

Research Article

중금속 흡착능 유산균 분리

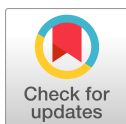
김자이 · 김선규 · 문기성*

한국교통대학교 생명공학전공

Isolation of Heavy Metal Scavenging Lactic Acid Bacteria

Ja-I Kim, Seon-Gyu Kim and Gi-Seong Moon

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea



Received: Jun 13, 2019

Revised: Jun 24, 2019

Accepted: Jun 24, 2019

*Corresponding author :

Gi-Seong Moon

Department of Biotechnology,

Korea National University of

Transportation, Jeungpyeong

27909, Korea.

Tel: +82-43-820-5251,

E-mail: gsmoon@ut.ac.kr

ORCID

Ja-I Kim

<https://orcid.org/0000-0002-9427-9211>

Seon-Gyu Kim

<https://orcid.org/0000-0003-0802-7788>

Gi-Seong Moon

<https://orcid.org/0000-0003-3033-5250>

Abstract

Nowadays micro-dust is a serious problem in Korea. In particular micro-dust contains heavy metals such as Pb (lead) and Cd (cadmium) which negatively effect on human health. In this study, we intended to isolate lactic acid bacteria which can scavenge the heavy metals. Firstly we isolated two lactic acid bacteria which were resistant to Ag, Cu, and Zn (30-100 mM AgNO₃, CuSO₄, ZnSO₄ in MRS broth). The two lactic acid bacteria CJNU 1877 and JG 15 were identified *Lactobacillus paracasei* and *Enterococcus faecium*, respectively. Subsequently the strains were inoculated in MRS broth and agar plate where 100 ppm of Pb(NO₃)₂ and CdSO₄ were added, respectively. They did grow in the conditions and we found aggregations from 24 h cultures, indicating the strains can absorb the heavy metals, which was further proved by scanning electron microscopy (SEM) and Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer. Therefore the isolated lactic acid bacteria can be used as a probiotics harboring heavy metal scavenging activity.

Keywords

micro-dust, heavy metal, lead, cadmium, lactic acid bacteria

서 론

최근 급격한 산업 발달은 심각한 환경오염을 일으키고, 직간접적으로 인간의 건강을 위협하고 있다. 특히 '미세먼지'는 산업 활동의 과정에서 배출된 납, 비소, 카드뮴 등 유해 중금속을 포함하며, 미세먼지 속 중금속은 공기, 식수, 식품을 통해 노출되어 인체 내로 유입된다. 중금속은 섭취나 호흡을 통해 인체 내로 유입되어 다량 섭취 시 급성중독, 소량 장기간 섭취 시 만성중독을 일으킨다(최, 2006; Bert and Ulmer, 1972). 환경 중 유해 중금속의 용해성 및 비용해성은 미생물에 의해서 결정되는 경우가 많으며, 그러한 기작은 중금속에 의해 오염된 환경을 복원시키는데 활용된다(Wade *et al.*, 1993; White *et al.*, 1997). 생물학적 중금속 제거 및 처리 방법은 생물흡착(biosorption), 생물축적(bioaccumulation),

산화·환원반응(oxidoreduction), 메틸화·탈메틸화(methylation-demethylation), 불용성 복합체 형성 (insoluble complex formation) 등이 있다(방 등, 2001). 그 중 생물흡착(biosorption)은 화학적 침전법의 단점을 보완하기 위해 많은 연구가 이루어져 왔다. 주요 기작은 세포벽 표면의 리간드(ligand)나 작용기(functional group)의 금속이온 결합을 통한 흡착, 세포 외 고분자에 의한 표면 흡착, 세포 내 효소에 의한 활성화, 세포 내 중금속의 변화 등이 있으며, 표면 흡착이 주요 연구대상이다(Volesky, 1987; Volesky, 1990; Bolton Jr and Gorby, 1995; Volesky and Holan, 1995). 본 연구에서는 인체에 유익한 프로바이오틱스인 유산균을 활용하여 중금속 흡착능이 우수한 균주를 선발하였고, 중금속 흡착 및 제거능을 검증하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

