

## 카드뮴 내성효모의 카드뮴축적에 미치는 계면활성제의 영향

송 형 익

대구공업전문대학 식품공업과

### Increased Uptake of Cadmium by Surfactants in a Cadmium-Tolerant Yeast

Hyung-Ik Song

Department of Food Technology, Taegu Technical Junior College

#### ABSTRACT

Cadmium uptake by growing and nongrowing (intact) cells of a cadmium-tolerant yeast *Hansenula anomala* B-7 in the presence of surfactants was studied. In growing cultures the addition of Triton X-100 or Tween 80 increased cadmium uptake by about 30% with no inhibition of cell growth, and in intact cells Triton X-100 increased cadmium accumulation by about 80% compared to surfactant-free controls. Considering balance between increased uptake and pollution, the addition of 0.1% Triton X-100 was preferable. By the mixed addition with defoamer silicone, during growth of cells Tween 80 or Triton X-100 enhanced uptake efficiency of cadmium compared to its single addition, whereas in intact biomass each of surfactants tested had no significant effect on cadmium uptake. The uptake of cadmium was observed to rise sharply to a maximum and then declined with increasing pH, and maximum accumulation of cadmium by growing and intact cells occurred at the pH of 6.0 and 7.0, respectively. A significant increase in cadmium uptake occurred with shaking culture. Cadmium uptake by growing and intact cells was almost completed during the culture time of 72 or 24 hrs, respectively. Scalded cells sorbed much more cadmium-ion than living cells.

**Keywords :** surfactant, *Hansenula anomala*, cadmium uptake, growing cells, intact cells

#### I. 서 론

산업활동의 결과로 배출되는 각종 중금속에 의한 환경오염은 날로 확대되어 가고 있다. 특히 유해 중금속인 카드뮴은 전기도금, 정련, 합금재료, 도료, 광업 등 다양한 산업폐수로부터 배출될 뿐만 아니라<sup>1)</sup> 인체에 강한 독작용<sup>2)</sup>과 함께 생태계에 미치는 영향이 크므로<sup>3)</sup> 이에 대한 대책이 절실히 요구된다.

카드뮴이 함유된 폐수로부터 카드뮴을 효과적으로 처리·제거하는 방법은 아직까지 침전, 산화, 환원, 이온교환 등 이화학적 방법에 의존하고 있다. 가장 널리 쓰이는 침전법은 카드뮴이 함유된 수용액의 pH를 알칼리성으로 하여 카드뮴을 용해도가 낮은 수산화물이나 황화물로 변화시켜 침전·제거하는 원리로 이루어진다. 그러나 이 방법은 pH를 높이는 데

한계가 있고 처리비용이 비교적 높을 뿐만 아니라 다량의 침전물이 생성되어 침전물 처리에도 상당량의 비용이 드는 등 문제점이 많으며 특히 저농도에서는 비효율적인 것으로 알려져 있다.<sup>4,5)</sup>

한편 세균, 방선균, 조류, 곰팡이, 효모 등과 같은 미생물을 이용하는 생물학적 방법은 미생물이 가지는 중금속 흡착능, 침전, 환원 등의 기능을 이용하는 것으로 최근 전통적인 방법의 보완 및 대체수단으로 그 필요성이 대두되고 있다.<sup>6)</sup> 폐수 중 카드뮴의 흡착제거에는 곰팡이, 효모, 조류 등이 이용되는데, 효모의 경우는 균체를 고정화하면 표면흡착능이 향상된다.<sup>5)</sup>

이처럼 미생물을 이용한 카드뮴의 흡착제거에는 카드뮴에 강한 내성을 가지는 내성균의 이용이 필수적이다. 이 점에 착안하여 저자 등은 아연광산지역에서 자연내성균 *Hansenula anomala* B-7을 분리하

여 카드뮴 내성, 세포내 카드뮴축적능, 축적기작, 카드뮴에 의한 형태변이 등을 검토한 바 있으며 계면활성제에 의한 균체내 카드뮴축적 촉진효과를 확인한 바 있다.<sup>7-10)</sup>

계면활성제와 미생물 관련 연구로서는 효모,<sup>11,12)</sup> 세균<sup>13)</sup>에서의 막투과성과 관련된 연구, 해양 녹조류<sup>14)</sup>에서의 중금속 흡수 촉진효과에 관한 연구, *Trichoderma reesei*<sup>15)</sup>가 생성하는 cellulase에 계면활성제를 첨가하면 계면효과에 의해 효소의 불활성이 지속적으로 감소된다는 연구 등 제한된 연구가 있을 뿐이고 카드뮴의 균체내 축적을 계면활성제와 관련된 시킨 연구는 거의 없다.

본 연구에서는 카드뮴 내성균 *Hansenula anomala* B-7의 균체내 카드뮴 축적능을 향상시킬 목적으로 계면활성제와 균체내 카드뮴 축적관계를 검토하였다. 즉 내성효모를 증식상태인 배양과정과 비증식상태인 intact cell로 구분하여 계면활성제 첨가효과, 최적 첨가조건 등을 검토함으로써 계면활성제의 이용가능성과 효율적인 첨가 방법을 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주

아연광산지역의 균원으로 부터 분리한 카드뮴 내성의 *Hansenula anomala* B-7을 사용하였다.<sup>7)</sup>

### 2. 배지 조제 및 카드뮴 첨가

균배양을 위한 기본배지로는 증류수 1,000 ml에 포도당 10 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 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 g을 넣어 녹인 후 pH를 6.0으로 조절하고 1 kg/cm<sup>2</sup>, 15분간 살균 후 냉각하였다. 균주 보존용으로는 기본배지에 한천을 넣은 고체 사면배지를 사용하였다.

