

Metallothionein 유전자가 도입된 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 생육과 금속제거에 대한 특성

정 동 환 · 김 대 옥 · †서 진 호

서울대학교 식품공학과 · 농업생물신소재연구센터

Characteristics of Growth and Metal Removal in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harboring a Metallothionein Gene

Dong-Hwan Chung, Dae-Ok Kim and Jin-Ho Seo[†]

Department of Food Science & Technology and Research Center for New Biomaterials in Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT

The effect of metallothionein expression on the metal resistance and removal by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing the plasmid pJW9 was investigated. The recombinant strain *S. cerevisiae* BZ-pJ was constructed by transforming the host strain *S. cerevisiae* BZ31-1-7Ba with the gene coding for a metal-binding protein, metallothionein. Introduction of the MT gene yielded an increase in the minimum inhibitory concentration(MIC) of copper more than three times compared with the host strain. The minimum inhibitory concentrations of Cr^{2+} , Zn^{2+} , and Pb^{2+} were not different for the two strains. The recombinant yeast grown in a medium containing 8mM CuSO_4 was able to remove copper with a capacity of 18.9mg Cu^{+2} /g dry cell. In a mixture of copper and zinc, the presence of copper relieved the toxic effects caused by zinc, resulting in an enhancement of the final cell density and the specific growth rate of the recombinant yeast. The capability to remove copper by the recombinant yeast was linearly proportional to the copper concentrations in the medium. The efficiency of copper removal was rather constant regardless of the initial copper concentrations. The specific removal of zinc was dependent on the zinc concentrations in media, though, and such a dependence was not so pronounced as the concentration of copper.

서 론

중금속을 제거 또는 회수하기 위하여 화학침전법, 응집, 이온교환, 착염화, 여과 막분리 등의 여러 기술들이 개발되었으나 효율증대와 비용감소를 위해 잠재력이 큰 생물공학적인 중금속 처리기술이 개발되기

시작하였다(1, 2). 곰팡이, 효모, 세균, 조류 등 다양한 미생물의 균체(dead biomass 또는 living cell)가 중금속의 생물공학적 처리기술을 위해 이용되고 있다. 이 중 효모와 곰팡이에 의한 금속축적은 대사과정과 무관한 세포벽에 의한 표면흡착(metabolism-independent surface binding)과 대사과정과 연결된 금속의 유입(metabolism-dependent intracellular

† Corresponding Author

accumulation)의 두가지 경로에 의해 이루어진다. 흡착작용은 속도가 빠르며, 세포벽에는 ligand로서 phosphate, carboxyl, amine, hydroxyl, sulfhydryl group과 chitin, chitosan, melanin 등과 그 외의 색소성분이 있어 금속흡착에 관여한다(3, 4, 5). 온도, pH, 다른 양·음이온이나 유기물질의 존재가 표면흡착에 영향을 미치기도 한다(6). Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} 의 흡착은 곰팡이 포자의 결합부위에서 Cu^{2+} 와 경쟁관계에 있으며 *Saccharomyces cerevisiae*의 경우 Ca^{2+} 에 의해, *Rhizopus arrhizus*의 경우는 Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} 에 의하여 우라늄의 흡착이 저해된다고 보고되었다(3, 4). 세포내로의 유입기작은 표면흡착보다 속도가 느리나 더 많은 양의 금속을 축적할 수 있으며 이 현상은 저온, 포도당 유사물질들, 대사저해물질, uncoupler 등에 의해 저해 받는다(5, 6, 7). 효모와 곰팡이에서는 Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} 의 세포내 유입이 알려져 있고, 이 현상은 saturation kinetics를 따른다. 금속 유입 후의 electroneutrality는 K^{+} 방출에 의해 유지된다고 여겨지며, 정확한 기작은 알려지지 않았으나 2가 금속의 유입에는 membrane potential이 구동력 역할을 하는 것으로 여겨진다(5, 7, 9).

