Kor. J. Appl. Microbiol. Biocng.
Vol. 13, No. 4, 403 – 408 (1985)

界面活性剤 添加培養에 따른 *Rhizopus oryzae*의 α-Amylase와 Phosphatase분비촉진

尹喜周 · 崔榮吉

漢陽大学校 生物学科

(1985년 10월 14일 수리)

Enhancement by Surfactant on Release of α-Amylase and Phosphatase in Submerged Culture of *Rhizopus oryzae*

Youn, Hee Ju and Yong Keel Choi

Dept. of Biology, Hanyang Univ.

(Received October 14, 1985)

Enhancement of surfactant on release of secretory enzyme, such as α-amylase, acid phosphatase and alkaline phosphatase, was investigated during submerged culture of *Rhizopus oryzae*. Morphological changes of colony was occured; small pelletal form in 0.18 mM of sodium dodecyl sulfate, pulpy form in 0.48 mM of sodium deoxycholate, and filamentous form in absence of surfactant. Supplement of sodium dodecyl sulfate induced 9 times increasing activity of α-amylase and that of acid phosphatase 25 times in cultural fluids. Alkaline phosphatase was increased 11 times in cultural fluid and also stimulated in cytoplasm with supplement of sodium deoxycholate.

Extracellular 효소에 관한 연구는 효소 수율의 증가를 목적으로 균주의 선별, 배양조건 조절 내지는 유전학적 응용의 방향에서 많이 연구되어 왔으며[1], Extracellular 효소는 특정한 효소가 세포내로 부터 과다분비라는 단순한 현상이 아니라 생합성 세포내 존재 위치 및 분비등의 일련의 분자생물학적 측면에서 이해되고 있다[2].

액체 배양시 사상체 균류의 성장 형태는 효소 분비 및 이차대사 산물의 생성에 많은 영향을 미치며 이에 따라 계면활성제를 첨가하여 성장 군락의 형태적인 변화를 꾀하려는 시도를 많이 하였다[3,4]. Nicolle (1977)[5]는 효모의 일종인 ***Trigonopsis variabilis***의 배양액에 Tween 80등 여러가지 계면활성제를 첨가하여 형태적 변화를 연구하였으나 계면활성제의 미생물과의 직접적인 효과는 Linear alkylbenzene sulfonate와 같은 합성세제 분해능과 생체막의 단백질 또는 인지질의 분석에 주로 활발하게 이용되어 왔다[6,7,8]. 그러나 계면활성제 첨가에 의한 extracellular효소의 증가에 대한 연구 결과는 대개의 경우 산업적 특허로 공개되지 않았으나 Reese (1971)는 Tween 80, phosphatidylinositol등에 의한 사상체 균류에 있어서 효소의 수율 증가에 대해 종설한 바가 있다[9]. 본인들은 α-amylase 생성과 유기산 발효에 유용한 균주로 평가되는 ***Rhizopus oryzae***를 선택하여 비교적 강력한 계면활성을 지닌 sodium dodecyl sulfate (SDS)와 steroid계통의 sodium deoxycholate (DOC)를 배지에 첨가하여 상기의 목적으로 실험하고 extracellular 효소인 α-amylase와 세포막 부착과 분비의 성향을 모두 띄는 acid 및 alkaline phosphatase의활성도를 배양 단계별로

측정하였으며 또한 균체내의 활성도와 상호 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험실에 보관중인 *Rhizopus oryzae*를 사용하여 potato dextrose agar에서 30℃로 7일간 전 배양시킨 다음 포자가 형성된 균체를 수확하여 glass wool과 멸균수를 이용하여 포자 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액은 4℃에서 보관하면서 20일 이내에 사용하였다.

배지의 조성은 포도당 3%, 펩톤 1%, 효모추출물 0.3%, 가용성 전분 0.1%를 기본 조성으로 하여 실험코자 하는 계면활성제를 SDS는 1.8 mM에서 0.18 mM까지 DOC는 4.8 mM에서 0.48 mM까지 농도별로 첨가하였다.

배양조건은 가압 멸균된 배양액 90 m*l*를 300 m*l* 용량의 플라스크에 넣고 최종 포자 농도는 1 m*l* 의 배양액에 1×10^5개의 포자수가 존재하도록 접종하여 New Brownsky사의 회전식 진탕배양기에서 회전수 150 rpm으로 30℃에서 배양하였다.

