

## Trichoderma 속의 제균종에 대한 protoplast formation 에 관한 연구

성연섭 · 안원근 · 주우홍\* · 이재동

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

\*창원대학교 자연과학대학 생물학과

### Studies on Protoplast Formation of *Trichoderma* spp.

Sung, Yun-Sub, Won-Gun An, and Woo-Hong Ju\*, Jae-Dong Lee

Dept. of Microbiology, Pusan National University

\*Dept. of Microbiology, Changwon National University

**ABSTRACT:** This research was focused on investigation of the general condition for protoplast formation of *Trichoderma* species. For protoplast formation, the mycelia cultured in YM medium were collected from each growth phase and were treated with the lytic enzymes. This procedure was carried out by all strains. The most optimal conditions of NOVOZYM 234 and DRISELASE were determined by *T. saturnisporum* IAM 12535 and *T. longibrachiatum* IBM 13107, respectively. The effect of osmotic stabilizers appeared  $\text{KCl} > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NaCl} > \text{mannitol} > \text{MgSO}_4$ , and the optimal concentration of each osmotic stabilizer was determined by 0.6-0.9 M. The optimal condition of DRISELASE for protoplast formation ; optimal pH 5.0, optimal concentration, 2%, optimal reaction time, 4 hours, and optimal temperature, 30°C. The optimal condition of NOVOZYM 234 for protoplast formation ; optimal pH 5.5, optimal concentration 1%, optimal reaction time 3 hours, and optimal temperature 30°C. The optimal culture period of mycelia for protoplast formation was between the initial and the middle exponential phase. Generally, DRISELASE was more effective than NOVOZYM 234 on protoplast formation except for *T. longibrachiatum* IAM 13107 and *T. viride* IAM 5141.

**KEYWORDS:** Protoplast formation, *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* 속은 최근들어 cellulose의 분해능이 높은 것으로 보고되고 있으며, 균주개발이라는 측면에서는 UV조사에 의한 변이균주 및 유용한 두 균주간의 fusion에 의한 융합균주를 이용하는 등의 여러가지 방법이 연구되어지고 있다(Cho 등, 1981; Peberdy, 1979). 미생물에 있어서 protoplast를 형성시키는 경우는 목적으로 하는 미생물의 생리적 기작의 해명, 세포내에 존재하는 핵산 및 고분자 화합물의 분리, 세포내 소기관에 관한 연구, 세포벽과 세포막에 결합되어 있는 물질들의 연구 및 생산을 위한 수단 등이다(Kolar 등, 1985; Benitez 등, 1975).

또한, 원형질융합을 통하여 산업적으로 유용한 균주의 개발은 유전공학의 중요한 수단으로 간주되며, 이것을 위한 전단계로서 protoplast형성은 필수

적이다(Hopwood, 1981; Kevei, 1985).

이제까지 연구된 바에 따르면 사상균의 protoplast생성을 위한 효소로는 달팽이의 소화액에서 추출한 helicase, gluculase, 및  $\beta$ -glucuronidase, *Trichoderma harzianum*에서 추출한 novozyme, *Streptomyces venezuelae* RA 로부터 추출한 세포벽 분해효소, *Streptomyces griseus*에서 추출한 chitinase, *Irpex lacteus*에서 추출한 driselase, *Micromonospora chalicea*로부터 추출한 세포벽 분해효소, 그의 cellulase제품들과 mecerozyme 등이 사용되고 있다(Garcia 등, 1966; Frenczy 등, 1977). 균류의 세포벽은 protein, lipids 등이 소량인 반면에 80-90%가 복잡한 polysaccharides로 이루어져 있기 때문에 단일종의 효소로는 세포벽의 제거가 어려운 것으로

**Table 1.** List of organisms used in the experiments.

No	Organisms	Source
1	<i>Trichoderma viride</i>	IAM*5141
2	<i>Trichoderma hamatum</i>	IAM 12505
3	<i>Trichoderma harzianum</i>	IAM 12506
4	<i>Trichoderma koningii</i>	IAM 12534
5	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	IAM 12535
6	<i>Trichoderma reesei</i>	IAM 13106
7	<i>Trichoderma longibruchiatum</i>	IAM 13107
8	<i>Trichoderma longibruchiatum</i>	IAM 13108
9	<i>Trichoderma</i> sp.	IAM 13109
10	<i>Trichoderma viride</i>	AL**1

\*IAM(Institute of Applied Microbiology)

\*\*AL(Ann Won Gun and Lee Jae Dong; 안 등, 1990)

알려져 있다. 이 때문에 균류의 protoplast생성에 사용되고 있는 효소는 대부분 복합효소이며, 여러 가지 활성능만 알려져 있을 뿐 enzyme system에 대해서는 정확하게 규명이 되어져 있지 않다.