금속은 세포내부로 들어간 후 vacuole 안에 축적되거나(10) vacuole이 없을 경우 cytoplasmic granule 형태로 되거나 metallothionein 단백질과 결합하여 존재하게 된다. 금속결합단백질인 metallothionein(MT)은 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 등과 결합하여 제독, 저장, 세포내 금속이온농도의 조절 등의 역할을 수행한다(11). 효모의 MT 단백질은 효모의 chromosome VIII의 *CUP1* locus에서 발견되며, 분자량은 5,655 daltons이다. 53개의 아미노산으로 구성되어 있고 12개의 cysteine을 포함하며 mole당 8mole의 Cu^{2+} 와 thiolate cluster 형태로 결합한다(12). 단백질분해효소에 매우 약한 것으로 보아 MT 단백질은 3차구조가 없는 것으로 여겨지며, Cu^{2+} 에 의해서만 유도되어 생성되나 생성된 단백질은 Cu^{2+} 외에 Ag^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 등과도 결합하며 결합하는 금속에 따라 단백질의 conformation이 달라진다. *S. cerevisiae*로 유입된 Cu^{2+} 는 먼저 *CUP2* 단백질에 의해 인지되고, *CUP2* 단백질은 DNA와 결합하여 *CUP1* 유전자를 발현시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(13, 14).

본 논문에서는 metallothionein 단백질의 유전자를 가진 plasmid pJW9로 형질전환된 *S. cerevisiae*

를 사용하여 고농도 금속 함유배지에서 재조합 효모의 생육 특성과 Cu^{2+} 및 Zn^{2+} 에 대한 중금속 제거 특성에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

균주

숙주효모로 *S. cerevisiae* BZ31-1-7Ba(*cup^s*, *trp1-289*, *ura3-52*, *ade8-18*, *arg4-16*)을 사용하였으며 *CUP1* 유전자를 함유한 plasmid pJW9로 형질전환된 재조합 효모를 *S. cerevisiae* BZ-pJ로 명명하였다(15). 사용한 숙주효모와 plasmid pJW9 그리고 염색체에 *CUP1* 유전자가 삽입된 *S. cerevisiae* YJW9은 미국의 Welch 박사(University of California, Berkeley)로부터 기증받은 것이다.

배지

YEPD배지(yeast extract 1%, bactopectone 2%, 포도당 2%)에 여러 농도의 금속염을 첨가하여 사용하였다. 금속과 chelation작용이 약하여 금속을 함유한 배지에서 buffer로 주로 사용되는 MES(2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)로 초기 pH를 5.2로 맞추어 pH 상승에 의한 금속의 침전을 방지하였다. 배양용 배지에 사용된 중금속은 $CuSO_4$ 와 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 이었으며, 최소성장저해농도 측정에 사용된 중금속은 $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 그리고 $Pb(NO_3)_2$ 이었다.

균체배양

포도당은 아미노산과 고온에서 Maillard 반응을 하고 살균시 MES의 일부를 분해시키는 작용을 하며, 많은 금속들도 고온에서 반응성이 증가하므로 각각 다른 배지성분과 분리하여 살균하였다. 500ml baffled flask에 150ml의 배양액을 만들어 초기 pH 5.2, 온도 30°C, 교반속도 200rpm의 조건하에서 shaking incubator를 이용하여 균체배양실험을 하였다. 비교실험의 경우 최종균체농도를 일정하게 하였고 배양중 주기적으로 배양액을 채취한 후 회석하여 spectrophotometer(Hitachi U1100)로 600nm에서 균체농도를 측정하였다. 건조균체량은 흡광도 0.1~0.5사이에 해당하는 세포 배양액을 채취하여 진공 여과(poresize : 0.45 μ m)하여 105°C oven에서 5시간 건조 후 desiccator에서 냉각 시킨 다음 무게를 측정하였다. 흡광도 1.0에 해당하는 건조균체

량은 0.19g/ℓ 이었다(16).

당 농도 측정

포도당 농도는 glucose oxidase와 peroxidase를 이용한 Glucose kit No. 510-A로 측정하였다 (Sigma Chemical Co. USA). Galactose와 mannose는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 이용하여 측정하였다(17).

최소성장저해농도 (Minimum inhibitory concentration)

Agar 2%, MES 0.96%를 포함하는 YEPD 혼합배지에 Pb(NO₃)₂, Cd(NO₃)₂·4H₂O, Cr(NO₃)₃·9H₂O, Zn(NO₃)₂·6H₂O를 넣어 농도를 달리한 후 20ml 씩을 petridish에 붓고 굳혔다. 각 petridish에 수주효모, 재조합효모, 염색체에 plasmid가 삽입된 효모를 도말한 후 30℃ 항온기에서 48시간 배양한 후 생성되는 colony 유무로 최소성장저해농도를 측정하였다 (16, 18).

