

## *Trichoderma koningii*의 Protoplast 생성에 관하여

趙南鎭·李榮河·洪淳佑

(서울대학교 自然科學大學 微生物學科)

### Formation of Protoplast from *Trichoderma koningii*

CHO, Nam Jin, Young Ha RHEE, and Soon Woo HONG

(*Dep. of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University*)

#### ABSTRACT

Protoplast production from *Trichoderma koningii* ATCC 26113 was investigated for the purpose of doing basic and applied researches by protoplast fusion of the cellulolytic filamentous fungus.

High yields of protoplast were obtained by using the 18 hr. old mycelia treated with the lytic enzyme Driselase of Kyowa Fermentation Co., Japan, in 0.6M MgSO<sub>4</sub> or (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as osmotic stabilizers. The optimum temperature of mycelial digestion was about 28°C and the number of protoplast increased rapidly after 3 hr. digestion.

Protoplasts produced at different periods showed distinct morphological heterogeneities in the whole size and the size of vacuole.

#### 緒 論

식량결핍 및 대체에너지 개발의 가장 바람직한 대책으로써 전세계적인 관심을 끌고있는 섬유소발효산업이 현대계에 내포하고 있는 제일 중요한 문제점은 보다 효율적이며 경제적인 cellulase 생산능력을 갖춘 우수균주의 개발이라 할 수 있다. 따라서 우수균주의 개발을 위한 새로운 차원에서의 연구가 시급히 요청되고 있는 실정이다. (Montenecourt 등; 1977, Demain; 1976)

특히, cellulase 생산에 가장 많이 이용되고 있음에도 불구하고 유전학적인 연구가 거의 이루어지고 있지 않은 *Trichoderma*屬의 개량균주를 얻기 위해서는 보다 자세하고 기본적인 유전

학적 분석이 절대적으로 필요하며 이에 있어서는 heterokaryon 또는 protoplast fusion에의 이용이 최근 고려되고 있다(Flickinger; 1980, Elander; 1980). 이러한 관점에서 본 연구에서는 cellulase 생산능력을 갖고 있는 *T. koningii*의 protoplast 및 proplast fusion의 원리와 방법을 cellulase 생산균주개발에 도입하여, 세포학과 유전학적으로 접근함으로써 새로운 측면에서의 fungal cellulase system의 본질규명과 균주개발의 가능성을 밝혀보기 위한 연구의 일환으로 *T. koningii*의 proplast 형성에 관여하는 여러가지 조건들을 밝혀보았기에 이에 보고하는 바이다.

#### 材料 및 方法

○ 균주 및 배지: 본 실험에 사용한 균주는

*T. koningii* (ATCC 26113)이며 Malt Extract 배지 (malt extract 20, peptone 1, glucose 10, g/l)에서 28°C로 진탕배양 하였다.

○ Osmotic Stabilizers : 사용한 무기염류와 sugar alcohol 중에서 KCl, mannitol, sorbitol은 0.1M phosphate buffer (pH5.8)에 녹이고 MgSO<sub>4</sub>와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 0.01M phosphate buffer (pH5.8)에 녹여 전체농도가 0.6M이 되게 하였다.

○ Lytic Enzyme : Driselase (日本 協和 醱 酵 工 業)를 osmotic stabilizer에 1% (W/V)되게 넣고 4°C에서 가끔 흔들어 주면서 24시간 방치한 다음 원심분리 (4,500g/20분)하여 얻은 상등액을 다시 membrane filter (porosity 0.45μm)에 여과하여 사용하였다.

○ Protoplast 생성 : 균체 배양액을 원심분리 (4,500g/20분)하여 얻은 균사체를 osmotic stabilizer로 두번 세척한 후 lytic enzyme으로 침적시키고 진탕시키면서 반응시간별로 생성된 protoplasts를 조사하였다.

○ Protoplast의 순수분리 및 농축 : 생성된 Protoplasts를 sintered glass filter (porosity 40~60μm)로 여과시켜 균사체와 분리하였으며 이 여과액을 원심분리 (700g/10분)하여 농축하였다.

○ 균사체의 dry weight 측정 : Whatman filter paper No.2를 사용하여 110°C drying oven에서 2시간 건조시켜 무게를 재었다.

