

Rhizopus oryzae 의菌體生産 및細胞壁除去

南周鉉

大邱工業專門大學 食品工業科

(1981년 5월 20일 수리)

Biomass Production and Cell Wall Lysis of *Rhizopus oryzae*

Joo Hyun NAM

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

(Received May 20, 1981)

Abstract

Several kinds of organic acids, alcohols, aromatic compounds and sugars as carbon sources were tested in order to produce the cell mass of *Rhizopus oryzae* which is used in part of food processing or organic acid fermentation.

Sodium acetate among them was good enough for carbon source as well as glucose under the concentration of one percent. All nitrogenous substances tested such as ammonium, nitrate or organic nitrogen compounds were well used by this strain of *Rhizopus oryzae* as nitrogen source.

Ammonium sulfate among inorganic nitrogen compounds was most utilized as a nitrogen source in glucose or acetate medium.

This strain did not require any growth factors such as yeast extract. The following composition of medium was therefore determined in order to produce the cell mass of *Rhizopus oryzae*: Na-acetate 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, NaCl 0.01% (pH 5.5).

The cell wall of mycelium grown in above medium was lysed optimally at pH 6.5 and 50°C by the action of Strepzyme 115-5.

On producing protoplast from mycelium by enzymatic action, almost all of the mycelium was damaged after 4hrs of treatment.

緒論

微生物의菌體蛋白質은食品과飼料의高品質蛋白質의 새로운資源으로서 많이研究되어지고 있다. 특히生産價格이低廉하고 손쉽게 구할수 있는原料 즉 starch나 cellulose^(1,2), n-paraffin⁽³⁾, alcohol⁽⁴⁻¹¹⁾, 有機酸⁽¹²⁻¹⁵⁾ 등을利用한微生物은細菌, 酵母, 곰팡이등 매우多樣하다. 그중에서도 酵母나細菌이 많이利用되고 있다. 또 곰팡이의菌體生産은그細胞壁의 견고성 때문에 이용면에서 더욱制限을 받아왔다.

細胞壁除去를 위해서 snail enzyme 과 microbial

enzyme 을利用할 수 있으며 microbial enzyme 으로서는 *Trichoderma viride*, *Bacillus circulans*, 또는 *streptomyces sp* 들로부터生成되는 glucanase⁽¹⁶⁻¹⁹⁾들이며 이들의混合처리로서도細胞壁除去에利用하고 있다.⁽²⁰⁾

本研究에서는菌絲體成長率이 매우 높은곰팡이中 특히 alcohol生産, 食品加工, 消化劑, 洗劑, 젖산生成, lipase生産 등⁽²¹⁻²⁵⁾ 광범위한使用用途를 가진 *Rhizopus oryzae* 를對象으로 하여菌體生成을 위한培養條件檢討와菌體利用面를 높이기 위하여 *Streptomyces sp* 에서生成된 Strepzyme 를使用하여細胞壁除去에 연관된 실험을 하여 그결

과를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 供試菌株

本 實驗에 사용된 菌株는 韓國種菌協會에서 分讓받은 *Rhizopus oryzae* YUFE 1406였으며, lytic enzyme 生産을 위해서는 慶北大學校 農化學科 微生物學室에서 分離保管 중인 *Streptomyces* sp 115-5 菌株⁽²⁶⁾를 使用하였다.

2. 菌의 培養

菌體生産力을 檢討하기 위한 液體培養基로는 Table I에서 보는바와 같이 NaNO_3 培地와 Peptone 培地로 나누어 각각의 炭素源의 效果를 調査하였다. 各 培地 10ml를 Petri-dish에 分注한 다음 Tween-80(0.05%) 溶液으로 *Rhizopus oryzae*의 spore를 懸탁시킨 후 懸탁액 0.1ml씩 接種하여 30°C에서 2日間 靜止培養하였다. *Rhizopus oryzae*의 cell wall 除去에 따른 Protoplast 生産을 위한 菌體培養은 Na-acetate 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, NaCl 0.01% (pH 5.5)를 添加한 培地에서 2日間 25°C에서 培養된 菌體를 使用하였다.