금속농도 측정

배양액을 5,000~8,000rpm에서 5-6분간 원심분리한 후 상등액을 금속농도 측정에 사용하였다. 배지중의 유기물 성분이 금속원자의 원자화를 저해하는 것을 방지하기 위하여 원심분리한 배양액에 HNO₃(1+1)를 첨가한 후 98℃ oven에서 유기물을 분해하면서 증발시켰다. 동일한 과정을 두번 수행하여 최대한 유기물을 분해한 후 HCl(1+1)로 잔류물을 녹여 atomic absorption spectrophotometer (Pye Unicam SP9 Series)를 이용하여 금속농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

Plasmid pJW9을 가진 재조합효모를 8mM CuSO₄가 함유된 배지에서 배양하였다(Fig. 1). 대수증식기에서 세포는 빠른 속도로 Cu²⁺를 제거하여 독성을 줄이면서 활발한 성장을 보였다. 포도당 농도의 변화도 Cu²⁺ 농도의 변화와 비슷한 양상을 보였다. 포도당은 MT 유전자 전사시 repressor 작용을 하며, galactose 경우에는 MT 유전자 전사가 derepression되어 MT 단백질의 발현이 촉진된다고 보고하였다(19). 탄소원의 종류에 따른 세포 생육과

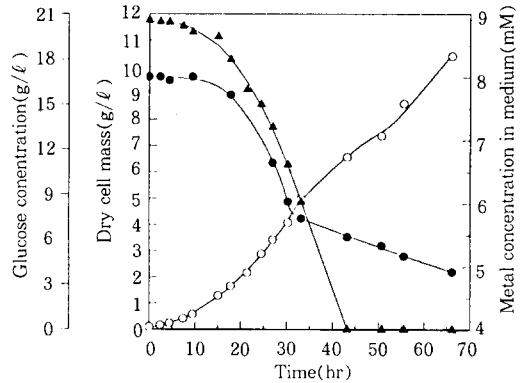


Fig. 1. Growth and copper removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in 8mM Cu²⁺ medium with glucose as a carbon source (○: dry cell mass, ●: copper concentration in the medium, ▲: glucose concentration).

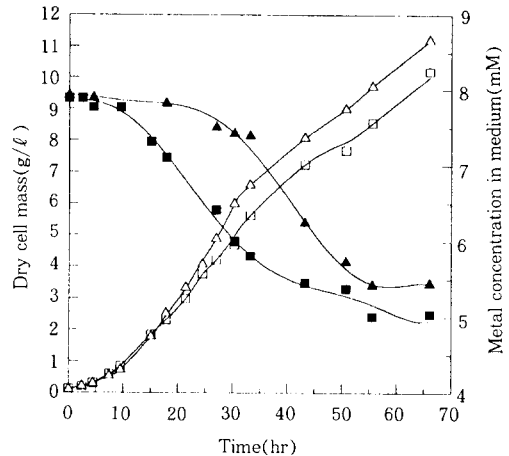


Fig. 2. Growth and copper removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in 8mM Cu²⁺ medium with various carbon sources(dry cell mass for galactose(△), and mannose (□). Copper concentration in the medium for galactose(▲), and mannose(■)).

구리제거효율을 살펴보기 위하여 포도당, galactose, mannose(모두 6탄당)를 함유한 배지에서 재조합효모를 배양·비교하였다(Fig. 2). 각 탄소원에서 최종 균체농도, 중금속제거능력 및 비성장속도를 Table 1에 정리하였다. 포도당을 탄소원으로 이용한

Table 1. Growth and copper removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in 8mM Cu²⁺ medium with different carbon sources.