균체량 측정과 잔유 포도당 및 단백질 정량

균체량과 배양액의 잔유 포도당 및 단백질의 함량을 측정하기 위하여 일정시간 배양한 균체 배양물을 수확하여 9,000×g로 20분간 원심분리한 후 그 상등액을 이용하여 포도당 함량은 Dubois *et al.* (1956)의 방법[10]에 의하여 phenol을 사용하여 488 nm에서의 흡광도로, 단백질 함량은 Lowry (1951) 방법[11]으로 측정하였다. 원심분리에 의하여 침전된 균체는 Büchner funnel에 옮겨 증류수로 3～4회 세척한 후 90℃에서 15시간이상 건조시켜 얻은 무게로 균체량을 측정하였다.

효소 활성도 측정

배양시기별 배양액 내의 α-amylase의 활성도는 Hernandez (1975)[12]가 개량한 방법을 아래와 같이 일부 수정하여 측정하였다. 16 m mol/*l*의 acetate 완충용액(pH 5.0)으로 가용성 전분 0.4%를 녹인 기질용액 1 m*l*에 효소원으로서 균체를 제거한 배양액 1 m*l*을 넣고 37℃에서 60분간 반응시킨 다음 1 N HCl 용액 1 m*l*를 넣어 반응을 정지시키고 반응액 0.1 m*l*를 0.2% Iodine－0.4% KI 용액 1 m*l*과 증류수 2 m*l*이 담겨있는 시험관에 넣고 잘 흔들어 준 다음 실온에서 15분간 방치한 후 620 nm에서 나타나는 흡광도로 측정하였으며 주어진 반응조건 아래서 가용성 전분 1mg을 37℃에서 15분간 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 계산하였다.

Acid phosphatase 및 alkaline phosphatase의 활성도는 Torriani (1960)[13]방법을 일부 수정하여 측정하였다. Acid phosphatase는 pH 4.5로 조절한 0.25 M citrate－NaOH 완충용액으로 제조한 10 mM의 p-nitrophenyl phosphate (NPP) 용액 1 m*l*에 배양액 2 m*l*을 넣고 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 2 M Na_2CO_3용액 1 m*l*을 넣어 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Alkaline phosphatase는 pH9.0의 0.5 M tris－HCl 완충용액에 $MgCl_2$는 2 mM, NPP는 10 mM 되게 녹인 기질용액 1 m*l*에 배양액 2 m*l*을 잘 섞은 후 37℃에서 5분간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도는 주어진 각각의 반응계에서 NPP를 분해하여 1분간 1 μ mol의 p-nitrophenol을 생성시키는 효소의 양을 1 unit로 계산하였다.

세포내 효소의 활성도 측정

대수기(24 hr)의 균체 3～5 g을 멸균 증류수로 3회 세척한 후 액체 질소로 급냉시킨 다음 해사(sea sand)를 넣어 미리 냉각시킨 막자사발에서 마쇄하면서 5배의 증류수를 서서히 가하여 균질의 마쇄물을 만들고 이어서 3,000×g로 원심분리시켜 얻은 상등액을 효소원으로 하였다. 활성도는 배양액에서와 동일한 방법으로 측정하였으며 균체외 분

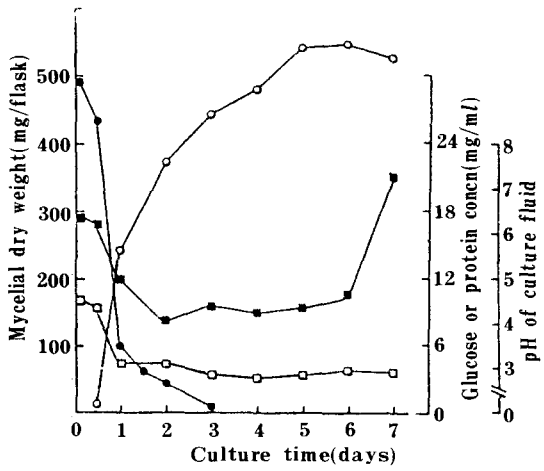

Fig. 1. Relationship between growth of mycelia and change of pH and residual content of glucose and protein in media during submerged culture of *Rhizopus oryzae*.

