 매스가 얻어졌으나, 이 조건에서 EBP 생성은 1.4 g L⁻¹로 매우 높았다. 그러나, 30 °C에서는 3일 후에 세포 성장은 최대가 되었으나 (건조 세포 매스, 3.45 g L⁻¹), 소량의 EBP만 분비되었다 (도 1a 및 b).

[0056] 실시예 3: EBP 정제 및 조성 특성

[0057] M1 최소 배지에서 BM07 세포 배양은 어떤 가용성 엑소바이오폴리머(exobiopolymer)를 생성시키지 않는다. 알코올 침전 후 진공 건조에 의해 또는 동결건조에 의해 분리된 EBP 시료는 물에 거의 용해되지 않았다. 따라서, 브래드포드 방법에 의한 시료의 단백질 정량은 불가능하였다. 그래서, 단백질 함량을 측정하고자 6 N 염산 가수분해와 RP-HPLC를 수행하였다. 아미노산 분석 결과, EBP는 주 성분으로는 단백질로 구성되어 있었다 (표 1). 아미노산 총량은 시료 무게의 약 75-85 wt%를 차지하였다. SEM 및 FTIR 분석 결과, 반복된 원심분리에도 불구하고, 분리된 EBP 시료는 여전히 적은 양의 원형의 세포, 세포 파편 및 폴리하이드록시알카노익산을 포함하였다. 소수성 아미노산이 단백질의 주 성분(~50 mol%) 을 차지하였다.

표 1

10°C의 과당-함유 M1 배지에서 성장한 슈도모나스 플루오르센스 BM07 균주에 의해 생성된 물불용성 엑소바이오폴리머의 아미노산 및 모노당 조성

아미노산 명칭	μg/mg	아미노산 명칭	μg/mg	아미노산 명칭	μg/mg	모노당 명칭	μg/mg
Asp+Asn	76.28	Thr	37.30	Ile	36.44	Glucose	59
Glu+Gln	93.50	Ala	77.66	Leu	75.92	Glucosamine	16
Ser	32.18	Pro	33.38	Phe	38.00	Galactosamine	2
Gly	42.68	Tyr	15.76	Lys	58.00		
His	17.68	Val	49.96	Trp	— ^a		
Arg	51.38	Met	20.64	Cys	— ^a		
				Sum	756.76		77

^a 매우 소량

[0058]

[0059] 정제된 EBP의 6 N 염산 가수분해물의 HPAEC-PAD 액체 크로마토그래피 분석 결과, 폴리머에서 당 유닛은 포도당, 글루코사민, 갈락토사민 및 초기 체류시간(retention time)에 소량으로 검출되는 2개의 동정되지 않는 성분으로 주로 구성되었다. 포도당과 글루코사민의 함량은 각각 59 및 16 μg/mg 이다 (표 1). 폴리펩타이드와 당 사이의 결합은 아직 결정되지 않았다.

[0060]

EBP는 0.1% (wt/wt) 이상의 SDS (sodium dodecyl sulfate)가 첨가된 8 M 우레아(urea) 용액에서 가용화되는 것으로 보이나, SDS-PAGE 분석 결과에서는 어떤 뚜렷한 밴드의 분리가 나타나지 않았다. 뮤코이드 층에서 분리되어 더 이상의 원심분리나 물세척 등의 처리공정을 거치지 않은 원상태의 (native) EBP조차도 SDS-PAGE에서 분리되지 않았다. 엑소폴리펩타이드의 전기영동상의 분리는 현재 진행중에 있다.

[0061] 실시예 4: 저온-유도 EBP (cold-induced EBP)의 위치 및 구조적 특성

[0062]

분리된 EBP는 물에 용해되지 않고 콜로이드 현탁액을 형성하였다 (도 2a). 따라서, 물에 용해되는 다른 엑소바이오폴리머와 달리, 저온-유도 EBP는 세포 주변에서만 위치하고, 배지로 확산되지 않는 것으로 예상된다. 원심분리 후에 회수된 EBP를 주사전자현미경 (scanning electron microscopy)으로 관찰하였다 (도 2b). 동결건조된 EBP는 192 °C에서 84 J/g의 엔탈피로 흡열 전이 (endothermic transition) (도 10)와 선명한 X-레이 회절 (X-ray diffraction) 패턴 (도 9)을 보였는데, 이는 EBP가 세포 주변에 독특한 조직화된 구조를 형성함을 의미한다. 그러나 동결건조된 EBP에 추가적으로 물 세척과 원심분리 (Beckman JA20, 27,200 g, 10 min)를 반복하면 X-레이 분석에서는 크리스탈린 피크 (crystalline peaks)가 점차 없어지고, DSC 분석에서는 흡열 전이

가 더 낮은 온도로 이동하였는데, 이는 반복된 원심분리 전단력 (shear force)이 EBP의 원구조(intrinsic structure)를 파괴할 정도로 강하다는 것을 의미한다. 따라서, 중금속 흡착 연구에 사용할 EBP는 탈이온수로 한번만 세척하여야 한다. 도 9 및 10의 데이터는 한번 세척한 EBP에 대한 것이다.

[0063] 실시예 5: 수은(II) 및 카드뮴(II) 흡수에 대한 생체흡착 키네틱(kinetics)과 pH 효과

[0064] EBP와 30 및 10 °C에서 성장한 세포에 의한 수은(II) (HgCl_2) 및 카드뮴(II) (CdCl_2)의 생체흡착 키네틱을 연구하기 위하여 지정된 시간 간격 (0, 20, 40, 60, 80, 100, 및 120 분)으로 수행된 배치 실험에 의하면 평형 시간이 모든 금속 이온에 대하여 120 분 내에 도달하였다. 접촉 시간은 금속이온의 흡수에 유의성있게 영향을 주었다. 30 및 10 °C에서 성장한 세포와 분리된 EBP에 대한 수은(II) 흡착은 각각 20, 40, 40 분 내에 최대에 도달하였던 반면, 카드뮴(II) 흡착의 경우, 3개의 모든 생체흡착제(biosorbent)에 대하여 동일하게 60분이 요구되었다. 따라서, 금속 이온의 생체흡착은 약간 차이가 나지만 거의 100 분 내에 일정해졌다. 30 °C에서 2시간 교반은 2 가지 금속이 모든 타입의 생체흡착제에 대하여 흡수 평형에 도달하기에 충분하였다. 첸 (Chen) 등은 슈도모나스 에루지노사 PU21 (*Pseudomonas aeruginosa* PU21) 미생물 세포에 의한 Cu(II)의 생체흡착은 10분 이내에 최대에 도달하였으나 Zn(II)에 대해서는 60분이 걸렸고 양 금속의 생체흡착은 120분 내에 일정하게 되었다는 것을 관찰하였다(Chen XC et al., (2005) Colloid Surf B Biointerfaces 46:101-107).

