

섬유소 가수분해효소와 Chitinase 처리에 의한 균류 원형질체 생성에 관한 연구

오 승희·장 명호
포항실업전문대학 식품공업과
(1981년 2월 17일 수리)

Formation of Fungal Protoplast by the Reaction of Cell Wall Lytic Enzymes

Sung Hi Oh and Myung Ho Chang

Department of Food Technology, Pohang Junior College, Pohang 680

(Received February 17, 1981)

Abstract

Osmotically sensitive fungal protoplasts were liberated from the mycelium of several kinds of molds by mixed enzyme system of cellulase from *Trichoderma viride* TO4 and chitinase from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. 115-5. Relatively higher number of protoplast were released from young mycelium of Zygomycetes strains than Ascomycetes strains by using 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) and 0.6 M NaCl as osmotic stabilizer.

Protoplasts were released through ruptures in the wall, initially at the apices, but later also from old parts of the hyphae.

서 론

균류의 미생물들은 외부에 매우 견고한 복합 다당류들의 세포벽으로 구성되어 있어 균체의 이용면에서나 세포막 관련성의 효소등을 연구하는데 직접적으로 방해가 되어왔다. 이들의 세포벽을 제거함으로써 형성되는 원형질체(protoplast)는 세포막의 조제, 세포핵, 미토콘드리아(mitochondria), 원형질체의 분리, 삼투압의 연구, 세포투과성의 연구, 단백질 효소 등의 합성과 위치, 세포벽 생합성, 항생물질과 표면장력제의 작용양상, Heterokaryon의 생성등의 연구자료로서 이용되어지고 있다⁽¹⁾. 진균류의 세포벽은 주로 N-acetylglucosamine의 $\beta(1,4)$ 결합의 중합체인 chitin 질과 glucose

의 $\beta(1,4)$ 결합인 cellulose 및 glucosyl residue의 $\beta(1,6)$, $\beta(1,3)$ 결합의 중합체인 glucan 등이 망상모양으로 얽혀져 있으며 어떤 경우에는 mannan 등이 당백질층과 인산 결합으로 연결되어 있다⁽²⁾. 이들 세포벽 구성 성분인 복합다당류들을 쉽고 안전하게 가수분해하여 제거시키기 위한 효소작용에 의한 진균류 세포벽에 관한 연구는 주로 Snail juice enzyme(helicase)을 이용한 것들이며 미생물효소를 이용한 것으로서 곰팡이류의 균사체로부터 원형질체 생성은 Aguirre⁽³⁾, Garcia⁽⁴⁾, Sietsma⁽⁵⁾, Tanaka⁽⁶⁾, Vries⁽⁷⁾ 등에 의한 *Streptomyces* sp. 또는 *Trichoderma viride*, *Bacillus circulans* 로부터 생성되는 glucanase를 단용으로 이용한 것들이다. 그리고 Anne⁽⁸⁾ 등에 의하여 섬유소 가수분해효소(cellulase), sulfase와 strepzyme의 복합

효소 처리에 의한 *Penicillium chrysogenum*의 원형질체생성에 대한 연구가 발표되었다. 효모류의 세포벽 분해에 따른 원형질체에 대한 연구는 Yamamura⁽¹³⁾ 등을 비롯한 많은 연구가에 의하여 이루어지고 있다. 이에 우리들은 원형질체연구의 중요성과 원형질체의 생성에 관한 내국인의 연구논문들 거의 찾아볼 수 없었기에 *Trichoderma viride* TO4와 *Streptomyces* sp. 115-5를 배양하여 얻은 효소를 혼용한 결과 우수한 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 섬유소가수분해효소는 *Trichoderma viride* TO4를 배양하여 얻었으며 chitinase는 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. 115-5를 배양하여 얻었다. 균사체를 얻기위한 각종 진균류로는 *Ascomyces*로서 *Aspergillus oryzae* K-12, *Aspergillus kawachii* K-25, *Penicillium* sp. X-21을 사용했으며 *Zygomycetes*로서는 *Rhizopus oryzae* YUFE 1406, *Rhizopus japonicus* YUFE 1417, *Mucor* sp. 79-1을 각각 사용하였다. 효모류에는 *Saccharomyces cerevisiae* K-109, *Saccharomyces sake* 7, *Candida tropicalis* IFO 0589를 배양하여 균체로 사용하였다.

