

# 카드뮴의 *Hansenula anomala* 세포내 축적에 미치는 Triton X-100의 효과

유대식 · 박정문 · 송형익\*

계명대학교 자연과학대학 생물학과 \*대구공업전문대학 식품공업과

## Effect of Triton X-100 on Intracellular Accumulation of Cadmium in *Hansenula anomala*

Yu, Tae-Shick, Jung-Moon Park and Hyung-Ik Song\*

Department of Biology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu, Korea

\*Department of Food Technology, Taegu Technical Junior College, Taegu, Korea

**ABSTRACT:** As a part of investigation on effective accumulation of cadmium in yeast cells, effect of surfactant was studied on intracellular accumulation of cadmium in extremely cadmium-tolerant yeast, *Hansenula anomala* B-7. Cadmium accumulation was enhanced up to approximately 40% by the addition of non-ionic surfactant, Triton X-100 and its optimal concentration was found to be 0.1-0.2%. Furthermore, optimum conditions for intracellular accumulation of cadmium were at 40 °C and initial pH 6.0 for 48 hours under shaking culture.

**KEY WORDS** □  $Cd^{2+}$  Accumulation in *H. anomala*, Triton X-100 effect.

중금속에 의한 환경오염은 직접적으로 인체에 피해를 줄 뿐만 아니라 미생물에 의한 오염물질의 분해를 저해하여 자정작용을 지연시키는 원인이 되는 등 생태계에 미치는 영향이 크므로 이에 대한 대책이 절실히 요구된다(Nagayama and Kurechi, 1979). 특히 카드뮴은 2 개의 중금속으로서 주로 아연광석에 함유되어 산출되므로 아연을 사용하는 공장의 폐수 또는 폐기물, 아연광산지역의 토양 또는 폐수 등이 오염원이 되며(後藤 등, 1977; Dreibach, 1980; 堀口, 1978), itai-itai 병의 원인으로 널리 알려져 있다(日本國, 厚生省, 1968).

카드뮴을 미생물학적인 방법으로 제거하기 위한 연구는 카드뮴에 내성을 가지는 것으로 알려진 원핵세포인 세균을 이용한 연구가 대부분이며(Horitsu 등, 1974, 1979; Oda and Minami, 1978; Kim and Lee, 1976; Park and Choi, 1979; Yu, 1979), 카드뮴에 대한 감수성이 커서

내성균의 분리가 어려운 것으로 알려진 진핵세포인 *Euglena* (Nakano 등, 1978), 곰팡이(Tachibana and Kawano, 1971), 효모(Norris and Kelly, 1977; Heldwein 등, 1976) 등에 대해서는 극히 제한된 보고가 있을 뿐이다. 더우기 효모를 대상으로 한 일부의 연구도 감수성균에 관한 것이며(Norris and Kelly, 1977), 카드뮴 내성균에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 특히 효모는 균보다 군체가 커서 중금속을 정화한 후 군체 자체가 용이한 점 등 다수의 이점이 알려지고 있다.

이상의 관점으로 저자 등은 아연광산지역으로부터 2,700 ppm의 카드뮴을 함유한 고체배지에서 도 생육이 가능한 고도 카드뮴내성균 B-7을 분리하여 *Hansenula anomala* B-7로 동정하고(Yu 등, 1986) 군체내 카드뮴 축적능(Yu and Song, 1981) 등을 이미 보고한 바 있다.

본 보고에서는 고도 카드뮴 내성효모 *Hansenula anomala* B-7을 대상으로 군 배양시 군체

내 카드뮴 축적능을 향상시키기 위한 방법으로 계면활성제가 어떤 영향을 미치는지는 가정하에 배지중에 계면활성제를 첨가하여 배양한 결과, Triton X-100이 카드뮴의 균체내 축적을 촉진한다는 사실이 확인되었으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균 주

전보 (Yu 등, 1986)에서 분리·동정한 카드뮴 내성효모 *Hansenula anomala* B-7을 사용하였다.

### 배 양

공시균의 배양은 500 ml 진탕플라스크에 Table 1과 같은 조성의 기본배지 100 ml를 넣고 1 kg/cm<sup>2</sup>, 15분간 고압증기 살균 후, 냉각하여 공시균을 접종, 30°C에서 진탕배양 (120 strokes/min. amplitude 4 cm)하였다.