[0065] 배치 pH는 미생물 세포 매스 생체흡착제에 의한 금속 흡착에 현저한 영향을 미친다. 다른 미생물 바이오매스와 유사하게, BM07 세포 바이오매스와 EBP는 생체흡착제 타입과는 상관없이 Cd(II)에 대해서는 pH 6.0에서, Hg(II)에 대해서는 pH 7.0에서 최대 생체흡착을 나타내었다 (도 3). 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 2가지 중금속에 대한 흡수는 낮은 pH에서는 적었다. pH 증가는 금속 흡착도를 증가시켰다. pH 증가에 따른 흡착 증가는 생체흡착제에서 여러 작용기 (카복실, 아미도, 티올, 설피드릴 및 포스페이트 기와 같은)의 탈양성자화(deprotonation)에서 기인한 표면 음전하 수의 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다(Herrero R et al. (2005) Water Res 39:3199-3210). 10 °C 및 30 °C-성장 바이오매스와 EBP의 생체흡착제 중에서 EBP가 가장 민감한 pH 의존성을 보였다. 30 °C-성장 바이오매스에서보다 10 °C-성장 바이오매스에 의한 높은 흡착은 저온-유도 분비된 엑소폴리펩타이드가 존재하기 때문이다 (표 1). 연구된 모든 pH 범위에서 카드뮴은 유리형태의 Cd(II)로 대부분 존재하기 때문에 BM07 바이오매스와 Cd(II)의 상호작용은 주로 박테리아 세포 벽 성분과 저온-유도 폴리펩타이드의 카복실레이트 이온 (pK 수치 3.5-5.0)과 정전기적일 수 있다. 반면, Hg(II)의 98% 이상은 pH 1과 9 사이의 수용액상 (aqueous phase)에서 $\text{HgCl}(\text{OH})$ 및 $\text{Hg}(\text{OH})_2$ 를 포함한 중성종(neutral species) HgCl_2 로 존재하기 때문에, 화학종 분류 (chemical speciation)는 수은 생체흡착 공정에서 중요한 요소가 되어야 한다. 도 3에서 Hg(II)의 S-형 곡선의 pH 의존성은 염화제2수은 (mercuric chloride)의 그런 복잡한 종 분류를 반영할 수 있다. 에레로(Herrero) 등은 HgCl_2 와 음전하된 리간드 A^- 사이의 착물 형성 (complex formation)(AHgCl_2^-) 기작을 제시하여 pH에 따라 조류 바이오매스 (algal biomass)에 수은 흡착이 증가하는 것과 Hg(II)와 Cd(II), Mg(II) 등과 같은 다른 2가 양이온 간에 어떠한 흡착 경쟁도 일어나지 않는 것을 설명하였다. 조류 바이오매스에 대하여 Hg(II)과 Cd(II) 사이에 경쟁적 흡착이 일어나지 않는다는 것은 각 중금속에 대하여 별도의 결합 부위 존재를 증명한다. 따라서, BM07 생체흡착제에서 Hg(II) 및 Cd(II)는 별도 결합 부위를 가질 가능성이 높다. 2개의 중금속에 대한 상이한 최대 생체흡착 pH도 이런 제안을 지지하는 것이다.

[0066] 실시예 6: 수은(II) 및 카드뮴(II) 생체흡착의 랭뮤어 및 프로인틀리히 흡착 근사법 (Langmuir and Freundlich adsorption approximation)

[0067] BM07 생체흡착제의 3가지 타입에 의한 수은(II)와 카드뮴(II)의 평형 흡수 (Q_{eq})을 도 4에서와 같이 평형농도 (C_{eq})의 함수로 도면을 나타내었다. 슈도모나스 플루오르센스 BM07 유래 3가지 생체흡착제에 대한 수은(II)와 카드뮴(II)의 흡수 특성을, 동일 단일-부위 결합(homogeneous single-site binding)을 가정하는 랭뮤어 등온식 모델을 이용하여 분석하였다. 도 4의 수은 데이터는 랭뮤어 흡착등온의 상반방정식(reciprocal equation)과 잘 일치하고, EBP, 10 °C 및 30 °C 바이오매스에 대한 각각의 상관관계수(r^2)는 0.998, 0.993, 및 0.997이었다 (표 2). EBP, 10 °C 및 30 °C 바이오매스 각각의 수은 흡착에 대한 Q_{max} 는 286.2, 97.4, 및 72.3 mg/g dry biosorbent 이고 K_d 수치는 147.0, 22.7, 및 15.3 mg/L 이다. 카드뮴 데이터도 상반방정식 (EBP, 10 °C 및 30

℃ 바이오매스에 대하여 각각 (r^2)=0.952, 0.961, 및 0.880) 과 잘 일치하였다. EBP, 10 ℃ 및 30 ℃ 바이오매스 각각의 카드뮴에 대한 랭뮤어 파라미터는 Q_{max} , 61.5, 27.0, 및 18.9 mg/g dry biosorbent와 K_d , 15.2, 7.1 및 2.5 mg/L 로 계산되었다. 양 금속에 대한, 저온-유도 EBP는 흡착에서 결정적인 역할을 한다. 수은(II)는 EBP에 더 두드러지게 결합한다. 랭뮤어 등온식으로의 Q_{eq} 데이터의 우수한 적합성은 EBP에서 2개의 금속에 대한 특이적 결합 부위가 존재한다는 것을 명확히 나타내는 것이다. 수은은 카드뮴보다 10 배 높은 K_d 를 가진다. 정역치(reciprocal value), $b=1/K_d$, 는 물리화적으로 특이적 결합 부위의 중금속의 결합 친화도를 나타낸다. 수은(II)의 낮은 b 수치는 매우 약한 결합을 의미한다. 카드뮴 (II)의 높은 b 수치는 매우 강한 결합을 의미한다. Cd(II)의 강한 결합은 유리 Cd^{2+} 이온과 엑소폴리펩타이드를 구성하는 산성 아미노산의 사이드 기(side group)에서의 음성 음이온간의 정전기적 상호작용 관점에서 설명할 수 있다 (표 1). 반면, EBP에 대한 수은(II)의 약한 결합은 고도로 분극된 수은종 (polarizable mercuric species) 과 소수성 엑소폴리펩타이드의 소수성 포켓과의 약한 반데르 발스 상호작용으로 매개될 수 있다. 표 2에서 2가지 중금속의 현저하게 상이한 K_d 수치 (또는 b 수치)는 EBP에 있는 결합 부위의 상이한 화학적 성질을 명확히 증명하는 것이다.

