

금속 이온에 의한 카드뮴 내성균주 *Hansenula anomala* B-7 세포의 용균 방지 효과

송형익 · 유대식*

대구공업전문대학 식품공업과

*계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Preventive Effect of Lysis in the Cadmium-Tolerant *Hansenula anomala* B-7 Cells by Metal Ions

Hyung-Ik Song and Tae-Shick Yu*

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

*Department of Microbiology, College of Natural Science,

Keimyung University, Taegu, Korea

ABSTRACT: The yeast, *Hansenula anomala* B-7, isolated from the Cd²⁺ rich soils and determined to be tolerant in the high concentration of Cd²⁺, were employed in this work. Its intact cells grown in high concentration of Cd²⁺ were observed to be lysed at the early stage when transferred to a cadmium deficient broth. Its intact cells found to be not lysed and grow well under the high concentration of Cd²⁺. The lysis of the intact cells grown at the high concentration of Cd²⁺ ion was not found when the metal ions were replaced with Cd²⁺ ion in the same concentration. This result indicated that lysis of yeast cells, at least in this isolate, would be related to cell osmosis with the mineral ions added.

KEYWORDS: *Hansenula anomala* B-7, lysis prevention.

이연 광산지역에서 분리된 공시균인 *Hansenula anomala* B-7은 2,700 µg/ml 카드뮴 농도의 고체배지에서도 생육이 가능한 고도 카드뮴 내성균이며(Yu *et al.*, 1986), 이 균은 uptake한 카드뮴의 74%를 세포외층에 흡착시키며, 26%의 카드뮴은 세포내에 축적한다(Yu *et al.*, 1990).

이 효모는 고농도 카드뮴(1,000 µg/ml cd²⁺)에 의하여 효모상 세포가 균사상 세포(mycelial cell)로 형태 변이되며, 더욱이 뒤엉킨 군집세포(clumped cell)를 형성하기도 하며, 기본배지 (1% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% NaCl, 0.03% MgSO₄·7H₂O, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% K₂HPO₄, pH 6.0)를 고압 증기 살균후, Cd(NO₃)₂·4H₂O로 조제한 카드뮴 10,000 µg/ml의 stock solution으로 카드뮴 농도가 1,000 µg/ml가 되게 첨가한 배지(Yu *et al.*, 1987)에서 배양된 세포의 세포벽 조성은 카드뮴 무

첨가 배지에서 배양된 세포의 세포벽 조성보다 glucan과 mannan 함량은 감소되고 단백질과 지질 함량은 증가 되었다(송과 유, 1991).

1,000 µg/ml의 카드뮴 첨가 배지에서 배양된 *Hansenula anomala* B-7 세포를 카드뮴 무첨가 배지에 재배양하면 증식이 정지될 뿐 아니라, 용균이 일어났다. 이 논문은 고도 카드뮴 내성 효모의 용균 현상과 용균 방지 효과를 규명하고자 했다.

Hansenula anomala B-7을 고농도 카드뮴(1,000 µg/ml)이 함유된 기본 배지(Yu *et al.*, 1987)에서 25 °C, 7일간 진탕 배양한 intact cell을 카드뮴 무첨가 배지에서 재배양하면서 세포수, 세포의 크기 및 균사상 세포의 비율 등을 조사하였다. 세포수는 haemocytometer를 사용하여 광학현미경하에서 직접 측정했으며, 세포 및 균사상 세포의 크기는 micrometer를 사용하여 직접 측정했다. 균사상 세포의

Table I. Time Course of Lysis on Basal Medium^a.

Culture time (day)	Cell number ^b (cells/ml)	Ratio of mycelial cell (%)
2	1.5×10^7	10.0 ± 1.1^b
3	1.1×10^7	6.7 ± 2.3
4	8.4×10^6	4.7 ± 0.4
5	— ^c	—

^a The inoculation seed culture cultivated in medium containing 1,000 µg/ml of cadmium at 25°C for 7 days, and stored at 4°C for 25 days.

^b Standard deviation.

^c Complete cell lysis was observed.

비율은 총균수에 대한 백분율로 표시했다.

Table I에 나타난 바와 같이, 재배양 기간이 길수록 세포수와 균사상 세포의 비율이 점진적으로 감소했으며, 2일간 배양하므로 이 intact cell은 완전히 용균(cell lysis) 되었다. 더욱이 고농도 카드뮴에서 배양된 intact cell을 4°C에서 30일간 저장한 균을 카드뮴 무첨가 배지에 2일간 재배양하면 쉽게 용균되며, 저장기간이 길수록 용균시간이 단축되며 60일간 저장된 균은 24시간 이내에 완전히 용균되었다.

효모세포는 세포내에 포유동물 세포의 lysosome과 유사한 역할을 하는 액포를 가지며 액포내에는 각종 분해 효소가 함유되어 있다(Watson *et al.*,

1987 ; Deacon, 1984). 따라서 용균은 세포내 액포의 가수분해 효소의 방출과 같은 세포내의 환경 변화에 의하여 일어날 수 있으리라 사료된다. 한편 세포 외부의 환경 변화에 의한 용균 즉, 세포의 삼투압 변화에 의한 용균도 알려져 있다.

미생물은 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 등 무기염류의 투과를 조절하여 세포내의 삼투압을 정상적으로 유지하며 이러한 무기이온은 배지로부터 흡수하거나 세포내에서 합성하기도 한다(日高 醇, 1989 ; Singleton and Sainsbury, 1987).

