

## *Trichoderma koningii*의 Protoplast Reversion에 대하여

趙南鎭 · 朴喜門 · 李榮河

(서울대학교 自然科學大學 微生物學科)

### Protoplast Reversion of *Trichoderma koningii*

CHO, Nam Jin, Hee Moon PARK, and Young Ha RHEE

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

#### ABSTRACT

Protoplasts from *Trichoderma koningii* were fractionated at varying digestion periods. There were distinct differences between the fractionated protoplasts in CMCase activity and protein content; namely, protein contents and CMCase activities in the early-protoplasts were higher than the late-produced protoplasts.

Reversion frequencies of the early-produced protoplasts (0 - 1 hr.) and the late-produced protoplasts (1 - 2.5 hr.) were 1.25% and 0.56%, respectively. From these results it was assumed that the early-produced protoplasts were more active in physiological metabolism.

Meanwhile, in osmotically stabilized liquid medium two distinct reversion patterns of these protoplasts were found. In the first, normal germ tube was developed from the opposite side of the protoplast after the production of an aberrant tube.

In the second, reversion occurred through germination of protoplast, but this pattern was uncommon.

It is suggested that the physiological and morphological heterogeneities in protoplast reversion are related to the heterogeneous origins of protoplasts from highly differentiated mycelium.

#### 緒 論

최근들어 여러분야의 기초 및 응용생물학에 있어 protoplast의 유용성이 계속 강조되고 있으며 (Elander : 1980, Flickinger : 1980, Masakazy : 1980, Peberdy : 1980) 세포학에서뿐만 아니라 산업적 가치가 높은 미생물의 균주개

발이라는 차원에서도 protoplast가 훌륭한 재료가 될 수 있음이 여러 미생물들에서 입증되고 있다 (Isaac등 : 1978, Croft등 : 1979, Gibson등 : 1979, Ibpwood등 : 1979, Morgan등 : 1980)

특히 protoplast가 세포벽재생 및 정상적인 균사체로의 reversion 능력을 갖추고 있음은 대단히 흥미있는 일로서 효모와 사상균에서 활발하게 연구되고 있다 (Peberdy등 : 1971, Benitez등

: 1975, Moore 등 : 1976, van den Broeck 등 : 1979). 하지만 균류의 protoplast reversion에 있어 형태적 특징과 빈도율은 균주에 따라 현격한 차이를 보이고 있다 (Garcia Acha 등 : 1966, Peberdy 등 : 1971, Benitez 등 : 1975, van den Broeck 등 : 1979, Peberdy : 1979). protoplast의 reversion 빈도율은 환경요인에 의해 큰 차이를 보임이 밝혀졌지만 (Peberdy : 1979, Necas : 1980) 아직까지 정확한 변수요인은 모르고 다만 핵의 유무 또는 protoplast의 생성부위 등의 요인들이 거론되고 있을 뿐이다. (Peberdy : 1979, Benitez 등 : 1980, Necas : 1980).

이와같은 다양성은 protoplast reversion의 형태적 모습에서도 발견되며 Peberdy (1979)는 사상균의 reversion 양상을 크게 2가지로 구분한 바 있지만 이 model에서 어긋나는 예가 많이 존재한다 (Garcia Acha 등 : 1966, Benitez 등 : 1975, Necas : 1980). protoplast reversion의 형태적 다양성에 대해서 Necas (1980)는 reversion의 양상과 해당 균주의 세포분열 기작과의 연관성을 주장하는데 반하여 Peberdy (1979)와 Isaac 등 (1980)은 다양하게 분화된 균사체로부터 생성된 protoplast의 불균일성을 주원인으로 제시하였다. 이러한 관점에서 빈도율 및 형태적 특징과 같은 protoplast reversion 기작이 protoplast의 생리적 성질과 어떤 연관성을 갖고 있는가 하는 문제는 많은 연구를 필요로 하며 이 문제의 해결방법으로써 protoplast의 분획화가 대단히 유용할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 앞서의 보고에 (趙 등 : 1981) 이어 *Trichoderma koningii*

에서의 protoplast 분획에 따른 생리적 특성과 reversion 양상에 대하여 조사하였다.