3. 菌體量 測定

培養한 菌體를 東洋濾紙 No. 2로 濾過集菌하여 蒸溜水로 3回 洗滌하고, 이 菌體를 100~105°C에서 恒量이 될때까지 乾燥시켜 秤量하였으며, 菌體의 量은 1ml 當 乾燥菌體 mg으로 나타내었다.

4. 酵素調製

*Rhizopus oryzae*의 cell wall에 對한 lytic enzyme를 얻기 위하여 *Streptomyces* sp. 115-5菌株⁽²⁶⁾의 Chitinase 生成培地에 *Rhizopus oryzae*의 乾燥菌體 0.5%를 添加하여 30°C에서 2日間 진탕培養한후 그 培養液을 lyophilize하여 使用했으며 이 酵素를 Strepzyme 115-5로 命名하였다.

5. Cell Wall 除去

10ml의 培地에서 培養된 菌體 모두를 集菌한後 蒸溜水로 洗滌하고 protoplast inducing solution으로 1ml 되게 懸탁하였다. 이 protoplast inducing solution은 50mM의 phosphate-buffer (pH 6.5) 溶液에 NaCl 濃도가 0.6M 되게 넣어 調製하였다.

여기에 Strepzyme 115-5(20mg)를 protoplast inducing Solution 1ml에 녹여 添加하였다. 30°C에서 4時間 동안 反應시키면서 菌絲體로 부터 cell wall를 除去시켰다.

6. Protoplast 計測

Strepzyme 酵素溶液과 菌絲體를 30°C에서 反應시킨後 遊離되는 protoplast를 필요에따라 protoplast inducing solution에 稀釋시켜서 倍率 600倍의 顯微鏡下에서 Haematometer로 計測하였다.

7. 蛋白質 定量

培養된 菌絲體를 Strepzyme(10mg/ml)으로 4時間 동안 처리시킨 後 反應 混合溶液에 5倍量의 蒸溜水를 넣어 强하게 混들어 protoplast를 破壞시킨 다음 遊離된 蛋白質量을 Anson 荻原變法⁽²⁷⁻²⁸⁾으로 定量하였다. 즉, 蛋白質 溶液 1ml와 0.05M- Na_2CO_3 2.5ml 그리고 Folin reagent 0.5ml를 넣어 30°C에서 30時間 發包시켜 波長 660nm에서 그 吸光度를 測定한 다음 Hammarstein casein을 표준 蛋白質로서 使用하여 이를 蛋白質量으로 換算하였다.

結果 및 考察

1. 炭素源의 影響

Table I에 표시된 基礎培地에 各種炭素源을 1.0%濃度로 添加하고 Initial pH를 5.0로 조절한 後 30°C에서 2日間 培養하여 各種炭素源에 의한 cell mass 生産의 效果를 Table 2.3.4에 나타내었다.

Table 1. Basal Medium Composition

NaNO ₃ Medium		Peptone Medium	
NaNO ₃	0.2%	peptone	0.1%
K ₂ HPO ₄	0.05	K ₂ HPO ₄	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01	NaCl	0.01

Table 2. The Effect of Organic Acids or their Salts as Carbon Source on Cell Growth

Organic acids or their salts (1%)	Dry weight (mg/ml)	
	Peptone medium	NaNO ₃ medium
Na-Acetate	3.94	2.25
Na-Oxalate	0.59	0.21
Lactic acid	1.37	0.27
Citrate	1.66	0.44
Tartaric acid	1.15	0
None	0.35	0

Table 2와 3에서 보는바와 같이 organic acids 혹은 그들의 鹽과 aromatic compound 中에서는 Na-acetate가 가장 效果의이 있으며 aromatic compound

는 거의 生育에 이용되지 않음을 알 수 있었다.