균사체의 조제

각종 진균류의 균사체와 균체를 얻기 위하여 다음과 같은 조성의 균사체 생산배지를 사용하였다. 즉 glucose 3%, peptone 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%, CaCl_2 0.05%, yeast extract 0.2%를 증류수에 녹여 최종 pH가 5.4가 되게 조정하였다. 30°C에서 20시간 진탕 배양하여 얻은 균사체들을 증류수로 세척한후 원형질체 생성의 재료로 사용하였다.

효소 조제

각종 곰팡이류의 세포벽에 대한 가수분해효소를 얻기 위하여 우선 섬유소가수분해효소는 *Trichoderma viride* TO4를 사용하여 밀기울 배지상에서 Wijayarathne⁽⁹⁾ 등의 방법에 따라 500 ml 삼각 플라스크에 수분함량이 55% 되게 밀기울을 40g 넣어서 상법에 따라 가압 살균한후 배지로 사용하였다. 25°C에서 9일간 배양했으며 이때의 CMC-activity는 82 unit/g이었다. 이 단위는 한 시간동안 1 mg의 환원당을 생산하는데 필요한 효소량으로 표시하였다. 여기에 3배량의 증류수로 효소를 추출한 다음 800 rpm에서 10분간 원심분

리 하여 상등 효소용액을 동결건조하여 건조 분말로 만들었다. 다음 chitinase는 *Streptomyces* sp. 115-5를 사용하여 홍⁽¹⁰⁾, 김 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 다음과 같이 조제하였다. 즉, glucose 0.3%, chitin 0.2%, peptone 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%, NaCl 0.05%의 배지를 500 ml flask에 100 ml씩 넣어 30°C에서 48시간 동안 진탕 배양한 다음 800 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포와 찌꺼기를 제거하고 그 상등액을 효소용액으로 사용하였다. 이때 사용한 chitin은 Whistler과 Bemiller의 변법을 사용하여 조제하였다^(15,16). 배양용액으로부터 분리한 상등액의 chitinase activity는 12 unit/ml이었으며 이 단위는 한시간당 1 μ -mole의 환원당을 생산하는데 필요한 효소량으로 기준하였다. 위 효소용액을 섬유소가수분해효소의 경우와 마찬가지로 동결 건조한 후 분말로 조제하였다.

곰팡이류의 원형질체 생성

균사체 생산배지에서 20시간 진탕 배양한 후 얻어진 신선한 각종 진균류의 균사체들을 원심분리하여 packing volume이 1 ml 정도 되게 집균한 후 증류수로 세척한 다음 Protoplast Inducing Solution(PIS)으로 다시 1 ml 되게 현탁하였다. 여기에 *Trichoderma cellulase* 15 mg과 chitinase 10 mg을 PIS 1 ml에 함께 녹여 첨가하였다. PIS는 10 mM의 인산완충용액(pH 6.0)에 NaCl을 0.6 M 되게 넣어 조제하였다. 37°C에서 4시간 동안 반응시키면서 균사체로부터 원형질체를 유출시켰다.

효모류의 원형질체 생성

효모세포들도 위 곰팡이류와 마찬가지로의 배양조건으로 20시간 동안 진탕 배양하여 생균체 그대로 원심분리하여 사용하였다. 균체량은 20 ml의 배지에서 증식한 균체 건부를 3000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 증류수로 세척한 다음 다시 PIS로 packing volume 1 ml 되게 현탁하였다. 여기에 섬유소가수분해효소 15 mg과 chitinase 10 mg을 1 ml의 PIS에 녹여 첨가한 후 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 효모세포벽의 용해 정도는 이들 반응 혼합물을 50배 증류수에 희석한후 lysis되지 않는 세포를 집균하여 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 생성된 원형질체량을 상대적으로 조사하고자 하였다.

원형질체의 계측

세포벽 분해효소용액과 균사체를 37°C에서 반응시키면서 유리되는 원형질체를 PIS에 희석시켜서 060

배 배율의 현미경 하에서 haemocytometer 로 계산하였다.

단백질의 정량

각종 진균류의 균사체를 섬유소 가수분해효소 15 mg 과 chitinase 10 mg 의 혼합효소용액으로 4 시간 동안 처리 시킨후 형성된 원형질체를 반응혼합용액과 동일량의 증류수를 넣어 심하게 흔들어 원형질체를 파괴시킨 다음 유출된 단백질량을 다음과 같은 Anson⁽¹⁴⁾ 법에 따라 정량하였다. 단백질 용액 1 ml 와 0.55 M 의 Na₂CO₃ 2.5 ml, 그리고 Folin-Ciocalteu 시약 0.5 ml 를 넣어 30°C 에서 30 분간 발색시킨 다음 660 nm 에서 흡광도를 측정하여 이들 단백질 함량을 Hammarstein casein 을 표준단백질로 기준하여 환산 하였다.