실험에 사용된 중금속 AgNO_3 , CuSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdSO_4 (이상 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)은 3차 증류수에 적정 농도로 녹여 여과(membrane filter; 0.22 μm ; Sartorius Co., Germany)한 후 고농도 용액으로 제조하였다. 만들어진 고농도 용액은 4℃에 보관하면서 적절한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

중금속(Ag, Cu, Zn) 내성 유산균주 선발

본 실험에서 사용된 유산균주는 김치, 치즈, 케피어, 케피어 그레인, 막걸리, 젓갈 등에서 분리하여 -78℃ 초저온냉동고에 보관 중인 균주를 무작위로 선발하여 사용하였다. 유산균주의 중금속에 대한 내성시험을 수행하기 위해 앞서 설명한대로 AgNO_3 , CuSO_4 , ZnSO_4 를 3차 증류수에 녹여 여과(membrane filter; 0.22 μm)한 후 MRS 고체배지(Difco, Sparks, MD, USA)에 최종농도 1-100mM 되게 첨가하였다. 여기에 유산균주 배양액을 점적하여 콜로니 형성 유무를 관찰하였다. 높은 중금속 농도에서 콜로니 형성이 관찰된 두 균주를 선발하여 그람 염색 및 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 유전자 염기서열은 생명공학 전문기업(MacroGen Co., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

선발 유산균주의 중금속(Pb, Cd) 내성시험

선발된 유산균주를 대상으로 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 와 CdSO_4 가 12.5, 25, 50, 100ppm 농도로 첨가된 MRS 고체배지와 액체배지에서의 증식 유무를 관찰하였다. 즉, 상기 배지에 균 배양액을 점적 혹은 1% 접종

하여 37℃, 12시간 정치 배양 후 콜로니 형성과 생균수 증가 유무를 관찰하였다.

선발 유산균주의 중금속(Pb, Cd) 흡착능 검증

Pb와 Cd에 대한 선발 유산균주의 흡착능을 광학 및 전자 현미경을 통하여 관찰하였다. 5mL의 MRS broth에 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 와 CdSO_4 를 각각 100ppm 되게 첨가한 후 균 배양액 1%를 접종하여 37℃, 24시간 배양 후 시료를 취해 광학 현미경(1,000×배율)을 통하여 형태를 관찰하였다. 또한 정교한 관찰을 위해 주사전자현미경(scanning electron microscope; JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 시료의 준비는 MRS 액체배지에 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 와 CdSO_4 를 각각 25ppm을 첨가한 후 균 배양액 1%를 접종하였다. 12시간 배양한 시료를 20 μL 취하여 원심분리(13,000rpm, 1분)한 후 균체를 회수하여 50% 에탄올 20 μL 에 현탁한 후 실온에서 15분 동안 방치하였다. 다시 원심분리하여 에탄올을 제거 후 60, 70, 90, 95, 100% 에탄올에 대해서도 동일한 과정을 반복하였다. 탈수한 균체를 마지막으로 100% 에탄올 20 μL 에 현탁하여 여과 필터(0.22 μm)에 점적한 후 코팅과정을 거쳐 관찰하였다.

Pb 제거능 정량분석

Pb 용액 상에서 흡착 반응을 한 후 상등액 속에 남아있는 Pb의 최종 농도를 분석하기 위해서 유도결합플라즈마 분광기(ICP-AES, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 먼저, 3차 증류수 5mL에 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 100ppm을 첨가하여 Pb 용액을 만들었다. 균 배양액 5mL를 원심분리(10,000rpm, 4℃, 5분)한 후 상등액을 제거한 균체에 3차 증류수 100 μL 를 넣어 현탁한 다음, 균 현탁액 100 μL 를 Pb 용액에 첨가하여 섞어준 후 200rpm, 30℃, 6시간 동안 교반하면서 반응하였다. 이후 원심분리(10,000rpm, 4℃, 5분)하여 상등액 5mL 전체를 채취한 다음, 여과(membrane filter; 0.45 μm) 후 상등액의 Pb의 농도를 측정하였다.

