

## *Rhizopus nigricans*로부터 원형질체의 분리

김명희 · 김말남\*

상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

### Isolation of Protoplasts from *Rhizopus nigricans*

Myung-Hee Kim and Mal-Nam Kim\*

Department of Biology, College of Science, Sangmyung Women's University, Seoul 110-743, Korea

**ABSTRACT:** Conditions for isolation of protoplasts from spores and mycelia of *Rhizopus nigricans* were studied. Larger amount of protoplasts was obtained from swollen spores in liquid medium contained with 5% of 2-deoxy-D-glucose for 4 hours than from mycelia. Enzyme mixture of Novozym 234(2%) and  $\beta$ -glucuronidase(5000 unit/ml) was most effective for the isolation of protoplasts from swollen spores and from mycelia. The solution of 0.6 M  $MgSO_4$  or mannitol and pH 6.0 showed good results as the osmotic stabilizer and the optimal condition of pH of the enzyme solution for the isolation of protoplast from the swollen spores, respectively. At this condition,  $8.0 \times 10^6$  cells/ml of protoplasts was obtained from swollen spores by digestion with lytic enzyme mixture for 2 hours.

**KEYWORDS:** *Rhizopus nigricans*, protoplast, swollen spores, mycelia

## 서 론

*Rhizopus nigricans*는 스테로이드의 미생물적 전환 반응(Kim 등, 1990), acetyl methyl carbanol과 2,3-butylene glycol의 생성(Field와 Richmond, 1987) 및 유기산의 생성(유, 1986) 등의 산업 분야에서 중요한 역할을 하는 부가가치가 높은 균주이다. 이 균주의 생산성을 증대시키기 위하여는 균주의 개발 및 육종이 필요하다.

Kao와 Michaylak(1974)이 polyethylene glycol에 의하여 식물체의 원형질체 융합이 효과적으로 이루어짐을 보고한 이래 세균(Park 등, 1993; Rodriguez 등, 1991), 방선균(Kim 등, 1983; Pidcock 등, 1985), 효모(Koh 등, 1992; Dhawale와 Ingledew, 1983) 및 사상균(Toyama 등, 1984; Lee 등, 1989)을 재료로 많은 연구가 진행되어 왔다. 이러한 연구의 결과 원형질체 융합 기술이 유전물질 전달을 위한 매우 유용한 방법임이 밝혀졌으며, 실제 이 기술을 이용

하여 산업적으로 유용한 우량 균주가 개발되었다(Petty와 Crawford, 1984; Lee와 Kim, 1993).

원형질체 융합에 의한 균주 육종을 위하여는 먼저 원형질체를 제조하여야 한다. Weibull(1953)이 최초로 *Bacillus megaterium*에서 원형질체를 분리하였으며, 사상균으로는 *Neurospora crassa*로부터 Bachman과 Bonner(1959)가 원형질체를 분리한 이후로 *Fusarium culmorum*(Laborda, 1974), *Trichoderma reesei*(Kumari와 Panda, 1992), *Pleurotus ostreatus*(Go 등, 1985), *Flammulina velutipes*(Yea 등, 1988), *Aspergillus nidulans*(Bos와 Slakhorst, 1981) 등에서 원형질체 제조가 이루어져 왔다.

격벽이 없어 다핵체의 균사로 이루어진 *Rhizopus* 속은 원형질체 형성이 효과적으로 이루어지지 못하여 이에 대한 연구 결과는 많지 않으며, *Rhizopus suinus*(Rhee 등, 1984)와 *Rhizopus oryzae*(Rhee와 Choi, 1986)의 균사체로부터 원형질체가 분리된 바 있다. Gabriel(1968)은 *R. nigricans*의 균사체로부터 원형질체를 분리하였으나 원형질체의 형성 및 재생 과정을 관찰하였을 뿐 원형질체의 형성술에 관하여

\*Corresponding author

는 언급하지 않았다.

