

카드뮴이온에 의한 *Hansenula anomala* B-7의 형태 변이

송형익 · 유대식*

대구공업전문대학 식품공업과
*계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Morphological Changes of *Hansenula anomala* B-7 by Cadmium Ion

Song, Hyung Ik 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: Yeast-form cells of cadmium ion-tolerant *Hansenula anomala* B-7 were changed to mycelial cells in medium containing more than 400 $\mu\text{g/ml}$ of cadmium. Moreover, the mycelial cells were exchanged into clumped cells in a medium containing more than 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of cadmium. Optimal conditions of mycelial cell formation were achieved in the presence of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of cadmium with shaking cultivation for 7 days. Glucan and mannan contents of the yeast cell wall grown with 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of cadmium decreased by 10% compared with those grown without cadmium. However, protein and lipid contents increased about 20%, respectively. By cadmium, no significant findings in specific amino acid contents were discovered.

KEY WORDS □ *Hansenula anomala* B-7, Mycelial cell, Clumped cell, Morphological change by cadmium ion.

서 론

중금속은 미생물의 생육, 포자형성, 형태 및 생화학 활성 등에 큰 영향을 미치며 중금속의 독작용은 필수 관능기의 절단, 필수 금속이온의 대체 및 단백질의 입체구조의 변화 등에 의하여 나타난다(Collins and Stotzky, 1989). 유해 중금속의 일종인 카드뮴도 세균, 균류 및 조류 등에 폭넓게 독성을 나타내며, 카드뮴은 물질의 수송계의 변화, 효소단백질의 생합성 및 효소 활성의 변화 등을 야기시켜 독성을 발현한다 (Trevors *et al.*, 1986). 더욱이 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 카드뮴에 의하여 효모세포는 호흡 결핍과 미토콘드리아의 형태적 변이가 일어나며 (Lindegren and Lindegren, 1973), 담수규조 *Tabellaria flocculosa*의 세포는 카드뮴 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 존재하에서 변이가 일어난다는 보고 (Adsh-Simonsen *et al.*, 1981)도 있다.

충분한 아연 농도(1 $\mu\text{g/ml}$)와 5-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 카드뮴이 함유된 배지에 배양된 *Euglena gracilis*는 비정상적 세포분열에 의하여 기형화 세포로 형태적 변

이가 일어나며 (Nakano *et al.*, 1980), *Pseudomonas aeruginosa*의 세포는 끈끈한 물질(sticky material)을 생성하나 카드뮴(100 $\mu\text{g/ml}$) 함유배지에 배양된 세포는 끈끈한 물질을 전혀 생성하지 않는다(Horitsu *et al.*, 1979).

저자들은 아연 광산 지역에서 분리한 고도 카드뮴 내성 효모 *Hansenula anomala* B-7 (Yu *et al.*, 1986)의 카드뮴 내성, 균체내 카드뮴의 축적능 및 카드뮴의 축적기구 등을 연구하는 과정에서 고농도 카드뮴이 함유된 배지에 배양할시 공시 효모균의 효모상 세포에서 형태적 변이가 일어나는 것이 관찰 되었다.

본 연구에서는 카드뮴에 의한 상기 효모의 형태적 변이에 미치는 제요인을 규명함과 아울러 형태변이가 세포벽 조성에도 어떤 영향을 미치리라는 가정하에 세포벽 조성에 미치는 영향에 대하여도 검토했다.

재료 및 방법

공시균 및 배양

실험에 사용한 *Hansenula anomala* B-7은 Yu 등 (1986)에 의하여 분리된 고도 카드뮴 내성 효모이며, 공시균의 배양은 전보(Yu 등, 1987)에 준하였다.

형태 변이

세포수는 haemocytometer를 사용하여 직접 현미경하에서 측정했으며, 세포 및 균사상 세포의 크기는 micrometer를 사용하여 직접 측정했다. 균사상 세포의 비율은 총균수에 대한 백분율로 나타냈다.

모든 실험은 3회 반복 실험하여 표준 편차로서 통계 처리했다. 균사상세포와 균집세포의 형태는 위상차 현미경하에서 관찰하였다.

세포벽 조제 및 순도 검증

세포벽은 Sugano 등 (1975), Nunokawa 등 (1973)의 방법에 의하여 분리했다. 즉, 배양된 균체를 집균하여 0.05 M 인산 완충액 (pH 7.0)으로 4회 세척했다.