### 材料 및 方法

○ 균주 및 배지 : 본 실험에 사용한 균주는 *T. koningii* (ATCC 26113)이며 Malt Extract 배지에서 28°C로 진탕배양 하였다.

○ protoplast의 분리 : 앞서의 趙 등 (1981)의 연구에서 서술한 바와 같이 lytic enzyme으로 1% Driselase를, osmotic stabilizer로서 0.01M phosphate buffer (pH 5.8)에 MgSO<sub>4</sub>를 녹여 최종농도가 0.6M인 용액을 사용하였다. 이 digestion로부터 1시간, 2.5시간, 4시간 반응시켰을 때 생성된 protoplasts를 sintered glass filter (porosity 40~60μm)로 여과시킨 후 원심분리 (700g/10분)하고 lytic enzyme을 제거하기 위해 동일한 buffer/stabilizer 용액으로 수차례 세척하였다.

○ CMCase 활성도 및 단백질 정량 : 단백질 정량에 방해가 되는 MgSO<sub>4</sub>를 제거하기 위하여 Isaac 등 (1978)의 방법으로 0.1M phosphate buffer (pH 5.8)에 NH<sub>4</sub>Cl을 녹여 전체농도가 0.6M이 되게한 stabilizer로서 반응시간별로 분획분리한 각각의 protoplasts를 세척하고 이 protoplast 혼탁액을 sonication시켜 CMCase 및 단백질 함량을 조사하였다. CMCase 활성도는 1% CMC 0.25ml, 0.1M acetate buffer (pH 5.0) 0.25ml 및 protoplast 파쇄액 0.5ml를 섞어 40°C에서 90분간 반응시킨 후 생성되는 환원당을

**Table 1.** Contents of CMCase and Protein in Protoplasts released at different digestion periods.

Period	No. of Protoplasts (10 <sup>-5</sup> ml <sup>-1</sup> )	CMCase <sup>a</sup>		Protein	
		U/10 <sup>6</sup> Pts	Relative Activities (%)	mg/10 <sup>6</sup> Pts	Relative Contents (%)
1 hr	0.75	18.50	100	15.20	100
2.5 hr	2.10	4.36	23.6	8.95	58.9
4 hr	2.85	4.48	24.2	3.26	21.4

a : One unit of CMCase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1.0 ug of glucose (or glucose equivalents) in 1 min. under the standard assay condition.

Somogyi-Nelson(1944) 방법으로 660nm에서 흡광도를 측정하였고 단백질 함량은 bovine serum albumin 용액을 표준액으로 하여 Lowry등(1951) 방법으로 정량하였다.

○ Reversion 배지 : protoplast reversion을 위한 배지로서 0.6M MgSO<sub>4</sub>(전체농도)를 첨가한 Malt Extract 액체배지(MES)를 이용하였고 reversion빈도를 측정은 역시 0.6M MgSO<sub>4</sub>를 함유한 Czapeck 최소평판배지에서 행하였다.

## 結果 및 考察

### 1. Protoplasts의 분획

Table 1에서 보는 바와 같이 digestion 시간에 따라 얻어진 각각의 protoplasts간에는 CMCase 활성도와 단백질 함량에서 커다란 차이를 나타내었다. 즉 반응후 1시간까지 생성된 protoplasts는 1~2.5시간 및 2.5~4시간 사이에 생성된 protoplasts에 비해 CMCase 활성도의 경우 각각 4.2배, 4.1배 높았으며 단백질 함량에 있어서는 각각 1.7배 및 4.7배나 높았다. Isaac 등(1978)은 stabilizer로써 0.6M KCl 및 0.6M MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 *Aspergillus nidulans* protoplasts의 digestion시간별로 chitin synthase의 변화를 살펴보았으며 특히 KCl의 경우 반응초기에 생성된 protoplast내에 chitin synthase와 단백질 함량이 보다 높음을 보여주었다. 그러나 본 실험의 *T. koningii*에서는 stabilizer로써 0.6M MgSO<sub>4</sub>가 사용되었음에도 Isaac 등(1978)과 비슷한 결과를 얻었으며 특히 섬유소 분해균주인 *T. koningii*가 뚜렷한 inducer가 존재하지 않았음에도 불구하고 Table 1과 같은 결과를 나타낼 수 있다는 것은 다음과 같은 의미를 부여한다. 첫째는 *T. koningii*의 경우 stabilizer의 존재하에서 lytic enzyme을 처리하였을 때 반응시간별로 hyphae의 서로 다른 부위에서 protoplast가 형성된다는 점이다. 특히 반응초기에는 모든 생리대사면에서 가장 활발한 상태인 hyphae의 apical region에서 protoplast가 형성되고 시간이 점차 경과됨에 따라 sub-apical 또는 distal region에서 protoplast가 형성됨을 보여준다. 이는 앞서의 보고(趙 등 : 1981)에서 지적한 protoplasts의 형태적 불균일성과 관련이 있