본 실험에서는 *Trichoderma* 속 중에서 10균종을 선별하여 전반적인 protoplast형성조건을 검토하는 것에 의해 새로운 분류체계의 모색 (Kuraishi, 1985; Bahareen, 1981)과 산업적으로 유용한 균주의 개발을 위한 기초자료의 제공을 목적으로 하였다.

## 材料 및 方法

**균주 및 배지:** 본 연구에 사용된 균주는 (Table 1)과 같으며, 사용된 9균주는 IAM (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Japan)에서 분양받은 것이며, 나머지 1균주는 본 실험실에서 분리·동정한 것이다(안 등, 1990). 생육성상을 관찰하기 위한 배지로는 Cellulose agar, Czapek Dox agar, Malt extract agar, Oatmeal agar, Potato Dextrose agar, Yeast extract-Malt extract agar를 사용하였으며, 균사체를 얻기위한 배지로는 YM과 YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose)를 사용하였다.

**효소액 및 삼투안정제 제조:** DRISELASE (KY-OWA HAKKO KOGYO CO, TOKYO, JAPAN)와 NOVOZYM 234 (NOVO INDUSTRIAS, COPE-

NHAGEN/DENMARK)를 0.01 M sodium phosphate buffer로 각각 1%, 2%, 3%, 4%의 효소용액을 제조하였으며, 삼투안정제로서는 KCl, NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mannitol,  $\text{MgSO}_4$ 를 0.01 M sodium phosphate buffer에 녹여 사용하였으며, 0.3 M과 1 M 사이에서 최적농도를 결정하였다.

**두 효소의 최적 반응조건 검토:** DRISELASE의 경우, *T. saturnisporum* IAM 12535, NOVOZYM 234의 경우, *T. longibruchiatum* IAM 13107를 18시간 진탕배양시켜서 얻은 균사체 50 mg을 pH별, 반응 온도별, 반응시간별, 효소 농도별로 protoplast 생성율을 검토 하였다.

pH에 따른 효과: 1% NOVOZYM 234, 2% DRISELASE를 각각 30°C에서 8시간 반응시켜 pH 4.0-6.5 사이에서 protoplast 생성율을 검토하여 최적 pH를 결정했다.

반응시간에 따른 효과: pH 5.5에서 2% DRISELASE, 1% NOVOZYM 234을 처리하여 30°C에서 1-8시간 사이를 1시간 간격으로 반응시켜 검토하였다.

반응온도에 따른 효과: 상기와 같은 조건으로 20-40°C 사이를 5°C 간격으로 8시간 반응시켜 검토하였다.

효소농도에 따른 효과: 상기와 같은 조건으로 효소농도를 각각 1%, 2%, 3%, 4%로 반응시켜 비교 검토하였다.

**DRISELASE와 NOVOZYM 234의 protoplast생성을 비교:** 상기의 실험과정에서 얻어진 결과를 토대로 최적조건을 설정하여 10균주에 대한 두 효소의 protoplast 생성율을 검토하였다.

## 結 果

**배지종류에 따른 각 균주의 생육정도:** 일반적으로 각 균주들은 YM agar에서 생육과 포자형성이 활발하게 이루어지고, Cellulose agar에서 생육을 못하거나 아주 미소한 생육도를 보이는 균주들이 많았다. *T. longibruchiatum* IAM 13107과 *T. longibruchiatum* IAM 13108은 동종의 균주로 명명되어 있지만, 배지종류에 따른 생육정도는 비교적 큰 차이를 보였으며 *T. viride* IAM 5004와 *T. viride* IAM 5141의 경우도 생육도 및 생육성상에 있어서 약간의

Table 2. Culture characteristics of organisms.