카드뮴의 첨가는 stock solution (Cd<sup>2+</sup> 10,000 µg/ml)을 사용하여 균배양과정에서는 배지의 살균·냉각 후에, 효모현탁액 상태에서는 그대로 무균적으로 첨가하였다.

### 3. 배양과정에서의 카드뮴 축적

500 ml 삼각플라스크에 기본배지 100 ml를 넣어 살균·냉각하고 카드뮴 농도가 100 µg/ml가 되도록 첨가하였다. 이어 효모현탁액 1 ml (2.0 × 10<sup>7</sup> cells/ml)를 주입하고 진탕배양기로 30°C 에서 24시간동

안 진탕배양 (120 strokes/min, amplitude 7 cm)하여 카드뮴을 효모균체내에 축적시켰다. 축적이 완료된 배양액은 3,000 × g에서 10분간 원심분리 (Beckman, J 2-21)하고 균체를 증류수로 3회 세척하였다.

### 4. 효모현탁액 상태에서의 카드뮴 축적

카드뮴 무첨가의 기본배지에서 30°C, 24시간동안 진탕배양하고 원심분리에 의해 집균·세척한 비증식상태의 intact cell을 사용하여 카드뮴 축적 실험을 실시하였다. 뚜껑이 달린 플라스틱제 원심관 250 ml에 효모균체 일정량과 최종 카드뮴 농도 100 µg/ml에 해당하는 stock solution을 첨가하고 0.9% 식염용액을 주입하여 균체를 현탁시키면서 pH를 7.0으로 조정후 최종용량이 100 ml가 되도록 하였다. 이를 30°C에서 24시간 동안 진탕배양하여 균체내에 카드뮴이 축적되게 한 후 원심분리에 의해 집균하고 증류수로 3회 세척하였다.

### 5. 계면활성제 종류별 카드뮴 축적능

배양과정에서는 카드뮴 농도 100 µg/ml의 기본배지에 각 계면활성제의 농도가 0.1 %가 되도록 첨가하여 30°C에서 24시간 진탕배양하였다. 비증식상태에서의 축적능은 미리 배양하여 세척한 효모균체에 0.9 % 식염수를 가하여 현탁하고 여기에 카드뮴농도는 100 µg/ml, 각 계면활성제의 농도는 0.1 %가 되도록 첨가하여 같은 조건에서 배양하였다. 한편, silicone과의 혼합첨가에서는 1종 또는 2종의 계면활성제를 총농도 0.2 % 범위내에서 첨가하였다.

### 6. 계면활성제 농도별 카드뮴 축적능

Triton X-100농도별 영향에서 배양과정에서는 농도범위를 무첨가 및 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0 %로, intact cell 이용시는 무첨가 및 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 %로 조절하여 카드뮴 축적능을 조사하였다. 한편, 균 배양중 0.1 % silicone 존재 하에서의 Tween 80 농도별 영향은 기본배지의 Tween 80 농도가 무첨가 및 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5, 1.0 %가 되도록 조절하여 축적능을 조사하였다.

### 7. pH별 카드뮴 축적능

배양과정에서는 배지의 최종용량을 100 ml로 맞추기 전에 1N NaOH와 1N HCl을 사용하여 pH가

각각 3, 4, 5, 6, 7, 8이 되도록 조절하였으며, 효모현탁액의 pH영향은 0.9 % NaCl이 함유된 McIlvaine buffer(pH 3~8)를 사용하여 pH를 3~8범위내에서 0.5 단위로 조절하여 실험하였다.

### 8. 진탕에 따른 카드뮴 축적능

진탕속도 120 strokes/min, 진폭 7 cm를 표준으로 진탕배양하는 경우와 정지배양하는 경우의 카드뮴 축적효과를 배양과정과 intact cell로 구분하여 조사하였으며, 배양과정 실험에서는 균생육도의 차이도 함께 비교하였다.

### 9. 배양시간별 카드뮴 축적능

균배양과정에서는 균생육 상태를 고려하여 배양 개시전 및 배양개시후 12, 24, 48, 72, 96 시간째에, intact cell 이용시는 카드뮴 축적 시간을 고려하여 배양개시전 및 배양개시후 1, 3, 5, 8, 24, 30 시간째에 각각 카드뮴 축적능을 조사하였다.

### 10. Scalded cell의 조제

Scalded cell은 일정량의 효모균체(intact cell)를 0.9% 생리식염수에 현탁하여 이를 끓는 수욕상에서 5분간 교반하면서 가열하고 즉시 냉수에 담가 냉각시켜 조제하였다.

### 11. 균생육도 및 효모현탁액의 균체농도

균체내 카드뮴 축적실험에서 세척이 완료된 균체를 도가니에 넣어 105°C 에서 18시간동안 건조시키고 desiccator내에서 냉각시킨 후 칭량하였으며, 이를 균 생육도 또는 효모현탁액의 균체농도로 나타내었다.

### 12. 카드뮴 정량

균체내 카드뮴함량은 균체를 회화시킨후 원자흡광법으로 측정하였다.<sup>16,17)</sup> 칭량이 끝난 건조균체를 진기로내에서 490°C 에서 4시간동안 회화시키고 회화안된 물질을 분해하기 위하여 HClO<sub>4</sub>와 HNO<sub>3</sub>를 각각 2.5 ml씩 첨가하여 완전 증발될 때까지 가열·산화시켰다. 이를 방지하여 냉각시키고 1N HCl 10 ml를 주입한 상태에서 100°C 로 5분간 가열하여 카드뮴을 용출·이온화시킨 후 1N HCl로 100 ml가 되도록 하였다. 전처리가 끝난 시료는 원자흡광분광광도계(Shimadzu, AA-646)를 사용하여 흡광도를 측정하고 동일 조건에서 표준용액을 사용하여 얻어진 검량

선에서 균체내 카드뮴 함량을 산출하였다. 이때 측정 조건은 lamp current 5 mA, wave length 228.8 nm, silt width 0.38 nm, burner height 4 mm, a-cetylene 4.0 l/min, air 4.0 l/min 였다.