결 과

중금속(Ag, Cu, Zn) 내성 유산균주 선발

다양한 유산균주를 대상으로 중금속(Ag, Cu, Zn)이 포함된 MRS 고체배지에서 내성이 있는지 확인하였다. 그 중 CJNU 1877 균주와 JG 15 균주가 사용한 중금속에 대한 내성이 관찰되었는데, CJNU 1877 균주는 Ag, Cu, Zn에 대하여 각각 30, 50, 100mM 농도에서 JG 15 균주는 각각 40, 40, 100mM 농도에서 내성이 확인되었다. 그람 염색 결과, CJNU 1877 균주는 간균 형태를, JG

15 균주는 구균 형태를 나타내었으며(Fig. 1), 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과, CJNU 1877 균주는 *Lactobacillus paracasei*로, JG 15균주는 *Enterococcus faecium*으로 동정되어 각각 *L. paracasei* CJNU 1877과 *E. faecium* JG 15로 명명하였다.

선발 유산균주의 중금속(Pb, Cd) 내성시험

선발된 두 유산균주를 활용하여 최근 미세먼지의 유해 중금속으로 문제가 되는 Pb와 Cd에 대하여 내성이 있는지를 확인하였다. Pb(NO₃)₂ 및 CdSO₄ 농도를 각각 12.5, 25, 50, 100ppm 되게 MRS 고체배지와 액체배지에 첨가한 후 두 균주의 배양액을 접종하여 37°C에서 12시간 정치 배양한 결과, 두 균주 모두 상기 조건의 고체배지에서 콜로니가 형성되었으며(Fig. 2), 액체 배지에서도 대조군(중금속 무첨가)에 비해 성장속도에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 이는 선발된 유산균주가 유해한 중금속인 Pb와 Cd에 대해서도 사용한 농도에서 내성이 있음을 의미한다.

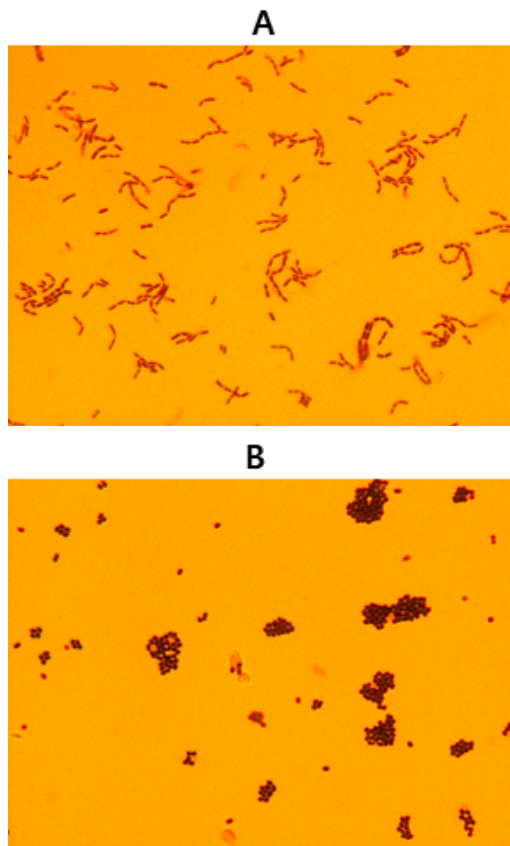


Fig. 1. Gram staining of *L. paracasei* CJNU 1877 (A) and *E. faecium* JG 15 (B).

