

*Trichoderma viride*의 변이균주 분리를 위한 Cellulase Semiquantitative Plate Assay

玄馨煥* · 白炯錫** · 李仁馥 · 李世永**

韓國原子力研究所 分子生物學 研究室
(1978년 9월 21일 수리)

Plating Technique for Cellulase Mutants of *Trichoderma viride*

Hyung Hwan Hyun · Hyung Suk Baik · In Bok Lee · Se Yong Lee

Molecular Biology Lab., Korea Atomic Energy Research Institute, Seoul, Korea
(Received Sept. 21, 1978)

Abstract

A plating technique was devised to screen for high producing cellulase mutants of *Trichoderma viride*. The method employs:

- 1) The use of deoxycholate to limit colony size and 2) saponin to enhance cellulase detection in combination with rice straw pulp and pure cellulose on agar plate. The method will be used to isolate constitutive cellulase mutants of *Trichoderma viride* and should prove useful for isolating high producing mutants from a range of organisms.

서 론

섬유소는 우리 주변의 가장 풍부한 탄수화물은 그 대부분이 효율적으로 이용되지 못하는 실정에 있으며, 세계적인 자원난으로 이를 포도당으로 전환시켜 식량과 에너지원으로 사용하려는 노력이 활발히 진행되고 있다. (1) 현재까지 연구된 바에 의하면 cellulase를 사용한 섬유소의 가수분해에 있어서, 포도당 생산 총비용의 60%정도가 cellulase의

생산에 사용되며 이것이 cellulase에 의한 포도당 생산이 상업적으로 이루어지지 않는 가장 큰 원인이다. (2) 따라서 값싸게 많은 양의 효소를 생산하는 것이 섬유소 이용의 중요한 관건이 되고있다.

지금까지 가장 좋은 균주라고 알려진 것은 U.S. Army Natick Laboratory에서 개발한 *Trichoderma viride* mutant인데 이 균주는 야생균주보다 cellulase 역가가 약 2.5배 증가한데 불과하다. 그러므로 cellulase를 가장 값싸게 얻기 위해서는 무엇보다도 cellulase분비 균주를 개량하는 것이 가장 좋은 방법이라고 생각된다.

그런데 *Trichoderma viride*의 cellulase는 inducible enzyme으로 sophorose같은 아주 효과적인 ind-

* 現 第一製糖 研究室

**現 高麗大學校 農科學 農化學科

ucer로 완전히 induce 되었을 때는 cellulose로 induce 되었을 때 보다 cellulase 역가가 수 백배 증가하는 것으로 보아^(3,4) 가장 효과적인 cellulase 분비 균주를 얻기 위해서는 constitutive mutant 같은 regulatory mutant를 얻는 것이 가장 좋은 방법이라고 생각된다. 그래서 constitutive mutant를 분리 하려고 계획하였으나 다른 fungi 균주 개발에서 공통적인 문제인 *Trichoderma viride*를 compact colony로 plating하는 것과 cellulase mutant들을 plate상에서 쉽게 확인할 수 있는 방법의 개발이 절실히 요망되어 plating technique를 개발하였다.

재료 및 방법

1. 균주

Trichoderma viride QM 9414를 사용하였다. 이는 U. S. Army Natick Laboratory에서 제공받은 것이며 야생균주보다 2~4배의 cellulase 역가를 가진 균주이다.

2. Stock culture

Potato dextrose agar (Difco)배지에 접종한 후 27°C에서 48시간 배양하여 냉장고에 보관하고 필요시마다 한 tube씩 사용하였다.

3. Spore suspension

Stock culture되어 있는 시험관에 멸균증류수 10 ml를 가한 후 유리병으로 slant를 굽고 잘 혼합하여 사용하였다.

4. plating 방법

일반적으로 fungi를 plate하는것 처럼 spore suspension을 직접 agar plate상에 도포하여 27°C에서 배양하였다. 기질로는 pure cellulose (Merck)와 pulp [삼정펄프(株)]를 사용하였다.