을 것으로 사려된다. 두번째는 *T. koningii*의 hyphal tip growth에 CMCase의 작용 가능성이 있다. inducer가 존재하지 않은 상태에서 반응초기에 생성된 protoplasts가 보다 많은 CMCase를 함유하고 있음은 *Achlya ambisexualis* Raper의 hyphal tip growth에 endo-cellulase를 비롯한 몇 종류의 lytic enzyme들이 다량 존재함을 밝힌 Hill 등(1980A, 1980B)의 연구와 일치한다. 하지만 hyphal tip growth에 CMCase와 같은 lytic enzyme들이 작용하는 기작이나 CMCase의 조절기작에 대한 더 자세한 연구가 이루어져야 할 것이다.

### 2. Protoplast reversion의 빈도율

전체농도가 0.6M이 되게 MgSO<sub>4</sub>를 첨가한 Czapeck최소평판배지에서 반응시간별로 분획한 protoplasts의 reversion 빈도율은 0~1시간 protoplasts가 1.25%인데 반하여 1~2.5시간 protoplasts의 경우에는 0.56%로 나타났다. *T. koningii*의 빈도율은 비록 최적조건은 아닐지라도 *Fusarium culmorum*(Garcia Acha 등 : 1966)의 배지의 탄소원에 따른 5~82%나 *A. nidulans* (Peberdy : 1979)의 10~30%, *Streptomyces griseus*와 *S. venezuelae* (Okanishi 등 : 1974)에서 배지에 첨가한 화학물질에 따른 각각의 reversion 빈도율인 0.4~48% 및 2~53%에 비하여 극히 저조한 편이지만 동일한 조건에서 분획된 protoplasts의 reversion 빈도율의 차이는 역시 hyphae의 apical region에서 생성된 protoplast의 보다 높은 reversion 능력을 보여주는 것이며 아울러 *T. koningii*의 reversion 빈도율에 영향을 주는 다양한 물리화학적 요인들에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

### 3. Protoplast reversion의 형태적 특징

*T. koningii*의 protoplast reversion시 두가지의 뚜렷하게 차이가 나는 양상이 관찰되었다.

첫째는, MES배지에 protoplast를 접종한 후 6시간만에 pyriform이 나타나고(plate 1) 이어서 효모모양의 사슬이 형성되었다(plate 2). 이후 protoplast내에 원형의 형태를 잃은 액포가 더욱 커지면서 이로부터 plate 3과 같은 대단히 불규칙한 모양의 tube(aberrant tube)가 생성되었으며 이 aberrant tube는 얼마동안 자라는데 끝부분으로 갈수록 점차 굵어지면서 매우 큰

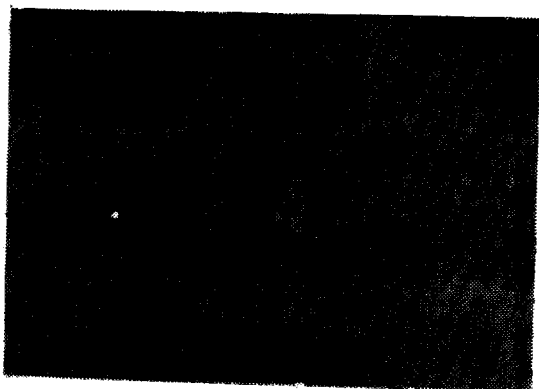


Plate 7. Another pattern of reversion occurred through direct germination of the protoplast. (150X)