Mycelial dry weight, ○－○; pH of media, ■－■; Glucose concn., ●－●; Protein concn., □－□.

비효소와의 비교는 units/mg of protein 단위로 계산하였다.

결 과

증식상의 변화

*Rhizopus oryzae*의 액체 배양에 의한 증식상의 변화는 Fig. 1과 같다. 유도기는 약 10시간 정도 지속되고 이어서 대수기 그리고 접종후 2일 경과후부터는 증식 속도가 감소하는 변환기(transition state)로 접어드는 것을 볼 수 있었고 정지기는 5～6일로서 그 이후의 쇠퇴기는 완만하게 진행되었다. 배양액 내의 포도당은 대수기에 대부분 소모되었고 단백질의 함량은 비교적 완만하게 감소하였으며 최적생육 pH는 4～5 사이이며, 쇠퇴기에 이르러서는 급격히 상승하는 것을 알 수 있었다.

SDS를 첨가할 경우 critical micellar concentration (CMC ; 8.2 mM)의 5배 희석한 농도에서도 생육이 완전히 저해되는 항균성을 나타내었고 더욱 희석 비율을 높임에 따라 유도기가 짧아지면서 성장 형태는 pelletal형으로 나타났다. DOC는 5 mM

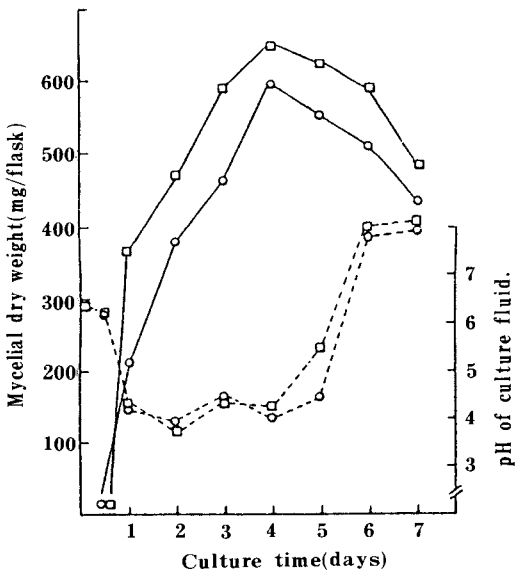

Fig. 2. Comparison of growth pattern and change of pH in culture fluid in presence of surfactants.

Growth in DOC (0.48 mM), ○－○ ; SDS (0.18 mM), □－□ ; Dotted line (---) represents change of pH. In case of surfactant not -suplemented, refer to Fig. 1.

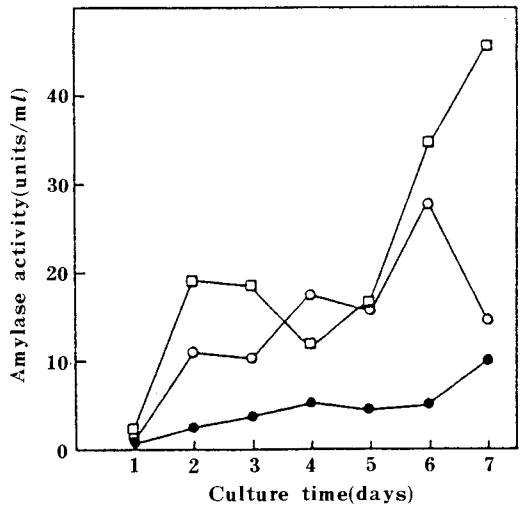

Fig. 3. Time course of amylase formation in submerged culture supplemented with surfactants.

Total activity represents as units/ml of culture fluid. Control (not supplemented), ●－● ; DOC (0.48 mM), ▲－▲ ; SDS (0.18 mM), □－□.

의 CMC와 동일한 농도에서 60%의 저해를 나타냈으나 그 형태는 pelletal형 보다는 계면활성제를 첨가하지 않은 대조군(Fig. 1)의 filamentous 형과 유사하였다. 따라서 이들 계면활성제를 순차적으로 희석하여 정상적인 성장속도를 나타내는 농도(SDS ; 0.18 mM, DOC ; 0.48 mM)에서의 증식상의 변화를 Fig. 2에서 나타냈다.