## 結果 및 考察

### 1. Protoplast 생성

lytic enzyme 과의 반응이 30분 경과한 후부터 균사체의 끝에서 bud-like 방식으로 조그마한 protoplast가 생성되기 시작하는데 (Plate 1), 이는 lytic enzyme에 의해 느슨해진 세포벽의 작은 구멍을 통해 protoplast가 비집고 나오는 것으로 추정된다 (Villanueva 등; 1971). 반응시간이 경과함에 따라 급격한 protoplast 생성의 증가를 보이며 생성부위와 양상도 다양해진다 (Plate 2). 시간별로 생성된 protoplasts 간에는 형태적인 면에서 큰 차이를 보이는데 반응후기에 생성된 protoplasts 일수록 내부에 보다 큰 액

포를 가지고 있으며 protoplast의 지름도 컸다. 0.6M MgSO<sub>4</sub>를 osmotic stabilizer로 사용하였을때의 평균 protoplast 크기 (지름)는 반응 후 1시간, 2시간, 3시간별로 각각 7.50μm, 8.55μm, 9.25μm로 나타났다. 이는 *Aspergillus nidulans*에서 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 얻은 Isaac 등 (1978)의 4.92±1.09, 5.65±1.37, 6.17±1.64와 비슷한 양상을 보이거나 전체적으로 *T. koningii*의 protoplasts가 컸다. 이와같은 protoplast간의 불균일성은 군사생장시 뚜렷한 차이를 보이는 군사부위와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다. 즉, 반응시간에 따라 생성되는 protoplasts의 생성부위가 다르므로써 형태적, 물질 대사능력에서 뿐만 아니라 정상적인 군사체로의 reversion역시 커다란 차이를 나타내는 것으로 믿어진다 (趙 등; 1981, Isaac 등; 1978, Peberdy; 1979, Necas; 1980). 3시간 반응시킨 후 생성된 protoplasts를 sintered glass filter 및 원심분리으로써 순수분리한 Plate 3에서도 전체지름과 액포의 크기에 있어 다양성을 보이고 있다.

Black yeast인 *Aureobasidium pullulans*에서 lytic agent로써 Driselase의 우수성을 지적한 Malcolm 등 (1980)의 결과와 마찬가지로 사상 균인 *T. koningii*에서도 보다 경제적이며 신속하게 protoplast 생성에 관여함을 보였다.

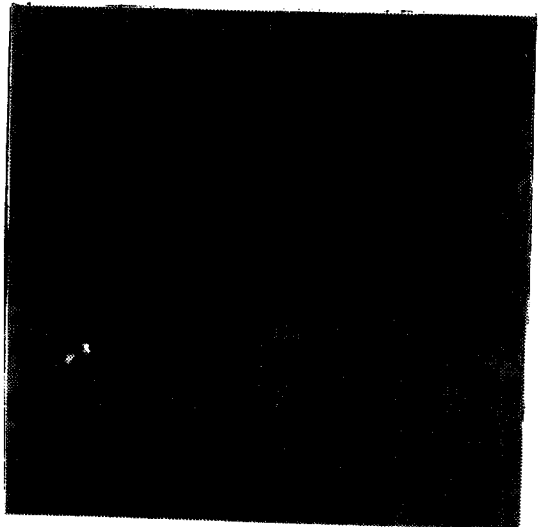


Plate 1. Protoplast is releasing from hyphal tip. (600X)

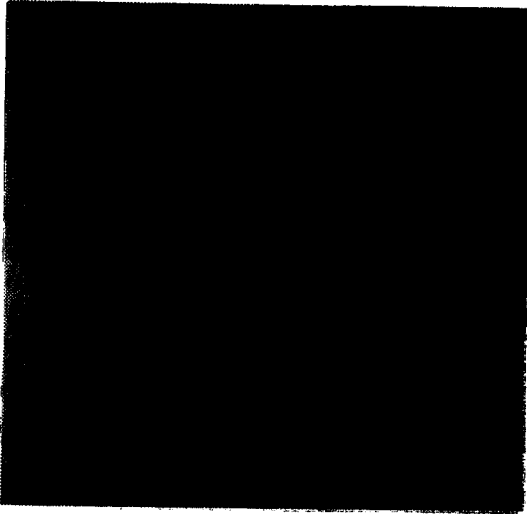


Plate 2. Protoplasts released sequentially (600X)

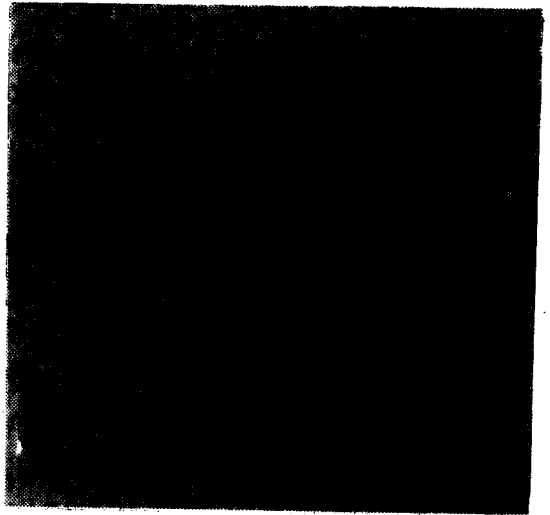


Plate 3. Purified protoplasts by filtration and centrifugation (150X)