Plate 8. Heterogeneity of reversion after 25 hrs. (150X)

액포가 중간중간에 생기고 사이에는 크기가 다른 여러개의 protoplast가 존재하며 이들 액포 및 protoplast들은 전체가 하나의 막으로 둘러싸여 있다(plate 4). aberrant tube의 수명은 약 20여시간 정도로 비교적 짧아 protoplast를 중심으로 tube가 형성된 반대 방향으로 정상적인 균사가 나타나면서(plate 5) tube는 점차 파

괴되어 tube내의 내용물들이 배지로 방출되었다. (plate 6) 이러한 reversion 양상은 aberrant tube모양의 budding cell의 사슬에서 직접 정상적인 균사가 형성되는 *A. nidulans* (peberdy등: 1979) van den Broeck등: 1979)의 reversion 양상과는 완전하게 다르며, "shell"이라 명명된 합성된 wall이 본 실험에서는 발견되지 않았지만 lytic enzyme이 제거된 배지에서 reversion 시킨 *T. viride*(Benitez등: 1975)의 결과와 비슷하겠다. 즉, aberrant tube의 생성은 protoplast가 regeneration될 때 cell wall의 견고성에 관여하는 성분의 일부가 결여됨으로 인하여 정상적인 균사의 형태를 갖추지 못하는 것으로 추정되며, Benitez등(1980)는 실제로 aberrant tube에서 chitin의 결여를 확인하였다.

두번째의 reversion 방식은 protoplast로부터 직접 정상적인 균사가 생성되는 것으로 마치 conidia로부터 균사가 생성되는 것과 유사한 모습을 하고 있으나(plate 7) 이러한 양상은 매우 드물게 나타났다.

한편 protoplasts간에는 reversion에 소요되는 시간과 정도가 서로 다르며(plate 8) 이러한 protoplasts의 불균일성은 reversion 빈도율의 차이를 보인 protoplasts의 불균일성과 일맥상통하는 것으로 보인다. 이상과 같은 protoplasts의 불균일성은 세포벽의 구성성분과 미세구조 등의 연구에 흥미로운 자료를 제공해줄 수 있을 뿐 아니라 특히 *T. koningii* 등의 섬유소 분해균주의 cellulase location 및 분비기작 등의 연구에도 많은 도움을 주리라 사료되며 균일한 protoplast의 획득을 위한 conidia로부터의 protoplast 생성 역시 중요과제로 믿어진다. (Moore 등: 1976)

## 摘 要

반응시간에 따라 분획된 *T. koningii*의 protoplast간에는 형태적인 면에서 뿐만 아니라 단백질 함량 및 CMCase 활성도에서도 큰 차이를 보였으며 반응초기에 형성된 protoplast가 보다 더 높은 단백질 함량과 CMCase 활성도를 가지고 있었다. 또한 반응초기(0~1시간) 및 반응후기(1~2.5시간)에 생성된 protoplast의 reversion 빈도율은 각각 1.25% 및 0.56%로서 역시 반응초기의 protoplasts가 활발한 생리대사기능을 보여 주었다.

한편 *T. koningii*의 protoplast로부터 2가지의 reversion 양상이 발견되었으며 첫째는 aberrant tube 형성 후 protoplast의 반대편에서 정상적인 균사가 형성되는 방식이고 두번째는 protoplast로부터 직접 균사형성이 이루어지는 방식으로 첫번째에 비해 대단히 드물었다. 이러한 protoplast reversion의 불균일성은 생성된 protoplast의 불균일성과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 나타났다.

