

Triton X-100이 *Trichoderma koningii*의 성장 및 형태에 미치는 영향

박희문¹ · 민경림² · 맹필재¹ · 하영철³

¹충남대학교 미생물학과
²태평양화학 생명공학연구소
³서울대학교 미생물학과

Effect of Triton X-100 on the Growth and Morphology of *Trichoderma koningii*

Park, Hee-Moon¹, Kyung-Ryum Min², Pil-Jae Maeng¹, and Young-Chil Hah³

¹Dept. Microbiol. Chungnam Nat'l. Univ.,
²Lab. Biotech. Pacific R & D,
³Dept. Microbiol. Seoul Nat'l. Univ.

ABSTRACT: We investigated the effect of Triton X-100 on the growth and morphology of *Trichoderma koningii* by comparing various parameters representing the growth of mold in the presence or absence of Triton X-100. The specific growth rate and doubling time of *T. koningii* were not affected by the addition of 0.05% Triton X-100 in batch culture. However, in the presence of Triton X-100, cultures reached its stationary phase earlier and showed reduced level in total yield of biomass. The addition of Triton X-100 into solid medium also resulted in decrease in the colony radial growth rate and this response was correlated with the formation of mycelia which showed increase in branching and septation in the presence of Triton X-100.

KEY WORDS □ Triton X-100, *Trichoderma koningii*, hyphal growth, morphology.

Tatum 등 (1946)은 야생형의 *Neurospora*가 L-sorbose를 첨가한 한천배지 상에서는 아주 제한적인 성장을 보이는 작은 군체를 형성하며, 액체배지 내에서는 밀도 높은 단단한 덩어리 (pellet)형의 군체를 형성함을 보고한 바 있다. 이와 같이 균류의 성장속도에는 영향을 미치지 아니하나, 성장 양상의 변화나 형태적 변이를 유발하는 물질을 paramorphogen이라 하는데, paramorphogen을 이용하면 유전학적 분석시, 한장의 평판배지 당 많은 수의 군체가 서로 구분가능하게 자라게 할 수 있어, 그 효율을 제고할 수 있는 장점이 있으며 (Park 등, 1984), 대체 식품으로 사용되는 mycoprotein의 질감을 변화시킬 수 있다 (Wiebe 등, 1989). Tatum 등의 보고 이래, 여러가지의 paramorphogen이 이용되었는데, 그 종류로는 Oxgall, Rose bengal, sodium deoxycholate, Triton X-100, Phosphon D, polyethylene glycol, saponine 등이 있다 (Park 등, 1984). 그러나 이들 paramorpho-

gen의 작용기작에 대한 연구는 미미한 편으로, L-sorbose의 경우 *Neurospora crassa*의 glycogen synthetase와 β -1,3-glucan synthase의 활성을 저해하여, 형태학적으로 균사의 격막 간격을 좁게하고 분지현상을 촉진하여 방사상 성장물을 감소시키며 (Tatum 등, 1949; Mishira 등, 1972), *Trichoderma reesei*도 L-sorbose에 대해 동일하게 반응한다고 하였다 (Bisaria 등, 1986). 한편, Wiebe 등(1989)은 choline 첨가에 의하여, *Fusarium graminearum*의 분지현상이 저해되어, 종국적으로 방사상 성장물이 증가됨을 보고하였다. 또한 Yoon 등(1985, 1986)은 *Rhizopus oryzae*에 sodium dodecyl sulfate와 sodium deoxycholate를 처리한 결과, 균사체의 형태 및 생체량이 변화하고, 단백질과 핵산의 양, 세포 외 분비효소능이 증가하였으나, 총지질의 양은 감소함을 조사 보고한 바 있다.