본 실험에서의 용균현상은 액포에서의 가수분해 효소의 방출에 기인한다기 보다는 무기이온에 의한 삼투압 조절기구에 어떤 영향을 끼쳐 일어난 osmotic shock라 사료된다(현미경으로 관찰하였음). 이러한 용균현상이 카드뮴의 영향 때문인지를 조사하기 위하여 고농도 카드뮴(1,000 µg/ml) 함유 배지에서 배양된 intact cell을 고농도 카드뮴 함유 배지와 카드뮴 무첨가 배지에서 각각 배양하면서 용균현상을 비교, 검토했다.

고농도 카드뮴 함유 배지에서 효모 세포를 고농도 카드뮴 함유 배지에 재배양 하면 고농도 카드뮴에 의해 용균이 방지 되었을 뿐 아니라 균사상 세포의 비율도 증가하여 배양 8일에 최고값을 나타냈으며, 카드뮴 무첨가 배지에 이 intact cell을 배양하면 배양 초기에 완전히 용균 되었다(Table II).

Table II. Culture Periods and Length of *Hansenula anomala* B-7 in the Broth Containing Cadmium.

Culture time (day)	Ratio of mycelial cell(%)		Length of mycelial cell
	without Cd ²⁺	with Cd ²⁺ 1,000 µg/ml	Cd ²⁺ 1,000 µg/ml
1	3.5 ± 1.7^b	4.2 ± 2.0	27.6 ^d
3	3.0 ± 0.7	4.2 ± 1.7	27.0
5	— ^c	8.7 ± 1.3	29.8
8	—	13.1 ± 0.6	32.6
10	—	4.1 ± 1.8	53.6
15	—	3.2 ± 1.1	46.7
20	—	3.1 ± 2.3	43.3
25	—	3.3 ± 1.6	37.4
30	—	3.4 ± 0.3	35.9

^a The inoculation seed culture cultivated in the same condition as Table I, and stored at 4°C for 35 days.

^b Standard deviation.

^c Difficulty to measure the length of mycelia because of cell lysis.

^d Values denote average of triple observation.

Table III. Cell Lysis of *Hansenula anomala* B-7 with Excessive Addition of Metal Ions^a.

Culture condition	Yeast cell after 24 hours
Basal medium	Lysis ^b
Basal medium with metal ion	No lysis, growth

^a The metal ions (Na⁺, K⁺, Fe²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Sn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, and Zn²⁺) added with the concentration of 1.7 M to the basal medium. The inoculation seed culture cultivated in the same condition as Table I, and stored at 4°C for 75 days.

^b The cell lysis observed with the light microscopes.

공시균이 17% NaCl 존재하에서도 생육하는 점 (Yu *et al.*, 1986)에 착안하여 고농도 카드뮴에서 배양된 intact cell을 10% NaCl 함유 배지에 배양하면 카드뮴의 효과와 같이 용균은 일어나지 않았다. 더욱이 카드뮴 이외의 1가 또는 2가의 금속이온에 의해서도 용균은 방지 되었다(Table III).

해양에서 분리한 *Pseudomonad* B-16 (ATCC 19855) 세포에 있어서, Mg²⁺는 세포벽의 peptidoglycan의 peptide subunit와 chelete complex를 형성하므로 Mg²⁺는 K⁺와 Na⁺보다 100-300배의 용균 방지 효과를 나타낸다(Leyman and MacLeod, 1975). 카드뮴이나 다른 금속에 의한 용균 방지 효과와 그 기구에 대하여는 잘 알려져 있지 않으나, 위의 결과로 용균 현상은 삼투압 조절과 관련이 있다고 추론할 수 있다.

摘 要

1,000 µg/ml의 카드뮴이 함유된 배지에서 배양된 고도 카드뮴 내성 *Hansenula anomala* B-7의 intact cell은 카드뮴이 함유되지 않은 배지에 재배양하면 쉽게 용균된다. 그러나 이 intact cell을 1,000 µg/

ml의 카드뮴이 함유된 배지에 배양하면 용균이 일어나지 않을 뿐 아니라 왕성하게 재증식 한다. 더욱이 재배양할시 Na⁺를 포함한 다른 금속을 배지에 첨가하더라도, 이 intact cell의 용균은 방지 되었다.

參考文獻

- Deacon, J. W. (1984): Introduction to modern mycology, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 38-39.
- Rayman, M. K. and MacLeod, R. A. (1975): Interaction of Mg²⁺ with peptidoglycan and its relation to the pervention of lysis of a marine *Pseudomonad*. *J. Bacteriol.* **122**: 650-659.
- Singleton, P. and Sainsbury, D. (1987): Dictionary of microbiology and molecular biology, 2nd ed., Wiley, New York, p. 623.
- Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A. and Weiner, A.M. (1987): Molecular biology of the gene (vol. 1), 4th ed., Benjamin, California, pp. 557-558.
- Yu, T. S., Song, H. I. and Chung, K. T. (1986): Characterization of a cadmium-ion tolerant strain of *Hansenula anomala*. *Kor. Jour. Microbiol.* **24**: 57-61.
- Yu, T. S., Park, J. M. and Song, H. I. (1987): Effect of Triton X-100 on intracellular accumulation of cadmium in *Hansenula anomala*. *Kor. Jour. Microbiol.* **25**: 110-116.
- Yu, T. S., Song, H. I. and Chung, K. T. (1990): Mechanism of cadmium accumulation into the cell of cadmium-ion tolerant yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 233-238.
- 송형익, 유대식. (1991): 카드뮴에 의한 *Hansenula anomala* B-7의 형태 변이. 한국 미생물학회지. **29**: 日高醇. (1989): 微生物學 辭典, 日本 微生物 學會, 技報堂出版(株), 東京, p. 531.

Accepted for Publication on November 15, 1991