

***Aspergillus nidulans* 의 분생포자에 존재하는 β -Glucosidase 에 관하여**

권기선, 이재훈, 하영철, 홍순우

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

The Conidial β -Glucosidase of *Aspergillus nidulans*

Kwon, K.S., J.H.Lee, Y.C.Hah and S.W.Hong

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University

Abstract: Two kinds of β -glucosidase, tightly-bound enzyme(TBE) and loosely-bound enzyme(LBE), were obtained from the conidia of *Aspergillus nidulans*. The existence of enzymes in conidia was confirmed by the fact that these enzyme activities were proportional to the number of conidia. The levels of enzyme activities were independent of aging of the conidia.

Enzymes were characterized partially. In spite of the physical and chemical treatments of conidia, there was no significant change in TBE activity. The optimum pH and temperature was 6.0 and 55 °C, respectively. Thermostability of the TBE was remarkably higher than that of mycelial β -glucosidase. The electrophoretic pattern of LBE was identical to that of mycelial β -glucosidase.

These results suggest that conidial β -glucosidases are involved in adaptation process of the conidia to variable environments.

Key words: *Aspergillus nidulans*, conidia, β -glucosidase

자낭균들은 무성생식의 결과 분생포자(conidia)를 생성하며 이는 균체의 번식 및 전파의 수단이 된다(Smith 등, 1977). *Aspergillus nidulans*에 있어서 포자에 대한 연구는 주로 분화의 관점에서 진행되어 왔으며(Clutterbuck, 1977), 현재에는 이에 관여하는 spore-specific gene에 대한 보고까지 되고 있다(Timberlake와 Barnard, 1981; Orr와 Timberlake, 1982). 한편 균류에 대한 생리학적 및 생화학적 연구는 대부분 균사체에서 유래된 효소에 대하여 이루어져 왔으며(Woodward와 Wiseman, 1982), 포자에서 유래된 효소에 대한 연구는 시도된 바가 거의 없다. 그러나, 포자에서 유래된 효소에 관한 연구는 포자의 존재가치만큼이나 중요하리라 본다.

일찌기, *A. nidulans*에 있어서 균사체에서 유

래된 β -glucosidase(E C 3. 2. 1. 21)의 생화학적 연구는 Chang 등(1982)과 Jung 등(1983)에 의해서 수행된 바 있다. 이 결과와 비교하여 본 연구에서는 *A. nidulans*의 분생포자에 존재하는 β -glucosidase들, 즉 포자벽에 느슨하게 결합되어 있어 쉽게 추출되는 loosely-bound enzyme(LBE)와 단단하게 결합되어 추출 불가능한 tightly-bound enzyme(TBE)의 성질을 밝히고 이의 기능을 고찰하였다.

재료 및 방법**균주 및 배지**

본 실험에서는 *Aspergillus nidulans* FGSC 168을 균주로 사용하였으며, 37°C에서 완전배지나

최소배지에서 배양하였다(Harsanyi 등, 1977).

분생포자의 수확 및 그 효소용액의 제조

A. nidulans 를 완전고체배지에서 37°C 로 5일간 배양하여, 해부현미경하에서 진공펌프로 분생포자만을 흡입하여 Whatman GF/F 유리여과지로 여과함으로써 순수하게 획득하였다. LBE 효소 용액으로는 Tween 80 수용액(0.02% v/v)에 분생포자를 현탁시켜 12,000×g 에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 사용하였다. 포자침전물에 0.02% Tween 80을 가하여 현탁액을 만든 뒤, 원심분리하여 얻어진 상등액에서 효소 활성도가 나타나지 않을 때까지 반복하여 세척하였다. 이렇게 얻어진 포자의 현탁액을 TBE 효소 용액으로 사용하였다.

포자의 물리·화학적 처리

초음파 분쇄는 ultra-sonicator(Lab-line Industries, Inc., USA)를 사용하여 온도상승을 방지하면서 (<4°C) 간헐적으로 120watt에서 5분간 처리하였다. Glass bead를 사용한 경우 포자 현탁액과 glass bead를 1:2의 부피비로 섞은 뒤 150초간 격렬하게 교반해준 다음 방치한 뒤 포자 현탁액만을 분획하였다. Triton X-100, Tween 80, acetone, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium deoxycholic acid(SD), Nystatin 등은 포자의 표면성질에 영향을 미치는 detergent이고, NaCl은 ion-exchange 효과를 위하여 처리되었다. 또한 이러한 모든 물리·화학적 처리가 된 포자를 -40°C에서 급속냉각시킨 후 18°C에서 서서히 녹였다.