Table 4에 표시된 各種 alcohol과 糖類에 대한 菌體增殖은 peptone 培地와 NaNO₃ 培地에 있어서 glucose와 maltose, starch, sucrose, pectin, lactose 등이 잘 利用되었다.

Table 3. The Effect of Aromatic Compounds as Carbon Source on Cell Growth

Aromatic compounds(1%)	Dry weight (mg/ml)	
	Peptone medium	NaNO ₃ medium
Benzene	0.01	0
Picric acid	0.05	0
Toluene	0.15	0
Xylene	0	0
Aniline acetate	0	0
Salicylic acid	0	0
Sulfanilic acid	0	0
Pyrogallol	0	0
Catechol	0	0
Phenol	0	0
None	0.35	0

위와같은 結果로 炭素源으로서 acetate가 glucose 대체자원으로서 效果의임을 觀察할 수 있었다.

이를 基礎培地上에서 濃度別로 菌體生成을 調査한 結果가 Table 5와 같다. Na-acetate를 炭素源으로 使用할 경우 2% 이상에서는 초산의 毒成에

따라 菌生育을 볼 수 없었으며, 菌生育 濃度에서는 炭素利用 效率이 glucose와 마찬가지로 좋은 炭素源으로 利用될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

Table 4. The Effect Alcohols and Sugars as Carbon Source on Cell Growth Dry Cell Weight (mg/ml)

Sugars and Alcohols (1%)	Peptone medium	NaNO ₃ medium
Glucose	6.65	3.78
Lactose	1.08	0.39
Maltose	5.31	4.01
Sucrose	2.59	1.17
Inulin	0	0
CMC	0	0
Starch	2.05	1.17
Pectin	1.15	1.15
Gum-arabic	0.38	0.20
Ethanol	0.14	0
Methanol	0	0
n-Butanol	0	0
sec-Butanol	0	0
iso-Amylalcohol	0	0
iso-Propylalcohol	0	0
Glycerin	0.61	0
Ethyl-acetate	0.13	0
Acetone	0	0
n-Hexane	0.08	0
None	0.36	0

Table 5 The Effect of Glucose and Na-acetate Concentrations on Cell Growth Dry Cell Weight(mg/ml)

Concentration (%)	Peptone Medium		NaNO ₃ Medium	
	Glucose	Na-acetate	Glucose	Na-acetate
0	0.35(mg/ml)	0.35(mg/ml)	0 (mg/ml)	0 (mg/ml)
0.25	2.1	0.8	1.95	0.9
0.5	3.95	1.9	2.55	1.4
1.0	6.60	4.3	3.80	1.9
2.0	9.30	0	5.3	0
3.0	10.3	0	6.43	0

2. 窒素源의 影響

炭素源으로 glucose 1% 혹은 Na-acetate 1%를 使用하여 各各에 대한 有機窒素源은 0.1%, 無機窒素源은 NaNO₃ 0.2%를 基準으로 하여 各 窒素源을 添加한 培地를 使用하여 *Rhizopus oryzae* 菌體生産에 미치는 各種 窒素源의 效果를 檢討한 結

果 일반적으로 無機窒素源보다 有機窒素源이 보다 菌體生育에 다소 양호한 結果를 나타내고 있다. 無機窒素源 中에서는 (NH₄)₂SO₄가 glucose 혹은 acetate를 炭素源으로 使用할 경우 좋은 窒素源으로 使用되어질 수 있었다(Table 6).