균사체로부터 분리되는 원형질체는 원형질체가 생성되는 균사체의 부위와 생성 시기에 따라 함유하고 있는 핵이나 세포내 소기관 등의 분포가 불균일하여(Gibson과 Feberdy, 1972) 정상 균사체로의 환원율이 낮으므로 융합 및 재조합체의 수득율이 낮은 단점이 있어(Park 등, 1983), 단세포 상태로 존재하는 포자로부터 원형질체를 분리하는 것이 유리하다. 실제로 포자로부터 분리해 낸 원형질체는 균사체로부터 생성된 원형질체보다 재생율과 융합율이 더 높음이 보고되었다(Park 등, 1983).

원형질체는 융합에 의한 우수 균주 육종 뿐만 아니라, 세포내 소기관 및 핵의 전이(Ferency와 Maraz, 1977), 외부 DNA의 수용체(Gayer-Herkert 등, 1989), 미생물의 유전적 분석 및 생리, 생화학적 연구에도 이용되고 있다.

원형질체를 이용한 연구에서의 과정은 다량의 원형질체를 얻는 것으로 원형질체의 생성율은 원형질체 생성에 사용되는 효소의 종류와 농도, 효소액과의 반응 시간과 효소액의 pH, 삼투안정제의 종류와 농도, 균사체의 배양시간 등에 영향을 받는 것으로 보고되었다(Feberdy, 1979).

본 연구에서는 산업적으로 응용도가 높은 *R. nigricans*의 균사체와 포자로부터 원형질체를 분리하는데 관여하는 제 조건들을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

본 연구에 사용한 균주는 *Rhizopus nigricans* Ehrenberg이며 배지 및 배양 조건은 전보(Kim과 Kim, 1991)에 따랐다.

### 포자로부터 원형질체의 분리

포자 현탁액 5 ml( $5.0 \times 10^6$  spores/ml)를 2-deoxy-D-glucose가 5% 농도로 첨가된 50 ml의 액체 배지에 접종하여 28°C, 180 rpm의 Rotary Shaker에서(Vision, KMC-8480SR) 진탕 배양시킴으로써 포자를 팽창시켰다. 배양이 끝난 후 팽창된 포자는 원심 분리(3,000×g, 20분)하여 분리하였으며, 삼투안정제로 세척하였다. 삼투안정제는 20 mM 인산완충액에 용해시켜 준비한 0.6 M NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, man-

nitol, NH<sub>4</sub>Cl을 사용하였다.

효소 용액 1 ml에 팽창된 포자를  $1.0 \times 10^7$  cells/ml 농도로 가하여 28°C에서 진탕배양하여 원형질체 생성을 유도하였다. 효소는 Novozym 234(Novo Ind., Denmark), β-glucuronidase(Sigma Chem. Co., USA), Chitinase(Sigma Chem. Co., USA), Driselase(Sigma Chem. Co., USA)를 단독 혹은 혼합하여 사용하였으며, 삼투안정제 용액에 완전히 녹인 후 membrane filter(Millipore Co., USA, 0.2 μm)로 세균하여 사용하였다.

### 균사체로부터 원형질체의 분리

포자 현탁액 1 ml( $5.0 \times 10^6$  spores/ml)를 50 ml의 액체 배지에 2-deoxy-D-glucose(5% W/V)와 함께 접종하여 28°C, 180 rpm에서 14시간 진탕배양하여 균사체를 준비하였다. 멸균 증류수와 삼투안정제로 세척하고, 균사체 습중량 0.1 g당 1 ml씩의 각종 세포벽 분해 효소를 첨가하여 반응시켰다. 효소 반응 후 생성된 원형질체는 sintered glass filter(pore size 40-60 μm)를 사용하여 균사체 잔여물로부터 순수 분리하여 삼투안정제로 2-3회 세척하였다. 이때 사용한 삼투안정제와 효소는 포자로부터 원형질체를 분리할 때와 동일한 것을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 원형질체 생성에 미치는 효소의 영향

동일한 균주에서도 사용하는 세포벽 분해 효소의 종류와 농도에 따라 원형질체 생성율이 다르게 보고되어 왔다. Chin(1984)은 *Pleurotus ostreatus* 균사체로부터 원형질체를 생성하는데 1.5%의 β-glucuronidase와 0.5%의 cellulase "Onozuca" R10 혼합 용액으로 단위 ml 당  $4.5 \times 10^7$ 에 달하는 원형질체를 생성시킨 반면, Byun 등(1984)은 같은 균주에서 Novozym 234가 가장 효과적임을 밝혔다.