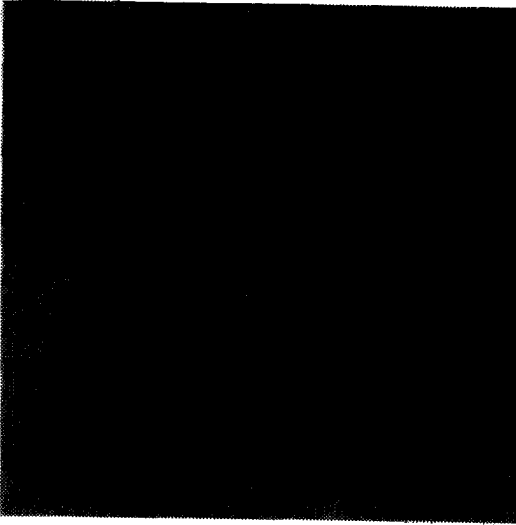


Plate 1. Pyriformed protoplast after 6 hrs reversion in MES medium. (600X)

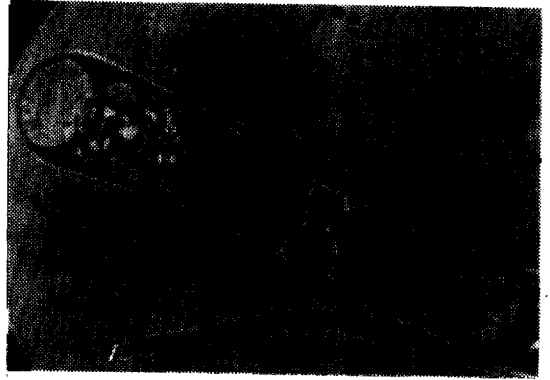


Plate 4. Aberrant tube possessing many protoplasts and vacuoles. (600X)

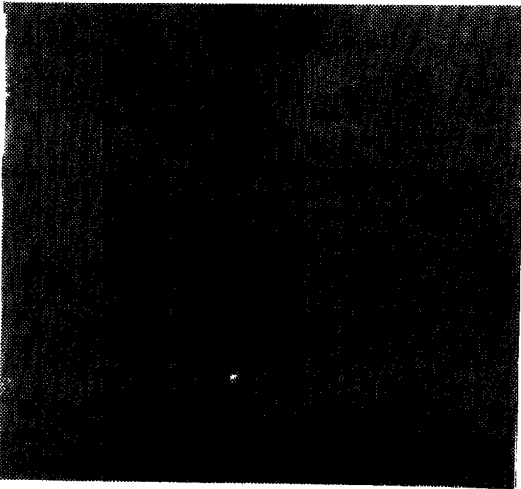


Plate 2. Protoplasts after 8 hrs reversion.

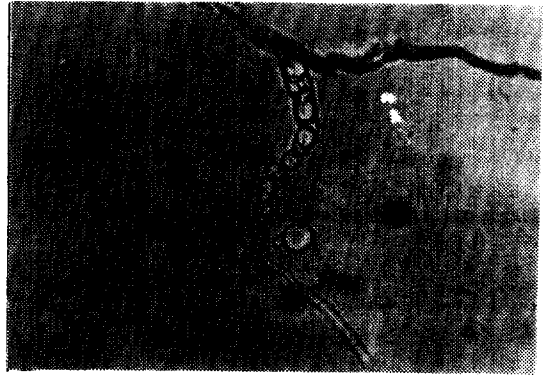


Plate 5. Aberrant tube and normal mycelium from single protoplast after 24 hrs reversion. (150X)  
NM, normal mycelium; OP, original protoplast; AT, aberrant tube

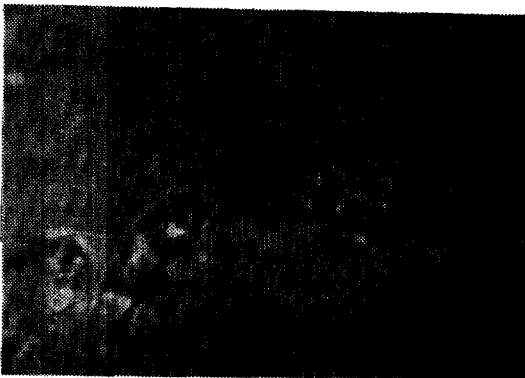


Plate 3. Aberrant tubes from *Trichoderma koningii* after 15 hrs reversion. (600X)