세척된 균체는 같은 완충액에 현탁하여 초음파 파쇄 (100 Hz, 120 min) 하면서 세포벽의 순도를 확인한 후, 원심분리하여 세포벽을 얻었다. 조제과정에서 세포벽 분해 효소에 의한 세포벽의 분해를 방지하기 위하여 파쇄 즉시 10% 식염수로 10회, 증류수로 4회, 95% 알코올로 2회 각각 반복 세척하여 순수한 세포벽을 얻었다. 세포벽은 105°C에서 18시간 건조하여 분말화시키고 desiccator에 보관하였다.

세포벽의 순도는 haemocytometer를 사용하여 파쇄율로 조사하였으며, 세척 중 순도는 Dyck(1964)의 방법에 의하여 흡광도로서 확인했다.

Glucan과 mannan의 정량

세포벽의 주성분인 glucan과 mannan은 Trevelyan Harrison(1952)의 방법에 따라 분획했다. 즉, 세포벽을 0.5 M HClO₄로 세척하고 원심분리하여 얻어진 침전물을 0.25 M Na₂CO₃로 100°C에서 45분간 glucan과 mannan을 추출했다. 추출물의 원심 상등액을 Fehling 용액으로 반응시켜 침전되는 mannan 회분을 얻었다. 0.25 M Na₂CO₃로 추출된 원심 침전물은 다시 0.5 M HClO₄로 100°C에서 30분간 추출하여 glucan 회분의 침전물을 얻었다.

얻어진 mannan과 glucan은 phenol-황산법 (Herbert 등, 1971)으로 정량했다.

일반성분의 정량

세포벽의 단백질은 Yamaguchi(1974)의 방법에 의하여 추출하고, Lowry법(1951)에 의하여 정량했다.

총지질은 Salton(1953)의 방법에 의하여 추출하고, Folch 등(1957)의 방법에 따라 불순물을 제거한 후, 분액 깔때기로 ether층을 분리하여 건조·정량했다.

총인은 Allen(1940)의 방법에 의하여 정량했다.

아미노산 조성

건조 세포벽 49.27 mg을 가수분해 시험관에 취하여 2-mercaptoethanol이 0.04% 함유된 6N HCl 6 ml를 넣고 동결상태에서 30분간 탈기·밀봉하여 110°C에서 24시간 가수분해 시켰다. 가수분해물은 45°C water bath에서 aspirator를 사용하여 감압농축하여 sodium citrate 완충액 (pH 2.2)으로 25 ml로 만든 후, 아미노산 자동분석기(Hitachi, model KLA-5)를

사용하여 분석했다. 아미노산 표준 용액은 Ajinomoto회사(일본)의 amino acid calibration mixture를 사용했다.

결 과

형태 변이

Hansenula anomala B-7을 500 µg/ml 카드뮴의 존재하에서 배양시 구형 또는 타원형인 효모상(Fig. 1-A)의 일부 세포가 균사상세포(mycelial cell)로 형태적 변이가 일어났다(Fig. 1-B). 더욱이 1,000 µg/ml 카드뮴의 존재하에서는 균사상의 일부세포가 뭉글게 뒤엉킨 균집세포(clumped cell)를 형성했다(Fig. 1-C).

카드뮴 농도와 형태 변이

카드뮴 농도에 의한 형태 변이 양상을 검토했다 (Table 1). 균사상 세포는 400 µg/ml 이상의 카드뮴에서 형성되었으며, 균사상세포는 효모상세포(5.3×6.1 µm)의 약 4배 정도로 길어졌으며 균사상세포의 출현 비율은 약 6% 정도였다. 공시균의 균사상세포 형성을 위한 최적 카드뮴 농도는 1,000 µg/ml 있으며, 균집세포는 1,000 µg/ml 이상의 카드뮴에서만 관찰되었다(Table 2).

공시균의 균사상세포의 형성시기를 검토하기 위하여 카드뮴 1,000 µg/ml 함유 배지에 공시균을 배양하면서 24시간마다 세포의 형태 변이를 관찰했다(결과 미표기).

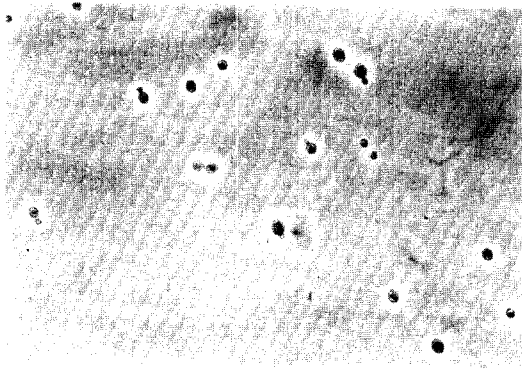
공시균은 배양 3일부터 균사상세포가 출현하였으며, 배양 7일에 가장 왕성한 균사상세포가 출현했다. 균사상세포의 길이는 배양 초기부터 조금씩 길어지는 경향이였다.