2. Osmotic stabilizer의 종류와 농도에 따른 효과  
 사용된 무기염류와 sugar alcohol들은 각기 protoplast 생성율과 안정도에 있어 현격한 차이를 보였다. Fig. 1에서 보는 바와같이 MgSO<sub>4</sub>와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 가장 뛰어난 osmotic stabilizer로서 작용하였으며 각각의 osmotic stabilizer들은 그 농도에 따라서도 역시 큰 차이를 보였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 MgSO<sub>4</sub>의 경우 0.6M에서 protoplast의 생성과 안정도에 가장 좋은 효과를 보였으며, 다른 농도의 MgSO<sub>4</sub> 경우 3시간 이후 안정성을 잃는 것과 대조를 이룬다. 다른 종류의 stabilizer 경우에도 MgSO<sub>4</sub>와 같이 대체로 0.6M 부근의 농도에서 각각 최대의 효과를 얻을 수 있었다. Fig. 1과 2의 결과는 *Streptomyces venezuela* RA lytic enzyme를 처리한 *T. viride*(Benitez 등: 1975의 경우와 비슷한 결과를 보여 주었으나 *A. nidulans*의 0.4M NH<sub>4</sub>Cl, *Penicillium chrysogenum*의 0.6M KCl, *Neurospora crasa*의 0.6M NH<sub>4</sub>Cl이 최고효과를 갖는다고 밝힌 Peberdy 등(1976)의 결과나 *Fusarium culmorum*에서 0.6M mannitor 또는 NH<sub>4</sub>Cl을 사용한 Garcia Acha 등(1966)의 결과와는 큰 차이가 있었다. 결국 protoplast 생성 및 안정성을 위한 보편적인 osmotic stabilizer는 없으며 organism에 따라 최적 osmotic stabilizer가 각기 다를 수 있다.

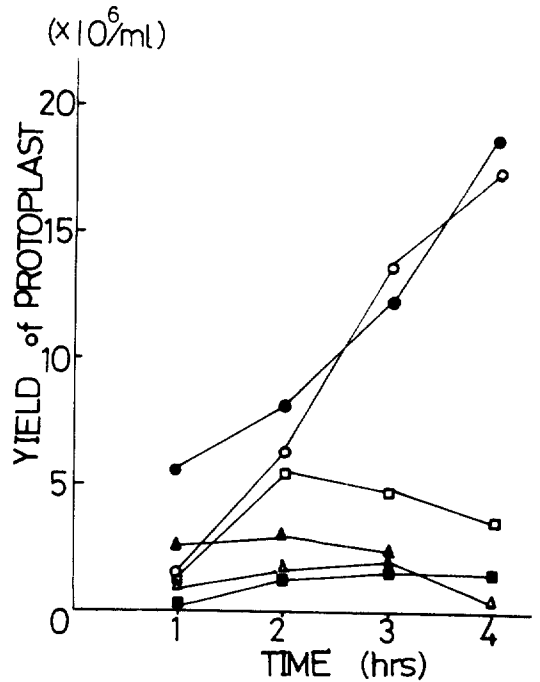


Fig. 1. Effect of different osmotic stabilizers of similar osmotic potentials. Incubations were performed in 0.6M MgSO<sub>4</sub> (●), 0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (○), 0.6M KCl (△), 0.6M NH<sub>4</sub>Cl (▲), 0.6M Mannitol (□), and 0.6 M Sorbitol (■) respectively. The formation of protoplasts was monitored with the microscope and numbers of protoplasts were counted at the times indicated.