이상과 같이 처리된 포자의 현탁액을 원심분리(12,000×g, 10분)한 후, 상등액을 얻고 침전된 포자로는 재현탁액을 만들어 각각에 대해 β -glucosidase 활성도를 측정하였다.

균사체 배양 및 그 효소용액의 제조

사면 배양체로부터 0.02% Tween 80으로 포자 현탁액을 만들어 완전액체배지에 5.0×10^5 conidia/ml 되게 접종한 후 37°C에서 18시간 동안 진탕배양하였다. 자란 균사체를 멸균된 식염수로 세척하여 탄소원이 없는 최소액체배지에 접종하여 24시간 동안 진탕한 뒤, 시료를 채취하여 원심분리(12,000×g, 20분)하여 얻은 상등액을 균사체 효소용액(mycelial enzyme)으로 사용하였다.

본 연구에서 사용된 정제된 β -glucosidase인 PI 및 PII는 Jung 등(1983)의 방법에 따라 획득된 두 가지 균사체 효소성분이다.

효소 반응

p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(PNPG)를 기질로 사용하여 β -glucosidase의 활성도를 측정하였다. 즉 0.05 M 초산완충용액(pH 5.0)에 PNPG를 2 mM 되게 녹인 기질용액 0.4 ml과 효소용액 0.1 ml을 섞은 반응혼합물을 55°C에서 30분간 반응시켰다. 이에 1 ml의 1 M Na₂CO₃를 넣어 반응을 정지시키고, 5 ml의 증류수로 희석하여 420 nm에서 spectrophotometer(CE272, Cecil Instruments Ltd., England)를 사용하여 유리된 *p*-nitrophenol(PNP)의 양을 측정하였다. 효소활성도는 30분간 1 nmole의 PNP를 생성시키는 효소량을 1 unit로 정하였다.

전기 영동

Davis (1964)의 방법을 변형하여 7.5% polyacrylamide slab gel(폭 150 mm×길이 170 mm×두께 1.5 mm) 전기영동을 하였다. β -Glucosidase에 대한 활성염색은 Kwon (1986)의 방법에 따라 다음과 같이 수행되었다. 초산완충용액(pH 5.0, 0.5 M)에 esculin과 FeCl₃를 각각 0.1%(w/v)과 0.03%(w/v)되게 녹인 수용액에 전기영동이 끝난 gel을 담가 55°C에서 5분간 반응시킨후 gel 상에 나타난 검푸른 띠(band)로 확인하였다.

결 과

LBE 및 TBE의 존재

완전고체배지에서 균사체가 오염되지 않도록 포자만을 순수하게 얻어낸 뒤, '재료 및 방법'에 기술된 바와 같이 분리된 LBE와 TBE의 활성도는 각각 포자수가 증가함에 따라 비례적으로 증가함을 볼 수 있었다(Fig.1). 이로써 *A. nidulans* 분생포자에서 유래된 β -glucosidase의 존재를 확인할 수 있었다.

포자의 aging에 따른 LBE와 TBE의 활성도 변화를 알아보기 위하여, 완전 고체배지에 포자현탁액을 접종한 뒤, 포자생성 초기부터 배양일수가 다 포자를 수확하여 LBE와 TBE의 활성도를 측

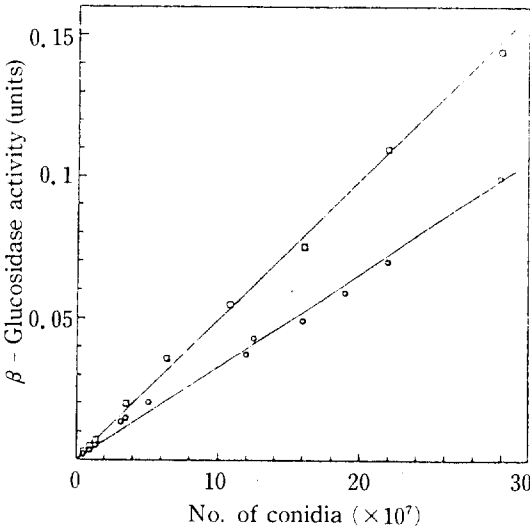


Fig. 1. Activities of loosely-bound (\square) and tightly-bound (\circ) β -glucosidase in relation to the number of conidia of *Aspergillus nidulans*.