결 과

Ascomycetes 류의 원형질체 생성

양조업, 식품업 등의 광범위한 발효공업에 많이 이용되는 전분 당화력이 우수한 *Aspergillus oryzae* K-12 와 *Aspergillus kawachii* K-25 균주와 *Penicillium* 속의 X-21 균주를 대상으로 섬유소 가수분해효소와 chitinase 를 동시에 작용시켜 원형질체의 유리 정도를 haemocytometer 로 측정 한 결과는 Fig.1 과 같다. 대체로 2 시간 이상의 작용시간이 경과한 다음부터 많은 원형질체가 유리되기 시작하며 *Aspergillus oryzae*

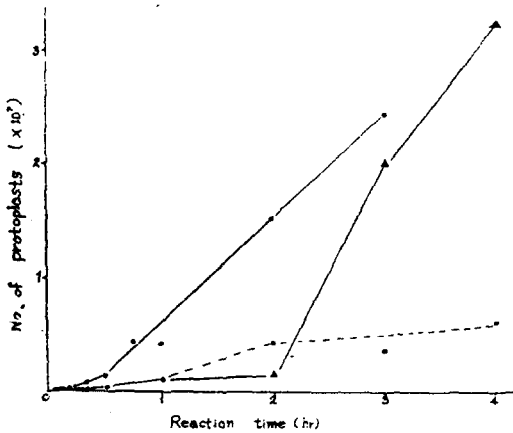


Fig. 1. Formation of protoplasts from mycelium of several Ascomycetes strains
 ●—● : *Aspergillus oryzae* K-12
 ○—○ : *Aspergillus kawachii* K-25
 ▲—▲ : *Penicillium* sp. X-21

K-12 균주의 균사체로부터는 3 시간 만에 1 ml 당 최대 2.4×10^7 개의 원형질체가 생성되었으며 *Aspergillus kawachii* K-25 균주는 4 시간 만에 5.6×10^6 개, *Penicillium* sp. X-21 은 최대 3.2×10^7 개의 원형질체가 생성 토출되었다. 그러나 2 시간 이상 반응이 진행됨에 따라 유리된 원형질체들이 가까이 있는 원형질체와 자기융합이 일어나는 경향이 있으며^(11,12), *Aspergillus oryzae* 의 경우 특히 심하게 일어났것 같다. 그래서 4 시간 이상 반응의 경우 유리된 원형질체의 개체수는 현저히 감소한 것으로 생각된다.

Zygomycetes 류의 원형질체 생성

세포벽에 chitin 의 함량이 타 진균류보다 비교적 많고 격막이 없는 *Rhizopus oryzae* YUFE 1406 과 *Rhizopus japonicus* YUFE 1417 그리고 *Mucor* sp. 79-1 을 대상으로 이들 균사체로부터 원형질체의 생성을 복합효소의 반응 시간별로 조사한바 Fig. 2 와 같다. 대

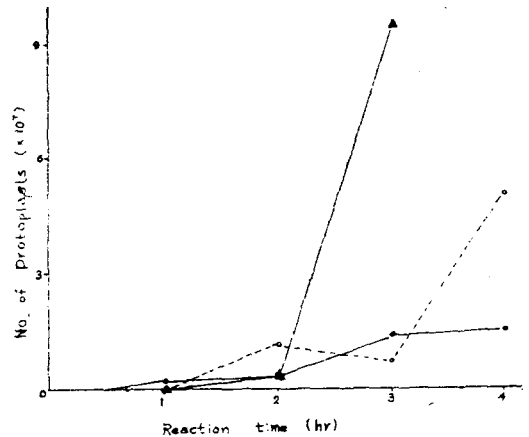


Fig. 2. Formation of protoplasts from mycelium of several Zygomycetes strains
 ●—● : *Rhizopus oryzae* YUFE 1406
 ○—○ : *Rhizopus japonicus* YUFE 1417
 ▲—▲ : *Mucor* sp. 79-1

체적으로 Ascomycetes 균들 보다는 3 배 정도의 많은 원형질체를 생성시킬 수 있었으며 *Mucor* 79-1 균주의 경우 3 시간 만에 1 ml 당 9.8×10^7 개 그리고 *Rhizopus japonicus* 의 경우 4 시간 만에 5.2×10^7 개, *Rhizopus oryzae* 의 경우 1.6×10^7 개의 원형질체가 생성되었다. 이들 Zygomycetes 균들도 앞의 Ascomycetes 류의 원형질체와 마찬가지로 2 시간 이상의 반응시간이 경과함에 따라 자가 융합된 대형의 원형질체와 또 원형질체의 덩어리(cluster)들을 볼 수 있었다.