Carbon sources	Glucose	Galactose	Mannose
Final cell density (g/ℓ)	10.4	11.2	10.2
Specific Cu ²⁺ removal (mg Cu ²⁺ /g dry cell)	18.9	14.2	17.9
Specific growth rate (hr ⁻¹)	0.15	0.16	0.17

경우, 최종균체농도는 10.4g/ℓ, 균체 g당 Cu²⁺ 흡착량이 18.9mg Cu²⁺/g dry cell이 이었다. 본격적인 Cu²⁺ 흡착(배지 중 Cu²⁺ 제거)은 배양 21시간 이후에 이루어졌다(Fig. 1, 2). 배양시간 18시간에서 30시간 사이에 총균체농도는 23%만이 증가하였으나 이 과정에서 전체 Cu²⁺ 제거량의 54%가 제거되었다. 30시간 경과후 Cu²⁺ 흡착속도는 현저하게 떨어지나 세포성장은 계속 활발하게 유지되는데 이는 Cu²⁺에 의한 독성이 생성된 MT 단백질에 의해 제독되어 세포성장에 영향을 미치지 못하기 때문이라 생각된다. 재조합효모의 생육을 저해하는 구리농도는 3mM 이상이었으며, 그 이하의 농도에서는 세포 생육의 저해 효과는 없었다(16). 대수증식기에서 측정된 비성장속도는 0.15hr⁻¹이었다.

Galactose 배지의 경우 배양 33시간까지 주로 세포성장만 일어나고 Cu²⁺의 흡착은 거의 없었다(Fig. 2). 본격적인 Cu²⁺ 흡착은 배양시간 33시간에서 56시간사이에서 일어났으며, 이 기간동안 균체농도는 28%만이 증가하였으나, Cu²⁺ 흡착은 79%가 이루어졌다. 대수증식기에서의 비성장속도는 0.16 hr⁻¹으로 오히려 포도당 배지보다 증가하였다. 최종균체농도는 11.2g/ℓ로 포도당 배지보다 8% 향상되었으나, 균체 g당 Cu²⁺ 흡착량은 14.2mg Cu²⁺/g dry cell로 포도당배지의 흡착량 75%에 불과하였다.

Mannose에서 배양한 경우, 최종균체농도(10.2 g/ℓ)와 Cu²⁺ 흡착량 (17.9mg Cu²⁺/g dry cell)은 포도당 배지와 차이가 없으나, Cu²⁺ 흡착 현상이 일찍 시작되어 배양 9시간 이후부터 30시간까지 Cu²⁺ 흡착이 활성화되었다.

Rhizopus arrhizus(20), *Aureobasidium pullulans* (21) 그리고 *Staphylococcus epidermis*(22)의

Table 2. Minimum Inhibitory Concentrations for different metals.

	Host Cell	Chromosome integrated Cell	Recombinant Cell with plasmid pJW9
Cu ²⁺	4	10	13
Cd ²⁺	>2.1	0.3	0.6
Cr ²⁺	14	10	10
Zn ²⁺	6	6	6
Pb ²⁺	10	8	8

Cu²⁺ 흡착량이 각각 16, 6.4, 4.93mg Cu²⁺/g dry cell인 것과 비교해 보면 재조합 효모의 Cu²⁺ 흡착능력이 다른 균주보다 뛰어나다는 걸 알 수 있다.

결론적으로 galactose는 재조합효모의 생육면에서는 유리한 탄소원이었으나 Cu²⁺ 흡착량 및 효율면에서는 포도당이 우수한 탄소원이었다.

최소성장저해농도의 결정

MT 단백질의 발현이 증금속 내성에 얼마나 기여하는지를 알아보기 위하여 숙주효모(*S. cerevisiae* BZ31-1-7Ba), 재조합효모(*S. cerevisiae* BZ-pJ), 염색체에 plasmid가 삽입된 효모(*S. cerevisiae* YJW9)를 Cd²⁺, Cr²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ 등이 함유된 plate에서 키워 최소성장저해농도를 결정하였다(Table 2). MT의 발현으로 재조합균주의 Cu²⁺에 대한 내성은 13mM로 숙주세포의 4mM보다 3배 이상 향상되었다. Cd²⁺와 Cr²⁺에 대한 내성은 숙주세포가 오히려 좋았으며, 재조합균주의 경우 현저하게 감소하였다. Zn²⁺과 Pb²⁺에 대한 내성은 숙주세포와 재조합균주 모두 차이가 없었다. MT 유전자가 Cu²⁺에 의해 발현이 되므로, Cu-MT 유전자를 다량 가진 재조합효모의 Cu²⁺내성이 숙주세포보다 증가되었다. 그러나 MT 유전자는 다른 금속에 의해 발현이 되지 않기 때문에 MT유전자와 Zn²⁺과 Pb²⁺에 대한 금속내성증가와와는 무관한 것으로 판명되었다. 그러나 재조합균주의 Cd²⁺과 Cr²⁺에 대한 내성이 숙주세포의 내성보다 감소한 이유는 불분명하다.