세포벽의 화학 조성

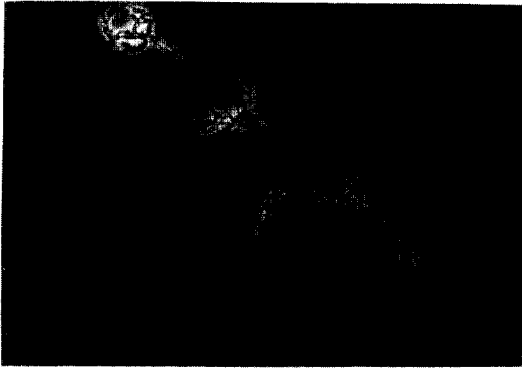
카드뮴 1,000 µg/ml를 함유한 배지에서 배양된 세포와 카드뮴 무첨가 배지에서 배양된 세포의 세포벽의 화학적 조성을 비교·검토하기 위하여, 집균한 균체를 120분간 초음파 파쇄 하면서 파쇄율을 조사한바, 파쇄율은 99% 이상이었다. 파쇄된 세포벽을 10% NaCl 용액으로 10회 세척한 후 세포내의 과립은 관찰되지 않았으며, 증류수로 4회 더 세척한 세척액의 260 nm에서의 흡광도는 0.01 이하였다. 이상의 방법으로 균체를 파쇄하고, 세척한 결과 세포벽은 균일하게 조제 되었음을 확인할 수 있었다. Table 3에 나타난 바와 같이 카드뮴 첨가 배양 세포의 세포벽의 glucan과 mannan 함량은 카드뮴 무첨가 배양 세포보다 10% 전후로 감소했으며, 단백질과 지질 함량은 카드뮴 첨가 배양세포가 카드뮴 무첨가 배양세포보다 약 20% 및 15% 증가했다.

인(P)의 함량은 2종류의 효모세포에서 변화를 나타내지 않았다.

세포벽의 아미노산 함량은 카드뮴 첨가 배양세포가 카드뮴 무첨가 배양세포보다 약간 높은 값을 나타내어 세포벽의 단백질 함량과 같은 경향이였다. 카드뮴에 의하여 공시균의 세포벽에 특정 아미노산은 검출되지



(A)



(B)



(C)

Fig. 1. Morphological Changes of *Hansenula anomala* B-7 Cells.

The yeast cells were cultivated in medium without cadmium for 1 day (A), and with 500 µg/ml of cadmium for 5 days (B) and with 1,000 µg/ml of cadmium for 7 days (C) at 28°C with shaking.

않았다(Table 4).

Tryptophan과 cystein은 산가수분해에 극히 불안정하므로 따로 측정하지 않았다.

Table 1. Effect of Cadmium Concentration on Mycelial Cell Formation.

Cadmium conc. (µg/ml)	Cell number (cells/ml)	Mycelial cell	
		Ratio (%)	Length (µm)
0	2.5×10^8	0	—
300	3.0×10^8	0	—
400	4.6×10^8	5.7 ± 1.3^a	24.1^b
500	6.0×10^8	5.9 ± 1.6	20.7

^aStandard deviation.

^bValues represent average of 3 experiments.

The yeast was grown in basal medium containing various concentrations of cadmium at 30°C for 7 days with shaking.

Inoculum size was 1.8×10^7 cells/ml.

Table 2. Time Course of Formation of Mycelial and Clumped Cell.

Cadmium conc. (µg/ml)	Days required for formation of	
	Mycelial cell	Clumped cell
400	3.3	—
500	3.6	—
1,000	3.0	3.3
2,000	4.3	7.3

Cultivated conditions were the same as those described in Table 1. Values denote average of 3 samples at 3 times.

고찰

고도 카드뮴 내성 효모 *Hansenula anomala* B-7을 카드뮴 400 µg/ml 이상 함유된 배지에 배양하면 구형 또는 타원형인 효모상세포의 일부는 균사상 (mycelial type)으로 변이되며 카드뮴 1,000 µg/ml 농도에서 왕성한 균사상세포를 형성한다. 1,000 µg/ml의 카드뮴 존재하에서 배양 3일부터 균사상세포가 나타나기 시작하여 배양 7일에 가장 왕성한 균사상세포가 관찰되었다. 더욱이 1,000 µg/ml의 카드뮴 존재하에서 배양된 세포는 균사상세포의 일부가 둥글게 뒤틀린 형태인 군집세포(clumped cell)를 형성한다.

중금속에 의한 진핵 미생물의 형태변이에 대해서는 거의 연구된바가 없다.