효모류의 원형질체 생성

곰팡이류의 세포벽이 chitin 질과 같은 견고한 중합체등으로 구성되어 있는 반면, 효모세포벽은 glucose 의 $\beta(1-3)$ 결합과 $\beta(1-6)$ 결합 등으로 이루어진 laminarin 과 같은 glucan 과 mannose 의 중합체인 mannan 등의 복합체로 구성되어 있다. 위의 곰팡이류의 원형질체 생성 능력과 비교하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae* K-109 와 *Saccharomyces sake* 7 그리고 *Candida tropicalis* IFO 0589 를 대상으로 위와같은 조건으로 섬유소 가수분해효소 15mg 과 chitinase 10mg 을 동시에 처리 시켜서 그 세포벽 용해 정도를 흡광도로 측정하여 나타낸바 아래 Fig. 3 과 같다. 대상균주 모두가 반응시간이 경과함에 따라서 반응하기 전의 흡광도와 별로 차이가 없었으므로 이들의 원형질체 생성에는 섬유소 가수분해효소와 chitinase 처리가 크게 효과를 나타내지 않았다. 따라서 이들 효모에 대한 원형질체 생성을 위해서는 다른 종류의 세포벽 용해효소의 작용이 필요한 것 같다.

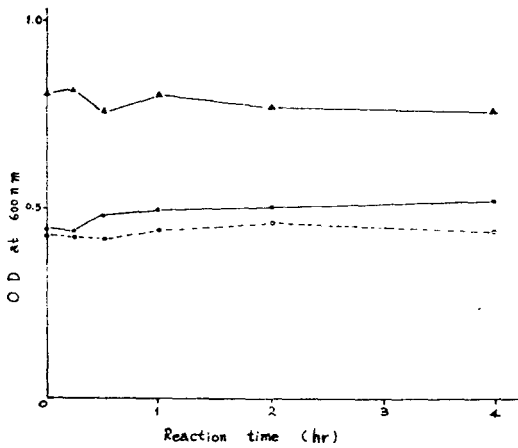


Fig. 3. Lysis of several kinds of yeast cells
 ●-●: *Saccharomyces cerevisiae* K-109
 ○-○: *Saccharomyces sake* 7
 ▲-▲: *Candida tropicalis* IFO 0589

원형질체 생성에 따라 유리된 단백질의 정량

섬유소 가수분해효소와 chitinase 의 작용에 따라 세포의 구성 성분이 가수분해되어 삼투압이 낮은 용액에 방치하면 세포막이 터져 세포질 구성 성분들이 밖으로 토출되어 나온다. 이런 작용의 정도를 각 진균류의 종류에 따라 4시간 동안 효소 작용시킨 다음 증류수로 희석하여 세포성분을 토출시켰다. 다음 이를 원심분리시

켜 세포찌꺼기를 제거한 후 가용성 단백질함량을 Anson⁽¹⁶⁾ 법으로 정량한 결과는 Table 1 과 같다. 효모류에서도 상당량의 단백질이 유출되었으며 이는 Budding scar 부분의 chitin 등이 가수분해 되는 등 부분적 세포벽 분해로서 세포성분이 밖으로 토출되어 나온 것으로 생각된다. 그러나 Table 1 에서 보는 바와 같이 전반적으로 곰팡이류에서 특히 Zygomycetes류가 섬유소 가수분해효소와 chitinase에 대해 더 민감하게 작용받아 많은 양의 단백질성 세포질 물질이 밖으로 토출되어 나왔다.