Media	YMA		Malt Extract Agar		PDA		Oatmeal Agar		Cellulose Agar		Czapek Dox Agar	
	growth	spore formation	growth	spore formation	growth	spore formation	growth	spore formation	growth	spore formation	growth	spore formation
<i>T. viride</i>	+++	+	+	-	++	-	+++	+	-	-	+++	-
AL No. 1												
<i>T. viride</i>	+++	+	+	-	++	-	+++	+	++	-	-	-
IAM No. 5141												
<i>T. hamatum</i>	++	-	+	-	+++	-	+++	-	-	-	+	-
IAM No. 12505												
<i>T. hamatum</i>	++	-	-	-	+++	-	+++	-	+++	-	+	-
IAM No. 12506												
<i>T. hamatum</i>	++	+	-	-	++	+	+++	-	-	-	+	+
IAM No. 12534												
<i>T. saturnisporum</i>	++	+	+	-	+++	+	+++	+	-	-	++	+
IAM No. 12535												
<i>T. reesei</i>	+++	+	+	-	+++	-	++	+	+	-	+	-
IAM No. 13106												
<i>T. longibruchiatum</i>	+	-	+	-	+++	+	+++	+	++	-	++	-
IAM No. 13107												
<i>T. longibruchiatum</i>	+++	+	+	-	-	-	+	-	+	-	++	-
IAM No. 13108												
<i>Trichodema</i> sp.	+++	+	+	+	+++	+	+++	+	+	-	++	-
IAM No. 13109												

+++ : good growth, ++ : moderate growth, + : poor growth, - : no growth

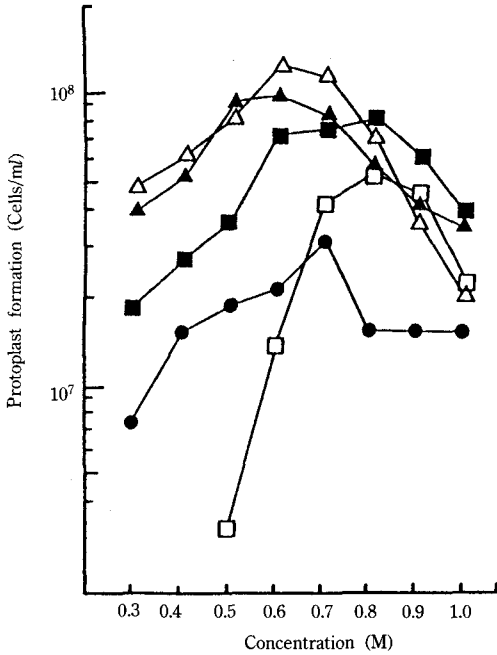


Fig. 1. Effect of osmotic stabilizers on protoplast formation. ■: NaCl, ▲: KCl, □: mannitol, △: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ●: MgSO<sub>4</sub>.

차이를 보였다(Table 2).

**삼투안정제의 종류와 농도에 따른 protoplast 생성을** : 각 삼투안정제에 대한 최적농도는 0.6-0.8 M 사이에서 결정되었으나, mannitol 의 경우, 0.8- 0.9 M 사이에서 높은 protoplast 형성율을 보였다(Fig. 1).

또한, 균주에 따라서 protoplast 생성율은 다양하게 나타났지만 삼투 안정제로서는 보편적으로 KCl이 가장 효과적이었으며, 다음으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > (NaCl) > mannitol > MgSO<sub>4</sub> 순으로 나타났다. 그러나 일부 균주에 있어서는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mannitol, MgSO<sub>4</sub> 등을 삼투안정제로 사용하였을 때 높은 protoplast 형성율을 보였다(Fig. 2).

**Protoplast생성을 위한 두 효소의 최적조건검토** : 균주에 따라 미소한 차이는 보였지만, DRISELASE의 경우, pH 5.0, 효소농도 2%, 반응온도 30°C, 반응시간 4시간, NOVOZYM 234의 경우, pH 5.5, 효소농도 1%, 반응온도 30°C, 반응시간 3시간 등의 조건에서 가장 높은 protoplast 생성율을 보였다(Table 3).