5. Colony 형성배지 및 형성조건

Trichoderma viride QM 9414는 36~48시간 안에 petri dish 전면을 균사로 덮어 버리므로 (Fig. 1) 단일 colony를 형성 시키기 위해서는 그 colony size를 제한할 필요가 있으므로 U. S. Army Natick Laboratory에서 submerged culture 용으로 사용하는 Table 1과 같은 조성의 배지에 접종한 결과도 Fig. 1과 같이 colony를 형성하지 않았다. 그래서 배지를 Table 2와 같은 deoxycholate agar medium

Table 1. *Trichoderma viride* Fermentation Media.

KH ₂ PO ₄	2.0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	1.4 g/l
Urea	0.3 "
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 "
CaCl ₂	0.3 "
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4 "
Mn SO ₄ ·H ₂ O	1.56 "
CoCl ₂	2.0 "
Cellulose	5.0 g/l
Agar	15 "

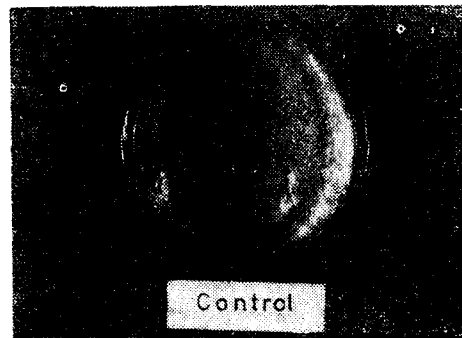


Fig. 1. *Trichoderma viride* QM 9411 were seeded on Medium described in Materials and Methods. Incubation is at 20°C for 96 hr.

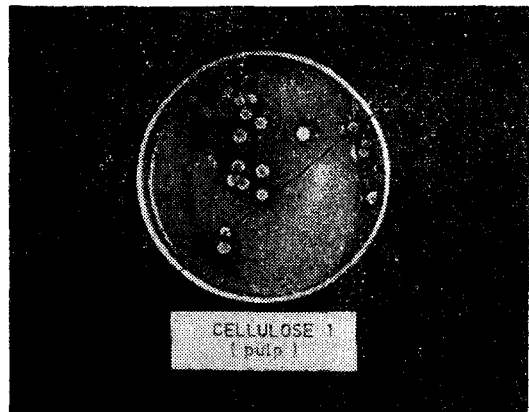


Fig. 2. *Trichoderma viride* QM 9414 Spores were Plated on Deoxycholate Agar Medium. Incubation is at 27°C for 360 hr.

Table 2. Deoxycholate Agar Medium.

NaCl	5 g/l
K ₃ HPO ₄	2 "
Ferric citrate	1 "
Sodium citrate	1 "
Peptone	10 "
Deoxycholate	1 "
Lactose	10 "
Agar	15 "

에 plate한 결과 Fig. 2와 같이 colony를 형성하였다. 그런데 deoxycholate agar medium에는 탄소원으로서 lactose가 들어있으므로 이를 제외시키고 pure cellulose와 pulp를 배지에 첨가하였을 때에도 역시 colony를 형성하였다.

6. Clear zone의 형성

Clear zone은 배지에 첨가된 섬유소가 균이 분비한 cellulase에 의해서 분해되어 생기는 것으로 아직까지는 clear zone이 형성되지 않았는데 이는 deoxycholate agar medium의 질소원인 peptone의 어떤 물질에 의하는 것으로 판단되어 peptone 대신

(NH₄)₂SO₄를 0.14% 첨가하여 본 결과 pulp를 첨가한 배지에서 clear zone이 형성되었다. 또한 생육촉진인자로서 Table 3과 같은 vitamin mixture를 첨가한 결과 clear zone의 형성 기간이 14일에서 10일정도로 단축되었다. 이렇게하여 형성된

Table 3. Vitamin Mixture for *Trichoderma viride*.

Biotin	0.005 mg/l
Inositol	2.0 "
Calcium pantothenate	0.2 "
Pyridoxine hydrochloride	0.2 "
Thiamine	0.2 "

clear zone은 명확하게 구분할 수 없었기 때문에 좀더 뚜렷한 clear zone을 형성시키기 위해서 saponin 0.1%를 배지에 첨가하였는데 Fig. 3 좌와같이 뚜렷한 clear zone을 형성하였다. 그러나 deoxycholate를 0.1% 첨가한 배지에서의 colony size는 너무 커서 한 plate당 50~100개의 colony를 형성시키기에 부적당하여 colony size를 좀더 제한할 필요가 있으므로 deoxycholate의 농도를 높인 결과 0.15%가 가장 적당하였다(Fig. 3의 가운데).