선발된 유산균주의 Pb 및 Cd 흡착능 검증

Pb와 Cd에 대한 선발균주의 흡착능 검증을 위해 Pb(NO₃)₂와 CdSO₄가 100ppm 농도로 포함된 MRS 액체배지에 균 배양액 1% 접종 후 24시간 배양한 시료의 세포 응집도를 관찰하였다(Fig. 4). 그 결과, 중금속에 노출된 선발 균주의 경우 24시간이 지났을 때 응집현상이 관찰된 반면, 대조군(중금속 무첨가)은 그러한 현상이 관찰되지 않았다. 보다 정교한 관찰을 위해 MRS broth에 Pb(NO₃)₂와 CdSO₄ 각각 25ppm을 첨가한 후 선발균주를 접종하여 12시간 배양과 탈수과정을 거쳐 주사전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 5). 그 결과, 중금속 유무에 따라 유산균주의 표면 모양 차이가 관찰되었고, 이는 세포 표면에 응집되어 있는 중금속으로 판단되었다. 이는 선발균주인 *L. paracasei* CJNU 1877 균주와 *E. faecium* JG 15 균주가 Pb와 Cd에 대해 흡착능이 있음을 의미하는 것이다.

선발균주의 Pb 제거능 정량분석

상대적으로 미세먼지에 많이 포함된 Pb를 대상으로 선발균주의 제거 능력을 알아보기 위해 Pb 용액에 균 현탁액을 반응시킨 후, 제균 상등액 상에 남아있는 Pb의 농도를 유도결합플라즈마 분광기(ICP-AES, Perkin Elmer)로 정량분석하였다. 그 결과, 선발 균주를 처리하지 않은 대조군은 55.90 ppm이 검출된 반면, *L. casei* CJNU 1877 균주가 적용된 시료는 17.84 ppm이 검출되었고, *E. faecium* JG 15 균주가 적용된 시료는 27.33 ppm이 검출되어 각

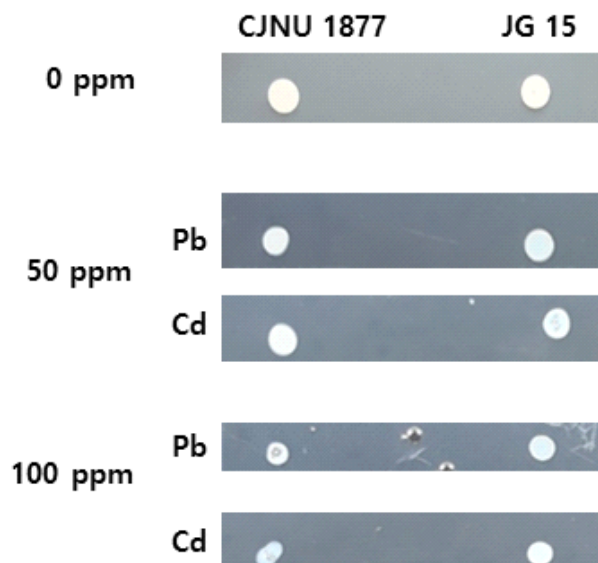


Fig. 2. Growth of *L. paracasei* CJNU 1877 and *E. faecium* JG 15 strains on MRS agar plates containing Pb (Pb(NO₃)₂) and Cd (CdSO₄).