카드뮴 첨가 실험에서는 배지를 살균, 냉각 후, 카드뮴 용액 (10,000 ppm Cd<sup>2+</sup>)을 사용하여 일정한 카드뮴 농도가 되도록 무균적으로 첨가하여 공시균을 배양하였다.

### 생육도 측정

균의 생육도는 균배양액을 3,000×g, 10분간 원심분리 (Backman, Model J2-21)하고 증류수로 3회 세척 후, 도가니에 넣어 105°C에서 48시간 건조시켜 건조균체량 (g)으로 나타내었다.

### 카드뮴의 정량

균체내 카드뮴은 직접법에 의하여 전처리하여 원자흡광법으로 정량하였다 (日本分析化學會, 關東

Table 2. Operating Conditions of Atomic Absorption Spectrophotometer.

Lamp current	5 mA
Wave length	2,288 Å
Slit width	3.8 Å
Burner height	4 mm
Acetylene	4.0 l/min
Air	4.0 l/min

支部, 1973; 武内 등, 1979; 日本化學會, 1977). 즉, 건조균체를 490°C에서 4시간 회화시킨 후, 미회화물질의 분해를 위하여 HClO<sub>4</sub>와 HNO<sub>3</sub>를 각각 2.5 ml씩 가한 다음 완전증발될 때까지 가열·산화시킨다. 이를 냉각 후 1N-HCl 10 ml를 첨가하여 100°C로 5분간 카드뮴을 용출·이온화시키고 1N-HCl로 100 ml가 되도록 한다. 전처리가 끝난 시료는 원자흡광분광광도계 (Shimadzu, AA-646)로, Table 2와 같은 조건에서 2,288 Å 파장의 흡광도를 측정했다.

### 시 약

배지에 첨가하는 카드뮴 (Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O) 및 카드뮴 정량용 표준용액 (1,000 ppm Cd<sup>2+</sup>)은 林純藥제품 (日本, 大阪)을 구입·사용하였다. Silicone KM-70은 信越化學제품 (日本, 大阪)을 Tween 80은 純正化學제품 (日本, 東京)을, Triton X-100 및 Aerosol OT는 和光純藥제품 (日本, 東京)을 cetyltrimethylammonium bromide는 東京化成제품 (日本, 東京)을, pepton은 極東製藥제품 (日本, 東京)을, 효모추출물은 Sigma 제품 (미국)을 각각 사용하였으며, 기타 일반시약은 시판 특급품을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 계면활성제의 영향

카드뮴의 농도가 100 ppm이 되도록 함유시킨 기본배지에 계면활성제를 각각 0.2%씩 첨가하여 공시균을 30°C, 24시간 진탕배양한 후, 균체내 카드뮴 함량을 조사했다 (Table 3).

계면활성제는 분자내의 이온성에 따라 양이온계, 음이온계, 양성이온계 및 비이온계로 분류 (平松 등, 1978)되며, 비이온계 계면활성제인

Table 1. Composition of Basal Medium.

Glucose	10 g
Peptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 g
Deionized water	1,000 ml
pH	6.0

Table 3. Effect of Surfactants on Intracellular Accumulation of Cadmium.

Surfactant	Growth (g)	Intracellular accumulation of cadmium	
		Total cadmium (mg)	Total cadmium/growth
None	0.3706	4.16 (100)*	11.23 (100)*
Tween 80	0.3458	3.89 ( 94)	11.25 (100)
Triton X-100	0.5207	5.78 (139)	11.10 ( 99)
CTAB**	0.0225	0.03 ( 1)	1.33 ( 12)
Aerosol OT	0.1126	4.21 (101)	37.39 (333)
Silicone KM-70	0.6217	3.01 ( 72)	4.84 ( 43)

\*; Relative values in parentheses.

\*\*; Cetyltrimethylammonium bromide.

*Hansenula anomala* B-7 was grown in 100 ml of the basal medium containing 100 ppm of cadmium and 0.2% of various surfactants with shaking at 30°C for 24 hours.