Table 1은 *R. nigricans*의 포자와 균사체를 여러 종류의 세포벽 분해 효소로 2시간 동안 처리하여 생성시킨 원형질체 수를 나타낸다. 삼투안정제로는 0.6 M MgSO<sub>4</sub>를 사용하였다. 단일 효소로 처리하였을 때에는 2% Novozym 234가 가장 효과적이었고 여기에 5000 unit/ml의 β-glucuronidase를 첨가한 경우 원형질체 생성율이 증가하였다. *Pyricularia or-*

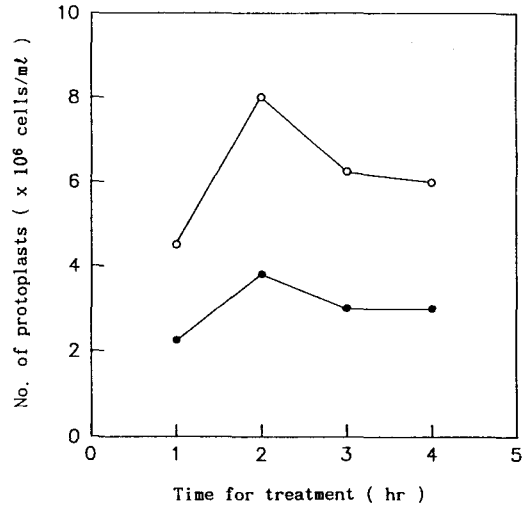
**Table 1.** Protoplast formation from swollen spores and mycelia of *R. nigricans* by treating the cells with lytic enzymes

| Lytic enzymes   | Number of protoplasts (cells/ml) |                   |
|---|----------------------------------|-------------------|
|   | swollen spores                   | mycelia           |
| Novozym 234(2%)   | $6.25 \times 10^6$               | $1.2 \times 10^6$ |
| $\beta$ -glucuronidase (10,000 unit/ml)                   | $2.0 \times 10^6$                | $3.0 \times 10^6$ |
| Driselase(2%)   | 0                                | 0                 |
| Chitinase(50 unit/ml)                                     | 0                                | 0                 |
| Novozym 234(2%)+<br>$\beta$ -glucuronidase(5,000 unit/ml) | $8.0 \times 10^6$                | $3.8 \times 10^6$ |
| Novozym 234(2%)+<br>Chitinase(50 unit/ml)                 | $6.2 \times 10^6$                | $1.0 \times 10^6$ |

yzae에서도 단일 효소보다 복합 효소를 사용하였을 때 더 큰 효과를 얻었다(Lee와 Chung, 1985). *Rhizopus*속의 세포벽은 chitin, chitosan과 단백질로 구성되어 있으며, chitin의 함량이 높으므로(Tominaga와 Tsujisaka, 1981) chitinase의 작용이 기대되었으나 chitinase는 원형질체 형성에 큰 효과를 나타내지 않았다. 균사체보다 팽창된 포자로부터 약 2.2배 더 많은 수의 원형질체가 생성되었으므로, 본 실험의 결과는 우수한 것으로 사료된다. Park 등(1983)도 균사체로부터 분리된 원형질체보다 포자로부터 분리된 원형질체가 재생율과 융합율이 더 높다고 보고한 바 있다.