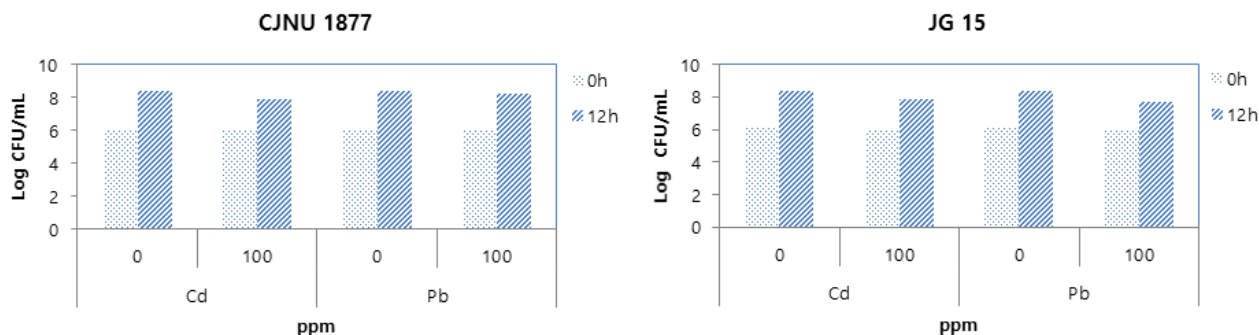


Fig. 3. Viable cell count of *L. paracasei* CJNU 1877 and *E. faecium* JG 15 strains in MRS broth with or without heavy metals Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) and Cd (CdSO_4).

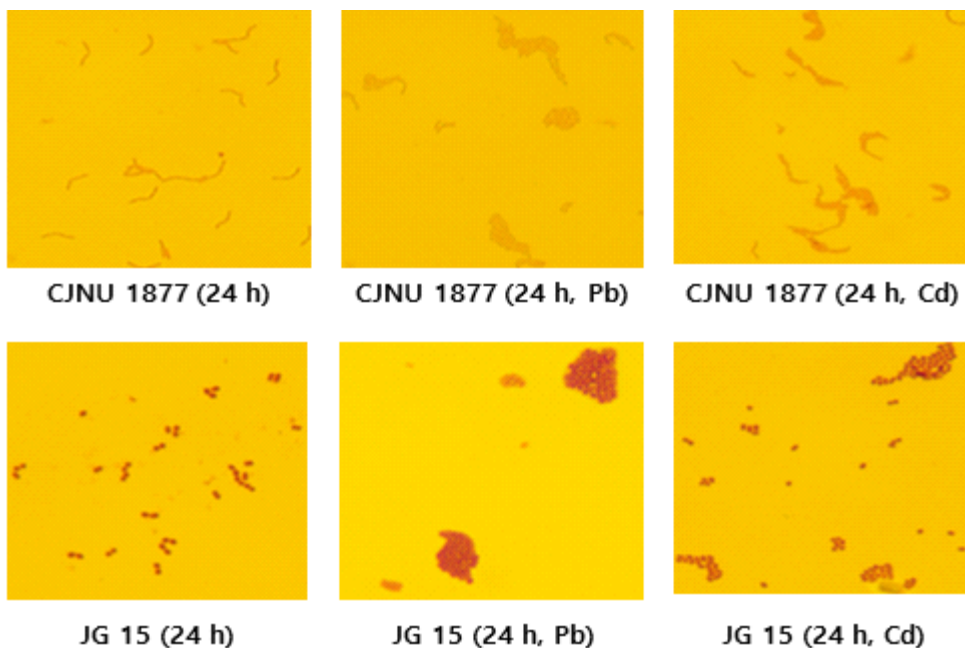


Fig. 4. Micrographs of cells of *L. paracasei* CJNU 1877 and *E. faecium* JG 15 strains cultured with or without Pb and Cd. One hundred ppm of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ or CdSO_4 was added in MRS broth for culture of the strains.

각 68%p와 51%p가 감소되었다.

고 찰

본 연구는 유산균이 풍부하다고 알려진 김치, 치즈, 케피어, 케피어 그레인, 막걸리, 젓갈 등에서 분리하여 보관하고 있는 유산균주를 무작위로 선별하여 중금속(Ag, Cu, Zn)이 포함된(최종농도 1-100

mM) MRS 고체배지에 접종한 후 배양하면서 사용한 중금속에 대한 내성 유무를 판단하였다. 그 중 상기 조건에서 상대적으로 내성이 우수한 CJNU 1877 균주와 JG 15 균주가 최종 선발되었고, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 각각 *L. paracasei*와 *E. faecium*로 동정되었다. 두 균주를 대상으로 최근 미세먼지에 포함되어 문제가 되는 중금속 Pb와 Cd에 대한 내성 시험 결과, 12.5, 25, 50, 100ppm의 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 와 CdSO_4 가 포함된 MRS 고체배지