각 균주에 대한 두 효소의 protoplast 생성을

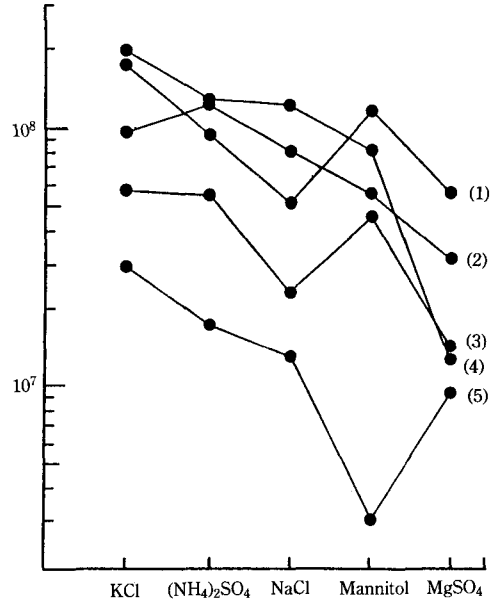


Fig. 2. Effect of osmotic stabilizers on *Trichoderma* spp. (1) *T. reesei* IAM 13106, (2) *T. saturnisporum* IAM 12535, (3) *T. longibruchiatum* IAM 13107, (4) *T. koningii* IAM 12534, (5) *T. viride* IAM 5141.

Table 3. Optimal conditions of DRISELASE and NOVOZYM 234.

	pH	React. Times	Temperature	Concentration
DRISELASE	5.0	4 hours	30°C	2%
NOVOZYME 234	5.5	3 horus	30°C	1%

**비교검토** : DRISELASE의 경우, pH 5.5, 효소농도 2%, 반응온도 30°C, 반응시간 4시간, NOVOZYM 234의 경우, pH 5.5, 효소농도 1%, 반응온도 30°C, 반응시간 3시간을 최적 조건으로 설정하여 10균주에 대한 protoplast 생성율을 비교 검토한 결과 *T. viride* IAM 5141과 *T. longibruchiatum* IAM 13107의 경우를 제외하고는 DRISELASE가 보다 효과적이었다(Fig. 3).

**균사체 배양시간에 따른 protoplast 생성을 검토** : 각각의 균주를 12-24시간 사이에서 2시간 간격으로 진탕배양한 후, 2%의 DRISELASE를 처리하여 30°C에서 100 r.p.m.으로 4시간 반응시킨 결과, 16-20 시간 사이 에서 얻어진 균사체가 protoplast생성에 있어서 가장 효과적이었다(Fig 4).

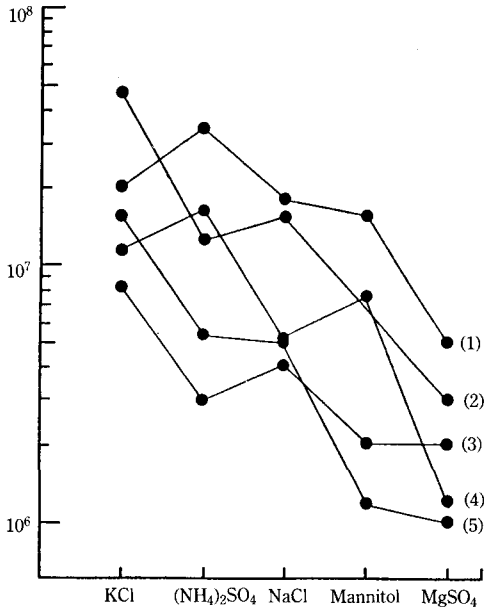


Fig. 3. Effect of osmotic stabilizers on *Trichoderma* spp. (1) *T. viride* AL 1, (2) *T. longibruchiatum* IAM 13108, (3) *T. hamatum* IAM 12505, (4) *Trichoderma* sp. IAM 13109, (5) *T. harzianum* IAM 12506.

**Protoplast 관찰** : 일반적으로 protoplast의 크기는 직경 7-20 μm로 다양했으며, 효소반응 시간에 비례하여 크기도 증가하였다. 예외는 있지만, NOVOZYM 234로 반응시켰을 때보다는 DRISELASE로 반응시켰을 때가 protoplast가 컸으며, 8시간 반응시켰을 때에는 크기가 최고 30 μm이었다(Fig 5).

삼투안정제에 있어서는 대개 MgSO<sub>4</sub>를 사용하였을 때 protoplast의 크기가 가장 크게 성장하였으며, 이는 액포의 성장에 기인하는 것으로 사료된다. 8시간이상 반응시켰을 때에는 protoplast가 반응액을 영양분으로 하여 발아관을 형성하는 것도 볼 수 있었다.