Triton X-100은 공시균의 생육뿐만 아니라 균체 내 카드뮴의 축적을 약 40% 촉진시키는 효과를 나타내었으나, Tween 80은 생육과 카드뮴의 축적에 영향을 미치지 못했다.

양이온계 계면활성제인 cetyltrimethylammonium bromide는 균생육 및 카드뮴 축적을 크게 저해하였다. 음이온계인 Aerosol OT는 공시균의 생육을 크게 저해하였으나 카드뮴 축적에는 아무런 영향을 미치지 못했다. 그러나 건조균체에 대한 카드뮴 축적능은 가장 높은 값을 보였다. 한편 소포제로 널리 쓰이는 Silicone KM-70은 공시균의 생육에 촉진효과를 나타내나 카드뮴 축적에는 오히려 저해현상을 나타내었다. 비이온계 Triton X-100의 첨가에 의해 균체내 카드뮴 축적이 크게 촉진되어, 이와같은 결과는 Triton X-100의 처리가 효모세포의 물질흡수를 촉진시키는 유용한 수단이 된다는 Kimura 등 (1981)의 보고와 같이 Triton X-100이 효모 세포막의 투과성에 어떤 영향을 주기 때문이라 사료된다.

양이온계 cetyltrimethylammonium bromide 및 음이온계인 Aerosol OT에 의한 균생육 저해현상은 이들 계면활성제의 일부가 미생물의 세포막 파괴 및 효소단백질의 변화를 일으키므로 소독제로도 사용되고 있어서 (古田 등, 1974) 당연한 결과로 사료된다. Silicone KM-70의 첨가로 균생육이 양호한 것은, 소포제로서 산소의 투과성과 관련이 있는 것으로 보이며, Aerosol OT에서 균생육이 저해되나 카드뮴 축적은 저해되지 않는 것은 카드뮴의 세포막 투과성을 촉진시킨다고 사료

된다.

#### Triton X-100 농도의 영향

공시균의 생육과 카드뮴의 균체내 축적을 촉진시키는 Triton X-100의 농도에 의한 영향을 측정하기 위하여 공시균을 Triton X-100의 농도가 다른 배지중에 배양 후, 균체내의 카드뮴 축적량을 조사하여 Fig.1에 나타내었다. Triton X-100을 0.1% 되게 배지중에 첨가하므로 카드뮴의 균체내 축적이 가장 양호했으며, 이 농도에서 카드뮴의 축적이 약 40% 촉진되었다.

#### 초기 pH의 영향

Triton X-100에 의한 카드뮴 축적에 미치는 초

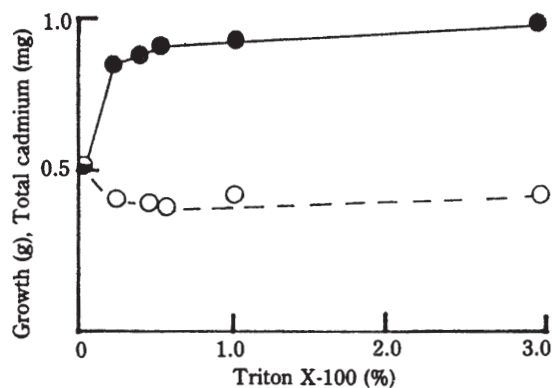


Fig. 1. Effect of Triton X-100 Concentration on Intracellular Accumulation of Cadmium.

The yeast was inoculated to the basal medium containing 100 ppm of cadmium and increasing concentrations of Triton X-100, and cultivated at 30°C for 24 hours on reciprocal shaker. (○-○); Growth, (●-●); total cadmium.

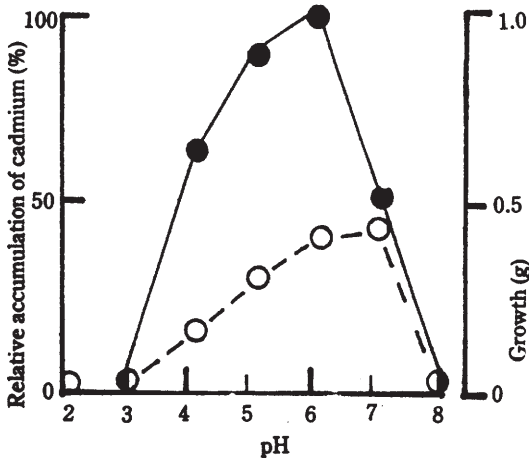


Fig. 2. Effect of Initial pH on Intracellular Accumulation of Cadmium.