Table 6. The Effect of Nitrogen Sources on Cell Growth

Nitrogen sources	Dry weight (mg/ml)		
	Glucose	Na-acetate	
Inorganic nitrogen (0.2%)	NaNO ₃	4.40	2.70
	NaNO ₂	4.06	2.33
	NH ₄ NO ₃	4.55	2.66
	NH ₄ Cl	3.84	2.46
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.81	2.78
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.11	2.44
	(NH ₂) ₂ CO	4.32	2.84
Organic nitrogen (0.1%)	Peptone	6.1	3.85
	Casein hydrolysate	5.7	4.65
	Asparagine	6.1	4.0
	Corn steep liquor	5.75	3.75
	None	0	0

3. Yeast extract 의 影響

炭素源으로 Na-acetate 1%, 窒素源으로 peptone 0.1%, 혹은 NaNO₃ 0.2%로 구분해서 生育因子의 影響을 yeast extract 의 濃度別로 添加한 培地에서 調査한바에서 보든바 Table 7 와 같이 添加한 培地나 添加하지 않은 培地에서 큰 差異가 없었다.

Table 7. The Effect of Yeast Extract on Cell Growth

Concentration (%)	Dry weight (mg/ml)	
	Peptone medium	NaNO ₃ medium
0	3.8	2.3
0.005	4.2	2.4
0.01	4.3	2.6
0.02	4.1	2.6
0.04	4.6	2.7
0.06	4.8	2.8

4. pH 의 影響

以上の 培地組成을 檢討한 結果 Na-acetate 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, KH₂PO₂ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, NaCl 0.01%를 添加한 培地를 使用하여 pH 를 2.0에서 7.0까지 調節하여 30°C에서 2日間 培養시킨 結果 그림 1 과 같이 초기 pH가 5.5일 때가 pH 5.0인 경우보다 2倍量의 菌體增殖을 나타내며 最大의 效果를 나타내었다.

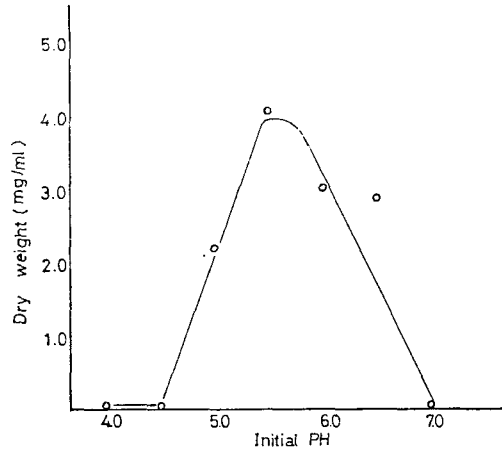


Fig 1. Effect of Initial pH on Cell Growth

5. 溫度에 依한 影響

위와 같은 培地組成으로 pH 5.5로 調整하여 2日間 溫度別로 菌體生産을 比較한 結果 그림 2 와 같다. 여기서 본바와 같이 25°C에서 最適溫度를 나타내었다.

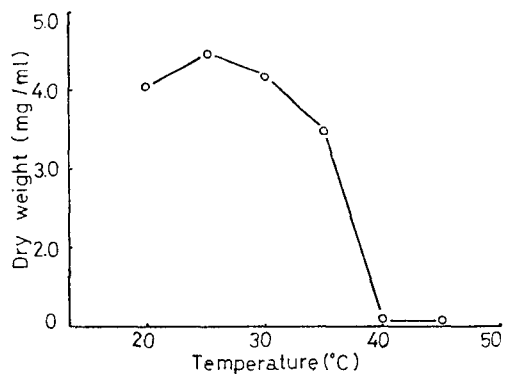


Fig 2. Effect of Temperature on Cell Growth

6. Rhizopus oryzae 細胞壁 分解時 pH 와 溫度 의 影響

細胞壁에 chitin 의 含量이 他眞菌類보다 비교적 많고 隔膜이 없는 *Rhizopus oryzae*의 本供試菌株을 上記의 培地上에서 pH 를 5.5로 調節한 後 2日間 25°C에서 培養한 菌絲體를 集菌한 後細胞壁 溶解를 위하여 Strepzyme 115-5의 作用에 따른 最適 pH 와 最適溫度를 調査한바 그림 3, 4와 같다. 또 生成된 protoplast 와 부분적 分解가 일어난 菌絲體를 5倍量의 蒸溜水를 添加시켜 破壞시킨 後

遊離되는 蛋白質量을 Anson 萩原變法으로 측정하였다.