정하였다(Fig.2). 배양초기의 높은 활성도는 시간이 지남에 따라 점차 감소하다가, 6 일 후부터는 거의 일정수준을 유지 하였다.

LBE의 성질

포자로부터 LBE를 추출함에 있어서 LBE의 활성도는 최초의 상등액에만 존재하였으며 반복되는 세척에서 얻어진 상등액에는 더이상의 활성도가 나타나지 않았다. 이로부터 이 효소가 쉽게 유리될 수 있는 세포외 효소임을 알 수 있었다.

LBE와 균사체에서 얻어진 β -glucosidase를

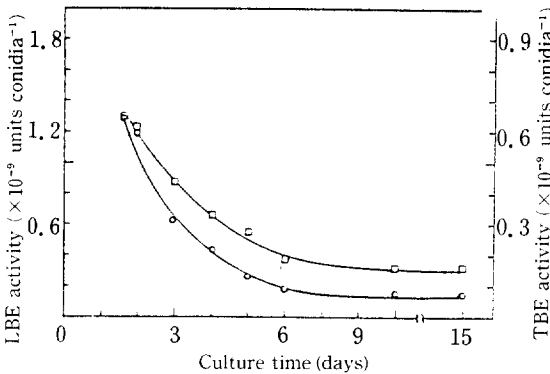


Fig. 2. Activities of loosely-bound β -glucosidase (\square) and tightly-bound β -glucosidase (\circ) according to the culture time of *Aspergillus nidulans*.



Fig. 3. Polyacrylamide slab gel electrophoretic patterns of loosely-bound β -glucosidase from conidia(a) and crude β -glucosidase from mycelia(b). After electrophoresis, β -glucosidase activities on the gel were located by activity staining. The migration of bromophenolblue from the top of the gel toward anode(right) indicated by arrow. PI and PII are the major components of mycelial β -glucosidase in *Aspergillus nidulans*.

비교하기 위하여 각각의 효소용액을 7.5% polyacrylamide slab gel을 사용하여 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 β -glucosidase 활성염색한 결과, 균사체에서 얻어진 효소와 LBE는 같은 양상을 나타냈다(Fig.3). 즉 LBE에도 균사체에서 유리된 두 개의 β -glucosidase 성분(PI 및 PII)과 동일한 성분이 존재함을 알 수 있었다. 결국 LBE의 성질은 Chang 등(1982)과 Jung 등(1983)에 의해 밝혀진 균사체의 β -glucosidase와 동일하리라 생각된다.

TBE의 성질

계속된 세척에도 불구하고 여전히 포자현탁액에 남아있는 TBE가 과연 얼마나 단단하게 붙어 있는지를 알아보기 위하여 여러가지 물리·화학적 처리를 시도하였다(Table 1). 초음파 분쇄시는 50% 정도의 포자가, glass bead를 사용한 경우에는 90% 이상의 포자가 파손되었음이 위상차 현미경에 의해 관찰되었다. Table 1에 열거한 방법으로 처리한 후 원심분리한 상등액에서는 어떤 경우에도 활성도가 나타나지 않았으며(자료생략), 재현탁액에서도 활성도의 큰 변화가 없었다. 용액상으로 효소가 포자로부터 추출되지 않았다는 것은 TBE가 포자에 상당히 강하게 붙어있음을 시사한다. 또한 재현탁액의 활성도가 크게 변하지 않은 것은 효소가 그만큼 안정화되어 있음을 시사하며, 단지 약간의 증가를 보이는 이유는 이들 처리에 의해 TBE가 부분적으로 노출되어 외부와의 접촉이 수월해졌기 때문이라고 추측된다. *Neurospora*의 경우에는, acetone 처리에 의해 포자

Table 1. Effect of physical and chemical treatment on tightly-bound β -glucosidase.

Treatment ^b	Reagent concentration	Relative activity (%)	
		Before freezing	After freezing ^a
None		100	112.5
Sonication		118	121
Glass bead		138	143
Triton X-100	0.25 %	106.5	118
Tween 80	0.25 %	117.5	127
Acetone	0.25 %	97.5	104
SDS	1 mM	116	116.5
SD	1 mM	121.5	132.5
Nystatin	50 μ g/ml	104	124
NaCl	1 M	121	122.5

Abbreviations: SDS, sodium dodesyl sulfate; SD, sodium deoxycholic acid.

^aConidia were brought quickly to -40°C and left for 18 hrs, and then allowed to thaw at 18°C .