표 2

수용액에서 Hg(II) 및 Cd(II) 생체흡착에 대한 랭뮤어 및 프로인틀리히 등온식 상수 및 상관관계수

Metal ion	Biosorbent	Langmuir constant				Freundlich constant		
		Q_{max}	K_d	b	r^2	K_F	n	r^2
Hg(II)	EBP	286.17	146.99	0.0068	0.998	4.25	1.55	0.929
Hg(II)	10 °C cell	97.42	22.70	0.044	0.993	9.02	2.39	0.855
Hg(II)	30 °C cell	72.26	15.27	0.065	0.997	8.69	2.50	0.846
Cd(II)	EBP	61.51	15.20	0.066	0.952	9.14	2.57	0.935
Cd(II)	10 °C cell	26.97	7.12	0.140	0.961	5.48	3.06	0.956
Cd(II)	30 °C cell	18.88	2.46	0.406	0.880	8.04	5.64	0.794

프로인틀리히 등온식 파라미터, K_F 와 n 을 계산하여 표 2에 나타내었다. 절편 K_F 는 흡착제의 흡수능의 척도이고 기울기 $1/n$ 은 흡착강도(n 은 1보다 큰수)의 척도이다. 연구된 생체흡착제의 모든 타입에 대하여, 상관관계수 비교로 측정된 바로는 수은(II)와 카드뮴(II)은 프로인틀리히 등온식보다는 랭뮤어모델에 적합하였다. 그러나, 프로인틀리히 파라미터의 상이한 생체흡착제 간에 프로인틀리히 모델로의 흡착 등온식 데이터의 우수한 적합성과 비체계적 변이(nonsystematic variation)는 특히 카드뮴(II)에 대하여 다수의 부위와 결합을 하게 하는 복잡한 생체흡착 공정을 의미하는 것이다.

실시예 7: 수은(II) 및 카드뮴(II) 결합의 분광학적 분석

2가지 상이한 타입의 동결건조된 BM07 바이오매스에 대한 수은 흡착 전과 후의 시료에 대해 EDX 분석을 수행하였다 (도 5). FE-SEM 실험전에 표본들은 금-코팅되었다. 수은 흡착 전의 2개 대조구 시료의 EDX 스펙트럼은 탄소, 산소, 칼슘 및 금에 해당하는 뚜렷한 피크를 보였다. 수은 흡착 후에, 스펙트럼은 금 피크와 겹치는 수은에 대한 별개 피크를 보였다. 대조구의 금에 해당하는 피크의 세기와 비교하였을 때, 수은 흡착 후 10 ℃ 바이오매스에 대한 수은 피크의 세기는 30 ℃ 바이오매스보다 강하였다. 수은 흡착 후에 칼슘 신호가 사라지기 때문에, 수은은 이온 교환기작을 통하여 칼슘이온과 대체되는 것으로 보인다. 수은 흡착 후에 클로라이드 신호의 출현은 바이오매스에 결합한 후에도 클로라이드가 $HgCl_2$ 및 $HgCl(OH)$ 와 같은 해리되지 않는 종으로 존재한다는 것을 의미한다. 이는 수은 이온 결합이 특이적 부위에서 부가생성물 (adduct) (비이온 교환)의 형태로 대부분 일어난다는 것을 의미한다. 반면, 카드뮴 흡착 후에, 스펙트럼은 카드뮴에 대한 별개의 피크를 보였다 (도 6). 카드뮴 생체흡착 후에 클로라이드에 해당하는 피크가 없어지고, 몇몇 다른 생체흡착제에서도 관찰된 바와 같이, Cd(II) 흡착 후에 칼슘 함량이 감소하는 것으로 보아 카드뮴은 어떤 부가생성물의 형성없이 단지 이온 교환을 통해 칼슘과 교환되었다는 것을 의미한다.

EBP에서 수은 결합에 관여하는 화학적 기 (chemical group)를 조사하고자 대조구 (수은 비적제)와 수은-적재된 ($C_i=400$ mg/L) EBP에 대한 고해상도 (0.1 cm^{-1}) FTIR 스펙트럼을 얻었다 (도 7). 금속 프리 대조구 시료에서는, 카르보닐 밴드 영역에서, 2개의 주 밴드, 아마이드 I의 $\gamma C=O$ ($1,657.3\text{ cm}^{-1}$)와 아마이드 II 밴드의 δ

NH/ γ C=O 결합 ($1,544.3 \text{ cm}^{-1}$) 이 관찰되었다. $1,745.3 \text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 세기를 보이는 밴드는 클로로포름 추출물의 NMR (nuclear magnetic resonance) 분석에 의해 바이오매스에 존재하는 폴리하이드록시알카노익산의 카르보닐 기인 것으로 밝혀졌으며, 참고피크 (reference peak)로 선택되었다. 수은 결합에서, 참고피크인 카르보닐 흡착은 $1,745.8 \text{ cm}^{-1}$ 로 상대적으로 일정하게 남아있었으나, 아마이드 I 및 II 밴드는 각각 $1,652.9$ 및 $1,542.2 \text{ cm}^{-1}$ 로 적색편이(redshift)하였다. 반대로 EBP에 카드뮴이 결합 ($C_i=800 \text{ mg/L}$) 했을때 아마이드 I 및 II 밴드는 각각 $1,659.17$ 및 $1,545.0 \text{ cm}^{-1}$ 로 이동하였고, 참고 피크는 $1,747.27 \text{ cm}^{-1}$ 에서 관찰되었다. 또한, 수은 또는 카드뮴 흡착 후에 수은-적재된 시료는 $1,066.19 \text{ cm}^{-1}$ 에서, 카드뮴-적재 시료는 $1,065.12 \text{ cm}^{-1}$ 에서 새로운 피크가 관찰되었는데, 이는 단백질에 존재하는 카르보닐 기 또한 수은 및 카드뮴 결합에 관여한다는 것을 나타낸다. 금속이 적재되지 않은 대조구 EBP 시료에서 관찰된 $1,160.19 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 피크가 Hg(II) 적재 EBP의 경우 $1,157.76 \text{ cm}^{-1}$ 로 이동하였고, Cd(II) 적재 EBP의 경우 $1,163.31 \text{ cm}^{-1}$ 로 이동하였는데, 이는 1차 및 2차 아민 또는 P-O 기 또는 지방족 아민 (aliphatic amines)의 관련성을 제시하였다. 10°C 및 30°C 세포 바이오매스에 대해서도 Hg(II) 및 Cd(II) 흡착 전과 후에 FTIR 분석을 수행하였다 (도 8). 수은-적재 10°C 바이오매스의 경우, 아마이드 영역의 피크 위치에서 주요 변화가 발견되었다. 피크들은 $1,653.80$ 에서 $1,654.95$ 로 그리고 $1,541.44$ 에서 $1,539.36 \text{ cm}^{-1}$ 로 이동하였다. 반면, $1,258.44 \text{ cm}^{-1}$ 에서 낮은 파수로(wave nubmer) 피크의 이동은 셀레이트 기의 관련성을 나타내었고, $1,161.79$ 에서 $1,160.79 \text{ cm}^{-1}$ 로의 이동은 일차 및 2차 아민들 또는 P-O 기 또는 지방족 아민의 관련성을 나타내었다. 30°C 세포 바이오매스에 의한 Hg(II) 흡착 후에, 아마이드 영역의 피크 위치에 대해서는 어떤 현저한 변화도 관찰되지 않았다. 수은이 적재되지 않은 대조구 30°C 세포 바이오매스에 대한 $1,380.89 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 피크가 수은이 적재된 후에 $1,384.35 \text{ cm}^{-1}$ 로 이동하였는데, 이는 Hg(II)와 COO^- 및/또는 CO- 기와의 상호작용을 나타내었고, $1,028.70 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 피크가 수은 적재후 $1,026.76$ 로 이동은 카르복실 기와의 관련성을 제시하였다. 10°C 세포 바이오매스에 의한 Cd(II) 생체흡착 후에, 카르복실기와의 상호작용에 의해 $1,457.89 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 피크가 $1,465.50 \text{ cm}^{-1}$ 로 이동하였고, 아마이드 밴드에서도 약간의 변화 ($1,541.44$ 에서 $1,542.57 \text{ cm}^{-1}$)가 일어났다. Cd(II)-적재 및 Cd(II)-비적재 30°C 바이오매스에 대한 IR 스펙트럼도 아마이드 및 카르복실 기들이 곤련되어 있음을 보여준다. 따라서 FTIR 분석에 의해 아마이드와 카르복실 기들이 주로 Hg(II)와 Cd(II) 흡착에 관련된 것을 알 수 있었다.