**세포벽 분해효소 처리시간의 영향**

Novozym 234(2%)와  $\beta$ -glucuronidase(5000 unit/ml) 복합효소로 효소 처리 시간을 달리하였을 때 원형질체의 생성 정도를 나타낸 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 균사체와 팽창시킨 포자 모두에서 2시간 처리하였을 때 가장 많은 수의 원형질체가 생성되었다. Bos와 Slakhorst(1981)는 *Aspergillus nidulans*의 팽창시킨 포자로부터 *Oerskovia xanthineolytica*에 의해 합성된 세포벽 가수분해 효소로 처리하여 원형질체를 분리하였을 때 반응 3시간만에 80%의 생성율을 얻었으며, *Trichoderma koningii*의



**Fig. 1.** Effect of duration of treatment with lytic enzymes on the formation of protoplasts from the swollen spores and mycelia of *R. nigricans*. Reaction was performed in a solution containing Novozym 234(2%) and  $\beta$ -glucuronidase(5,000 unit/ml). ○: protoplasts from swollen spores, ●: protoplasts from mycelia.

포자로부터 Park 등(1983)은 2% Driselase로 3시간 처리하여  $7.0 \times 10^6$  protoplasts/ml의 원형질체를 분리하였다.

**삼투 안정제의 효과**

원형질체의 생성과 보존 유지에 필요한 삼투 안정제로는 0.4-0.8 M 농도의 NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, mannitol, sucrose, sorbitol 등이 가장 많이 사용되고 있으며 모든 균류에 공통적으로 사용 가능한 삼투 안정제는 없다고 보고되어 있으므로(Davis, 1985), 균주와 가수분해 효소의 종류에 따라 삼투 안정제의 종류와 농도를 다르게 사용하여야 한다.

본 실험에 사용한 삼투 안정제의 종류에 따른 원형질체의 생성 정도를 Fig. 2에 나타내었다. 삼투 안정제로 MgSO<sub>4</sub>와 mannitol을 사용한 경우 가장 효과가 좋았으며 NaCl에서는 가장 적은 수의 원형질체가 생성되었다.

**효소 용액 pH의 효과**

Fig. 3은 세포벽 분해 효소를 용해시키는 삼투

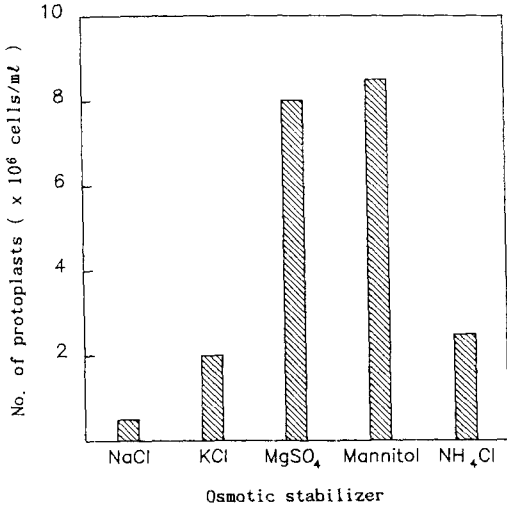


Fig. 2. Effect of osmotic stabilizer on the formation of protoplasts from the swollen spores of *R. nigricans*. Concentration of salts and mannitol is 0.6 M in 20 mM phosphate buffer at pH 6.0 and lytic enzymes consists of Novozym 234(2 %) and  $\beta$ -glucuronidase(5,000 unit/ml).

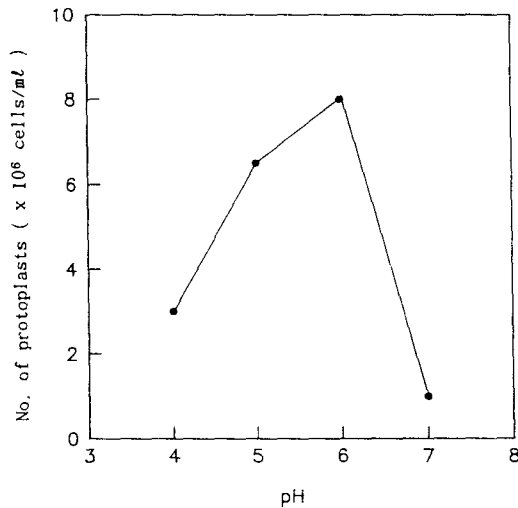


Fig. 3. Effect of pH of lytic enzyme solution on the formation of protoplasts from the swollen spores of *R. nigricans*.