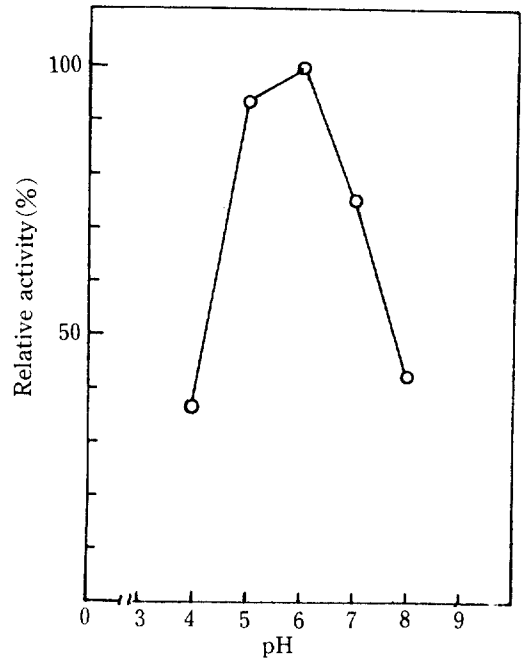
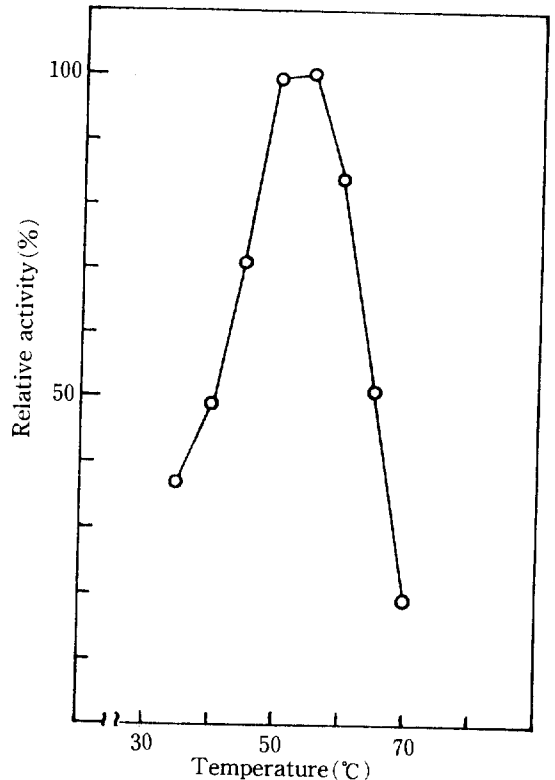
^bThe reagent were allowed to incubate with conidia at 18°C for 30 min before freezing.

에 잔존하는 β -glucosidase가 상당량 유리됨이 보고된 바 있다(Eberhart, 1961).

TBE의 이상과 같은 특성으로 인하여 포자로부터 효소단백질만을 추출해 낼 수 없었고 효소의 순수분리도 불가능하였다. 이리하여 TBE의 성질을 부분적으로나마 밝히고 균사체로부터 획득된 β -glucosidase와 비교하기 위하여, 포자현탁액을 직접 효소용액으로 사용하였다.

TBE 활성도의 pH에 따른 영향을 조사하기 위하여, 반응혼합물의 pH를 달리하여 효소활성도를 비교하였다. pH 4.0에서 pH 5.0까지는 초산완충용액으로 pH 6.0에서 pH 8.0까지는 인산완충용액으로 조정하였다. 그 결과, pH 6.0에서 최고의 활성을 보였으며 이는 Jung 등(1983)에 의한 균사체 β -glucosidase의 결과와 일치하였다(Fig.4).

TBE 활성도의 온도에 따른 영향을 조사하기 위하여, 반응혼합물을 여러 온도에서 반응시킨 결과, Fig.5에서 보는 것처럼 55°C 에서 가장 높은 활성도를 나타내었다. 균사체에서 분리된 두 β -glucosidase 성분중 PI는 55°C 에서 PII는 60°C

**Fig. 4.** Effect of pH on the activity of tightly-bound β -glucosidase.**Fig. 5** Effect of temperature on the activity of tightly-bound β -glucosidase.