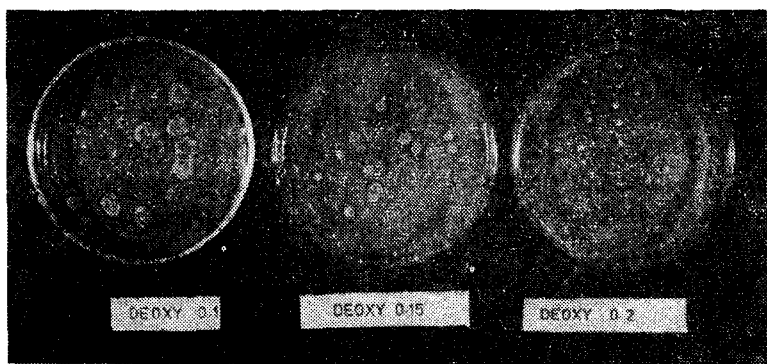


Fig. 3. *Trichoderma viride* QM 9414 Spores were Plated on Deoxycholate Agar Medium, Modified as described, and 1% Rice Straw Pulp, plus 0.1% Saponin, with 0.1% Deoxycholate (left), 0.5% Deoxycholate (center), and 0.2% Deoxycholate (right). Incubation is at 27°C for 240 hr.

7. Constitutive mutant의 선별을 위한 배지조성

기질로 pure cellulose를 첨가한 배지에서는 clear zone이 나타나지 않으므로 이것을 직접 사용하거나 (Fig. 4) 기질로 pulp를 사용할 경우에는 포도당은 1%, cellobiose나 glycerol은 0.5%를 배지에 첨가하여 사용하면 mutant를 선별할 수 있다, (Fig. 5)

결과 및 고찰

본 실험은 *Trichoderma viride* QM 9414의 생육을 저해하여 colony를 형성시키고 배지에 첨가된 섬유소가 균이 분비한 cellulase에 의해서 분해되어 생긴 clear zone으로서 육안으로 cellulase 역가를

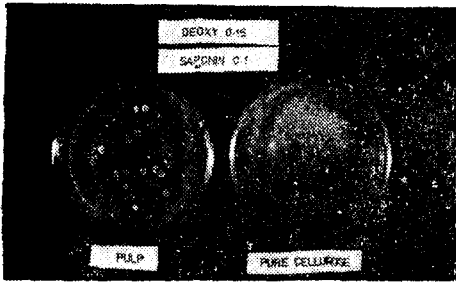


Fig. 4. *Trichoderma viride* QM 9414 Spores were Plated on Deoxycholate Agar Medium. Modified as described, 1% Rice Straw Pulp, 0.15% Deoxycholate, and 0.1% Saponin. Left Plate Contain Rice Straw Pulp, an Right Contain pure Cellulose as Carbon Source.

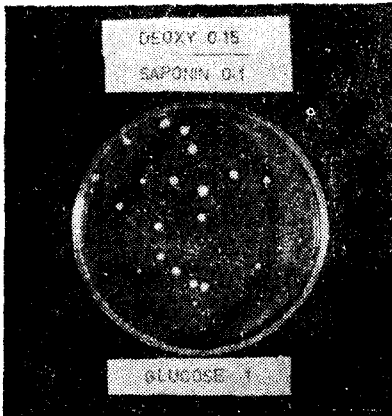


Fig. 5. *Trichoderma viride* QM 9414 Spores were Plated on Deoxycholate Agar Medium Modified as Described, 1% Rice Straw Pulp, 0.15% Deoxycholate, 0.1% Saponin, and 1% Glucose. Glucose is Added as the Repressor.

쉽게 측정할 수 있으며 repressor인 glucose, cellobiose, 그리고 glycerol을 pulp가 기질로한 배지에 첨가하거나 pure cellulose가 기질로 첨가되어있는 배지에서 constitutive mutant를 선별할 수 있는 방법에 관하여 실험한 것이다.

Colony를 형성시키기 위해서 여러가지 화합물이 실험되어 졌으나 deoxycholate가 가장 효과적이었다.