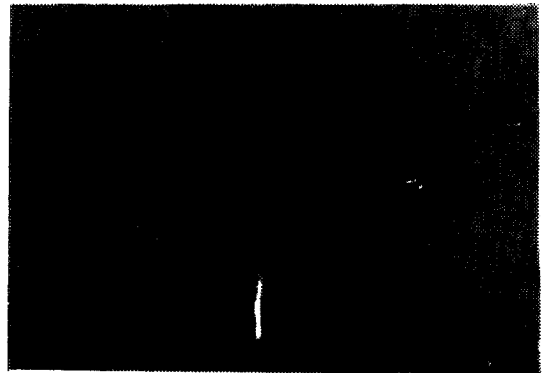


Plate 6. Disappearance of aberrant tube and formation of normal mycelium (150X)

## 引用文献

1. 趙南鎮, 李榮河, 洪淳佑, 1981. *Trichoderma Koningii* 의 Protoplast 생성에 관하여 *Kor. J. Microbiol.* 19, 186
2. Benitez, T., S. Ramos, and I. Garcia Acha, 1975. Protoplasts of *Trichoderma viride*. *Arch. Microbiol.* 103, 199-203.
3. Demain, A.L., 1976. Enzymatic conversion of cellulosic materials: Technology and applications, Symp. No. 6, 79-81, John Wiley and Sons.
4. Finkelman, M. J., J. E. Jajic, and A. Vardanis, 1980. New method of producing protoplasts of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(4), 923-925.
5. Flickinger, M. C., 1980, Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuel: How far have we come? *Biotechnol. and Bioeng.* 22(suppl. 1), 27-48.
6. Garcia Acha, I., F. Lopez-Belmonte, and J. R. Villanueva, 1966. Regeneration of mycelial protoplasts of *Fusarium culmorum*. *J. Gen. Microbiol.* 45, 515-523.
7. 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.
8. Gibson, R., and R. Sherwood, 1979. Transformation of Yeast with recombinant DNA vectors. In Protoplasts - Application in microbial genetics 57-60, ed. J. F. Peberdy, University of Nottingham.
9. Hill, T. W., and J. T. Mullins, 1980A. Hyphal tip growth in *Achlya*. I. Cytoplasmic organization. *Can. J. Microbiol.* 26, 1132-1140.
10. Hill, T. W., and J. T. Mullins, 1980B. Hyphal tip growth in *Achlya*. II. Subcellular localization of cellulase and associated enzymes. *Can. J. Microbiol.* 26, 1141-1146.
11. Hopwood, D. A., H. M. Wright, M. J. Bibb, and J. M. Ward, 1979. Application of protoplasts in *Streptomyces* genetics. In Protoplasts-Application in microbial genetics. 5-11, ed. J.F. Peberdy, University of Nottingham.
12. 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.
13. Isaac, S., L. G. Briarty, and J. F. Peberdy, 1980. The stereology of protoplasts from *Aspergillus nidulans*. In Advances in protoplast research. 213-220, ed. L. Ferenczy and G. L. Farkas, Pergamon press.
14. Kukuchi, M., 1980. Application of genetics for strain improvement in industrial microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 22, (suppl. 1), 195-208.
15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
16. Moore, P. M., and J. R. Peberdy, 1976. Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 66(3), 421-423.
17. Morgan, A. J., J. L. Hall, A. Brunner, and P.A. Whittaker, 1980. Protoplast fusion in the study of mitochondrial genetics in the petite-negative yeast, *Kluyveromyces lactis*. In Advances in protoplast research. 93-98. ed. L. Ferenczy and G. L. Farkas, Pergamon press.
18. Necas, O., 1980. Regeneration of protoplasts. In Advances in protoplast research. 151-162. ed. L. Ferenczy and G. L. Farkas, Pergamon Press.
19. Nelson, H. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
20. Okanishi, M., K. Suzuki, and H. Umezawa, 1974. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: Cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* 80, 389-400.
21. Peberdy, J. F., 1979. Fungal protoplasts:

- Isolation, reversion, and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 21-39.
22. Peberdy, J. F. 1980. Protoplast fusion - a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 23-29.
23. Peberdy, J. F., and R. K. Gibson, 1971. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **69**, 325-330.
24. Peberdy, J. F., C. E. Buckley, D. C. Daltrey, and P. M. Moore, 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **67**(1), 23-26.
25. Van den Broeck, H. W. J., H. G. Stunnenberg, and L. M. J. Wennekes, 1979. Protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microbios.* **26**, 115-128.