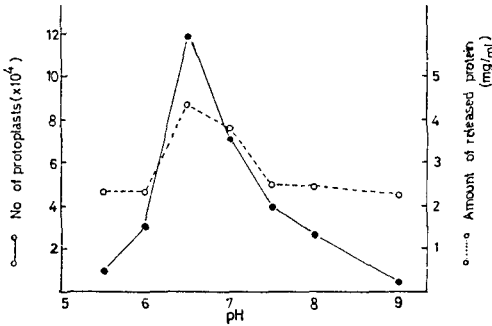


Fig. 3. Effect of pH on the Production of Protoplast

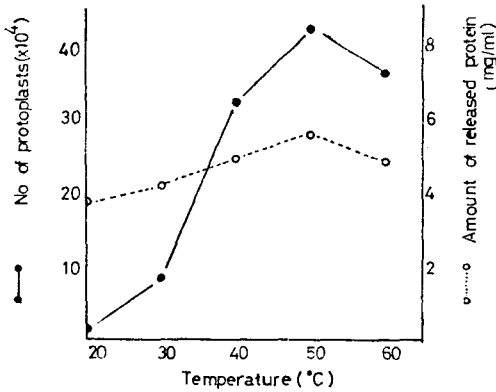


Fig. 4. Effect of Temperature on the Production Protoplast

本 strepzyme 의 *Rhizopus oryzae* 의 菌絲體에 作用하여 細胞壁을 分解하는데는 pH 6.5와 溫度 50°C 에서 protoplast 生成이 가장 좋았으며 역시 이때 cell wall 構成成分이 加水分解되어 滲透壓이 낮은 溶液에 放置하므로써 細胞膜이 터져 細胞質構成成分들이 밖으로 吐出되어 나오는 정도도 일치하였다.

7. Protoplast 生成의 形態의 觀察

本 供試菌株의 Protoplast 生成은 10分 동안의 strepzyme 115-5 酵素 處理에도 보여지기 시작했다.

이들은 처음에는 주로 菌絲體의 끝부분에서 吐出되기 시작하여 나중에서는 菌絲體 中間部分에서

도 비교적 커다란 protoplast 또는 아주 작은 protoplast 가 나타나 크기에 있어서는 大小의 差가 심한 것을 볼 수 있다. protoplast 의 吐出 過程을 倍率 600倍 정도 擴大해서 顯微鏡상에 나타난 것을 原菌絲體와 反應을 30分, 1時間, 2時間, 4時間 동안 處理시킨 것을 그림 5에 나타내었다.

要 約

食品加工이나 有機酸 生産工業 등에 널리 使用되는 *Rhizopus oryzae* 를 對象으로 하여 菌體生産을 目的으로 各種 有機酸, alcohol, aromatic 化合物과 糖類 등의 炭素源들을 調査한 바 Na-acetate 가 1% 以下の 濃度에서는 glucose 와 마찬가지로 좋은 炭素源으로서 ammonium 態나 窒酸態窒素 그리고 有機窒素 化合物 모두 대체로 같은 정도로 잘 이용될 수 있음을 알았으며 無機窒素態窒素 中에서 (NH₄)₂SO₄ 가 그중 가장 좋은 窒素源으로 使用되었다. 이 *Rhizopus oryzae* 는 또 yeast extract 와 같은 微量營養源을 要求하지 않았으므로 最終적으로 다음과 같은 組成의 培地로 배양하였다. Na-acetate 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, NaCl 0.01%, (pH 5.5)의 培地上에서 生育한 菌絲體를 Strepzyme 115-5를 使用하여 견고한 細胞壁을 除去하는 實驗에서 pH 6.5와 溫度 50°C 에서 最適條件을 나타내었다. 이때 細胞壁 除去에 따른 protoplast 의 生成은 酵素 處理 10分後부터 나타나기 시작하여 處理 4時間 後에는 거의 모든 菌絲體가 作用받았음을 알았다.