[0073]

중금속 양이온의 결합에 관여하는 작용기를 밝히고자 바이오매스의 화학적 변형 (Chemical modification) 연구가 수행되어 왔다. 본 연구에서도 EBP, 10°C 및 30°C 바이오매스에 의한 Hg(II) 및 Cd(II)의 생체흡착에 주역할을 수행하는 결합부위를 밝히고자 아민 및 카르복실 기들을 화학적으로 변형시켰다. EBP의 아마이드 기의 화학적 변형 후에, Hg(II) 생체흡착능은 화학적 변형 전의 대조구 시료와 비교하여 60% 까지 엄청나게 감소하는 반면, 카르복실 기의 화학적 변형 후에는 18%만이 감소되었는데, 이는 Hg(II) 흡착이 주로 아민 기에서 일어난다는 것을 의미한다. Cd(II) 생체흡착의 경우 아민과 카르복실 기 모두가 중요한 역할을 수행하였다 (표 3). 10°C 바이오매스도 비슷한 결과를 보여주었으나, 30°C 바이오매스의 경우는 명확하지 않았다.

표 3

EBP 및 10°C 와 30°C 생장한 세포의 화학적 변형 전과 후의 흡착 용량 (Q_{eq})

Metal ion	Biosorbent	Q_{eq} before chemical modification (mg/g)	Q_{eq} after chemical modification of carboxyl group (mg/g)	% reduction of Q_{eq}	Q_{eq} after chemical modification of amide group (mg/g)	% reduction of Q_{eq}
Hg(II) ^a	EBP	141.69	116.07	18.08	55.96	60.50
Hg(II) ^a	10°C cell	90.27	64.62	28.42	43.59	51.71
Hg(II) ^a	30°C cell	82.77	62.28	24.76	57.81	30.16
Cd(II) ^b	EBP	40.05	18.50	53.81	22.40	44.07
Cd(II) ^b	10°C cell	21.00	11.64	44.57	13.50	35.71
Cd(II) ^b	30°C cell	16.50	9.70	41.21	11.80	28.48

^aHg(II) 초기농도 (C_i)는 93.8 mg/L
^bCd(II) 초기농도 (C_i)는 113.5 mg/L

[0074]

실시예 8: EBP의 WAXD 및 DSC분석

[0075]

[0076]

중금속-적재 EBP 시료를 비적재 대조구 시료와 함께 WAXD 분석 하였다 (도 9). 금속-프리 EBP는 크리

스탈린 (crystalline) 패턴을 보였으나, 모든 중금속-적재 시료는 선명한 결정 피크를 보이지 않고, 대신, 수은 결합은 $2\theta \sim 20^\circ$ 에서 강한 그러나 넓은 피크를 보이고, 카드뮴 결합은 $2\theta \sim 30^\circ$ 에 강한 추가 피크를 보였다. 따라서, 2 개의 명확히 다른 회절 패턴은 2가지 중금속에 별도로 유효한 결합 부위가 존재함을 나타낸다.

[0077] 어떤 물질이 열 민감한 구조적 변화를 가질 때 가열에 의해 열상 전이 (thermal phase transition)가 일어난다. 동결-건조된 금속-프리 대조구 EBP는 192°C (피크 온도) 에서 $\Delta H=83\text{ J/g}$ 의 강한 흡열 전이를 나타내었다 (도 10). EBP는 주로 폴리펩타이드로 구성되기 때문에 (표 1), 흡열 열전이 (endothermic thermal transition)는 EBP에서 풀딩된 구조의 파괴 때문이다. 수은 ($C_i=400\text{ mg/L}$) 및 카드뮴 ($C_i=800\text{ mg/L}$)-적재 EBP는 각각 $\Delta H=44$ 및 51 J/g 의 엔탈피 값으로 165°C 및 199°C (피크 온도)에서 전이를 보였다. 따라서, 수은 결합은 EBP의 엔탈피 수치 뿐만 아니라 주요 전이 온도를 감소시켰으며, 이는 금속 결합에 의한 구조적 변동을 의미하는 것이다. 반면, 카드뮴 결합은 전이온도에 있어서는 어떤 현저한 차이를 일으키지 않았으나 흡열 피크의 형태가 더 예리하게 변하였는데, 이는 카드뮴 적재 EBP가 수은 결합된 것보다 더 고도화된 구조를 가진다는 것을 의미한다. 이러한 열전이 프로파일은 WAXD 데이터와 잘 일치하였다. 결론적으로, FTIR, WAXD, 및 DSC 데이터는 K_d 수치에 근거하여 우리가 제시했던, “BM07 저온-유도 엑소폴리펩타이드에는 수은(II) 및 카드뮴(II)에 대한 별도 결합 부위가 존재한다” 는 사실을 증명한다.