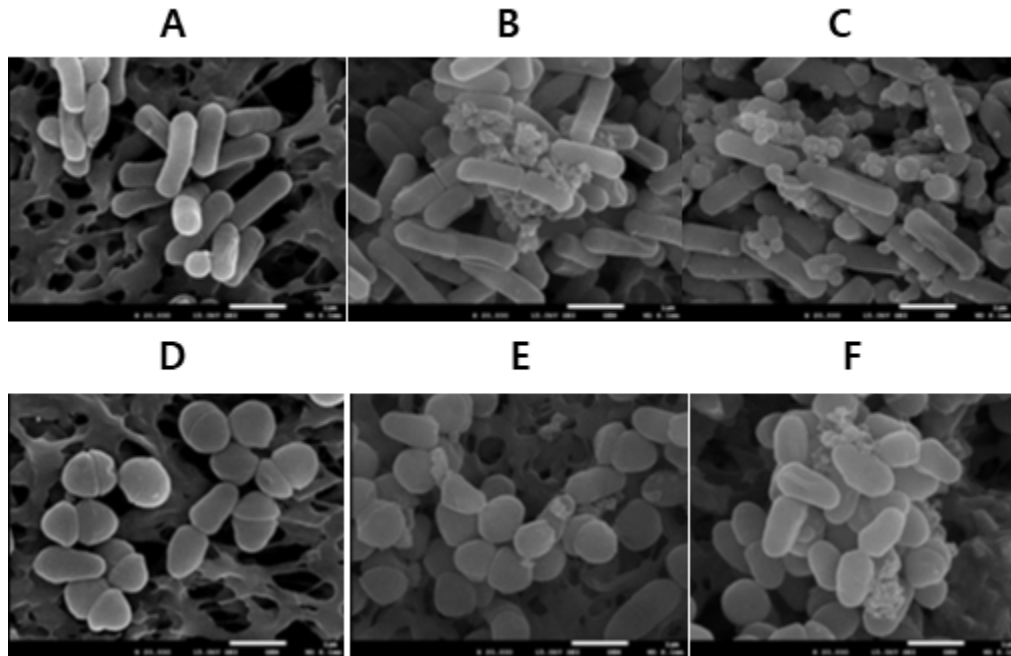


Fig. 5. Scanning electron micrographs of cells of *L. paracasei* CJNU 1877 and *E. faecium* JG 15 strains cultured with or without Pb and Cd. Twenty five ppm of $Pb(NO_3)_2$ or $CdSO_4$ was added in MRS broth for culture of the strains. A: *L. paracasei* CJNU 1877 only; B: CJNU 1877 with Cd; C: CJNU 1877 with Pb; D: *E. faecium* JG 15 only; E: JG 15 with Cd; F: JG 15 with Pb.