Cu²⁺ 농도의 영향

Zn²⁺의 초기 농도를 1mM로 고정된 후 Cu²⁺의 농도를 0~3mM로 변화시키며 재조합효모의 생육과 금속제거능력을 측정하였다. 탄소원으로 포도당을 사용하였다. Cu²⁺가 첨가된 배지에서는 lag time의 차이를 제외하고는 성장형태의 차이가 없었다(Fig.3, 4)

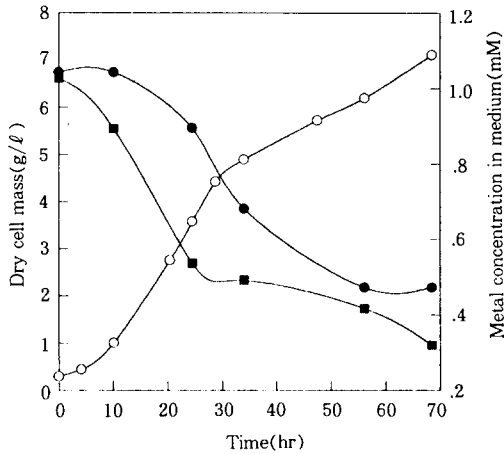


Fig. 3. Growth and removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in a mixture of 1mM Cu²⁺ and 1mM Zn²⁺ (○:dry cell mass, concentrations of Cu²⁺(●) and Zn²⁺(■)).

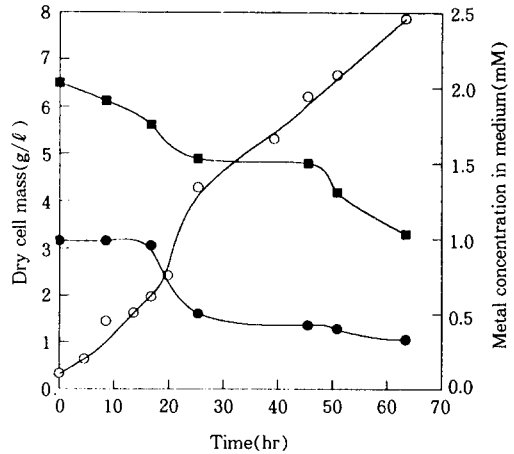


Fig. 5. Growth and metal removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in a mixture of 1mM Cu²⁺ and 2mM Zn²⁺ (○:dry cell mass, concentrations of Cu²⁺(●) and Zn²⁺(■)).

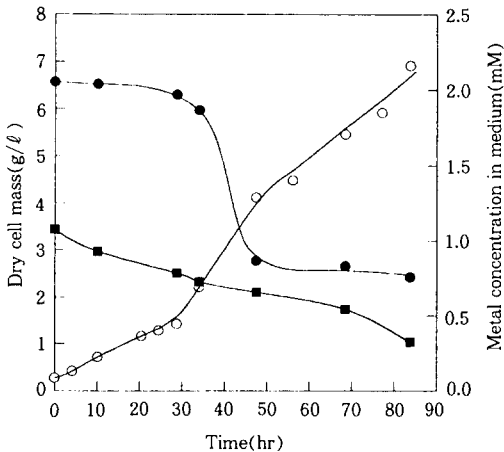


Fig. 4. Growth and metal removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in a mixture of 2mM Cu²⁺ and 1mM Zn²⁺ (○:dry cell mass, concentrations of Cu²⁺(●) and Zn²⁺(■)).