이 論文은 1980年度 文教部 學術研究 조성비에 의하여 研究되었음.

參 考 文 獻

- Grupta, J.K., Kuma, L., Vadehra, D.V.: *J. Scient. Ind. Res.* **355**, 325 (1976)
- Gregory, K.F., Reade, A.E., Khar, G.L.: *Food Technol.*, **5**, 30. (1976)
- 福井三郎, 田中渥夫, 川本進, 山村みどり: 旭硝子工業技術獎勵會研究報告, **30**, 109(1977).
- Kim, J.H., Ryu, D.Y.: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 427 (1976)
- Amano, Y., Sawada, H., Takada, N., Terui, G.: *J. Ferment. Technol.*, **53**, 315 (1975)
- Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M., Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**,

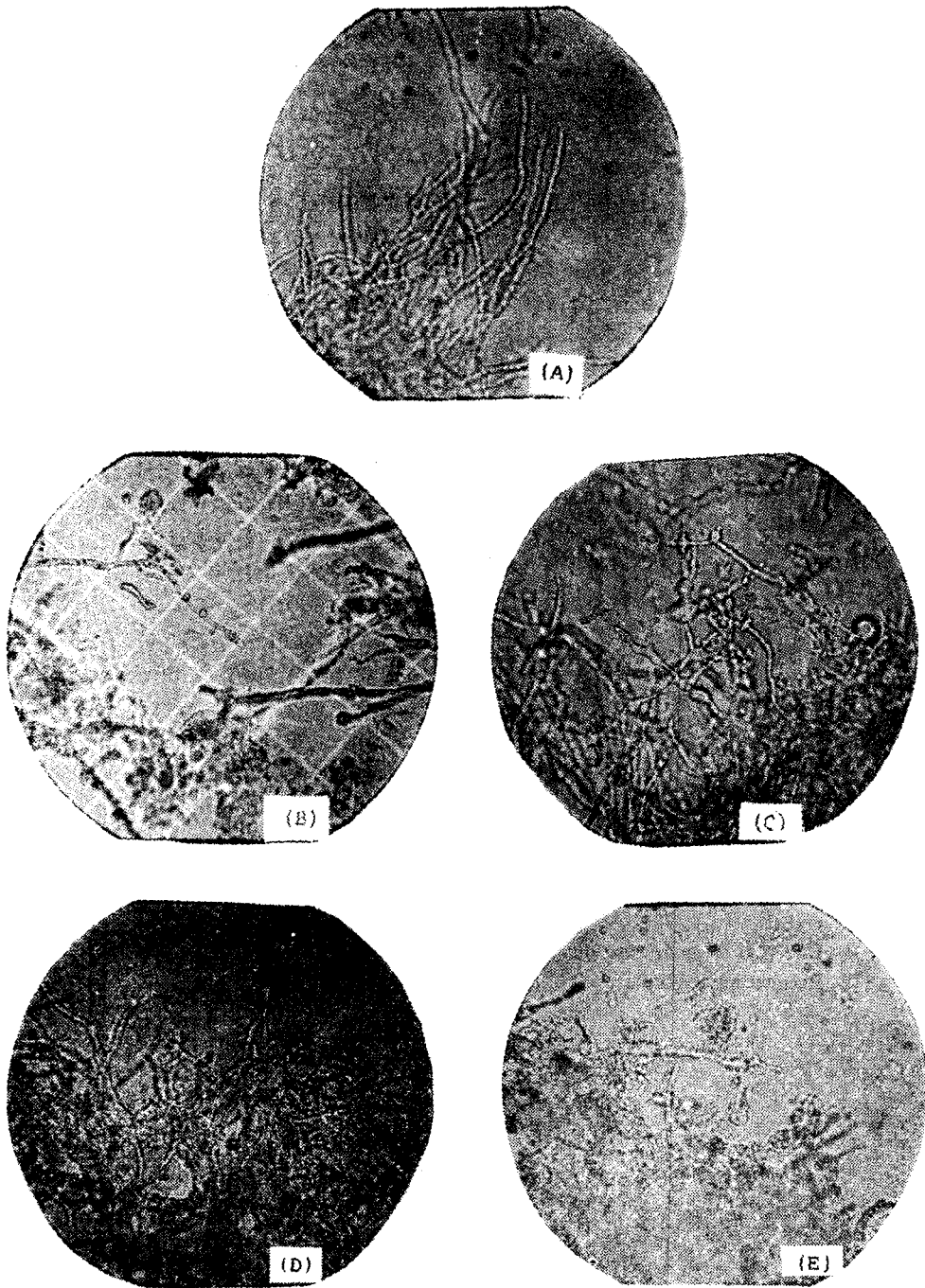


Fig 5. Photomicrograph of Hyphae of *Rhizopus oryzae*.
Before(A), after 30 min(B), after 1 hrs(C), after 2hrs(D), and 4hrs
incubation(E), with strepzyme 115-5.

- 389 (1970).
7. Levine, D.W., Cooney, C.L. : *Appl. Microbiol.*, **26**, 982 (1973)
 8. Oki, T., Kouno, K., Kitai, A., Ozaki, A. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 295 (1972)
 9. Vary, P.S., Johnson, M.J. : *Appl. Microbiol.*, **15**, 1473 (1967)
 10. Cooney, C.L., Levine, D.W. : *Advan. Appl. Microbiol.*, **15**, 337 (1972)
 11. Kato, N., Tsuji, K., Tani, Y., Ogata, K. : *J. Ferment. Technol.* **52**, 917 (1974)
 12. 緒方, 西川, 大杉, 醸工, **48**, 478 (1970).
 13. Cama, F.J., Edwards, V.H. : *J. Ferment. Technol.*, **48**, 787 (1970)