SDS나 DOC를 처리한 경우 모두 유도기는 대조군보다 2～3시간 지연되는 반면에 정지기가 1일 정도 빨라지고 쇠퇴기는 급격하게 진행되는것을 알 수 있었다. 또한 정지기에서 growth yield가 대조군보다 높게 나타났고 pH 변화는 생체량의 변화에 따라 성장속도가 빠르면 낮아지다가 쇠퇴기에 이르면 올라갔다.

배양액의 효소 활성도의 변화

α-Amylase의 성장시기에 대한 활성도 변화는 Fig. 3과 같이 나타났다.

계면활성제 처리군이 대조군 보다 전 배양시기를 통하여 높게 나타났는데 특히 SDS 처리군이 대수기에서도 높은 활성을 보인 반면 대조군은 정지기에서 차차 활성이 높아지는 성향을 나타냈다. Acid phosphatase의 분석결과는 Fig. 4에서 나타냈는데 활성도 변화는 SDS나 DOC를 첨가한 경우 모두 amylase와 동일한 양상을 보였으나 다만 SDS 처리

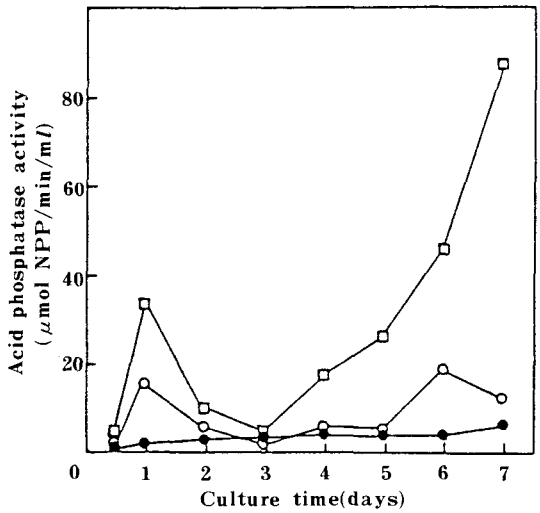

Fig. 4. Effect of DOC-and SDS-supplement on acid phosphatase relase into culture media.

Growth conditions and denotations on surfactants were the same as shown in Fig. 3.

군이 대수기 및 배양 후기에 높아지는 경향이 더욱 현저하였다. 그리고 대조군은 전 배양기간을 통하여 일정하게 유지되었다. Alkaline phosphatase는 이러한 성향이 줄어들고 다만 대수기에 있어서만 SDS 처리군이 높았으며 정지기 이후에서 SDS나 DOC 처리군이 높은 활성을 Fig. 5에서 찾아볼 수 있었으며 Fig. 4와 Fig. 5를 상호비교하여 보면 계면활성제를 첨가하지 않는 경우에는 alkaline phosphatase가 acid phosphatase보다 균체 밖으로 분비하는 성향이 훨씬 높게 나타났다. 그러나 SDS를 처리하면 분비성이 비교적 낮은 acid phosphatase도 배양액 내 효소활성도가 높게 나타남을 알 수 있었다.

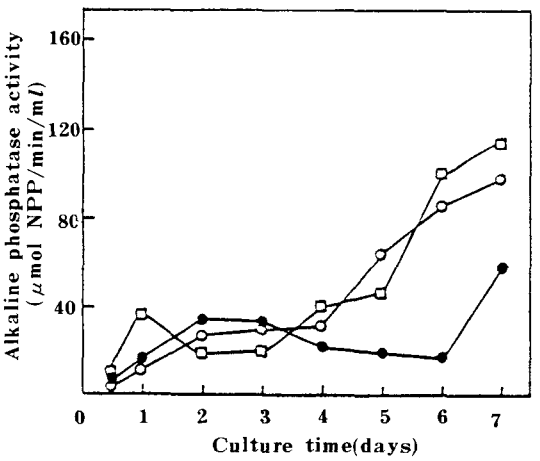

Fig. 5. Effect on alkaline phosphatase release into culture fluid.