考 察

NOVOZYM 234에 있어서 본 실험의 결과는 기존의 연구결과와 유사하지만, DRISELASE의 경우 Cho 등(1981)의 연구결과와는 *T. koningii* ATCC 26113의 균사체를 이용하여 1% DRISELASE를 최적 농도로 보고한 반면, 본 실험에서는 2% DRISELASE가 *T. koningii* IAM 12534의 protoplast생성에

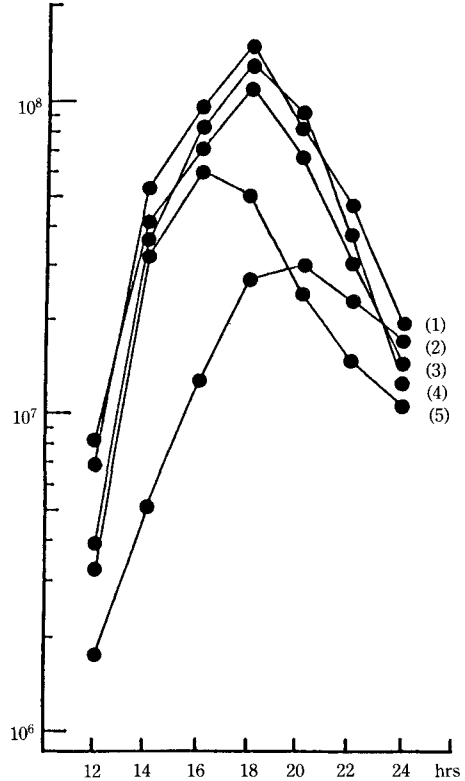


Fig. 4. Effect of mycelial age on protoplast formation. (1) *T. koningii* IAM 12534, (2) *Trichoderma* sp. IAM 13109, (3) *T. saturnisporum* IAM 12535, (4) *T. reesei* IAM 13106, (5) *T. longibruchiatum* IAM 13107.

있어서 최적 농도이었다. 삼투안정제의 최적농도에 있어서는 균주에 따라 그리고 삼투안정제의 종류에 따라서 다양하게 나타났다. 예를 들면 *T. reesei* IAM 13106의 경우, 0.7 M KCl이 가장 효과적인 반면, mannitol의 경우, 0.9M에서 가장 높은 protoplast생성율을 보였다. 삼투안정제의 종류에 따른 protoplast생성율은 KCl>mannitol>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>>MgSO<sub>4</sub>>NaCl 순이었으며, 이는 Benitez(1975)의 연구와는 다소 차이가 있었다. *T. saturnisporum* IAM 12535의 경우, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>>KCl>NaCl>mannitol>MgSO<sub>4</sub>순으로 protoplast 생성율을 보였으며, 다른 균주들에 비하여 각 삼투안정제에 따른 최적 농도가 큰 폭으로 나타났다.

*T. longibruchiatum* IAM 13107과 *T. longibruchiatum* IAM 13108의 경우, 동일종으로 분류동정된 균임에도 불구하고 protoplast생성률도 다를뿐만 아

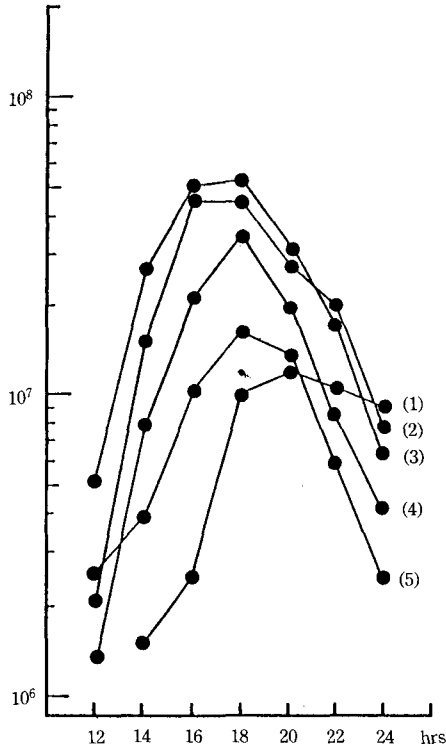


Fig. 5. Effect of mycelial age on protoplast formation. (1) *T. hamatum* IAM 12505, (2) *T. viride* AL 1, (3) *T. longibruchiatum* IAM 13108, (4) *T. viride* IAM 5141, (5) *T. harzianum* IAM 12506.