[0078] **저온-유도 BM07 EBP의 독특한 구조 및 콜로이드 특성 (colloidal property)**

[0079] 미생물의 슬라임을 형성하는 대부분의 세포의 폴리머 물질 (주로 다당류)들은 많은 하이드록실기와 다양한 이온 하전된 기로 인하여 물가용성이다. 저온에서 과당을 함유하는 M1 최소 배지에서 분비된 BM07 EBP는 WAXD 크리스탈린 패턴뿐만 아니라 192°C 에서 강한 열전이를 보여줄 정도로 구조적으로 독특하다. EBP는 50 mol% 이상의 소수성 아미노산 잔기를 가지며, 너무 소수성이라서 물에서 불용성 콜로이드 현탁액을 형성한다. 따라서, 잘 분산된 콜로이드 특성은 물에 용해된 소수성 물질의 흡착에 유용하다. 특히, 중금속 결합후에, 금속-흡착된 EBP는 쉽게 침전되었다. 빠른 침전은 생명공학 및 경제적 면에서도 매우 유용한 특성이다.

[0080] **BM07 EBP에서 Hg(II) 및 Cd(II)의 결합 부위**

[0081] 정제된 동결건조된 EBP는 Hg(II) 및 Cd(II)에 대하여 우수한 흡착능을 보였다. 그러나 10°C 바이오매스는 30- 40 wt%의 EBP를 가지고 있음에도 불구하고, 10°C 바이오매스에 의한 Hg(II) 및 Cd(II)의 생체흡착능은 예상과 달리 전체 C_0 수치에 걸쳐 30°C 바이오매스 보다 많이 높지 않았다 (도 1, 2, 3, 및 4). 이것은 아마도 EBP가 최소의 처리 후에 동결건조 된 반면, 10°C 바이오매스는 121°C 에서 고압멸균되었기 때문일 것이다. 따라서 10°C 세포에 결합된 EBP는 정제된 EBP와는 다른 종류의 처리에 의해 본래의 고유한 구조를 잃어버렸다. 121°C 에서 고압멸균되거나 격하게 물-세척된 EBP 시료는 동결-건조된 EBP에서 관찰되는 DSC 열전이나 WAXD 피크를 보이지 않았다. 고압멸균 방법에 의해 유도되는 구조적 변화는 중금속 흡착에 불리하였다. 따라서, 다른 제조 과정에서 발생하는 BM07 EBP의 구조적 변화는 중금속 흡수능과 선택성에 영향을 줄 수 있다.

[0082] 30°C 바이오매스에 의한 카드뮴(II) 흡착을 제외하고는 모든 평형 생체흡착은 랭뮤어 모델과 우수하게 맞았고 ($r^2>0.95$), 이는 동일 단일-부위 결합이 존재함을 의미한다. 수은(II)는 카드뮴(II) 보다 EBP에 2.6 배 (물 비) 더 흡착되었다 (표 2). 중금속 흡착 시스템에서, BM07 엑소폴리펩타이드가 시스테인 잔기를 거의 가지지 않기 때문에 수은(II)- 또는 카드뮴(II)-설피드릴(sulfydryl) 반응은 배제되어야 한다 (표 1). 수은은 카드뮴보다 높은 연성 (softness) (편극도: polarizability)을 가진다. 단백질의 소수성 아미노산 잔기는 친수성 환경과 함께 소수성 캐비티 (cavity)를 형성하므로 분극성이 높은 금속이온은 소수성 부위 영역에 흡착될 수 있다. BM07 EBP에 대한 수은 (II)의 매우 낮은 b 수치는 수은과 소수성 엑소폴리펩타이드의 소수성 포켓간의 반데르발스/런던 상호작용 때문이다. 염화제2수은(Mercuric chloride)은 염화카드뮴 (cadmium chloride) 보다 알코올에서 높은 가용성을 가지나, 물에서는 반대이다. 이런 반대의 가용성은 소수성 EBP의 강화된 수은(II) 흡착을 지지한다. 수은(II)과 카드뮴(II) 사이의 현저한 연성차이는 BM07 EBP에서 상이한 결합 부위 존재를 나타낸다. 수은 결합에 의해 유발된 아미드 I 및 II 밴드의 이동은 수은(II)가 펩타이드-유닛 (아미드) 영역에 매우 근접하게 결합한다는 점을 명확하게 나타낸다. 그러나, 카드뮴(II)는 Cd^{2+} 이온 형태로 음으로 하전된 측-

쇄 기에 결합하는 것으로 추정되며, 이는 수은(II) 흡착 보다 카드뮴(II) 흡착의 현저한 감소를 초래하는 카르복실 기의 화학적 변형에 의해 증명된다 (표 3). 별도의 결합-부위 가정은 WAXD 및 DSC 분석으로 증명되었다. 수은(II) 와 카드뮴(II)의 별개 결합에 대한 유사한 관찰은 경쟁 흡착 실험을 이용한 바다 해조 바이오매스 (marine algal biomass)에서 최근 보고 되었다 (Herrero R et al. (2005) Water Res 39:3199-3210).

[0083] **추운-계절 중금속 생물적 환경정화의 저온세균의 유용성**

[0084] 분비된 폴리머 타입은 상이하지만, 남극 시 아이스 저온성 균주 (Antarctic sea ice psychrotrophic strain)에서 저온 유도에 의한 엑소폴리사카라이드의 높은 생산에 대한 비슷한 예가 최근 보고되었다 (Mancuso Nichols CA et al. (2005) Appl Environ Microbiol 71:3519-3523). 저온-유도 엑소폴리사카라이드는, 극단적 고염도와 저온이 미생물 생장과 생존에 압박이 되는, 시 아이스 (sea ice)의 염수 채널 (brine channels)에서 항냉동적 역할 (cryoprotective role)을 가지는 것으로 제안된다. BM07 균주도 저온에서 아마도 생존을 위해 과량의 엑소바이오폴리머를 생산하며 동시에 이러한 엑소바이오폴리머는 중금속, 특히 수은에 대해 극히 좋은 흡착능을 보여준다. 또한, 낮은 초기 수은(II) 농도와 낮은 온도에서 수은(II)의 유사한 흡착 반응이 관찰되었다. 대부분의 박테리아는 중온성균이고 겨울에 상대적으로 불활성이기 때문에, BM07과 같은 저온세균은 EBP를 분비하면서 상대적으로 활성을 유지하며 효율적인 수은(II) 제거를 할 수 있다.