The yeast was grown into the same conditions as those described in the Table 5 with shaking at different pH.

(-○-); Growth, (-●-); relative accumulation of cadmium.

기 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH를 3.0에서 8.0까지 조절하고, 카드뮴 100 ppm을 함유시킨 배지에서 공시균을 30°C에서 24시간 진탕배양한 후, 균의 생육과 카드뮴의 균체내 축적량을 조사하였다(Fig.2).

카드뮴의 균체내 축적은 pH 6.0에서 최고에 이르고, 균생육은 pH 7.0에서 최고에 도달하였다. 그러나 균생육이 최고에 이르는 pH 7.0에서는 카드뮴 균체내 축적이 약 50% 저해되며 pH 3.0과 pH 8.0에서는 균의 생육뿐만 아니라 카드뮴의 균체내 축적도 거의 이루어지지 않았다.

#### 배양온도의 영향

카드뮴 100 ppm과 0.2%의 Triton X-100을 함유한 배지에서 공시균을 각각 다른 온도에서 24시간 진탕배양하여 균의 생육과 카드뮴의 균체내 축

적량을 조사하여 Table 4에 나타내었다.

공시균의 생육은 30°C에서 가장 양호했으나 카드뮴의 축적은 40°C까지 배양온도가 높아짐에 따라 급격히 증가하며, 20°C에 비하여 30°C에서 약 300% 정도의 높은 축적을 나타냈다. 공시균의 생육은 40°C에서 저해되나, 카드뮴의 축적은 상대적으로 증가했다.

#### 진탕의 효과

카드뮴의 균체내 축적에 미치는 진탕의 효과를 조사한 결과는 Table 5에 정리했다. 카드뮴의 균체내 축적은 진탕배양이 정지배양보다 약 2 배의 높은 축적량을 나타냈다.

진탕배양에 의하여 공시균의 생육이 촉진됨으로써 균체내의 카드뮴의 축적량도 증가한다고 사료되나, 균생육에 비하여 카드뮴의 균체내 축적이 비례적으로 증가하지 않는 것은 카드뮴의 균체내 축적이 세포막의 산소 투과성과는 상관관계가 없는 것으로 사료된다.

#### 아연의 영향

카드뮴과 가장 유사한 금속으로서 물리·화학적 성질이 비슷하며(Nakano 등, 1978) 다수의 metalloprotein(Nakamura 등, 1981) 및 metalloenzyme(Mitra 등, 1975)의 구성 성분으로 알려져 있는 아연의 첨가가 균배양시 카드뮴의 균체내 축적에 미치는 영향을 조사하였다(Table 6).

Triton X-100 0.2%와 카드뮴 100 ppm을 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 결과, 균생육은 고농도 아연첨가에 의해 저해되는 경향이었으나 카드뮴의 균체내 축적량은 아연 0.5 mM 농도까지는 계속적으로 증가하였으나 아연 2.0 mM 농도에서는 균생육과 카드뮴 축적이 급격히 저해되었다.

이상과 같은 카드뮴 축적양상은 일반적으로 카

Table 4. Effect of Culture Temperature on Intracellular Accumulation of Cadmium.

Culture temp. (°C)	Growth (g)	Intracellular accumulation of cadmium	
		Total cadmium (mg)	Total cadmium/growth
20	0.3604	0.24 (100)*	0.66 (100)*
30	0.4372	0.76 (317)	1.74 (263)
40	0.2130	0.91 (379)	4.27 (647)

\*; Relative values in parentheses.

Cultivation of the yeast was carried out into the basal medium containing 100 ppm of cadmium and 0.2% of Triton X-100 with shaking at the different temperature as indicated in the Table for 24 hours.



**Table 5.** Effect of Shaking on Intracellular Accumulation of Cadmium.

Culture time Condition	Growth (g)		Total cadmium (mg)	
	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
Static	0.100 (100)*	0.125 (100)*	0.505 (100)*	0.745 (100)*
Shaking	0.475 (475)	0.425 (340)	0.950 (188)	1.050 (141)

\*; Relative values in parentheses.