### 13. 시 약

카드뮴이온 stock solution 조제용 Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O와 카드뮴 정량용 표준용액(Cd<sup>2+</sup> 1.000 µg/ml)은 Hayashi Pure Chemical Co. 제, silicone은 Shinetsu Chemical Co. 제의 KM-70, Tween 80은 Junsei Chemical Co. 제, Triton X-100 및 Aerosol OT는 Wako Pure Chemical Industries 제, cetyltrimethylammonium bromide는 Tokyo Kasei Co. 제, peptone은 Kyokuto Pharmacia Co. 제, 효모 추출물은 Sigma Chemical Co. 제를 각각 사용하였으며 기타 일반 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 계면활성제 종류별 영향

시험균의 균체내 카드뮴축적에 미치는 계면활성제 종류별 영향을 검토하기 위하여 카드뮴 존재상태에서 비이온성, 양이온성 및 음이온성 계면활성제와 소포제를 균 배양과정과 비생육상태의 효모균체 현탁액에 첨가하여 24시간동안 진탕배양한 후 균체내 카드뮴 함량을 측정했다(Table 1).

균 배양과정에서의 계면활성제 영향을 보면, 비이온계인 Triton X-100과 Tween 80의 첨가배양에서는 균 생육에 영향을 주지 않으면서 균체내 총카드뮴 축적량이 무첨가에 비해 약 30% 정도씩 촉진되었으며 양이온계인 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)나 음이온계인 Aerosol OT의 경우는 균생육 및 카드뮴축적을 크게 저해하였다. 또한 소포제로 사용되는 silicone(KM-70)의 경우 균생육에는 촉진효과를 나타내었으나 카드뮴축적에는 오히려 저해 현상을 나타내었다.

한편 intact cell을 이용한 검토에서는 건조균체당 카드뮴함량 기준으로 Triton X-100 첨가조건에서 무첨가에 비해 81% 정도까지 카드뮴축적 촉진효과를 나타내어 가장 우수하였으며 Aerosol OT도 약 64%의 촉진효과를 나타내었다.

계면활성제의 영향을 종합해 보면, 비이온계는 균생육에 별다른 영향을 주지 않으면서 카드뮴의 균체내 축적을 촉진하는 것으로 나타나서 첨가효과가 크

**Table 1.** Effect of surfactant on cadmium uptake by growing and nongrowing cells of the *Hansenula anomala* B-7.

Surfactant added(0.1%)	Growing cells			Nongrowing cells	
	Growth(g, dry wt)	Total Cd <sup>2+</sup> uptake(mg)	%*	Cd <sup>2+</sup> uptake(mg/g dry wt)	%*
None	0.3310	5.02	100	4.01	100
Tween 80	0.4255	6.63	132	4.56	114
Triton X-100	0.3854	6.67	133	7.26	181
CTAB**	0.0207	0.05	1	4.29	107
Aerosol OT	0.1093	2.51	50	6.58	164
Silicone	0.5497	3.77	75	3.61	90

\* Values were expressed relative to surfactant-free control(none) which were taken as 100%

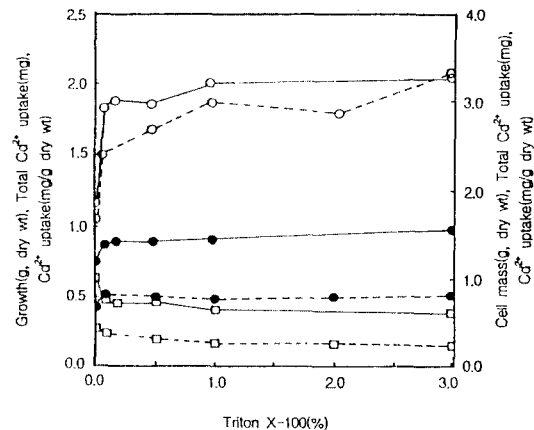
\*\* Cetyltrimethylammonium bromide

In growing cultures, the organisms were grown in basal medium containing 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and different surfactants with shaking at 30°C for 24 hrs, and the organisms were harvested and assayed for their cadmium contents. In experiments on cadmium uptake by using intact cells, the nongrowing cells pre-grown and harvested were resuspended at a biomass of approximately 0.035 g/l on dry basis in 0.9% saline containing 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and different surfactants, and incubated at 30°C for 24 hrs on a reciprocal shaker.

다고 할 수 있으며 Triton X-100이 가장 효과적이었다. 양이온계 및 음이온계는 균생육을 저해하므로 배양과정 중 첨가는 불가능하지만 intact cell 상태 첨가시는 카드뮴 축적효과가 인정되었다. 소포제는 균생육에 도움이 되지만 배양과정 중이나 비생육상태 모두에서 카드뮴 축적을 오히려 억제하는 경향이 있었다.

계면활성제에 의한 균체내 카드뮴 축적효과는 아직 분명히 해명되어 있지 않지만 Triton X-100의 경우 효모 세포막 투과성을 좋게 하거나 세포벽의 구조를 변화시켜 카드뮴의 균체내 축적을 촉진하는 것으로 추정된다. 이와같은 추정의 근거로서는, 계면활성제가 미생물 세포벽의 지질을 용해하여 세포벽을 파괴한다는 점,<sup>18)</sup> 세균 cell envelope의 단백질과 lipopolysaccharide가 계면활성제 처리에 의해 쉽게 추출된다는 보고,<sup>13)</sup> Triton X-100 처리가 효모세포 표면을 기능적으로 변화시켜 물질흡수를 촉진하는 유용한 수단이 된다는 보고,<sup>12)</sup> 효모세포에 permeability agent로 0.05% Triton X-100을 처리하면 고분자물질의 확산이 촉진되어 효소활성 측정이 용이하다는 보고<sup>11)</sup> 등을 들 수 있으며, 해양 녹조류의 중금속 흡수가 Triton X-100 첨가에 의해 다소 촉진된다는 보고<sup>14)</sup>가 이를 뒷받침한다고 할 수 있다.