나라 *T. longibruchiatum* IAM 13107의 경우에는  $KCl > (NH_4)_2SO_4 > \text{mannitol} > NaCl > MgSO_4$  순으로 삼투안정제의 효과를 보인 반면, *T. longibruchiatum* IAM 13108에서는 mannitol보다 NaCl이 효과적인 삼투안정제로서 역할을 했다. 또한, 배지종류에 따른 생육도에 있어서도 다소 차이를 보였다(Table 2).

*T. koningii* IAM No.12534의 경우,  $KCl > (NH_4)_2SO_4 > NaCl > \text{mannitol} > MgSO_4$ 의 순으로 삼투안정제의 효과를 보였는데, 이는 Cho 등(1981)의 연구결과인  $MgSO_4 > (NH_4)_2SO_4 > \text{mannitol} > KCl$ 와는 아주 큰 차이를 보였다. 또한, 삼투 안정제의 농도에 있어서도, 0.6M NaCl보다는 0.8M NaCl이 효과적이었다. *T. viride* IAM 5141의 경우,  $KCl > (NH_4)_2SO_4 > MgSO_4 > NaCl > \text{mannitol}$  순으로 삼투안정제의 효율을 보였으며 최적농도는 0.7 M로 Benitez(1975)의 연구 결과와 아주 유사했다. 이에 반하여 본 실험실에서 분리동정한 *T. viride* AL 1의 경우, 삼투안

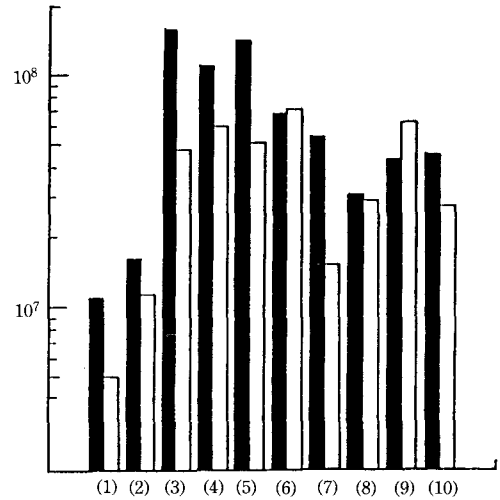


Fig. 6. Comparison with NOVOZYM 234 and DRISEALASE on protoplast formation. (1) *T. hamatum* IAM 12505, (2) *T. harzianum* IAM 12506, (3) *T. koningii* IAM 12534, (4) *T. saturnisporum* IAM 12535, (5) *T. reesei* IAM 13106, (6) *T. longibruchiatum* IAM 13107, (7) *T. longibruchiatum* IAM 13108, (8) *Trichoderma* sp. IAM 13109, (9) *T. viride* IAM 5141, (10) *T. viride* AL 1, □: NOVOZYM 234, ■: DRISEALASE.

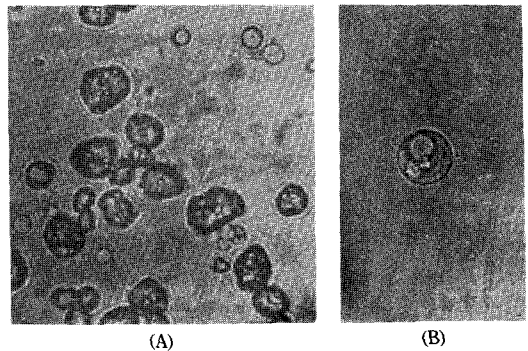


Fig. 7. Microscopic photograph of protoplasts. (A) Protoplasts after 4 hours-reaction (X400), (B) Giant protoplast after 8 hours-reaction (X400).

정제의 효율은  $(NH_4)_2SO_4 > KCl > NaCl > \text{mannitol} > MgSO_4$  순이었으며, 배지종류에 따른 생육정도에 있어서도 다소 차이를 보였다.

일반적으로 protoplast생성시에 삼투안정제로서  $MgSO_4$ 가 효과적인 것으로 보고되어 있는데, 본 실험결과는 *T. viride* IAM 5141을 제외하고는  $MgSO_4$ 가 삼투 안정제로서는 좋은 결과를 나타내지 않았다.

또한, 삼투안정제의 농도에 있어서도 대개 동일균주에 한해서는 각 삼투안정제의 농도가 똑같은 것으로 보고되어 있는데, 본 실험에서는 동일균주에 대해서도 각각의 삼투안정제의 농도가 다소 다를 수 있다는 것을 볼 수 있었다.