Table 3. Growth and metal removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in Zn²⁺ (1mM) media with different concentrations of Cu²⁺

	Zn ²⁺ 1mM + Cu ²⁺ 0mM	Zn ²⁺ 1mM + Cu ²⁺ 1mM	Zn ²⁺ 1mM + Cu ²⁺ 2mM	Zn ²⁺ 1mM + Cu ²⁺ 3mM
Final cell density (g/l)	4.9	7.1	6.9	6.8
Specific Zn ²⁺ removal (mg Zn ²⁺ /g dry cell)	13.3	6.5	7.1	6.8
Specific Cu ²⁺ removal (mg Cu ²⁺ /g dry cell)	N.A	5.1	11.9	15.8

N.A: not available

Zn²⁺와 Cu²⁺가 혼합된 배지에서 Zn²⁺은 발효초기부터 제거되었으며 Cu²⁺는 Fig. 1에서 관찰된 경향과 비슷하게 대수증식기에서 주로 제거되었다. Zn²⁺만 존재하는 배지에서는 재조합효모의 최종균체농도는 4.9g/ℓ에 불과하였으나 Zn²⁺ 제거능력은

13.3mg Zn²⁺/g dry cell이었다. 그러나 Cu²⁺가 존재하면 Zn²⁺ 제거량은 오히려 6.8mg Zn²⁺/g dry cell로 Zn²⁺만 있는 배지의 약 50%에 불과했다 (Table 3). Zn²⁺ 제거능력이 Cu²⁺ 첨가에 따라 감소되는 이유는 분명하지 않으나 Cu²⁺와 Zn²⁺이 세포 내 물질과 경쟁적으로 결합하기 때문인 것으로 생각된다. Cu²⁺ 1mM과 Zn²⁺ 1mM 혼합배지에서의 전

Table 4. Growth and metal removal of recombinant *S. cerevisiae* BZ-pJ grown in the Cu^{2+} (1mM) media with different concentrations of Zn^{2+}

	Cu^{2+} 1mM + Zn^{2+} 0mM	Cu^{2+} 1mM + Zn^{2+} 1mM	Cu^{2+} 1mM + Zn^{2+} 2mM
Final cell density (g/l)	6.8	7.1	7.9
Specific Zn^{2+} removal (mg Zn^{2+} /g dry cell)	N.A	6.5	8.3
Specific Cu^{2+} removal (mg Cu^{2+} /g dry cell)	1.2	5.1	5.3

N.A :not available

체금속제거량은 11.6mg ($\text{Zn}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$)/g dry cell로 Zn^{2+} 만 존재하는 배지에서 제거량인 13.3mg Zn^{2+} /g dry cell과 비슷한 값을 나타내었다. 재미있는 현상은 Cu^{2+} 제거량이 배지의 Cu^{2+} 농도에 비례한다는 것이다. Cu^{2+} 의 농도가 2배, 3배 증가할 때 균체 g당 Cu^{2+} 제거량도 각각 2.3배, 3.1배 증가하였다. 이러한 경향은 Cu^{2+} 만 존재하는 배지에서의 Cu^{2+} 제거량의 실험 결과와도 일치하는 것이었다(16). 그러나 Cu^{2+} 제거율은 Cu^{2+} 농도에 관계없이 거의 일정한 값인 57%이었으며, Zn^{2+} 제거량도 별 차이가 없었다.

Zn^{2+} 농도의 영향

Cu^{2+} 의 농도를 1mM로 일정하게 하고 Zn^{2+} 의 농도를 0~3mM로 변화시키면서 재조합효모의 생육과 금속제거능력을 살펴보았다. Zn^{2+} 3mM이 함유된 실험구에서는 성장이 일어나지 못하였으나 Zn^{2+} 2mM에서는 성장을 보여주었다(Fig. 5). 이는 재조합효모의 생육에 Zn^{2+} 의 독성이 Cu^{2+} 의 독성보다 더 강하게 작용한다는 것을 보여준다. Table 2에 나타난 Zn^{2+} 의 최소성장저해농도는 6mM 이었으나 액체배지에서는 3mM 미만이었다. 이러한 최소성장저해농도의 차이는 미생물의 환경조건이 다르기 때문인 것으로 여겨진다. Table 4에서 알 수 있듯이 Zn^{2+} 의 농도가 2배 증가해도 균체 g당 Zn^{2+} 제거량은 1.2배만 증가하였다. Cu^{2+} 의 제거량은 배지중 농도가 일정하게 1mM로 유지되었기 때문에 Zn^{2+} 농도와는 무관하게 비슷한 값을 나타내었다. Cu^{2+} 1mM만 함유된 배지에 Zn^{2+} 이 첨가되면서 Cu^{2+} 의 흡착량이 4.3배 정도 증가한 것은 Zn^{2+} 첨가에 의한 증금

속 독성 강화로 부터 세포를 보호하기 위해 세포가 더 많은 금속을 제거했기 때문인 것으로 생각된다. Zn^{2+} 의 농도가 1mM에서 2mM로 증가하면서 전체 금속흡착량이 11.6mg ($\text{Zn}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$)/g dry cell에서 13.6mg ($\text{Zn}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$)/g dry cell로 증가하나 그 차이가 2.0mg ($\text{Zn}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$)/g dry cell에 불과하므로 금속흡착능력은 Zn^{2+} 농도 변화보다는 Cu^{2+} 농도에 더 민감하게 의존하였다.