양이온계 및 음이온계에 의한 균생육 저해는 이들 계면활성제의 일부가 미생물의 세포막 파괴 및 효소 단백질의 변성을 유발하여 소독제로 사용되고 있으므로<sup>19)</sup> 당연한 결과로 생각된다. 소포제의 균생육 촉진은 배양과정에서의 소포작용으로 인한 산소이용



**Fig. 1.** Effect of Triton X-100 concentration on cadmium uptake by growing cultures (full lines) and intact cells (dotted lines) of the *Hansenula anomala* B-7.

In growing cultures, the organisms were grown in basal medium containing 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and different concentrations of Triton X-100 with shaking at 30°C for 24 hrs, and then the uptake of cadmium by harvested and washed cells was determined. In experiments on cadmium uptake by intact biomass, the organisms were pre-grown in cadmium-free basal medium, and harvested and washed 3 times in distilled water. Cells were resuspended in 0.9% saline containing 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and different concentrations of Triton X-100, and incubated with shaking at 30°C for 24 hrs.

Symbols : □, cell growth or cell mass (g, dry wt) ; ●, total cadmium uptake (mg) ; ○, cadmium uptake (mg/g dry wt)

의 용이성과 관련이 있는 것으로 보인다.

Aerosol OT나 CTAB의 경우 균생육은 크게 저해되지만 카드뮴 축적은 오히려 촉진되는 결과를 나타내었다. 이는 dead cell이 living cell에 비해 더욱 많은 양의 중금속을 흡착한다는 보고<sup>20)</sup>와 무관하지 않을 것으로 사료되어 추후 검토가 요망된다.

## 2. Triton X-100 농도의 영향

카드뮴 축적효과가 가장 우수하고 균생육에도 영향이 별로 없는 Triton X-100 을 사용하여 배양과정과 intact cell을 대상으로 Triton X-100 첨가농도에 따른 영향을 조사하였다(Fig. 1).

배양과정이나 intact cell 모두 Triton X-100 0.1% 첨가조건에서 무첨가에 비해 카드뮴축적 촉진효과가 가장 크게 나타났으며 그 이상의 농도에서는 농도가 커질수록 축적량은 증가하지만 축적속도는 완만하였다. 균 생육은 Triton X-100 첨가량 증가와 더불어 다소 저해되는 경향이었으나 저농도에서는 그 영향이 거의 없었다.

한편, 계면활성제는 그 자체가 수계에서 BOD 부하의 원인이 되고 50 mg/l 정도의 농도에서는 미생물의 유기물 분해를 억제하며,<sup>21)</sup> 과량 존재시 유기물의 응집효과를 감소시켜 폐수처리를 방해하는 것으로 알려지고 있다.<sup>22)</sup> Triton X-100의 축적 촉진효과와 오염문제를 동시에 고려할 때 축적 촉진효과가 나타나는 범위내에서 Triton X-100 의 첨가농도를

가능한 한 저농도로 설정해야 하며 따라서 0.1% 첨가가 가장 바람직하리라 사료되었다.

## 3. 계면활성제와 silicone 혼합첨가의 영향

균배양 과정에서 발생하는 거품을 제거하여 원활한 배양을 도모하기 위한 방법으로 소포제 silicone의 이용가능성을 고려하였다. silicone (KM-70)의 단독첨가는 앞서의 실험에서 처럼 생육중인 균체나 전배양한 균체에서 카드뮴축적을 억제하므로 다른 계면활성제와의 혼합첨가효과를 조사하였다(Table 2). 소포제는 저농도 일 때 폐수처리과정에서 거의 문제가 되지 않는다는 점<sup>22)</sup>도 고려되었다.

배양과정에서의 영향을 보면 silicone (KM-70) 0.1% 존재하에서 Tween 80 0.1% 첨가시 균생육 촉진효과와 함께 무첨가 대비 약 60 % 정도의 촉진효과를 보여 가장 우수하였으며, Triton X-100 0.1% 첨가시는 무첨가에 비해 균생육이 부진하였으나 균체내 카드뮴축적은 45% 정도 촉진되어 비교적 높게 나타났다. 따라서 비이온계인 Tween 80과 Triton X-100 이 모두 단독첨가시의 약 30%에 비해 카드뮴 축적효율이 크게 향상된 셈이다. 한편 Aerosol OT 0.1% 첨가시는 균생육의 현저한 감소에 비해서는 비교적 다량의 카드뮴을 균체내에 축적하였는데 이는 앞서도 언급한대로 강한 독작용 때문에 균생육 억제와 함께 세포를 사멸시킨 결과<sup>20)</sup>로 생각된다.

또한 silicone과 더불어 Tween 80과 Triton X-

**Table 2.** Effect of surfactant in the presence of silicone on cadmium uptake by growing and nongrowing cells of the *Hansenula anomala* B-7.

Surfactant added	Growing cells			Nongrowing cells	
	Growth(g, dry wt)	Total Cd <sup>2+</sup> uptake(mg)	%*	Cd <sup>2+</sup> uptake(mg/g dry wt)	%*
None	0.6023	3.51	100	3.42	100
Silicone 0.2%	0.6401	3.21	91	3.75	110
Silicone 0.1%	0.6439	5.62	160	3.48	102
+Tween 80 0.1%					
Silicone 0.1%	0.4753	5.10	145	3.34	98
+Triton X-100 0.1%					
Silicone 0.1%	0.1772	2.99	85	3.88	113
+Aerocol OT 0.1%					
Silicone 0.07%	0.5053	3.12	89	3.41	100
+Tween 80 0.07%					
+Triton X-100 0.07%					

\* Values were expressed relative to control(none) which were taken on 100%

Experimental conditions were the same as those described in Table 1 except that biomass in cell suspension was approximately 0.027 g/l on dry basis.