산업이용 가능성

[0085] 중금속에 대하여 우수한 흡착활성능을 가지는 본 발명의 조성물은, 생분해되고 생물독성이 없는 환경친화적인 생체흡착제로서, 다양한 환경 산업 분야에서 중금속 제거에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0086] 도 1은 70 mM 과당-함유 M1 최소 배지에서 성장하는 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 엑소바이오폴리머 합성 및 세포 생장의 생장온도-의존적 시간별 프로파일을 보여준다: (a) 30 °C; (b) 10 °C

[0087] 도 2는 배양 배지에서 분리한 저온-유도 BM07 엑소바이오폴리머의 형태적 특징을 보여준다. (a)는 10 °C M1 배지에서 성장한 슈도모나스 플루오르센스 BM07에 의해 분비된 EBP의 (물에서의) 콜로이드 현탁액을 보여주고 (하부 플라스크), 반면, 30 °C에서 성장한 세포는 적은 양의 엑소바이오폴리머를 분비하였다 (상부 플라스크). (b)는 M1 뮤코이드 층-함유 분획의 원심분리 동안에 형성된 저온-유도 슈도모나스 플루오르센스 BM07 섬유의 전자 현미경 결과를 보여준다.

[0088] 도 3은 10 °C 및 30 °C의 M1 최소 배지에서 성장한 슈도모나스 플루오르센스 BM07의 엑소바이오폴리머 (EBP)와 비생물 세포에 의한 수은(II) 및 카드뮴(II)의 특이적/평형 흡착 (Q_{eq}) 에 대한 pH의 효과를 나타낸다 (Hg(II)의 경우 C_i -240 mg L⁻¹, Cd(II)의 경우 46 mg L⁻¹, 및 바이오매스의 경우 0.33 mg/mL; 온도, 30 °C)

[0089] 도 4는 10 °C 및 30 °C에서 성장한 저온 유도된 엑소바이오폴리머 (EBP)와 비생물 BM07 세포의 수은(II) 및 카드뮴(II)의 생체흡착 등온식을 나타낸다. (C_i -생체흡착제에 대하여 0.33 mg/ml; 온도, 30 °C; Q_{eq} -특이적 흡착, C_{eq} -금속의 평형 농도).

[0090] 도 5는 30 °C (a) 및 10 °C (b)에서 성장하는 비생물 BM07 세포에 의한 수은(II) 흡착의 에너지 분산 X-레이 분석 결과이다. 하부 데이터는 수은-적재 시료에 대한 것이다. 수은 흡착을 위하여 바이오매스 시료는 Hg(II)의 경우 C_i -824.5 mg/L, 바이오매스의 경우 0.33 mg/mL의 조건에서 30 °C에서 배양하였다. 30 °C 및 10 °C에 대한 Q_{eq} 는 각각 324.8 및 490.8 mg/g (건조 바이오매스) 로 계산되었다.

[0091] 도 6은 30 °C (a) 및 10 °C (b)에서 성장한 비생물 BM07 세포에 의한 카드뮴(II) 흡착의 에너지 분산형 X-레이 (Energy dispersive X-ray) 분석 결과이다. 하부 데이터는 카드뮴(II)-적재 시료에 대한 결과이다. 카드뮴(II) 흡착에 대한 바이오매스 시료는 Cd²⁺에 대하여 C_i -448.80 mg/L, 바이오매스에 대하여 0.33 mg/mL 조건으로 30 °C에서 배양하였다. Q_{eq} 는 30 °C 및 10 °C에 대하여 각각 23.40 및 35.1 mg/g으로 계산되었다.

[0092]

도 7은 저온-유도 BM07 엑소바이오폴리머에 의한 수은(II) 및 카드뮴(II) 흡착의 FTIR 분석 결과이다. 상부 스펙트럼은 카드뮴(II)-적재 시료에 대한 것이고, 중간 스펙트럼은 수은 적재된 시료에 대한 것이며 하부는 금속-적재되지 않은 시료(대조구)에 대한 것이다. $1,745\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 흡착은 상대적 이동(relative shift)에 대한 대조구 피크로 사용되었으며, 이는 세포에서 폴리하이드록시알카노익산과 관련된 것으로 밝혀졌다. 박스는 $2,000$ 에서 $1,000\text{ cm}^{-1}$ 파수 사이를 확장시켜 보여주는 것이다.

[0093]

도 8은 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) 및 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) BM07 세포 바이오매스에 의한 수은(II) 및 카드뮴(II) 흡착의 FTIR 분석 결과이다.

[0094]

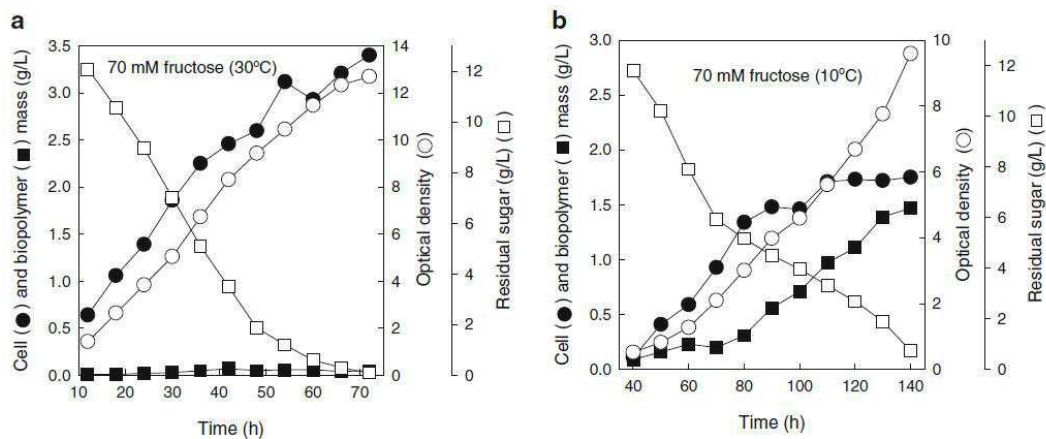
도 9는 동결건조 BM07 엑소바이오폴리머 시료의 광각 X-선 회절 (wide angle X-ray diffraction) 프로파일을 나타낸다. 표시된 초기 농도에서 상부 곡선은 금속-적재되지 않은 EBP에 대한 것이고 하부 4개 곡선은 금속-적재 EBP에 대한 것이다.