안정제(MgSO<sub>4</sub>)의 pH를 달리 함으로써 효소 용액의 pH가 원형질체 생성에 미치는 영향을 조사한 결과로 Rhee와 Choi(1986)가 *R. oryzae*에서 보고한 최적 pH 범위(pH 6.0-6.5)와 유사한 pH 6.0에서 세포벽 분해 효소에 대한 가장 높은 효소 활성을 나타내었다.

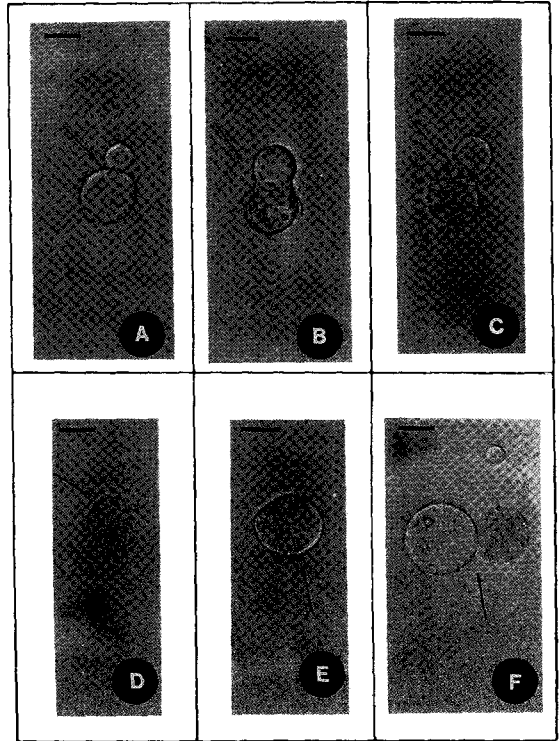


Fig. 4. Protoplasts releasing from the swollen spores of *R. nigricans*. Protoplast protruding from the swollen spores(A-C) and protoplast formation by cell wall lysis(D-F). Arrows indicate protruding of protoplast. Bar represents 12.5  $\mu$ m.

원형질체 생성의 현미경적 관찰

Fig 4와 5는 각각 팽창된 포자와 균사체로부터 원형질체가 생성되는 과정을 나타내고 있다. 팽창시킨 포자의 경우(Fig.4)는 포자의 한 부분에서 세포벽이 약화되어 원형질체가 분리되거나(Fig. 4-A~C), 또는 세포벽 분해 효소가 세포벽 전체에 작용하여 세포벽이 분해됨으로써 원형질체가 분리되어 나왔다(Fig. 4-D~F). 균사체로부터의 원형질체의 분리는(Fig. 5) 균사체의 정단부위(Fig. 5-A, B), 균사체의 측면부위(Fig. 5-C, D) 등 여러 부위에서 관찰되었으며, 생성 부위에 따라 원형질체의 크기가 다양하게 나타났다.

이상의 결과로부터 격벽이 없는 다핵체의 균사체로 이루어진 *R. nigricans*에서도 팽창된 포자로부터 효율적으로 원형질체를 분리해 낼 수 있음을 알 수 있으며 이를 이용하여 원형질체 융합에 의한 체제