본인 등은 이미 Triton X-100이 *Trichoderma*속

균의 성장저해제로 가장 효과적임을 밝힌 바 있는데 (Park 등, 1984), 본 실험에서는 Triton X-100이 균체적으로 균사체 성장에 어떠한 영향을 미치는가를 성장계수 측정 및 균사체 형태관찰을 통하여 살펴 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배지

균주로는 *Trichoderma koningii* ATCC 26113을 사용하였으며, potato dextrose agar (Difco) 사면배지에 접종한 후 28°C에서 3-4일 간 배양하여 4°C에 보관하였다. 완전배지로는 malt extract agar 배지를 사용하였으며, 최소배지로는 Mandels 등 (1962)의 배지를 다소 변형하여 사용하였다(Park 등, 1984). 균체 성장 유도를 위한 배지는 최소평판배지에 Triton X-100의 최종농도가 0.05%가 되도록 첨가한 후 (Park 등, 1984), 멸균하여 직경 9 cm의 멸균된 페트리접시에 멸균된 피펫으로 20 ml/ 씩 부어 두께가 일정한 평판배지를 만들었다.

성장계수 측정

Triton X-100이 균체의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위하여, Triton X-100이 첨가되거나 첨가되지 아니한 최소액체배지 각각 50 ml 씩을 일련의 삼각 플라스크 (250 ml)에 담고, 포자를 총 5.0×10^7 수준으로 접종하여 진탕배양 하면서, 매 3 시간 간격으로 생성된 균사체의 양을 측정하였다.

균사체의 건조중량은 유리섬유 여과지에 균사체를 걸러 증류수로 3-4 회 세척한 후, 110°C에서 2 시간 건조하여 측정하였다 (Calam, 1969). 방사상 성장률 (radial growth rate: Kr)은, 최소평판배지에서 자란 균사체를 직경 4 mm의 크기로 떼어내어 새로운 최소평판배지에 옮겨 28°C에서 2 일간 배양하고, 2 일 후 다시 각종 paramorphogen이 첨가된 최소평판배지에 4 mm 직경으로 옮겨, 28°C에서 4-5 일 간 배양하면서 6 시간 간격으로 균체의 직경을 측정하여 결정하였다. Kr 값은 단위시간 당 균체의 직경증가를 측정하는 것으로 $Kr = (R_1 - R_0) / (t_1 - t_0)$ ($\mu\text{m}/\text{h}$)의 식에 의거하여 계산하였다 (Trinci, 1971; Trinci와 Collinge, 1973). 또한 specific growth rate은 $\mu = \ln M_1 - \ln M_0 / (t_1 - t_0)$ (h^{-1}), doubling time은 $Td = \ln 2 / \mu$ (h), 총균사체 생성수율은 $Y = \text{Biomass produced (g)} / \text{Amount of glucose added in medium (g)}$ 에 의하여 계산하였다 (Trinci, 1971; Trinci 등, 1973; Skone 등, 1981a, 1981 b). 이론상의 peripheral growth zone은 $\omega = Kr / \mu$ (μm)에 의하여 구하였으며 (Trinci, 1971), 격막의 길이는 $A_1 - A_0 = Kr \cdot Td$ (μm)의 식에 의거하여 계산하였다 (Bainbridge, 1976).

격막의 간격 측정

격막의 간격을 측정하기 위하여 Triton X-100이 첨가되거나, 첨가되지 아니한 최소평판배지에 앞서 기술한 바와 같이 균체를 접종하여 배양 30 시간 쯤에

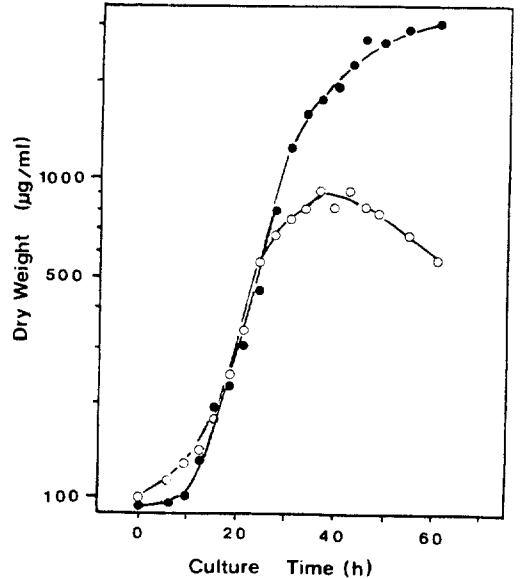


Fig. 1. Growth curve of *Trichoderma koningii* ATCC 26113. Cultures were grown in liquid minimal medium with no added Triton X-100 (●) or 0.05% Triton X-100 (○).