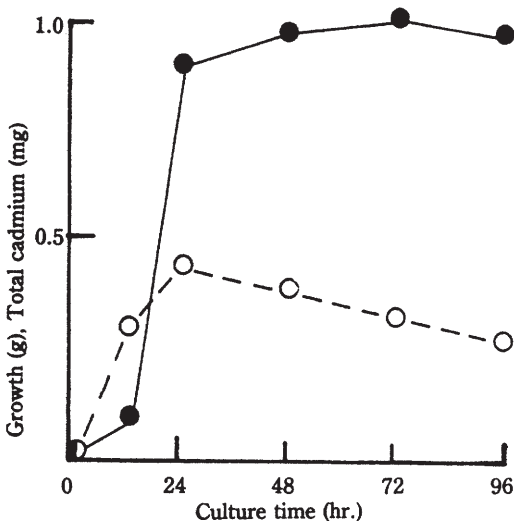
The yeast was grown into the basal medium containing 100 ppm of cadmium and 0.2% of Triton X-100 at 30°C for 24 hours with static or shaking.

**Table 6.** Effect of Zinc on Intracellular Accumulation of Cadmium.

Concn. (mM)	Growth (g)	Intracellular accumulation of cadmium	
		Total cadmium (mg)	Total cadmium/growth
0.00	0.6449	0.72 (100)*	1.12 (100)*
0.25	0.6438	0.78 (108)	1.21 (108)
0.50	0.4935	0.97 (135)	1.96 (175)
1.00	0.2254	0.90 (125)	3.99 (356)
2.00	0.1409	0.15 ( 21)	1.06 ( 95)

\*; Relative values in parentheses.

The yeast was grown into the basal medium containing 100 ppm and 0.2% of Triton X-100 at the various concentrations of zinc at 30°C for 24 hours with shaking.

**Fig. 3.** Time Course of Growth and Intracellular Accumulation of Cadmium.

Condition of cultivation was carried out the same as those described in Table 5 with shaking.

(○); Growth, (●); total cadmium.

드름에 대한 아연의 길항작용과 상반된 결과이며 *Euglena*를 이용한 실험에서 배지의 아연은 카드뮴의 균체내 축적을 강하게 저해한다는 Nakano 등 (1978)의 보고와 상반된 결과였다.

#### 균체내 카드뮴 축적의 time course

Triton X-100 0.2% 첨가에 의한 공시균의 균생육도 및 카드뮴의 균체내 축적을 검토한 바(Fig. 3), 균생육은 배양 24시간에 최고에 이르고 그 이후는 점차적으로 감소하는데 반하여 카드뮴의 축적은 배양시간이 경과함에 따라 평형상태를 유지했다.

이상의 결과는 카드뮴의 축적이 균생균 초기에는 거의 일어나지 않고 후기에 활발하게 일어난다는 Yu와 Song (1981), Oda와 Minami (1978), 村山 등 (1977)의 보고와 일치하였다. 공시균에 의한 카드뮴의 균체내 축적은 공시균의 생육이 최고에 도달하는 정지기 이후에 이루어졌다.

## 적 요

고도 카드뮴 내성효모 *Hansenula anomala* B-7의 균체내에 다량의 카드뮴을 축적시키기 위하여 배양시 계면활성제를 첨가

하여 배양하는 방법을 검토했다.

계면활성제 중 비이온계인 Triton X-100에 의하여 약 40%의 카드뮴의 축적효과를 나타내며 유효농도는 0.1-0.2%였다.

균체내 카드뮴 축적의 최적조건은 다음과 같다.

정지배양보다 진탕배양이 효과적이었으며, 48시간 진탕배양으로 카드뮴의 균체내 축적이 최대에 도달했으며, 배지의 초기 pH는 6.0이었으며, 배양온도는 40°C가 양호했다.

## 사 사

본 연구는 1986년도 계명대학교 교내 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표시하는 바입니다.