[0095]

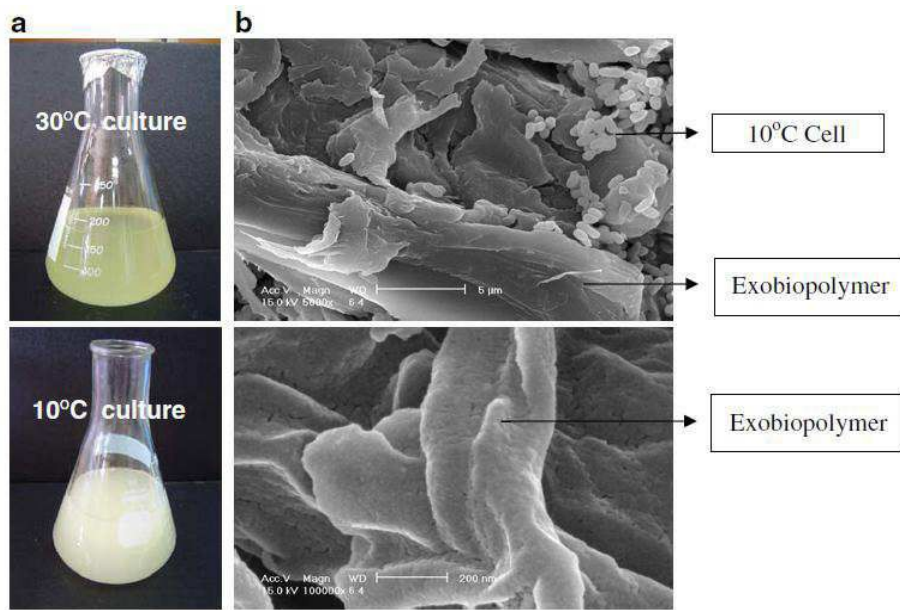
도 10은 금속-적재되지 않은 (대조구) 엑소바이오폴리머 및 수은(II)(중간)- 및 카드뮴(II)(하부)-적재 EBP 시료에 대한 시차주사열량분석 (differential scanning calorimetric analyse) 결과이다. T_m 은 주요 흡열전이의 피크 온도이다.