빵 효모세포의 미토콘드리아 크리스테는 10 µg/ml의 카드뮴에 의하여 크리스테가 소멸되어 호흡결핍이 일어나며 (Lindegren and Lindegren, 1973). 카드뮴 0.001 µg/ml에서 담수규조 *Tabellaria flocculosa*의 지그자그 형태로 연결된 세포가 직쇄상으로 변이된다는 보고(Adshead-Simonsen 등, 1981)가 있을 뿐이다. 본 연구에서와 같이 카드뮴이 효모상세포를 균사상으로 변이시키는 요인이나 이 균사상

Table 3. Chemical Composition of Cell Wall of the Yeast Grown with or Without Cadmium Ion.

Component	Content (mg/100 mg cell wall)	
	without Cd ²⁺	with Cd ²⁺ 1,000 µg/ml
Glucan	21.2	19.6
Mannan	15.4	13.4
Glucan/Mannan	1.4	1.5
Protein	4.3	5.1
Total lipid	8.1	9.3
Total phosphorus	2.9	2.8

Cultivated conditions were the same as those described in Table 1 except concentration of cadmium as indicated in the table.

Table 4. Amino Acid Composition of Cell Wall Prepared from the Yeast Grown with or Without Cadmium Ion.

Amino acid	Content (mg/100 g dry cell wall)	
	without Cd ²⁺	with Cd ²⁺ 1,000 µg/ml
Lysine	1,788.3	2,064.2
Histidine	514.7	586.5
Arginine	3,444.7	4,013.0
Aspartic acid	1,604.0	1,841.7
Threonine	1,070.0	1,137.7
Serine	928.5	1,148.5
Glutamic acid	1,841.7	2,166.5
Proline	878.8	956.8
Glycine	900.4	952.0
Alanine	1,109.6	1,130.5
Valine	1,186.2	1,302.6
Methionine	143.5	173.4
Isoleucine	1,081.2	1,237.9
Leucine	1,424.6	1,477.5
Tyrosine	596.7	726.5
Phenylalanine	885.8	1,193.3
Ammonia	1,143.3	1,298.0

The conditions were in accordance with those described in Table 3.

세포가 위균사(pseudomycelium)인지 등은 앞으로 검토 되어야 할 과제이다. 다만 고농도 카드뮴에 의한

균사상 세포로의 전환은 효모세포벽의 화학적, 생화학적, 생물물리화학적 성질의 변화와 관련이 있을 것이라 사료된다.

효모의 균집세포 형성은 세포벽의 표면에서 분비되는 당단백질로 이루어진 2종류의 성교착 물질(sexual agglutinin)이 서로 결합하기 때문인 것으로 알려져 있으며, 이러한 성교착 물질은 *Hansenula vingei*, *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Schizosaccharomyces pombe* 등에서 분리된 바 있다(日本微生物學會, 1989). 더욱이 이들 효모의 flocc 형성과도 관련시켜 생각할 수 있다. 맥주 효모를 stirred tank에서 장시간 배양하면 flocc 또는 pellet를 형성하며 flocc의 크기는 shear rate에 좌우되는 것으로 알려져 있다(Atkinson and Mavituna, 1983).

자연계에서 고농도인 1,000 µg/ml 이상의 카드뮴에 의한 효모의 균집세포 형성에 관하여는 전혀 보고된바 없다. *Hansenula anomala* B-7 세포는 3-4일 정도의 진탕배양으로 균집세포를 쉽게 형성한다는 것은 카드뮴이 점착성이 강한 세포외 고분자 물질의 분비를 촉진하기 때문이라 사료된다.

공시균의 세포벽중 glucan과 mannan 함량은 각각 21.2%와 15.4%로서 *Saccharomyces cerevisiae* D-71의 14.5%와 19.0%와는 비슷한 함량이었다(Chung 등, 1988). 중금속이 진핵세포의 세포벽 조성에 미치는 영향에 관한 연구는 단편적으로 이루어지고 있으며, *Cunninghamella blakesleeana*를 Cu 또는 Co 함유 배지에 배양하면 세포벽중의 인 함량은 2배 와 3배 각각 증가되며 hexosamine은 감소된다. 더욱이 Cu 함유 배지에 배양된 세포의 세포벽중에 hydroxyprolin이 특이적으로 나타나며 citrulline 함량이 비정상적으로 증가했다(Venkateswerlu and Stotzky, 1986).