균체 가장자리의 균사체를 채취하여 관찰하였다. 관찰법은, 균사체를 슬라이드 유리에 옮긴 후, trypan blue로 염색하고 현미경사진을 촬영한 다음 사진상에서 길이를 측정하였다. 실제길이는 현미경의 배율, 사진의 확대배율을 함께 사진촬영한 micrometer의 길이를 기준으로 보정하여 산정하였다.

결과 및 고찰

Triton X-100이 성장에 미치는 효과

본인 등은 이미 섬유소분해균인 *Trichoderma*의 평판배지상의 균체성장(colonial growth) 유도에 Triton X-100이 효과적으로 이용될 수 있음을 조사한 바 있다 (Park 등, 1984). 본 연구에서는, 실제 Triton X-100이 균사체량의 증가 및 성장에 어떤 영향을 미치는가를 규명하기 위하여, Triton X-100 이 0.05% 첨가된 경우와 첨가되지 아니한 최소액체배지에서의 균체량을 시간별로 조사하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 최소배지에서의 대수기는 배양 12 시간 부터 33 시간 사이이며, Triton X-100이 0.05% 수준으로 첨가된 경우에는 배양개시 12 시간 부터 24 시간 사이로 Triton X-100이 첨가된 경우는 정지기(stationary phase)에 빨리 도달하며, 정지기 후의 균사체량 감소도 매우 급속히 이루어졌다.

대수기를 위와 같이 상정할 때, 대수기 동안의 specific growth rate (μ)는 두 경우 모두 0.12 h^{-1} 로 변화가 없었다. 그런데, 고체배지상에서의 방사상 성

Table 1. Effect of Triton X-100 on the hyphal growth of *Trichoderma koningii* ATCC26113.

Medium Growth parameter	Solid		Liquid		Theoretical	
	Kr (μ)	μ (h^{-1})	Td (h)	Y	ω (μm)	$A_1 - A_0$ (μm)
Minimal medium	589	0.12	5.77	0.31	4908	3398
Minimal medium + Triton X-100 (0.05%)	76	0.12	5.77	0.13	633	439

Table 2. Effect of Triton X-100 on the septation of *Trichoderma koningii* ATCC26113.

	Minimal medium	Minimal medium + Triton X-100
Distance between hyphal tip and first septum (μm)	337 \pm 15 ^a	131 \pm 6 ^b
Distance between first and second septum (μm)	130 \pm 8 ^a	48 \pm 2 ^b

^aResult represents the mean (\pm standard error of mean) of eight determinations.

^bResult represents the mean (\pm standard error of mean) of twelve determinations.

장률(Kr)이 각 각 589 $\mu m/h$ 와 76 $\mu m/h$ 이므로, 이론적인 peripheral growth zone(ω)은 최소배지상에서는 4908 μm 이며, Triton X-100이 첨가된 경우에는 633 μm 이다. 한편, 대수기 동안의 doubling time(Td)도, 두 경우 모두 5.77 h로 동일하였다. 그런데, 두 경우의 ω 와 Td가 동일함에도 불구하고 Triton X-100이 첨가된 경우 값이 낮게 조사된 것으로 보아 Triton X-100의 첨가에 의하여 균사의 분지가 훨씬 많이 이루어지고, 균체의 밀도 또한 높아진 것으로 추정할 수 있다. 따라서, Triton X-100은 진정한

paramorphogen임을 알 수 있다.