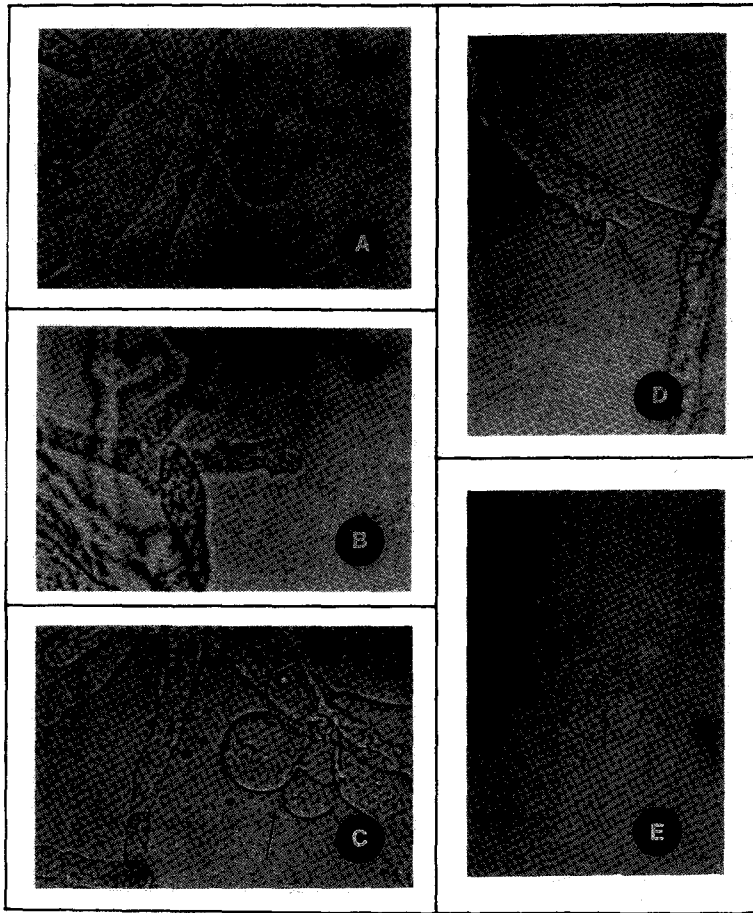


Fig. 5. Protoplasts releasing from the mycelia of *R. nigricans*. Protoplasts protruding from hyphal tip(A, B) and from lateral surface of hyphae(C, D). Protoplasts were formed from the mycelia(E). Arrows indicate protruding of protoplast. Bar represents 12.5  $\mu$ m.

포잡종을 유도함으로써 우량균주를 개발할 수 있을 것으로 전망된다.

## 적 요

*Rhizopus nigricans*의 포자와 균사체로부터 원형질체 생성을 위한 최적 조건을 조사하였다. 5% 2-deoxy-D-glucose가 첨가된 액체 배지에서 14시간 배양시킨 균사체보다 동일배지에서 4시간 배양하여 팽창시킨 포자로부터 더 많은 원형질체가 생성되었으며, Novozym 234(2%)를 단독으로 처리하였을 때 보다는 5000 unit/ml의  $\beta$ -glucuronidase와 혼합하였을 때 원형질체의 생성율이 더 높았다. 삼투 안정

제로 0.6 M  $MgSO_4$ 를 사용한 복합 효소 용액(pH 6.0)에 2시간 처리하였을 때 팽창된 포자로부터 단위 ml당  $8.0 \times 10^6$ 의 원형질체를 분리할 수 있었다.

## 参考文献

- Bachman, B. J. and Bonner, O. M. 1959. Protoplast from *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **78**: 550-561.  
 Bos, C. J. and Slakhorst, S. M. 1981. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Can. J. Microbiol.* **27**: 400-407.  
 Byun, M. O., Go, S. J., Park, Y. H. and Shin, G. C. 1984. Some factors affecting the protoplast release from *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **12**: 9-14.