한편, 균사체 배양시간에 따른 protoplast 생성율은 대수증식기 초기와 증기사이의 균사체가 최적이었다.

이상의 실험결과, *Trichoderma* 속의 제균종을 대상으로 한 protoplast 생성에 있어서 효소의 최적 조건은 모든 균주에 걸쳐 비교적 균일한 결과를 보였으나, 삼투안정제의 종류 및 농도에 있어서는 기존의 연구논문과 비교해 볼 때 protoplast 생성 및 안정성을 효과적으로 유지시켜주는 공통적인 삼투안정제와 그 농도는 존재하지 않으며, 사용균주 및 세포벽 분해효소의 종류 그리고 기타 반응상의 조건에 따라 달라질 수 있는 것으로 사료된다.

한편, 본 실험에서 사용된 *Trichoderma* 속의 균주들에 있어서 과거의 분류기준은 생육상태, 배양 조건 등에 의해 결과가 불안정하고, 판정하는 사람에 따른 차이를 감안한다면 좀 더 객관적인 분류기법이 도입되어야 할 것이다. 이를 위해 필수적으로 요구되는 protoplast의 형성에 관한 전반적인 조건을 검토하였으며, 앞으로 본 실험의 결과를 기반으로 새로운 분류학적인 접근이 수행되어야 할 것이다.

## 摘 要

*Trichoderma* 속의 제균종중에서 10균주를 선별하여 protoplast 형성에 관한 제반조건을 검토하였으며 그 결과는 다음과 같았다. 보편적으로 protoplast 형성에 있어서 삼투안정제의 효과는  $KCl > (NH_4)_2SO_4 > NaCl > mannitol > MgSO_4$  순이었으며, 최적 농도는 0.6-0.9 M 사이에서 결정되었다. Protoplast 형성을 위한 DRISELASE의 최적조건은 pH 5.0, 효소농도 2%. 반응시간 4시간, 반응온도 30°C 이었다. NOVOZYM 234의 최적조건은 pH 5.5, 효소농도 1%, 반응시간 3시간, 반응온도 30°C 이었다. Protoplast 생성은 대수증식기 초기와 증기사이의 균사체가 최

적이었다. Protoplast 생성에 있어서는 DRISELASE가 효과적이었으나 *T. longibruchiatum* IAM 13107과 *T. viride* IAM 5141의 경우에는 NOVOZYM 234가 보다 효과적이었다.

## 參考文獻

- Bahareen, S. 1981. The evolution of antarctic yeasts : DNA base composition and DNA-DNA homology, *Can. J. Microbiol.*, **28**: 406-413.
- Benitez, T., Ramos, S. and Garcia, A.I. 1975. Protoplast of *Trichoderma viride*, *Arch. Microbiol.*, **103**: 199-203.
- Cho, N.J., Rhee, Y.H. and Hong, S.W. 1981. Formation of protoplasts from *Trichoderma koningii*, *Kor. J. Microbiol.*, **19**: 186-191.
- Frenczy, L., Szegedi, M. and Kevei, F. 1977. Interspecific protoplast fusion and complementation in *Aspergillus experimentia*, *J. Gen. Microbiol.*, **33**: 184-186.
- Garcia, A.I., Belmonte, F.L. and Villanueva, J.R. 1966. Regeneration of mycelial protoplasts of *Fusarium eulmorum*, *J. Gen. Microbiol.*, **45**: 515-523.
- Hopwood, D.A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplast, *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**: 237-272.
- Kevei, F.C. 1985. Further studies on protoplast fusion and inter-specific hybridization within the *Aspergillus nidulans* group, *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 2229-2236.
- Kolar, H., Michak, H., Kammel, W.P. and Kubicek, C.P. 1985. Carboxymethylcellulase and  $\beta$ -glucosidase secretion by protoplast of *Trichoderma reesei*, *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 1339-1347.
- Kuraishi, H. 1985. Ubiquinone systems in fungi : Distributions of ubiquinones in the major families of Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes and their taxonomic implications, *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **26**: 383-395.
- Peberdy, J.F. 1979. Fungal protoplasts : Isolation, reversion, and fusion, *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**: 21-39.
- 안원근, 이재동. 1990. 섬유소 분해능을 가진 불완전균류의 분류에 관한 연구, *한국균학회지*, **18**: 70-76.

Accepted for Publication on March 3, 1992