100을 함께 첨가한 조건에서는 무첨가에 비해 균생육에는 큰 영향이 없으나 카드뮴축적은 다소 억제되어 예상과는 다른 결과였다.

비생육상태의 효모균체를 이용한 경우는 전반적으로 별다른 영향이 없는 것으로 나타나서 혼합첨가의 효과가 인정되지 않았고, 단독첨가에 비해서도 오히려 축적효율이 떨어졌다. 다만 Aerosol OT는 다소 높은 축적효과를 보여 주목되었다.

Silicone과의 혼합배양에서 계면활성제의 영향이 다양하게 나타난 것은 계면활성제의 이온성, 이화학적 성질, 독성 등이 효모세포의 생육이나 막투과성에 각기 다른 영향을 미치기 때문이 아닌가 사료된다.

이와는 별도로, 배양과정 실험에서 가장 우수한 혼합첨가 효과를 보였던 Tween 80을 이용하여 silicone (KM-70) 첨가농도를 0.1%로 고정한 조건에서 Tween 80의 첨가농도별 영향을 조사하였다 (Fig. 2).

대체로 저농도 (0.05~0.2%)에서는 카드뮴 축적효

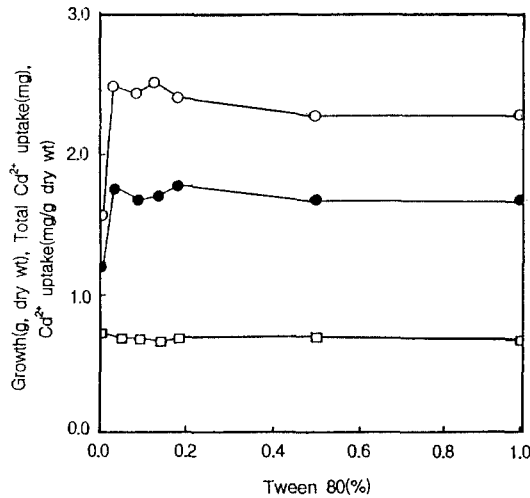


Fig. 2. Effect of Tween 80 concentration in the presence of 0.1% silicone on cadmium uptake by growing cells of the *Hansenula anomala* B-7.

The organisms were grown in basal medium containing 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and different concentrations of Tween 80 with shaking at 30°C for 24 hrs, and then the uptake of cadmium by harvested and washed cells was determined.

Symbols : □, cell growth (g, dry wt) ; ●, total cadmium uptake (mg) ; ○, cadmium uptake (mg/g dry wt)

과가 silicone 단독 첨가, 즉 Tween 80 무첨가에 비해 50% 정도 크게 촉진되었으며 고농도일수록 축적 효과가 다소 떨어졌다. 그러나 균생육에는 별다른 영향이 없었다. 따라서 실제 이용에서는 환경에 미치는 영향을 고려할 때 0.05% 첨가가 가장 바람직하였다.

#### 4. 초기 pH의 영향

배양과정과 intact cell로 구분하여 카드뮴의 균체 내 축적에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하였다. 수

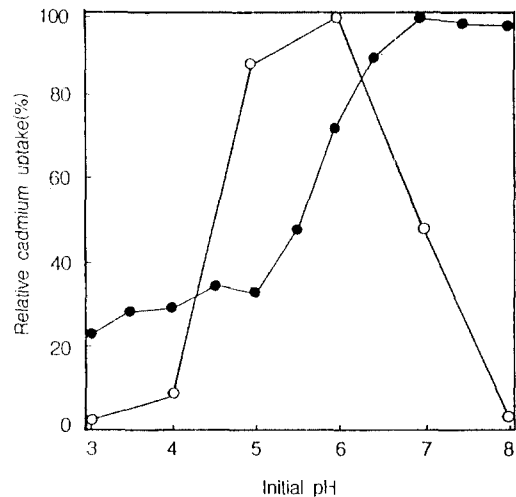


Fig. 3. Effect of initial pH on cadmium uptake by growing cultures (open symbols) and intact cells (closed symbols) of the *Hansenula anomala* B-7.

In growing cultures, the organisms were grown in basal medium containing 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and 0.1% Triton X-100 with shaking at 30°C for 24 hrs, and the uptake of cadmium by washed cells was determined. The pH was adjusted in increments from 3 to 8 using either 1N HCl or 1N NaOH prior to adjusting the final medium volume to 100 ml. In experiments on cadmium uptake by using intact biomass, the nongrowing cells pre-grown and harvested were resuspended at a biomass of approximately 0.028 g/l on dry basis in McIlvaine buffer (pH 3-8) containing 0.9% NaCl, 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and 0.1% Triton X-100. Cells were incubated with shaking at 30°C for 24 hrs. Each point was an average of two experiments.

Symbols : ○, relative cadmium uptake (%) based on total cadmium contents (mg) in cells ; ●, relative cadmium uptake (%) based on mg per g of dry wt.

용액의 pH가 알칼리성으로 되면 일반적으로 중금속은 용해도가 낮은 수산화물이나 황화물로 되어 침전한다.<sup>53</sup> 이 원리를 이용하면 이화학적 방법으로 중금속을 제거할 수 있다.

카드뮴의 경우는 pH 7.5 까지는  $Cd^{2+}$  상태로 존재하지만 그 이상에서는  $CdOH^+$ 가 나타나기 시작하는 것으로 알려지고 있어서<sup>54</sup> 본 실험에서는 카드뮴이  $Cd^{2+}$  상태로 존재하도록 pH 영역을 3~8 범위로 조정하였다.