Table 1. Amount of protein released from several kinds of fungal protoplasts

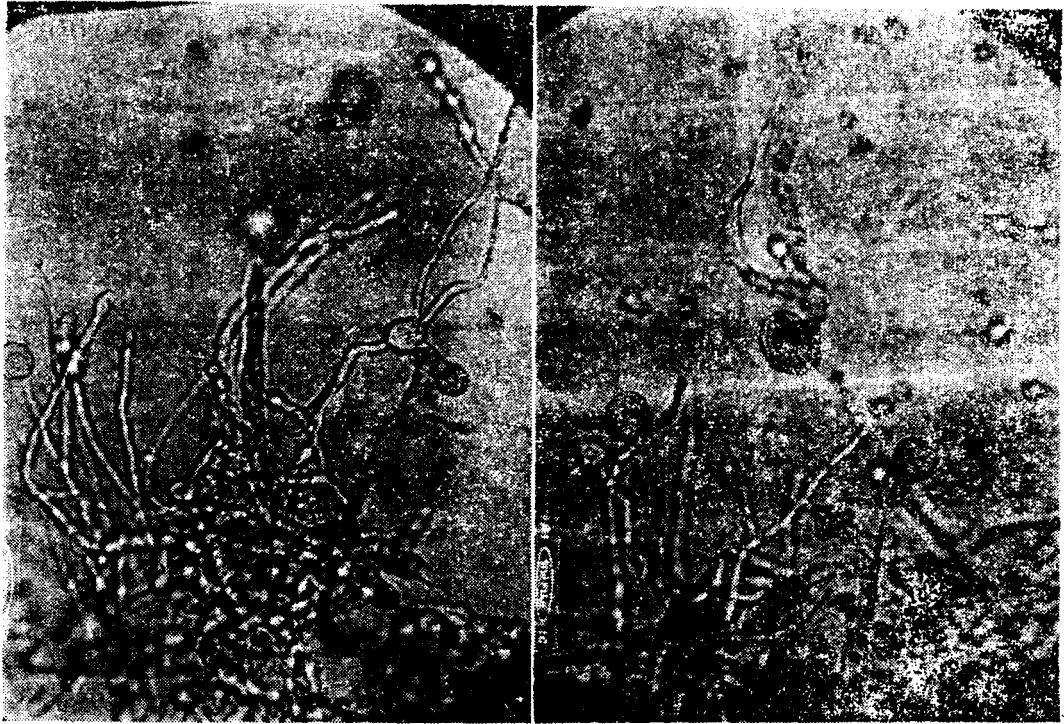
Names of strains	Amount of protein (mg/ml)
<i>Aspergillus oryzae</i> K-12	18.4
<i>Aspergillus kawachii</i> K-25	24.3
<i>Penicillium</i> sp. X-21	20.0
<i>Rhizopus oryzae</i> YUFE 1406	24.6
<i>Rhizopus japonicus</i> YUFE 1417	16.0
<i>Mucor</i> sp. 79-1	34.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K-109	11.8
<i>Saccharomyces sake</i> 7	12.2
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0589	12.0

원형질체의 형태적 관찰

곰팡이류에 있어서 원형질체의 생성은 10분동안의 효소처리에 의해서도 보여지기 시작하였다. 이들은 처음에는 주로 균사체의 끝부분에서 토출되기 시작하며 나중에는 균사체의 중간 부분에서도 마찬가지로 나타나기 시작하였다. 특히 Zygomycetes 류에서는 격막이 없기 때문에 비교적 커다란 원형질체가 생성되기도 하고 때로는 아주 작은 원형질체가 나타나기도 한다. 그래서 크기에 있어서 대소의 차가 심한 것을 볼 수 있다 대표적으로 *Aspergillus oryzae* K-12 균주의 균사체에 대해서 30분 동안과 *Rhizopus japonicus* YUFE 1417 균주의 균사체에 대하여 마찬가지로 30분동안 Protoplast Inducing Solution 에서 효소작용 시킨후 배율을 400 배 정도 확대해서 현미경 상에 나타난 원형질체의 토출 과정을 Fig. 4 에서와 같이 볼 수 있었다.

고 찰

많은 원형질체 생성에 관한 연구에서 달팽이 소화즙에 함유된 helicase 와 sulfase 의 작용을 이용하여 왔으며 미생물에서 분리한 효소로서는 섬유소 가수분해효소, strepzyme, zymolase, laminarinase 등의 glu