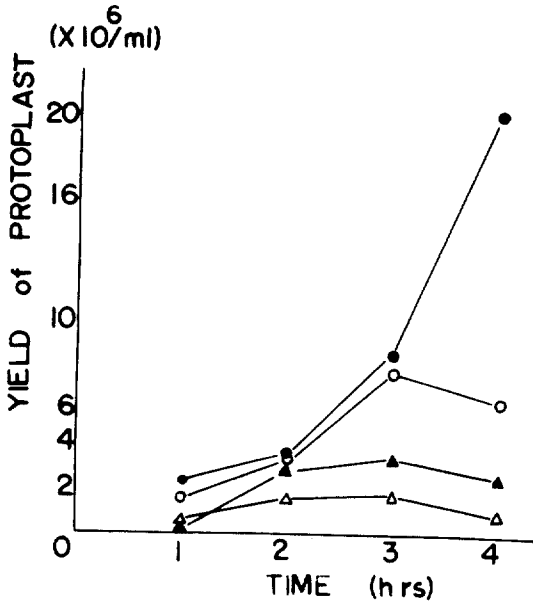


Fig. 2. Effect of different concentrations of the osmotic stabilizer MgSO<sub>4</sub> on the formation of protoplasts. Incubation were performed in 0.4M ( Δ-Δ ), 0.6M ( ●-● ), 0.8M ( ○-○ ), and 1M ( ▲-▲ ) respectively.

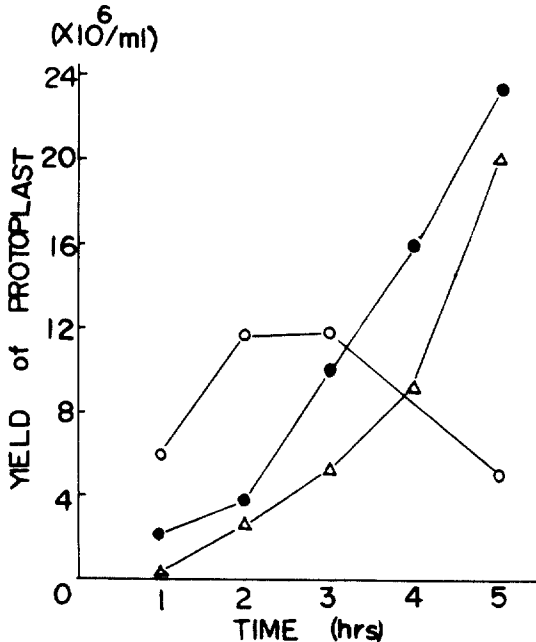


Fig. 4. Effects of digestion temperatures on the formation of protoplasts. ( Δ-Δ ) 24°C; ( ●-● ), 28°C; ( ○-○ ), 37°C.

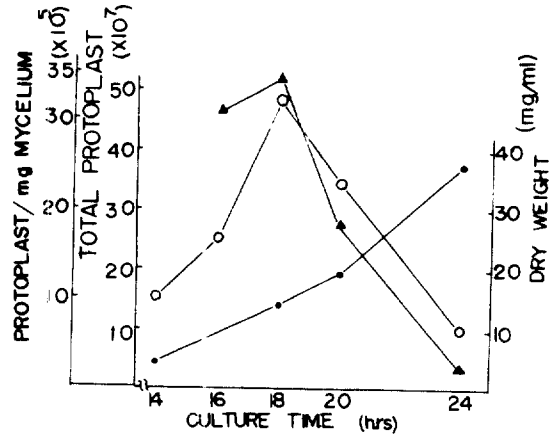


Fig. 3. Effect of mycelial ages on the formation of protoplasts for 4hrs incubation time. ●-● mycelium dry weight; ○-○ total protoplasts yield; ▲-▲ protoplasts/mg mycelium.

3. 균사체 배양시간의 효과

배양시간 (14~24시간)을 달리하여 얻은 각각의 균사체에 lytic enzyme을 4시간 처리한 후에 생성된 protoplasts를 각각 비교한 결과, 생성된 전체 protoplasts의 수에서 뿐만 아니라 균사체 dry weight 당 생성되는 protoplasts 수에서도 18시간 배양한 균사체에서 최대의 protoplast 생성을 얻을 수 있었다 (Fig. 3). 이같은 결과는 *A. flavus* (Peberdy 등 : 1976)의 24시간, *A. nidulans* (van den Broeck 등 : 1979)의 14~16시간과는 약간의 차이를 보이나 *T. viride* (Benitez 등 : 1975)의 18시간과는 일치한다. 또한 *Aspergillus*屬의 경우 late exponential growth phase의 균사체로부터 수율이 최대가 되는 반면에 (Peberdy 등 : 1976) *T. koningii*는 early exponential growth phase의 균사체로부터 최대의 수율을 얻을 수 있었다. 아직까지 균사체 배양시간의 차이가 가지는 원인은 자세히 밝혀지지 않았으나 lytic enzyme이 작용하는 균사체의 물리화학적 변화와 관련이 있는 듯하다 (Rosenberg : 1976, Peberdy 등 : 1976)