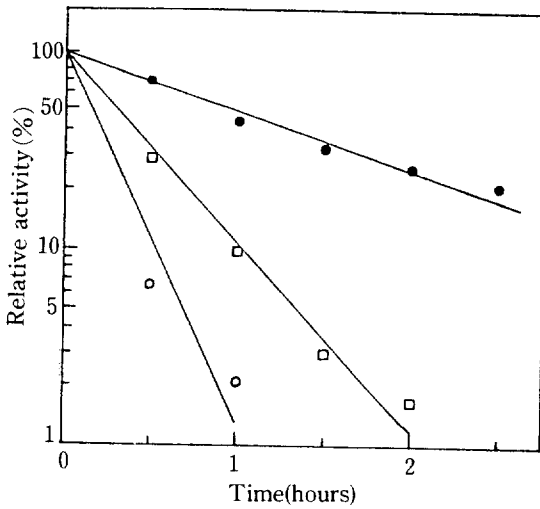


Fig. 6. Thermostability of tightly-bound β -glucosidase (●) from conidia and the β -glucosidases from mycelia (PI, ○; P II, □). The enzyme was preincubated in shaking water bath at 60°C.

에서 가장 활성도가 높았다(Jung 등, 1983). 열안정성을 비교하기 위하여 TBE, PI, PII 등을 각각 60°C에서 30분 간격으로 전처리 시킨후, 기질을 넣고 표준조건에서 반응시켜 효소활성도를 측정해 보았다(Fig. 6). TBE는 균사체에서 얻어진 두 β -glucosidase 보다 열안정성이 훨씬 좋았다.

Chang 등(1982)에 따르면 균사체 β -glucosidase 성분중 PI은 Hg^{2+} 이온에 의해 효소활성이 심하게 저하되는 반면, PII는 크게 영향받지 않았다. TBE의 Hg^{2+} 이온에 의한 영향을 PI 및 PII와 비교하기 위하여 반응혼합물에서 Hg^{2+} 이온의 최종농도가 각각 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10 mM 씩 되게 한 후, 효소활성도를 측정하였다. 그 결과 TBE는 Hg^{2+} 이온의 영향을 그리 심하게 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 7). 즉 PII와 비슷한 수준으로 Hg^{2+} 이온 내성을 보였다.

고 찰

분생포자에서 유래된 효소에 대한 연구는 비교적 등한시 되어왔다. 그러나 Zalokar와 Cochrane(1956)은 diphosphopyridine nucleotidase가 *Neurospora crassa* 분생포자의 체외 효소로 존재함을 밝혔으며, *Aspergillus lu-*

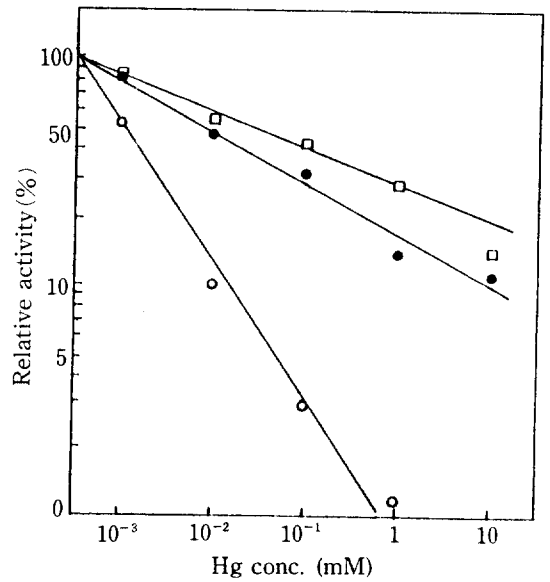


Fig. 7. Effects of mercuric ion (Hg^{2+}) on the activities of tightly-bound β -glucosidase (●) from conidia and the β -glucosidase from mycelia (PI, ○; P II, □).

*chuensis*에서도 maltase, trehalase, cellobiase 등이 분생포자에 존재함이 밝혀진 바 있다(Mandels, 1953), Eberhart(1961)은 *Neurospora*의 분생포자에 존재하는 cellobiase, maltase, invertase 등이 분생포자가 여러 이탄당을 이용하여 생장할 수 있도록 해주는 적응능력을 준다고 주장하였다.

본 연구에서는 *A. nidulans*의 분생포자에 두 종류의 β -glucosidase, 즉 LBE와 TBE가 존재함을 알 수 있었다. LBE는 soluble하여 포자로부터 쉽게 유리되어 나오며 균사체의 β -glucosidase와 유사하게 두 종류의 성분을 가지고 있었다(Fig. 3). 즉 균사체 β -glucosidase와 동일한 효소들(PI 및 PII)이 포자의 표면에 붙어 있다고 볼 수 있다. 이와같은 성질의 β -glucosidase가 포자에 존재함으로써 포자가 전파되어 새로운 환경에 접했을 때, 주위의 수분에 의해 확산되어, 포자의 주변에 존재하는 천연의 β -glucoside들(e.g. arbutin, esculin, salicin, cellobiose, amygdalin)을 분해하여 포자가 생장하는데 필요한 에너지를 얻게 되리라 추측된다.