 14. Matsuura, S., Takahashi, H., Manabe M. : *J. Ferment. Technol.*, **53**, 658 (1975).
 15. 松浦, 高橋, 眞鍋 : 醸1 **51**, 783 (1973).
 16. Aguirre, R., Acha, G., Villanueva, J.R. : *Antonie van Leeuwenhoek*, **30**, 33 (1964).
 17. Gacia, B., Lippman, E. : *J. Gen Microbiol.*, **42**, 411 (1966)
 18. Sietsma, J.H., Eveleigh, D.E., Haskin, and Spencer, J.F.T. : *J. Microbiol.*, **13**, 1701 (1967).
 19. Tanaka, H., Phaff, H.J. : *J. Bact.* **89**, 1570 (1967).
 20. Anne, J. Eyssen, H., Desomer, P. : *Arch. Microbiol.*, **98**, 159 (1974)
 21. Yamaguchi, T., Muroya, N., Isobe, M. and Sugiura, M. : *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 999 (1973).
 22. Tatsuoka, S., Miyake, A., Wada, S., Imada, I. and Matsumura, C. : *J. Biochem.*, **46**, 575 (1969).
 23. Fukumoto, F., Iwai, M., Tsujisaka, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 257 (1964).
 24. Iwai, M., Tsujisaka, Y. : *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1241 (1974).
 25. 鄭東孝 : 醸酵斗 微生物工學 (先進文化社) p. 295, 301, 646 (1979).
 26. Kim, K.H. and Seu, J.H. : *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng* **6**(4), 149 (1978)
 27. 萩原文二, 赤堀四郎 : 酵素研究法, II (朝倉書店, 日本東京) p. 237 (1956).
 28. Anson, M.I. : *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79(1938)
 29. 萩原, 江上 : 標準生化学實驗 (文光堂, 日本) p. 207 (1953).