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 *Hansenula anomala* B-7의 균체내 카드뮴 축적은 대체로 pH의 상승과 함께 급격한 증가를 보이다가 최고값을 나타낸 후 크게 감소하는 경향이있으며 최고값은 배양과정에서는 pH 6.0, 비증식상태에서는 pH 7.0에서 나타났다. 배양과정에서는 pH의 영향을 크게 받아 pH 7.0에서도 최고값의 약 50%정도 카드뮴 축적이 저해되었으며 pH 3.0과 pH 8.0에서는 축적이 거의 일어나지 않았다. 한편 intact cell의 경우는 배양과정에 비해 상대적으로 pH 영향을 덜 받는 것으로 나타났으나 pH 8.0을 제외하고는 pH 변화에 따른 편차는 여전히 컸다.

pH의 영향은 대단히 복잡하며, 일반적으로 pH가 증가함에 따라 중금속의 수산화물, 산화물 등의 형성과 함께 중금속 이온의 세포내 투과가 촉진된다.<sup>55</sup> 본 실험에서도 pH가 비교적 높은 중성영역에서 카드뮴 축적량이 증가하는 것으로 나타났다.

양이온을 띠는 중금속의 음이온을 띠는 미생물세포에의 흡착은 pH 의존적이고, pH 의존성은 특정 중금속과 세포 흡착부위와의 친화성에 따라 변화된다. 따라서 중금속 흡착의 최적 pH도 균주에 따라 달라진다.<sup>56</sup> 카드뮴의 pH 의존성을 진핵세포에 한정할 때 *Aureobasidium pullulans*의 경우 pH가 6.5보다 낮을수록 카드뮴의 표면흡착과 세포내 축적이 크게 감소되었다.<sup>57</sup>

## 5. 진탕의 효과

균체내 카드뮴 축적양상을 Triton X-100 0.1% 첨가상태에서 정치배양과 진탕배양으로 나누어 조사하였다(Fig. 4).

배양과정에서는 진탕배양이 정치배양에 비해 균체내 총카드뮴 함량이 약 2배정도, 균생육도는 약 4배 증가한 것으로 나타나서 진탕배양이 훨씬 효과적이었다. 또한 intact cell을 이용한 경우도 건조 균체당 카드뮴 함량기준으로 진탕배양이 정치배양보다 약 3배의 축적효과를 나타내어 진탕배양이 역

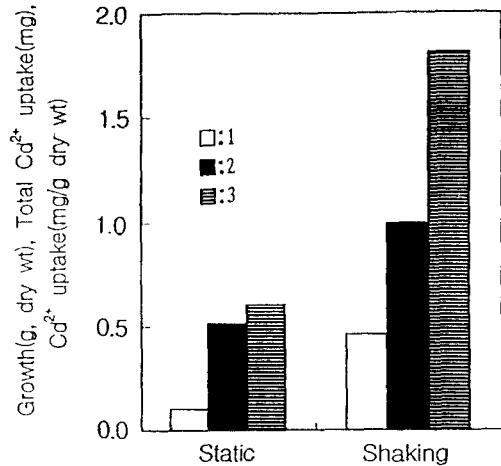


Fig. 4. Effect of shaking on cadmium uptake by growing cultures and intact cells of the *Hansenula anomala* B-7.

Symbols : 1, cell growth (g, dry wt) in growing cultures ; 2, total cadmium uptake (mg) in growing cultures ; 3, cadmium uptake (mg/g dry wt) by intact cells.

In growing cultures, the organisms were grown in basal medium containing 100  $\mu\text{g/ml}$   $Cd^{2+}$  and 0.1% Triton X-100 at 30°C for 24 hrs. In experiments on cadmium uptake by using intact cells, the nongrowing cells pre-grown and harvested were resuspended at a biomass of approximately 0.045 g/l on dry basis in 0.9% saline containing 100  $\mu\text{g/ml}$   $Cd^{2+}$  and 0.1% Triton X-100, and cells were incubated at 30°C for 24 hrs.

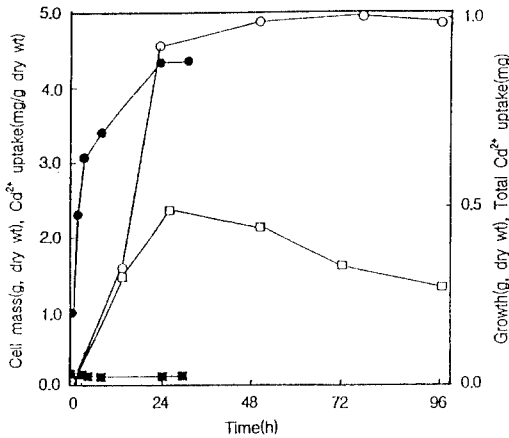
시 우수하였다. 결국 배양과정에서 보다는 intact cell을 이용하는 편이 진탕효과면에서 훨씬 유리한 셈이다.

진탕배양에 의한 균체내 카드뮴축적 촉진효과는, 배양과정실험의 경우 균생육촉진이 균체내 총카드뮴 함량을 증가시킨 결과로 사료되며, intact cell의 경우는 효모세포 표층부위의 산소투과성과 카드뮴 축적 사이에 정(positive)의 상관관계가 성립되기 때문이 아닌가 추측된다.

## 6. 배양시간의 영향

균체내 카드뮴축적에 미치는 영향을 배양시간별로 조사하여 Fig. 5에 나타내었다.

균배양과정에서의 영향을 보면 균생육은 배양 24시간에 가장 왕성하고 이후는 점차적으로 감소하였으



**Fig. 5.** Time course of cadmium uptake during growth of cells (open symbols) and by intact cells (closed symbols) of the *Hansenula anomala* B-7.