Growth condition and denotation were the same as shown in Fig. 3.

Table 1. Comparison of activity of extracellular enzyme in culture fluid to the intracellular enzyme in cytoplasm of mycelia at logarithmic phase.

Treatment	Enzyme activity (units/mg of protein) of					
	α-Amylase		Acid phosphatase		Alkaline phosphatase	
	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra
Control	0.38	ND	3.15	30.9	0.27	1.15×10^3
DOC	0.67	ND	2.04	98.6	3.22	1.25×10^3
SDS	2.25	ND	7.05	59.5	6.34	1.04×10^3

ND, not detectable.

균체내 효소 활성 및 수율 증가효과

Table 1은 대수기에서 intracellular 효소와 extracellular 효소 활성도의 비교치이다. α-Amylase는 균체의 세포질에서는 활성도를 나타내지 않았으며 acid와 alkaline phosphatase의 경우는 세포질에서는 DOC 처리군이 활성도가 가장 높았고 배양액내에서는 SDS 처리군이 높게 나타났다. 또한 세포질내에서 alkaline phosphatase는 acid보다 활성이 월등히 높게 나타났다.

Table 2는 SDS나 DOC 처리에 의한 효소 수율 증가에 대해서 종합적으로 나타낸 결과로서 α-am-

Table 2. Effect of surfactant addition on enzyme productivity in culture fluid

Treatment	Growth phase	Ratio of enzyme yield ($\frac{+\text{ surfactant}}{-\text{ surfactant}}$)		
		α-Amylase	Alkaline phosphatase	Acid phosphatase
DOC	Logarithmic	1.76	0.64	11.77
	Early transition	3.31	0.85	0.74
	Late transition	3.83	1.13	1.48
	Stationary	6.09	11.11	7.15
SDS	Logarithmic	5.92	2.36	24.60
	Early transition	5.91	0.62	1.22
	Late transition	2.42	1.88	6.19
	Stationary	7.92	6.73	16.56

ylase의 경우 SDS 처리에 의하여 성장 초기에 높은 수율을 얻을 수 있고 정지기에서 최고 8 배의 증가를 나타내었으며 alkaline phosphatase는 DOC 처리에 의해 11배, acid phosphatase는 SDS처리에 의하여 24배의 활성도가 각각 대수기에서 증가되어 있음을 보여준다.

고 찰

일반적으로 pelletal 형의 성장은 대수기에서는 filamentous형 보다는 생체량 증가면에서 뒤떨어진다. SDS와 같은 음이온성이나 양이온성 계면활성제는 흔히 항균제로서 사용해 왔는데 본 실험결과에서 나타난 SDS처리에 의한 생체량의 증가는 Palmela (1984)[14]가 지적한 바와같이 amphipathic 물질은 CMC 이상의 고농도에서는 세포막을 분해하지만 저농도에서는 세포막 성분의 재분포를 일으켜 투과성의 변경등 새로운 생리적 기능을 나타낸다는 결과와 일치하는 것으로 사료된다. 따라서 낮은 농도의 SDS는 독성효과는 감소되고 균사의 분지작용(branching)을 상승시켜 직경이 작은 pelletal 형태를 일으키면서 제한된 공간에 최대의 생체량을 나타내는 것으로 보인다.

계면활성제에 의한 효소 수율의 증가는 계면활성제의 단백질과 인지질에 대한 고유의 유해작용과 세포막의 투과성 변경[7,15] 등에 기인된다고 사료된다. 또한 Shimida (1977)[16]는 ***Aspergillus niger*** 의 acid phosphatase는 multiple form으로 존재하며 분비 효소와 세포질 효소와의 구성비율이 다르다는 것을 밝혔고 Schönholzer (1985)[17]는 ***Saccharomyces cerevisiae*** 세포내에서 maturation과 세포외 분비과정을 연구한 결과 alkaline phosphatase의 생성 및 분비과정은 endoplasmic reticulum에서 합성되어 golgi apparatus, secretory vesicle을 거쳐 세포표면으로 나온다고 하였다. 따라서 대수기의 높은 효소 활성은 균사의 빈번한 분지작용(branching) 과 secretory vesicle이 밀집되어 있는 균사의 정단부위가 계면활성제에 많이 노출되는 현상도 포함된다고 생각되며 정지기 이후의 활성 상승현상은 pelletal 중심 부위의 autolysis와 정지기의 영양물 고갈과 독성 배설물에 의한 쇠퇴기의 autolysis 양자가 신속히 진행되므로서 배태되는 결과라고 사료된다.