- Chin, K. H. 1984. Studies on the protoplast formation and reversion in *Pleurotus ostreatus*. Master's thesis of Sug Myung Women's University.
- Davis, B. 1985. Factors influencing protoplast isolation, In *Fungal Protoplasts*, pp. 45-72. ed. J. F. Peberdy and L. Ferenczy. New York: Marcel Dekker.
- Dhawale, M. R. and Ingledew, W. M. 1983. Interspecific protoplast fusion of *Schwanniomyces* yeasts. *Biotechnol. Lett.* **5**: 826-830.
- Ferenczy, L. and Maraz, A. 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **268**: 524-545.
- Fields, M. L. and Richmond, B. 1987. Substrate effect on 2,3-butylene glycol production by *Rhizopus nigricans* and *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* **15**(6): 1313-1315.
- Gabriel, M. 1968. Formation and regeneration of protoplasts in the mold *Rhizopus nigricans*. *Folia Microbiol.* **13**: 231-234.
- Gayer-Herkert, G., Schneider, J. and Kutzner, H. J. 1989. Transfection and transformation of protoplasts of the thermophilic actinomycete *Faenia rectivirgula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 371-375.
- Gibson, R. K. and Peberdy, J. F. 1972. Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 529-538.
- Go, S. J., Shin, G. C. and Yoo, Y. B. 1985. Protoplast formation, regeneration and reversion in *Pleurotus ostreatus* and *P. sajor-caju*. *Kor. J. Mycol.* **13**(3): 169-177.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1974. A method for high frequency intergenetic fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**: 355-367.
- Kim, M. H., Lee, J. J., Kim, M. N. and Min, B. R. 1990. Optimal material and conditions for the immobilization of *Rhizopus nigricans* in the 11 $\alpha$ -hydroxylation reaction of progesterone. *Kor. J. Mycol.* **18**(2): 84-88.
- Kim, M. H. and Kim, M. N. 1991. Transformation pathway of the progesterone by *Rhizopus nigricans*. *Kor. J. Microbiol.* **29**(2): 111-116.
- Kim, K. S., Ryu, D. D. Y. and Lee, S. Y. 1983. Application of protoplast fusion technique to genetic recombination of *Micromonospora rosaria*. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 273-280.
- Koh, M. S., Kim, S. M. and Chun, S. B. 1992. Construction of astaxanthin overproduction strain of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**(1): 46-49.
- Kumari, J. A. and Panda, T. 1992. Studies on critical analysis of factors influencing improved protoplasts from *Trichoderma reesei* mycelium. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 241-248.
- Laborda, F., Acha, I. G. and Villanueva, J. R. 1974. Studies on a streptozyme capable of obtaining protoplasts from *Fusarium culmorum* conidia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **62**: 509-518.
- Lee, Y. H. and Chung, H. S. 1985. Formation of protoplasts from *Pyricularia oryzae*. *Kor. J. Microbiol.* **23**(3): 209-214.
- Lee, E. J. and Kim, J. K. 1993. Development of a novel yeast strain which ferments soy sauce by protoplast fusion. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**(1): 24-30.
- Lee, S. Y., Lee, J. S. and Lee, Y. N. 1989. Protoplast fusion of *Aspergillus oryzae*. *Kor. Jour Microbiol.* **27** (3): 216-220.
- Park, H. J., Baik, H. S., Song, J. C. and Jun, H. K. 1993. Studies on the protoplast fusion between *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**(2): 107-112.
- Park, H. M., Hong, S. W. and Hah, Y. C. 1983. Isolation of protoplasts from conidiospores of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **21**(4): 213-219.
- Peberdy, J. F., 1979. Fungal protoplast: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 21-39.
- Petty, T. M. and Crawford, D. L. 1984. Enhancement of lignin degradation in *Streptomyces* sp. by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 439-440.
- Pidcock, K., Montenecourt, B. S. and Sands, J. A. 1985. Genetic recombination and transformation in protoplasts of *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(3): 693-695.
- Rhee, Y. H. and Choi, Y. K. 1986. Characteristics of protoplast induction by autolytic enzyme of *Rhizopus oryzae*. *Kor. J. Mycol.* **14**(4): 273-280.
- Rhee, Y. H., Kim, M. S. and Choi, Y. K. 1984. Protoplast fusion of *Rhizopus sinuatus*. *Chungnam J. Science* **11**: 193-202.
- Rodriguez, H., Garcia, B., Ancheta, O. and Sipiczki, M. 1991. Formation, regeneration, and fusion of protoplasts in a *Cellulomonas* strain. *Current Microbiol.* **23**: 265-269.
- Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y. 1981. Investigation of the structure of *Rhizopus* cell wall with lytic enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **45**(7): 1569-1575.
- Toyama, H., Yamaguchi, K., Shinmyo, A. and Okada, H. 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*,

- using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(2): 363-368.
- Weibull, C. 1953. The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J. Bacteriol.* **66**: 688-695.
- Yea, U. H., Yoo, Y. B., Park, Y. H. and Shin, G. C. 1988. Isolation of protoplasts from *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Mycol.* **16**(2): 70-78.
- 유주현. 1986. 식품미생물학. 개문사.