이는 validamycin A와 L-sorbose가 μ 에는 영향을 미치지 아니하나, Kr 값은 감소시킨다는 Trinci(1984) 및 Robson 등 (1988, 1989)의 보고와 일치하는 것이다. 최소액체배지에서의 총 균사체 생성수율(Y)은 0.31이며, Triton X-100이 첨가된 액체배지에서는 0.13이었다. 이는 Triton X-100의 첨가로 균사의 자가 분해 (autolysis)가 촉진되는 것으로 볼 수 있으나, 정확한 원인은 현단계에서 설명할 수 없다.

Kr 값과 Td 값으로부터 성장단위(즉, septum)의 길이를 산출할 수 있는데(Brainbridge, 1976), 최소배지에서는 약 33.981 μm 이며, Triton X-100이 첨가된 경우에는 약 439 μm 이다. 이상의 결과를 종합한 것이 Table 1이다. 이를 종합적으로 정리해보면 *N. crassa*의 균사체 성장에 미치는 L-sorbose의 영향과 유사하게(Trinci등, 1973; de Terra등, 1961), Triton X-100은 균사체 성장시 균사의 분지현상(branching)이 더 많이 일어나게 하며, 결국 격막의 간격을 좁게 하여, 종국적으로 균체의 균사체 밀도가 높게 하는 것으로 추론된다. 이를 확인하기 위하여 실제 균사체내의 격막의 간격을 사진촬영한 후 측정하여 보았다.

격막의 형성에 미치는 효과

격막의 간격을 측정하여 Table 2에 요약하였다. 즉, 균사의 정단부로부터 첫번 째에 위치하는 격막 (first

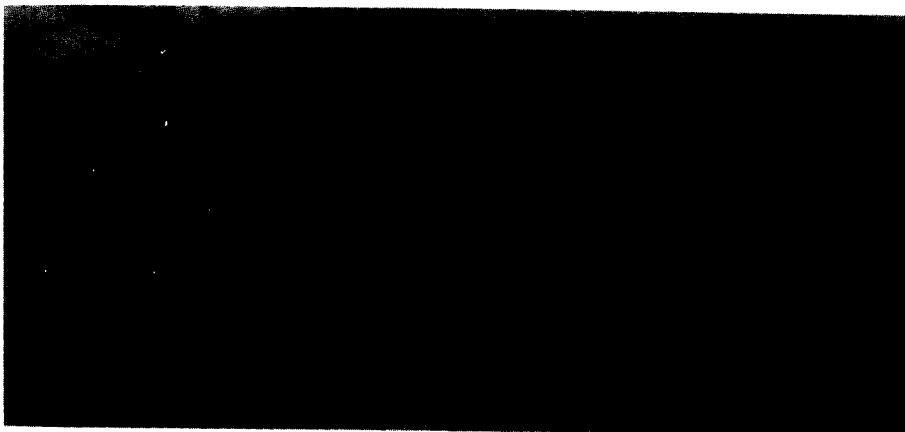


Fig. 2. Hyphae from 30 hr old mycelia of *Trichoderma koningii* ATCC26113 grown on minimal plate (a), and minimal plate plus 0.05% Triton X-100 (b). Mycelia were stained with trypan blue to localize the septa (arrows). Bar represents 100 μm .

septum)까지의 간격이 최소배지상에서는 337 μm 이고, Triton X-100이 첨가된 배지상에서는 131 μm 로 Triton X-100에 의하여 균사체 격막의 간격이 짧게 형성됨을 확인할 수 있었다. 또한 시기적으로 첫번째 격막보다 먼저 형성된 (위치상으로는 균사의 정단부로부터 두번째) 두번째 격막 (second septum)의 경우에도 그 간격이 최소배지상에서는 130 μm , Triton X-100 존재 하에서는 48 μm 로 첫번째 격막과 동일한 양상을 보여주고 있었다.