기질로 사용한 pure cellulose와 pulp는 서로 상이한 결과를 가져왔다. 즉 기질로 pure cellulose를 사용할 경우에 있어서 colony는 형성하나 clear

zone은 형성치 않았다. 이는 이 균이 분비한 효소만으로는 pure cellulose를 분해할 수 없고 다른 inducer가 첨가 되므로써 효소작용을 나타낼 수 있는 것으로 생각된다.

Clear zone을 형성시키기 위해서 peptone대신 다른 질소원, 즉 $(NH_4)_2SO_4$, urea등이 실험되어 졌으나 urea의 경우에는 colony가 퍼지고 clear zone이 불명확하였다. 한편, clear zone의 형성시간을 단축하기 위하여 첨가한 vitamin mixture는 단지 colony와 clear zone의 형성시간만을 단축하였을 뿐 colony size나 clear zone의 명확도에는 다른 영향을 미치지 않았다. Clear zone을 명확하게 하기위해서 첨가한 saponin은 clear zone의 크기를 균일하게 하는 작용이 있었다.

Montenecourt등⁽⁵⁾은 colony가 형성된 후 50°C에서 하룻밤을 배양하면 clear zone의 크기가 2배정도로 커져 clear zone의 확인시간이 단축된다는 것을 보고한 바 있으나 본 실험은 그렇게 하므로써 colony size가 커지는 clear zone이 불명확하며 타원형으로 되는 까닭에 cellulase 역가를 육안으로 식별하는데 곤란을 주었다.

Constitutive mutant를 선별하기 위해서 pulp와 glucose는 1%, cellobiose나 glycerol의 경우에는 0.5%를 배지에 첨가하면 clear zone을 전혀 생성하지 않았다.

이상의 결과로 보아 현재보다 역가가 높은 균주를 선별하기 위한 배지는 기질로 pulp를 사용하여 repressor를 첨가하지 않고 clear zone의 크기로서 역가를 확인하여 균주를 선별해야하며 constitutive mutant를 선별하기 위해서는 pure cellulose를 기질로한 배지에 직접 균을 심어 clear zone이 생성되는 균을 선별하거나 pulp를 기질로한 배지에서는 glucose의 경우에는 1%, cellobiose나 glycerol은 0.5%를 배지에 첨가하여 clear zone이 나타나는 colony를 선별하면 constitutive mutant를 찾을 수 있다.

요 약

Trichoderma viride QM 9414의 생육을 저해하여 colony를 형성 시키고 배지에 첨가된 cellulose가 균이 분비한 cellulase에 의해서 분해되어 생긴 clear zone으로서 육안으로 cellulase 역가를 쉽게 측정할 수 있는 방법과 repressor를 첨가하여 constitutive mutant를 선별할 수 있는 방법에 관한 실험을 하였든 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) Colony를 형성시키고 그 size를 제한 하는데 deoxycholate를 배지에 0.15% 첨가 하였을 때가 가장 좋았다.

2) Saponin을 배지에 0.1% 첨가하면 뚜렷한 clear zone을 형성하였다.

3) Constitutive mutant를 선별하기 위해서는 기질로 pulp를 사용하였을 경우 glucose를 1% 첨가하거나 glycerol이나 cellobiose를 0.5% 첨가하면 가능하다고 생각되며 기질로 pure cellulose를 사용하였을 경우는 그대로 배지에 spore를 plating하면 가능하다고 생각된다.

4) Cellulase 역가가 높은 균주는 clear zone의 크기로서 쉽게 분리할 수 있다.

참고문헌

- 1) Reese, E. T., Mandels, M. and Weiss, A. N.: *Cellulose as a Novel Energy Source*, 2Ed. Springer Verlag, 181~200 (1972).
- 2) Wilkie, C. R., Yang, R. D., and V. Von Stockar: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **VI**, 155 (1976).
- 3) Mandels, M. and Weber, J.: *Adv. Chem. Series*, **95**, 391 (1969).
- 4) Mandels, M., Weber, J. and Perizek, R.: *Appl. Microbil.*, **21**, 152 (1971).
- 5) Montencourt, B. S., and Eveleigh, D. E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 178 (1977).