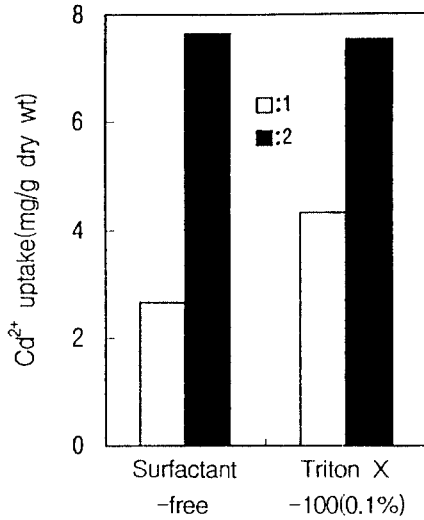
Experimental conditions were the same as those described in Fig. 4 except for biomass and incubation time.

Symbols : □, cell growth (g, dry wt) ; ■, cell mass (g, dry wt) ; ○, total cadmium uptake (mg) during growth of cells ; ●, cadmium uptake (mg/g dry wt) by intact cells.

며, 균체내 카드뮴 축적량은 배양 24시간까지 빠른 속도로 증가하다가 점차 그 증가속도가 둔화되어 배양 72시간만에 최고치를 나타내었다. 균생육이 최고치를 나타내는 정지기, 즉 24시간 이후에도 카드뮴은 균체내에 계속적으로 축적되므로 생육과 카드뮴 축적양상은 일치되지 않았다. 이런 결과는 카드뮴의 축적이 균생육의 후기에 활발하게 일어난다는 보고<sup>26,27)</sup>와 거의 일치하였으며, 카드뮴의 축적이 효모의 대사 작용과도 관련이 있음을 시사해 주었다.<sup>28)</sup>

Intact cell에 의한 카드뮴축적의 시간별 영향을 보면, 전반적으로 배양시간 경과와 더불어 축적량이 늘어나지만 배양초기인 5시간까지는 축적량이 거의 직선적으로 증가하다가 이후부터 8시간째까지는 축적속도가 다소 둔화되며 8시간 경과후에는 축적속도가 아주 완만하여 배양 24시간으로 축적이 거의 완료되었다.

*Citrobacter*의 resting cell을 1 mg/ml 카드뮴을 함유한 Tris buffer에 현탁한 조건에서, 카드뮴축적은 15시간 정도까지는 빠른 속도로 증가하다가 이후는 상당히 둔화되며 24시간경부터는 거의 일정수준의 축적량을 유지하였다.<sup>24)</sup>



**Fig. 6.** Effect of Triton X-100 on cadmium uptake by living(intact) and scalded cells of the *Hansenula anomala* B-7.

Symbols : 1, living cells ; 2, scalded cells.

Scalded cells were prepared by heating of living(intact) cells suspended in 0.9% saline for 5 min. in boiling waterbath and cooling immediately in cold water. The living or scalded cells were resuspended at a biomass of approximately 0.011 g/l on dry basis in 0.9% saline containing 100 µg/ml Cd<sup>2+</sup> and then incubated at 30°C for 24 hrs on a reciprocal shaker.

균배양과정과 intact cell을 비교할 때, intact cell의 경우가 배양과정에 비해 카드뮴 축적이 시간적으로 훨씬 빠르게 일어나며 단위균체당 축적량도 훨씬 많았다. 이상의 결과는 효모균체가 폐수중 카드뮴의 유용한 흡수제(biosorbent)로 이용될 수 있을 가능성을 제시해 주었다.

**7. Living cell과 scalded cell의 카드뮴 축적능 비교**

앞서 계면활성제 종류별 검토에서 음이온계 Aerosol OT는 강한 균생육 억제작용에도 불구하고 intact cell에 사용시 높은 카드뮴 축적효과를 나타내어 주목되었다. 균 생육억제는 Aerosol OT의 강한 독성에 기인하며, intact cell에 이를 첨가하면 세포가 사멸한다. 더욱이 dead cell이 living cell에 비해 많은 양의 카드뮴을 흡착한다는 보고<sup>20)</sup>가 있고 보면 Aerosol OT의 높은 카드뮴축적은 세포의 사멸 때문이 아닌가 추정된다.



이 점에 착안하여, 실제로 intact cell, 즉 living cell로부터 dead cell, 즉 scalded cell을 조제하여 Triton X-100 첨가유무에 따른 카드뮴 축적양상을 비교 검토하였다(Fig. 6). living cell을 이용한 scalded cell 조제과정에서 끓는 수욕상에서의 가열 시간이 5분이상이면 대부분의 효모세포가 사멸되므로 여기서는 5분동안 가열하여 scalded cell을 조제하였다.

Triton X-100 첨가유무에 따른 영향을 보면, Triton X-100의 첨가로 living cell에서는 60% 이상의 카드뮴축적 촉진효과가 인정되었으나 생물학적 활성을 상실한 scalded cell에서는 거의 영향이 없었다. 이는 본 효모에 의한 카드뮴의 세포내 축적이 대사작용에 의해 일어남을 뒷받침해 주며,<sup>8)</sup> Triton X-100의 첨가로 세포막 integrity에 변화를 일으킨 결과로 보여진다.

Living cell과 scalded cell의 카드뮴 축적정도를 비교해 보면, Triton X-100 첨가여부와 무관하게 scalded cell의 경우가 living cell에 비해 훨씬 많은 양의 카드뮴을 축적하였으며 축적량 또한 거의 동일하였다. 따라서 scalded cell의 카드뮴 축적은 생물학적 활성보다는 세포표층부위에 일어나는 강한 물리적인 흡착에 기인하는 것으로 추정할 수 있었다.