도면

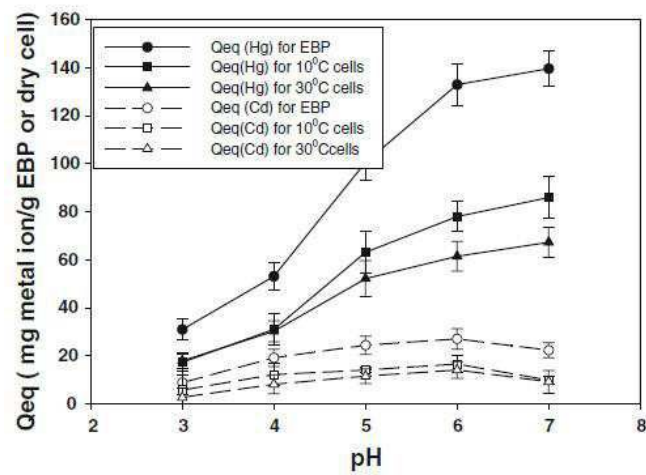
도면1



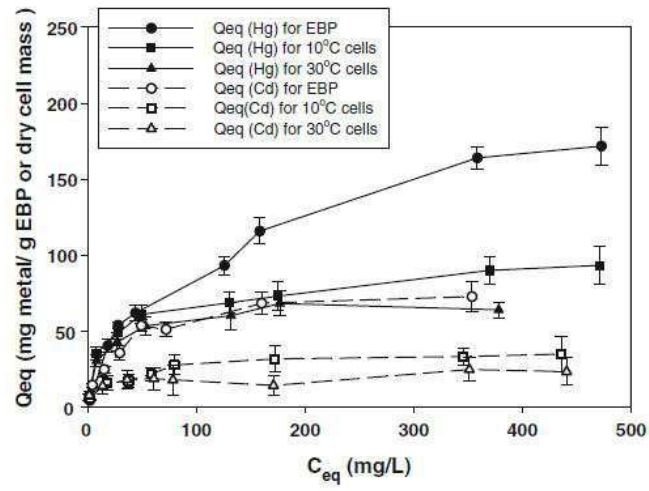
도면2



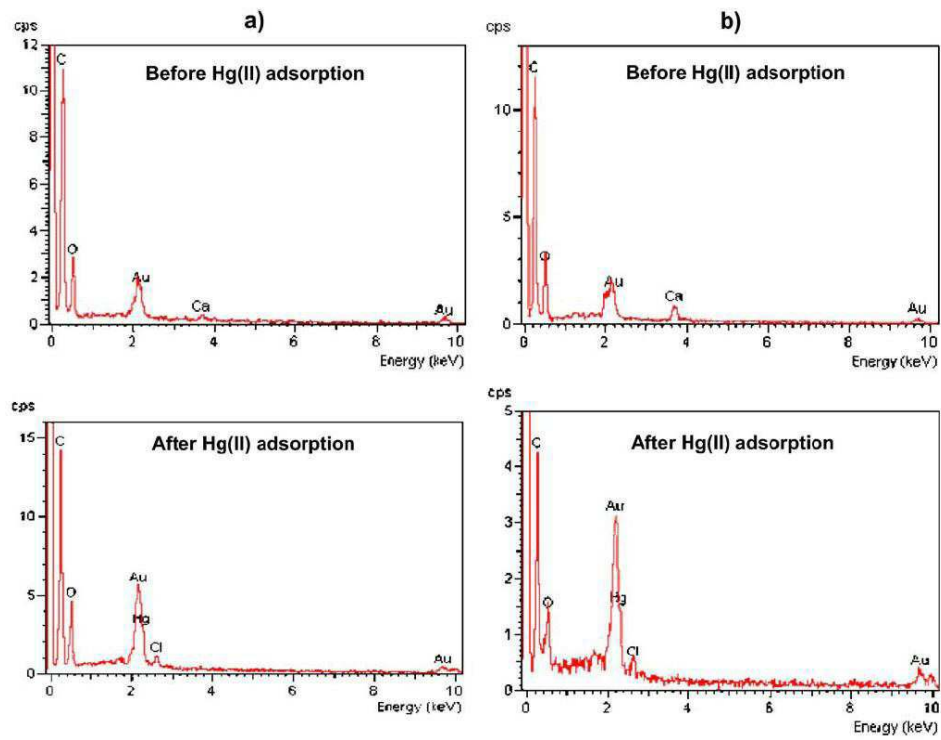
도면3



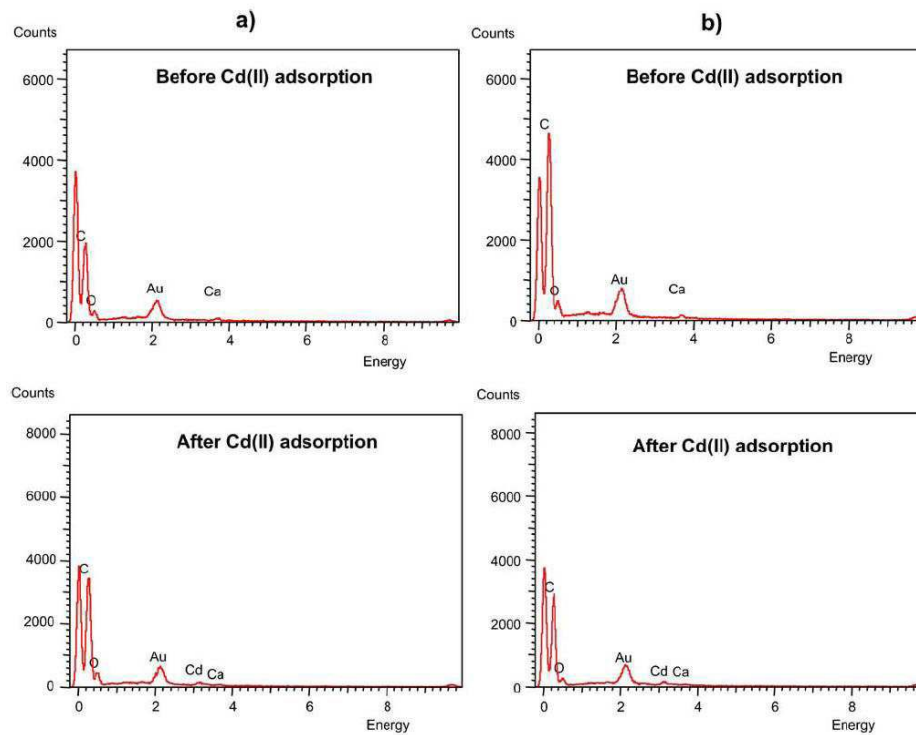
도면4



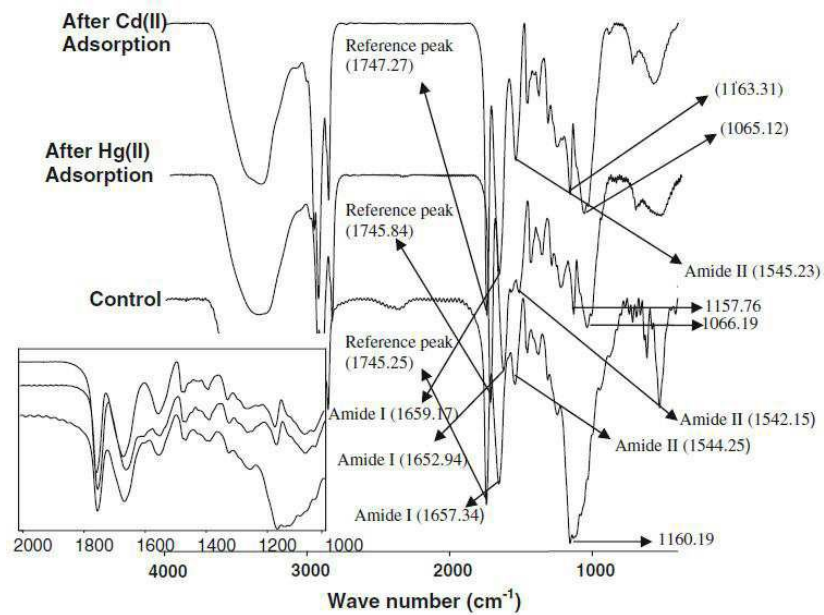
도면5



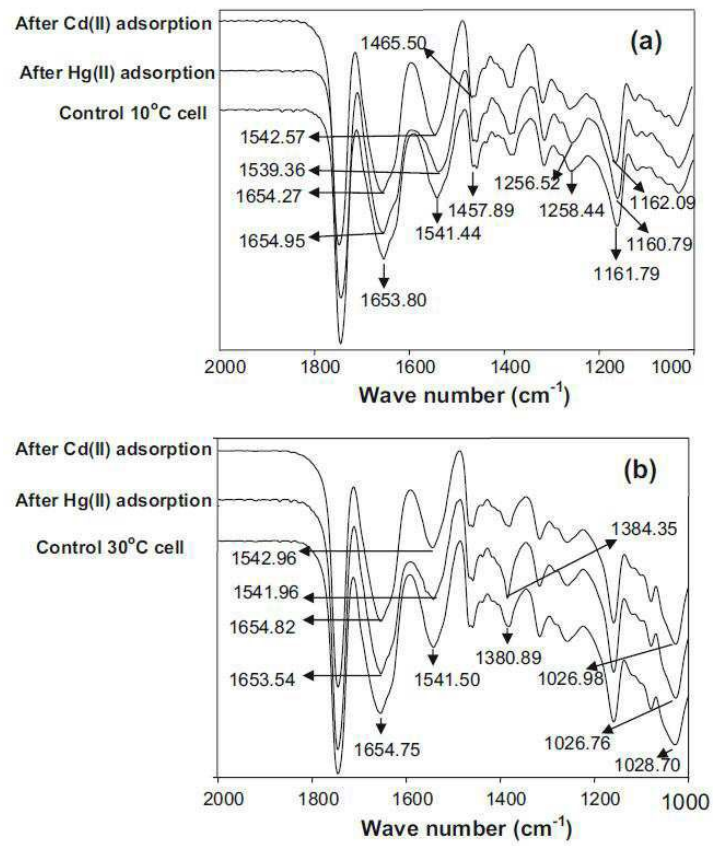
도면6



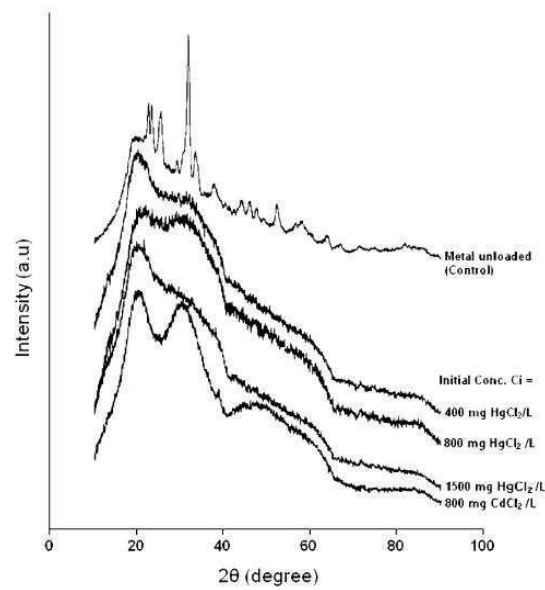
도면7



도면8



도면9



도면10