본 연구에서도, 카드뮴에 의하여 세포벽중의 glucan과 mannan의 감소와 단백질과 지질 함량의 증가가 인정되었으며, *Cunninghamella blakesleeana*는 Cu에 의하여 인 함량이 증가하나 공시균에서는 카드뮴에 의하여 인 함량 변화는 없었다. 이상과 같은 세포벽의 화학적 조성의 변화는 카드뮴이 세포벽 형성에 영향을 미친다는 증거로 생각된다. 이러한 영향에 의하여 미생물 세포는 형태 변이를 유발하는 현상이 된다고 사료된다.

카드뮴의 존재로 아미노산 함량이 증가된 것은 세포벽의 단백질 함량이 증가되므로 나타난 당연한 결과라 하겠다.

적 요

고도 카드뮴 내성 효모, *Hansenula anomala* B-7을 400 µg/ml 이상의 카드뮴 함유 배지에 배양하면 효모상 세포는 균사상 세포를 형성하며, 1,000 µg/ml 이상의 카드뮴 함유 배지에서는 균사상세포가 균집세포를 형성한다. 균사상세포 형성의 최적 조건은 1,000 µg/ml의 카드뮴 존재하에서 7일간 배양이었다. 카드뮴 1,000 µg/ml 첨가 배양 세포의 세포벽의 glucan과 mannan 함량은 카드뮴 무첨가 배양 세포보다 약 10% 감소하나 단백질과 지질 함량은 약 20% 증가했으며, 특이한 아미노산의 함량 증감은 없었다.

참 고 문 헌

1. 日本 微生物 學會, 1989. 微生物學 辭典. 技報堂 出版 (株). 東京. p.289,563.
2. Adshear-Simonsen, P.C., G.E. Murray and D.J. Kushner, 1981. Morphological changes in the diatom, *Tabellaria flocculosa*, induced by very low concentrations of cadmium. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **26**, 745-748.
3. Allen, R.J.L., 1940. The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, **34**, 858-865.
4. Atkinson, B. and F. Mavituna, 1983. Biochemical engineering and biotechnology handbook, Macmillan. p. 20.
5. Chung, C.K., C.J. Kim and J.S. Lee, 1988. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S to zymolyase-20T. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 136-141.
6. Collins, Y.E. and G. Stotzky, 1989. Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. Metal ions and bacteria (Beveridge T.J. and R.J. Doyle), Wiley, New York. pp. 31-90.
7. Dyke, K.G.H., 1964. The chemical composition of the cell wall of the yeast, *Nadsonia elongata*. *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 374-384.
8. Folch, S., M. Lees and G.H. Sloan-Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
9. Herbert, D., P.J. Phipps and R.E. Strange, 1971. Chemical analysis of microbial cells. In methods in microbiology (5B) (Noris, J.R. and D.W. Ribbons, eds), Academic Press, New York. pp. 272-277.
10. Horitsu, H., H. Kate and M. Tomoyeda, 1979. Uptake of cadmium by a cadmium chloride-tolerant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ferment. Technol.*, **57**, 273-279.
11. Lindegren, C.C. and G. Lindegren, 1973. Mitochondrial modification and respiratory deficiency in the yeast cell caused by cadmium poisoning. *Mut. Res.*, **21**, 315-322.
12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.T. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
13. Nakano, Y., K. Abe and S. Toda, 1980. Morphological observation on *Euglena gracilis* grown in zinc-sufficient media containing cadmium ions. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2305-2316.
14. Nunokawa, Y., Y. Sato and K. Ouchi, 1973. Cell synthesis and flotability of cells in sake yeast. *J. Ferment. Technol.*, **51**, 551-559.
15. Salton, M.R.J., 1953. Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 512-523.
16. Sugano, N., S. Suzuki and H. Akiyama, 1975. Comparative study of the chemical composition of the cell walls of sake yeasts aggregating and non-aggregating with cellulose. *Nippon Noeikagaku Kaishii*, **49**, 141-148.
17. Trevelyan, W.E. and J.S. Harrison, 1952. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrate. *Biochem. J.*, **50**, 298-305.
18. Trevors, J.T., G.W. Stratton and G.M. Gadd, 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 447-464.
19. Venkateswerlu, G. and G. Stotzky, 1986. Copper and cobalt alter the cell wall composition of *Cunninghamella blakesleeana*. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 654-662.
20. Yamaguchi, H., 1974. Effect of biotin insufficiency on composition and ultrastructure of cell wall of *Candida albicans* in relation to its mycelial morphogenesis. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 217-228.
21. 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.
22. Yu, T.S., J.M. Park and H.I. Song, 1987. Effect of Triton X-100 on intracellular accumulation of cadmium in *Hansenula anomala*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **25**, 110-116.

(Received December 2, 1991)

(Accepted December 17, 1991)