## 참고문헌

1. 古田幸子, 河合芳子, 1974, 界面活性劑の抗菌性について, 纖消誌, 15, 460~464.
2. 後藤稔, 池田正之, 原一郎, 1977, 産業中毒便覧, 醫齒藥出版(株), 東京, 219~224.
3. 平松宏一, 青木幸一郎, 1978, 陽イオン界面活性劑と蛋白質の相互作用, 蛋白質・核酸・酵素, 23, 974~983.
4. 堀口博, 1978, 公害食品, 三共出版(株), 32~33.
5. 厚生省, 1968, 富山縣におけるイタイイタイ病に関する厚生省の見解.
6. 村山徹郎, 遠山鴻, 内貴信夫, 1977, 酵母における適應と制御, 酵母の重金属耐性について, 長谷川武治編, 學會出版センター, 東京, 97-114.
7. 日本化學會, 1977, カドミウム, 丸善株式會社, 東京.
8. 日本分析化學會, 關東支部, 1973, 公害分析指針 7, 共立出版社, 23-26.
9. 武内次夫, 鈴木正己, 1979, 原子吸光分光分析, 南江堂, 東京.
10. Dreishach, R.H., 1980. Handbook of poisoning, 10th ed., Lange, Los Altos, California. 221-222.
11. Heldwein, R., H.W. Tromballa und E. Broda, 1976. Aufnahme von cobalt, blei und cadmium durch backerhefe. Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologia. 17, 299-308.
12. Horitsu, H., H. Kato and M. Tomoyeda, 1979. Uptake of cadmium by a cadmium chloride-tolerant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. J. Ferment. Technol. 57, 273-279.
13. Horitsu, H., T. Maeda and M. Tomoyeda, 1974. Isolation of a cadmium nitrate-tolerant microorganism and the incorporation of the heavy metal ion into the cells of the microorganism. J. Ferment. Technol. 52, 14-19.
14. Kim, Y.B. and S.R. Lee. 1976. Isolation of cadmium-Tolerant bacteria and accumulation of cadmium into the bacteria cell. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 4, 111-115.
15. Kimura, A., K. Arima and K. Murata, 1981. Biofunctional change in yeast cell surface on treatment with Triton X-100. Agric. Biol. Chem. 45, 2627-2629.
16. Mitra, R.S., R.H. Gray, B. Chin and I.A. Bernstein, 1975. Molecular mechanisms of accommodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd<sup>++</sup>. J. Bacteriol. 121, 1180-1188.
17. Nagayama, T. and T. Kurechi, 1979. The effects of heavy metals on the microorganisms in river water. Eisei kagaku. 25, 289-294.
18. Nakamura, Y., S. Katayama, Y. Okada, F. Suzuki and Y. Nagata, 1981. The isolation and characterization of a cadmium and zinc-binding protein from *Tetrahymena pyriformis*. Agric. Biol. Chem. 45, 1167-1172.
19. Nakano, Y., K. Okamoto, S. Toda and K. Fuwa, 1978. Toxic effects of cadmium on *Euglena gracilis* grown in zinc deficient and zinc sufficient media. Agric. Biol. Chem. 42, 901-907.
20. Norris, P.R. and D.P. Kelly, 1977. Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 99, 317-324.
21. Oda, M. and K. Minami, 1978. Isolation and identification of the cadmium-ion tolerant microorganisms and accumulation of cadmium-ion by the cells. J. Ferment. Technol. 56, 1-8.
22. Park, C.S. and K.H. Choi, 1979. Isolation of a

- bacterial strain which has specific tolerance against the cadmium. *J. Korean Soc. Food and Nutr.* 8, 25-30.
23. Tachibana, S. and S. Kawno, 1971. Effect of Fe(II) in the disappearance of cadmium-induced phenomena on *Rhizopus javanicus*. *J. Ferment. Technol.* 49, 24-29.
24. Yu, T.S., 1979. Microbiological characteristics of heavy metal ion-tolerant microorganisms. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 7, 183-190.
25. Yu, T.S. and H.I. Song, 1981. Cultural conditions of heavy metal-ion tolerant microorganisms and accumulation of heavy metal-ion into the cells. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 9, 59-64.
26. Yu, T.S., H.I. Song and K.T. Chung, 1986. Characterization of a cadmium-ion tolerant strain of *Hansenula anomala*. *Kor. Jour. Microbiol.* 24, 57-61.

(Received Mar. 24, 1987)