(A) *Asp. oryzae* K-12

(B) *Rhi. japonicus* YUFE 1417

Fig. 4. Photographs of the released protoplasts from ruptured mycelium

canase 들이 사용되어 왔다^(1,12). 본 연구에서는 섬유소가수분해효소와 chitinase 를 미생물에서 분리하여 혼합한 보다 강력한 세포벽 분해력을 이용하여 각종 균주들을 대상으로 조사해 보았다. 이때 반응 조건으로서 pH문제는 *Trichoderma* 섬유소 가수분해효소의 경우 최적 pH는 5.0 근처이고^(7,9), chitinase 115-5는 pH 7.0이 최적으로 나타났기 때문에^(10,11) 본 실험에서는 pH 6.0을 선정하여 행하였다. 또 osmotic stabilizer로는 각종 무기염류 당류 당알콜류 등이 이용되지만^(1,12) 가장 널리 이용되는 NaCl을 0.6 M 되게 조제하여 본 실험에 사용하였다. 이런 조건하에서 대체적으로 Zygomycetes 류가 Ascomycetes 류보다 더 민감하게 원형질체생성이 일어나는 것은 Zygomycetes 류의 세포벽 구성 성분으로서 chitin 함량이 많은 비중을 차지하므로 chitinase 의 동시 처리에 따른 효과의 증대로서 나타난 것 같다. 이로서 본 실험에 사용된 cellulase-chitinase system 을 사용하여 효모보다 더 세포벽이 견고한 곰팡이류 그중에서도 특히 Zygomycetes 류에 대해 더욱더 강한 작용을 나타내므로 이들 균종들에 대한 원형질체 형성에 가장 좋은 enzyme system 의 하나

로서 사용되어 질수 있을 것 같다.

요 약

균류의 세포벽은 복합 다당류의 매우 견고한 막으로 되어있기 때문에 균체의 이용이나 세포막 관련성 효소 연구등에 직접적으로 방해가 되어왔기 때문에 이의 제거를 위해 본 실험에서는 *Trichoderma viride* TO4 균주에서 얻은 섬유소 가수분해효소와 토양에서 직접 분리한 *Streptomyces* sp. 115-5균주에서 얻은 chitinase 를 혼용하여 각종 균사체에 작용시켜 세포벽의 제거 정도에 따른 원형질체 생성을 균체별로 측정하여 그 결과를 얻었다.

- (1) Ascomycetes 류에서는 반응 3시간 후 3×10^7 개의 원형질체가 생성되었다.
- (2) Zygomycetes 류에서는 반응 3시간 후 9×10^7 개의 원형질체가 생성 되었다.
- (3) 효모류는 이 혼합효소작용에 대하여 별다른 반응을 나타내지 않았다.

 謝 意

본 연구는 1980년도 문교부 학술연구 조성비의 지원을 받아 연구된 것입니다.

문 헌

1. Villanueva, J. R. and Acha, I. G. : *Method in Microbiology*, Vol 4, Academic Press, p. 665 (1971)
2. Dawes, I. W. and Sutherland, I. W. : *Microbial Physiology*, Vol. 4, Black Scientific Publications, p. 3 (1976)
3. Aguirre, R., Acha, G. and Villanueva, J. R. : *Antonie van Leeuwenhoek*, **30**, 33 (1964)
4. Garcia, B. and Lippman, E. : *J. Gen. Microbiol.*, **42**, 411 (1966)
5. Sietsman, J. H., Eveleigh, D. E., Haskins, R. H. and Spencer, J. F. T. : *Can. J. Microbiol.*, **13**, 1701 (1967)
6. Danaka, N. and Phaff, H. J. : *J. Bact.*, **89**, 1570 (1967)
7. DeVries, O. M. H. and Wessels, J. G. H. : *J. Gen. Microbiol.*, **73**, 13 (1972)
8. Anne, J., Eyssen, H. and DeSomer, P. : *Arch. Microbiol.*, **98**, 159 (1964)
9. Wijeyaratne, S. C., Waki, T., Suga, K. I. and Ichikawa, K. : *Annual Reports of ICME*, **2**, 210 (1979)
10. 홍용기, 서정훈 : 한국산업미생물학회지, **7**, 149 (1979)
11. 김광현, 서정훈 : 한국산업미생물학회지, **6**, 149 (1978)
12. Peberdy, J. F. : *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 21 (1979)
13. Yamamura, M., Deranishi, Y., Danaka, A. and Fukui, S. : *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 13 (1975)
14. 赤堀四郎外 : 酵素研究法 1, 朝倉書店, p. 164 (1955)
15. 江上不二不 : 多糖類化學, 共立出版社, p. 232 (1955)
16. Bemiller, J. N. : *Method in Carbohydrate Chem.*, Vol. 5, Academic Press, p. 103 (1965)