요 약

금속결합 단백질인 metallothionein(MT) 유전자의 발현이 효모의 증금속 내성과 제거 특성에 미치는 영향을 살펴보았다. MT유전자로 형질전환된 재조합 효모는 숙주세포에 비해서 Cu^{2+} 내성이 3배 이상 증가하였으나, Cr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} 에 대한 내성은 숙주세포와 별 차이가 없었다. 재조합효모는 8mM CuSO_4 를 함유하며 포도당을 탄소원으로 한 배지에서 18.9mg Cu^{2+} /g dry cell로 Cu^{2+} 를 제거하였다. Cu^{2+} 와 Zn^{2+} 의 혼합배지에서 Cu^{2+} 가 존재함으로써 Zn^{2+} 이 효모에 미치는 독성을 완하시켜 효모의 생육 속도와 최종균체농도를 증가시켰다. 재조합효모의 Cu^{2+} 제거량은 배지중 Cu^{2+} 농도에 비례하였다. Cu^{2+} 농도가 2배, 3배 증가할 때 균체 g당 Cu^{2+} 제거량은 각각 2.3배, 3.1배 증가하였다. 그러나 Cu^{2+} 제거율은 Cu^{2+} 농도와 무관하게 거의 일정한 값인 57%를 보였다. Zn^{2+} 제거량은 Zn^{2+} 농도에 비례하나 증가율은 Cu^{2+} 에 비하여 매우 낮았다.

감 사

본 연구는 교육부 학술연구조성연구비(유전공학)에 의해 수행되었으며 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

1. 유영제, 최석순, 전영웅(1993), *생물공학*, **7**, 92.
2. 안대희, 정윤철(1993), *한국생물공학회지*, **8**, 336.
3. M. Tsezos(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 385.
4. M. Tsezos(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2025.
5. J. L. Mowll and G. M. Gadd(1984), *J. Gen.*

- Microbiol.*, **130**, 279.
6. G. M. Gadd and A. J. Griffiths(1978), *Microbial. Ecol.*, **4**, 303.
 7. J. L. Mowll and G. M. Gadd(1983), *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 3421.
 8. G. M. Gadd and J. L. Mowll(1985), *Exp. Mycol.*, **9**, 230.
 9. L. P. Lichko, L. A. Okorokov and I. S. Kulaev(1980), *J. Bacteriol.*, **144**, 666.
 10. L. A. Okorokov, L. P. Lichko and I. S. Kulaev(1980), *J. Bacteriol.*, **144**, 661.
 11. N. T. Christie and M. Costa(1984), *Biol. Trace Element Res.*, **6**, 139.
 12. D. H. Hamer, D. J. Thiele and J. E. Lemontt (1985), *Science*, **228**, 685.
 13. J. Welch, S. Fogel, C. Buchman and M. Karin (1989), *The EMBO Journal*, **8**, 255.
 14. H. Tohyama, M. Inouhe and M. Joho(1990), *Cur. Genet.*, **18**, 181.
 15. S. Fogel and J. W. Welch(1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5342
 16. N. S. Han, J. H. Seo and Y. C. Chung(1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 7.
 17. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **13**, 426.
 18. D. J. Ecker, T. R. Butt and E. J. Sternberg (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 16895.
 19. T. R. Butt and D. J. Ecker(1987), *Microbiological Reviews*, **52**, 351.
 20. J. M. Tobin, D. G. Cooper and R. J. Neufeld (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 125.
 21. G. M. Gadd and A. J. Griffiths(1978), *Microbio Lett.*, **6**, 117.
 22. 조수연, 김달남(1994), *Kor. J. Microbiol.*, **32**, 387.