및 액체배지에서 모두 콜로니 형성과 증식이 관찰되어 사용한 농도에서 두 균주 모두 내성이 있는 것으로 확인되었다. 또한 주사전자현미경을 활용한 중금속 Pb와 Cd의 흡착능과 유도결합플라즈마 분광기를 활용한 중금속 Pb의 제거능 정량분석 결과는 선발된 두 균주 모두 중금속 Pb와 Cd를 제거하는데 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다. 지금까지 유산균을 활용한 중금속 흡착능 및 제거능과 관련된 논문은 다수 발표되었으며(Kinoshita, 2019; Ojekunle *et al.*, 2017; Kirillova *et al.*, 2017), Kinoshita (2019)는 유산균의 중금속 흡착능 정량분석법 및 중금속 결합 단백질 동정과 관련된 내용의 논문을 발표하였고, Ojekunle *et al.*(2017)는 *Weissella cibaria*와 *Lactobacillus plantarum* 균주를 활용한 카드뮴과 납 독성 예방효과 검증을 위한 *in vitro* 및 *in vivo* 평가 결과에 대한 논문을 발표하였으며, Kirillova *et al.* (2017)은 *Lactobacillus* 균주를 활용하여 납과 카드뮴에 대한 내성과 생물정화(bioremediation) 능력을 측정하였다. 모든 연구논문에서 유산균주가 중금속을 흡착하여 제거하는 효과가 우수한 것으로 확인되었다. *Enterococcus faecium* 균주의 경우, 수용액 상의 납과 카드뮴을 효율적으로 제거하는 것으로 확인되었다(Topcu and Bulat, 2010). 그러나 아직까지 *L. paracasei*의 중금속(특히 납과 카드뮴) 흡착능과 관련된 논문은 찾아보기 어렵다. *L. paracasei* 균주

와 *E. faecium* 균주는 프로바이오틱스로 활용이 가능하며(Sharma *et al.*, 2017; Holzapfel *et al.*, 2018) *L. paracasei* CJNU 1877 균주와 *E. faecium* JG 15 균주의 납과 카드뮴 흡착능은 부가적인 기능을 부여할 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. Bert LV and Ulmer DD (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91-128.
2. Bolton Jr H and Gorby YA (1995) An overview of the bioremediation of inorganic contaminants. In: *Bioremediation of Inorganics*. Hinchey RE, Means JL, and Burris DR (eds), Battelle Press, Columbus, OH, pp. 1-16.
3. Holzapfel W, Arini A, Aeschbacher M, Coppolecchia R, and Pot B (2018) *Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. *Benef. Microbes* **9**, 375-388.
4. Kinoshita H (2019) Biosorption of heavy metals by

- lactic acid bacteria for detoxification. *Methods Mol. Biol.* **1887**, 145-157.
5. Kirillova AV, Danilushkina AA, Irisov DS, Bruslik NL, Fakhrullin RF, Zakharov YA, Bukhmin VS, and Yarullina DR (2017) Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to lead and cadmium. *Int. J. Microbiol.* **2017**, 9869145.
 6. Ojekunle O, Banwo K, and Sanni AI (2017) *In vitro* and *in vivo* evaluation of *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum* for their protective effect against cadmium and lead toxicities. *Lett. Appl. Microbiol.* **64**, 379-385.
 7. Sharma K, Mahajan R, Attri S, and Goel G (2017) Selection of indigenous *Lactobacillus paracasei* CD4 and *Lactobacillus gastricus* BTM 7 as probiotic: assessment of traits combined with principal component analysis. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1310- 1320.
 8. Topcu A and Bulat T (2010) Removal of cadmium and lead from aqueous solution by *Enterococcus faecium* strains. *J. Food Sci.* **75**, T13-17.
 9. Volesky B (1990) Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
 10. Volesky B (1987) Biosorbents for metal recovery. *Trends Biotech.* **5**, 96-101.
 11. Volesky B and Holan ZR (1995) Biosorption of heavy metals. *Rev. Biotechnol. Prog.* **11**, 235-250.
 12. Wade MJ, Davis BK, Carlisle JS, Klein AK, and Valoppi LM (1993) Environmental transformation of toxic metals. *Occup. Med.* **8**, 574-601.
 13. White C, Sayer JA, and Gadd GM (1997) Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 503-516.
 14. 방상원, 최영길, 한명수. (2001) 유독 중금속 오염물질 처리를 위한 미생물 균주의 최근 이용 및 개발. *환경생물* **19**, 93-99.
 15. 최은석. (2006) 장내유래 *Lactobacillus* sp. CH-2의 중금속 흡착능에 관한 연구. 건국대학교 석사학위논문, 서울, 대한민국.