4. 반응온도의 효과

24°C ~ 37°C까지 digestion용액의 반응온도를 달리하여 protoplast 생성효과를 비교하였다. Fig. 4에서 보듯이 28°C에서 가장 안정하게 p-

rotoplasts가 생성되었으며 37°C와 같은 보다 높은 반응온도에서는 초기에 더 많은 protoplast를 생성하지만 3시간 이후에 급격히 감소되었고, 24°C처럼 낮은 온도에서는 비록 초기에 저조한

생성효과를 보이지만 오랜시간까지 계속하여 생성이 증가함을 보여준다. 반응온도에 따른 protoplast 생성효과는 사용한 lytic enzyme의 물리화학적 성질과 연관이 있을 것으로 사려된다.

## 摘 要

Cellulase 생산에 있어서 이용도가 가장 높은 *Trichoderma*屬 균주의 protoplast fusion에 의한 유전학적, 세포학적인 연구의 일환으로 *T. koningii*의 protoplast 획득방법을 추구하였다.

*T. koningii*의 protoplast 생성에 Driselase가 lytic enzyme으로 좋은 효과를 나타냈으며, 최적 균사체 배양시간은 18시간에서, osmotic stabilizer로써는 0.6M MgSO<sub>4</sub>와 0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 가장 뛰어났다. 또한 균사체 digestion의 최적온도는 28°C이며, 3시간 이상의 반응 후 급격한 protoplast 수의 증가를 보였다. 반응시간에 따라 생성된 protoplasts 간에는 전체크기와 액포의 크기에서 현격한 불균일성을 나타냈다.

## REFERENCE

- Benitez, T., S. Ramos, and I. Garcia Acha, 1975. Protoplasts of *Trichoderma viride*. *Arch. Microbiol.* **103**, 199-203.
- Benitez, T., and I. Garcia Acha, 1980. Characterization of hydrolases in protoplasts, mycelium, spores and aberrant tubes of *Trichoderma viride*. In *Advances in protoplast research*. 199-204, ed. L. Ferenczy and G. L. Farkas, Pergamon press.
- Croft, J. H., and R. B. G. Dales, Protoplast fusion and vegetative incompatibility in *Aspergillus nidulans*. In *Protoplasts-Application in microbial genetics*. 27-34 ed. J. F. Peberdy, University of Nottingham.
- Demain, A. L., 1976. Comments on cellulase production. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 6, 79-81, John Wiley & Sons, Inc.
- Elander, R. P., 1980. New genetic approaches to industrially important fungi. *Biotechnol. and Bioeng.* **22**(supp.1.) 49-61.
- Elander, R. P., 1980, New genetic approaches to industrially important fungi. *Biotechnol. Bioeng.* **22**(supp. 1), 49-61.
- Flickinger, M. C., 1980. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuel: How far have we come? *Biotechnol. Bioeng.* **22** (supp. 1), 27-48.
- Garcia Acha, I., F. Lopez-Belmonte, and J. R. Villanueva, 1966. Regeneration of mycelial protoplasts of *Fusarium culmorum*. *J. Gen. Microbiol.* **45**, 515-523.
- Isaac, S., N. S. Ryder, and J. F. Peberdy, 1978 Distribution and activation of chitin synthetase in protoplast fractions released during the lytic digestion of *Aspergillus nidulans* hyphae. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 45-50.
- Montenecourt, B. S., and D. E. Eveleigh, 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. and Environ. Microbiol.* **34**(6), 777-782.
- Necas, O., 1980. Regeneration of protoplasts. In *advanced in protoplast research*. ed. L. Ferenczy and G. L. Farkas, 151-161, Pergamon press.
- Peberdy, J. F., 1979. Fungal protoplasts: Isolation, reversion, and fusion. *Ann. rev. Microbiol.* **33**, 21-39.
- Peberdy, J. F., C. E. Buckley, D. C. Daltrey, and P. M. Moore, 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Tran. Br. Mycol. Soc.* **67**(1), 23-26.
- Rosenberger, R. F. 1976. The cell wall. In *the filamentous fungi* 2, 328-344, Edward Arnold, London.
- van den Broeck, H.W.J., H. G. Stunnenberg, and L. M. J. Wennekes, 1979. Protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microbios.* **26**,

- 115-128.
16. Villanueva, J. R., and I. Garcia Acha, 1971. Production and use of fungal protoplasts. In *Methods Microbiol.* **4**, 665-718.
17. 趙南鎭, 朴喜門, 李榮河, 1981. *Trichoderma koningii* protoplast의 reversion 에 대하여 *Kor. J. Microbiol.* **19**. 192.