그리고 계면활성제에 의한 세포벽의 효소 손실에도 불구하고 세포질 내에 활성이 높은 것은 feed back control이 잘 일어난다는 것을 보여주며, α-amylase의 활성이 나타나지 않는 것은 세포질 내에서는 불활성의 precursor로 존재하다가 membrane에서 활성화되어 세포벽 밖으로 분비되는 효소의 분자학적 가설(Ramaley, 1979)[2]과 일치하는 것을 알 수 있었다. 따라서 낮은 농도의 SDS나 DOC의 첨가는 idiophase에서 얻을 수 있는 분비 효소를 trophophase에서도 수확할 수 있으며 아울러 높은 수율의 증가를 획득할 수 있는 가능성을 보여주어 분자생물학적 견지에서 분비 효소의 기작연구에 좋은 도구가 될 수 있다고 사료된다.

요 약

Rhizopus oryzae 를 액체배양하는 동안, α-amylase, acid phosphatase그리고 alkaline phosphatase와 같은 분비효소의 분비능에 대한 계면활성제의 촉진효과를 조사하였다.

그 결과 집락의 형태적인 변화를 볼 수 있었는바, 1.8mM SDS 처리구에서는 작은 pelletal형, 0.48 mM DOC 처리구에서는 pulpy 형, 계면활성제를 처리하지 않은 시험구에서는 사상형의 집락을 나타내었다.

SDS를 첨가함으로써 α-amylase는 8 배, acid phosphatase는 25배의 활성도 증가가 유도되었다. DOC 첨가 시험구에서 alkaline phosphatase 활성도는 배양액에서 11배 증가가 나타났을 뿐 아니라 세포질에서도 역시 상승하였다.

참고문헌

1. Douglas, E. E. and S.M. Bland: *Advan. in Appl. Microbiol.* **25,** 57-74. (1979)
2. Ramaley, R. F.: *Advan. in Appl. Microbiol.* **25,** 37-55. (1979)
3. Metz, B. and N. W.F. Kossen: *Biotechnol. Bioengin.* Vol. XIX, 781-799. (1977)
4. Martin, J. F. and A.L. Domain: Developmental mycology (Smith,J.E. and D.R. Berryed, ed.) Edward Arnold, London, Vol 3, 426-450 (1977)
5. Nicolle, H.P. and M.B. Audrey: *J. Gen. Microbiol.* **101,** 233-236. (1977)
6. Gledhill, W.E.: *Advan. in Appl. Microbiol.* **17,** 265-293. (1974)
7. Helenius, A. and K. Simons: *Biochim. Biophys. Acta.* **415,** 29-79. (1975)

8. Lee, C. S., H.Y. Lee, K.S. Cho, S.H. Cho, S.Y. Chang and Y.K. Choi: *Kor. J. Microbiol.* **21,** 115-126. (1983)
9. Reese, E.T. and W.T. Faith: *Advan. in Biochem. Engin.* **1,** 78-111. (1971)
10. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith : *Anal. Chem.* **28,** 350-356. (1956)
11. Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall : *J. Biol. Chem.* **193,** 265-275. (1951)
12. Hernandez, E. and S.J. Pirt: *J. Appl. Chem. and Biotech.* **25,** 297-304. (1975)
13. Torriani, A.: *Biochim. Biophys. Acta.* **38,** 460-469. (1960)
14. Palmela, M. and S.J. Singer: *Biochemistry* **23,** 232-240. (1984)
15. Tanford, C. and T.A. Reynolds.: *Biochim. Biophys. Acta.* **457,** 133-170. (1976)
16. Shimida, Y., A. Shinmyo and T. Enatsu. : *Biochim. Biophys. Acta.* **480,** 417-427. (1977)
17. Schonhölzer, F., A.M. Schweingruber, H. Trachsel and M.E. Schweingruber: *Eur. J. Biochem.* **147,** 273-279. (1985)