한편, TBE는 매우 강하게 포자에 결합되어 있으며, 다양한 물리·화학적 환경의 변화에도 불구하고

하고 그 활성을 잃지않음을 알 수 있었고(Table 1), 높은 열안정성과 수은이온에 대한 내성을 보였다(Fig.6, 7). 이와같은 성질로부터, 혹독한 자연환경의 변화에도 자연계에 널리 존재하는 β -glucoside 들을 분해하여 포자가 생장할 수 있으리라고 생각된다.

더구나, *A. nidulans* 의 분생포자를 상온에서 상당기간 동안 방치시켜도 LBE 및 TBE의 활성

이 감소되지 않고 일정수준으로 유지되는것은 이와같은 환경적응능력을 뒷받침해 준다고 볼 수 있다(Fig.2).

A. nidulans 의 분생포자에는 위와같은 β -glucosidase 외에도 탄소원 및 에너지원을 얻어내기 위한 여러종류의 분해효소들이 존재하리라고 예상되며, 이를 밝히기 위한 연구가 계속 진행중이다.

적 요

Aspergillus nidulans 의 분생포자에는 두 종류의 β -glucosidase, 즉 tightly-bound enzyme(TBE)과 loosely-bound enzyme(LBE)이 존재한다. 포자수와 효소활성도가 정비례함을 보아 이 효소의 존재를 확인할 수 있었으며, 배양조건 하에서의 오랜기간 방치에도 일정 수준의 활성을 유지하는 높은 안정성을 보였다.

분생포자에 여러가지 물리·화학적 처리를 한 뒤에도 TBE의 활성도에는 큰 변화가 없었으며, TBE의 최적 pH 및 온도는 각각 6.0, 55°C였다. TBE의 열안정성은 균사체의 β -glucosidase 보다 높았으며, Hg^{2+} 이온에 대한 내성도 비교적 높은 수준을 보였다.

LBE와 균사체 β -glucosidase의 전기영동 양상이 유사한 것으로 보아 균사체와 동일한 효소가 포자의 표면에 존재함을 알 수 있었다.

REFERENCE

1. Chang, T.Y., Y.H. Rhee, and S.W. Hong, 1982. Purification and properties of β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* FGSC 159. *Kor. Biochem. J.* 15, 81-94.
2. Clutterbuck, A.J. 1977 The genetics of conidiation of *Aspergillus nidulans*. (in Genetics and physiology of *Aspergillus*. ed. J.E. Smith and J.A. Pateman) pp. 305-317. Academic Press.
3. Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis II. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
4. Eberhart, B.M., 1961. Exogenous enzymes of *Neurospora* conidia and mycelia. *J. Cell. Com. Physiol.* 55, 11-16.
5. Harsanyi, Z., I.A. Granek, and D.W.R. Mackenzie, 1977. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *A. nidulans*. *Mut. Res.* 48, 51-74.
6. Jung, J.S., Y.C. Hah and S.W. Hong 1983. Enzymatic property and action of β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* FGSC 159. *Kor. Biochem. J.* 16, 165-173.
7. Kwon, K.S., A new convenient zymogram for β -glucosidase, unpublished.
8. Mandels, G.R., 1953. Localization of carbohydrases at the surface of fungus spores by acid treatment. *Exp. Cell Res.* 5, 48-55.
9. Orr, W.C. and W.E. Timberlake, 1982. Clustering of spore-specific genes in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 5976-5980.
10. Smith, J.E., J.G. Anderson, S.G. Deans, and B. Davis, 1977. Asexual development in *Aspergillus*. (in Genetics and physiology of *Aspergillus*. ed. J.E. Smith and J.A. Pateman) pp.23-58. Academic Press.
11. Timberlake, W.E. and E.C. Barnad, 1981. Organization of a gene cluster expressed specifically in asexual spores of *A. nidulans*. *Cell* 26, 29-37.
12. Woodward, J. and A. Wiseman, 1982. Fungal and other β -D-glucosidases: their properties and applications. *Enz. Microbiol. Technol.* 4, 73-97.
13. Zalokar, M. and V.W. Cochrane, 1956. Diphosphopyridine nucleotidase in the life cycle of *Neurospora crassa*. *Am. J. Bot.* 43, 107-110.

(Received Nov. 7, 1986)