#### IV. 결 론

계면활성제가 카드뮴내성효모 *Hansenula anomala* B-7의 카드뮴축적에 미치는 영향을 조사하였다. 배양과정에서는 Triton X-100과 Tween 80이 균 억제없이 약 30%의 촉진효과를 나타내었고, 비중식세포에서는 Triton X-100이 80%의 축적 촉진효과를 나타내었다. 농도별로는 축적 촉진효과와 오염을 고려할 때 Triton X-100 0.1% 첨가가 바람직하였다. 소포제 silicone과의 혼합첨가시 배양과정에서는 Tween 80과 Triton X-100이 단독첨가보다 축적효율이 향상되었으나 intact cell에서는 어떤 계면활성제도 축적효과가 인정되지 않았다. 카드뮴의 축적은 pH의 상승과 더불어 급격히 증가하다가 최고값을 나타낸 후 크게 감소하는 경향을 보였으며 최고값은 배양중에는 pH 6.0, intact cell의 경우 pH 7.0 에서 나타났다. 진탕배양이 정지배양에 비해 카드뮴축적에 효과적이었고 배양기간별로는 배양중에는 72시간

째에, intact cell의 경우 24시간째에 카드뮴축적이 거의 완료되었다. 또한 scalded cell이 living cell에 비해 카드뮴축적량이 훨씬 많았다.

#### 감사의 글

본 연구는 1995년도 대구공업전문대학 학술연구 조성비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- 1) 後藤 穠, 池田正之, 原 一郎 : 産業中毒便覽, 醫齒藥出版(株), 東京, 1977.
- 2) Menner, J. H. : Cadmium toxicity. vol 15, Marcel Dekker, Inc., New York, 1979.
- 3) Nriagu, J. O. : Cadmium in the environment. part I. Ecological cycling. John Wiley & Sons, Inc, Somerset, 1980.
- 4) Jeong, B.C. and Macaskie, L.E. : Heavy metal removal by microorganisms. Use of immobilized cells, 微生物과 産業, 19(4), 2-13, 1993.
- 5) 龍口 洋 : 重金屬의 微生物による 吸着除去法, 水處理技術, 36(1), 35-47, 1995.
- 6) 龍口 洋 : 微生物による 有害金屬의 沈殿および 還元除去, 水處理技術, 35(12), 607-619, 1994.
- 7) Yu, T. S., Song, H. I. and Chung, K. T. : Characterization of a cadmium-ion tolerant strain of *Hansenula anomala*, *Kor. Jour. Microbiol.*, 24(1), 57- 61, 1986.
- 8) Yu, T. S., Song, H. I. and Chung K. T. : Mechanism of cadmium accumulation into the cells of cadmium-ion tolerant yeast, *Kor. J. Appl. Microbiol Biotech*, 18(3), 233-238, 1990.
- 9) 송형익, 유대식 : 카드뮴이온에 의한 *Hansenula anomala* B-7의 형태변이, 한국미생물학회지, 29(6), 397-401, 1991.
- 10) Yu, T. S., Song, H. I. and Chung, K. T. : Intracellular accumulation of cadmium by intact cadmium tolerant yeast cells, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 17(1), 29-34, 1989.
- 11) Miozzari, G. F., Niederberger, P. and Huetter, R. : Permeabilization of microorganisms by Triton X-100, *Analytical Biochemistry*, 90, 220-233, 1978.
- 12) Kimura, A., Arima, K. and Murata, K. : Biofunctional change in yeast cell surface on treatment with Triton X-100, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2627-2629, 1981.
- 13) Moriyon, I. and Berman, D. T. : Effect of non-ionic, ionic and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope, *J. Bacteriol.*,

- 152(2), 822-828, 1982.
- 14) Hao, Y., Zhao, Y. and Ramelow, G. J. : Uptake of metal ions by nonliving biomass derived from marine organisms. Effect of pH and chemical treatments, *J. Environ. Sci. Health*, A29(10), 2235-2254, 1994.
  - 15) Kim, M. H., Lee, S. B., Ryu, D. D. Y. and Reese, E. T. : Surface deactivation of cellulase and its prevention. *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 99-103, 1982.
  - 16) 日本化学會：カドミウム, 丸善(株), 東京, 1977.
  - 17) 日本分析化学會 關東支部：公害分析指針 7, 公立出版社, 東京, 1973.
  - 18) 김승욱, 이진석, 정용섭, 조영일, 홍 석 : 생물화학공학, 최중당, 1994.
  - 19) 古田辛子, 河合芳子 : 界面活性劑の抗菌性について, 織消誌, 15, 460-464, 1974.
  - 20) Kurek, E., Czaban, J. and Bollag, J. -M. : Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(5), 1011-1015, 1982.
  - 21) 박홍수 : 계면활성제와 공해(II), 한국섬유공학회지, 15(1), 32-39, 1978.
  - 22) 유현종 : 섬유에 적용되는 실리콘 물질의 환경에 대한 영향과 시장, 신기술, 9(8 / 9), 21-44, 1995.
  - 23) Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R. : Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp., *J. Gen. Microbiol.*, 130, 53-62, 1984.
  - 24) Gadd, G. M. : Heavy metal pollutants, Environmental and biotechnological aspects, Encyclopedia of microbiology, vol 2. Academic Press, Inc, 1992.
  - 25) Mowll, J. L. and Gadd, G. M. : Cadmium uptake by *Aureobasidium pullulans*, *J. Gen. Microbiol.*, 130, 279-284, 1984.
  - 26) Yu, T. S. and Song, H. I. : Cultural conditions of heavy metal-ion tolerant microorganisms and accumulation of heavy metal-ion into the cells, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 9(2), 59-64, 1981.
  - 27) 村山徹郎, 遠山 鴻, 内貴信夫 : 酵母の重金屬耐性について, 酵母における適應と制御, 長谷川武治 編, 學會出版センター, 東京, 1977.