균사체의 양상을 현미경으로 관찰 촬영한 것이 Figure 2인데, Triton X-100이 첨가되지 아니한 경우 (a)와, 첨가된 경우 (b)의 차이를 쉽사리 인식할 수 있다. 즉, Triton X-100이 첨가된 경우 전체적으로 균사체가 더욱 조밀하게 존재하며, 격막의 간격 또한 훨씬 짧음을 알 수 있다.

Table 2와 Figure 2에서 보는 실제 관찰치는 이론적으로 계산해 본 격막의 간격과는 정확하게 일치하지는 않으나 (이는 Kr. Td 값으로부터 이론적인 격막의 간격을 계산하는 Bainbridge의 식이 수정되

어야 함을 의미함). 그 경향성에 있어 일치함을 알 수 있다. 그런데, Bisaria 등(1986)은 L-sorbose에 의해 *T. reesei* QM 9414 균사의 분지 (branching)와 격막형성 (septation)이 증가됨을 보고한 바 있다. 이는 본 실험의 결과와도 일치하는 것으로, 일반적으로 쓰이는 성장저해제 (growth inhibitor 또는 paramorphogen)의 작용효과가 유사한 것으로 추정된다. 더욱이 Bisaria 등(1986)은 L-sorbose 처리 결과, *T. reesei*의 세포벽 구성성분 중 glucan의 함량이 감소된다고 하였다. 여기서 Triton X-100의 작용기작이 sorbose와 동일하여 glucan의 합성을 저해할 것이라고 단정할 수 없으나, 최소한 Triton X-100이 특정 세포벽 합성 효소의 활성을 저해하는 것으로 추정해 볼 수도 있다 (Mishra 등, 1972; Nanda 등, 1986; Bisaria 등, 1986). 그러나, Triton X-100이 세포벽 합성 및 구성성분의 조성에 미치는 영향은 Triton X-100 존재 하에 배양한 균사체의 글루칸 합성효소능 등을 조사해 보아야 분명해 질 것으로 사료된다.

적 요

Triton X-100이 *Trichoderma koningii*의 성장 및 형태에 미치는 영향을 조사하기 위하여, Triton X-100 첨가 여부에 따른 각 종 성장계수의 변화를 조사하여 보았다. 액체 배양시 Triton X-100의 첨가에도 불구하고, specific growth rate과 doubling time은 변화가 없었으나, Triton X-100의 첨가에 의하여 정지기에 도달하는 시간이 빨라졌고 총 균사체 생량도 감소하였다. 한편, 고체 배지에 Triton X-100을 첨가한 경우, 균체의 방사상 성장물이 감소하였다. 이러한 현상은 Triton X-100에 의하여 균사의 분지 형성이 촉진되고, 격막형성이 촉진되어 격막 간의 간격이 짧아져 나타나는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

- Bainbridge, B.W., 1976. Estimation of the germination time and peripheral growth zone of *Aspergillus nidulans* and *Alternaria solani* hyphae from radial growth rates and ranges of apical cell length. *J. Gen. Microbiol.*, **97**, 125-127.
- Bisaria, V.S., M. Nanda, and T.K. Ghose, 1986. Effect of L(-) sorbose on the release of β -glucosidase by *Trichoderma reesei* QM9414. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 973-978.
- Calam, C.T., 1969. The evaluation of mycelial growth. In: *Methods in Microbiology*. (eds.: J.R. Norris and D.W. Ribbons.) vol. 1, pp. 567-591. Academic Press. New York.
- de Terra, N. and E. Tatum, 1961. Colonial growth of *Neurospora*. *Science*, **134**, 1066-1068.
- Mandels, M., F.W. Parrish, and E. T. Reese, 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bacteriol.*, **83**, 400-408.
- Mishra, N.C. and E.L. Tatum, 1972. Effect of L-sorbose on polysaccharide synthetase of *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 313-317.
- Nanda, M., V.S. Bisaria, and T.K. Ghose, 1986. Effect of L(-) sorbose on cellulase activity in *Trichoderma reesei* QM9414. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 3201-3207.
- Park, H.M., S.W. Hong, and Y.C. Hah, 1984. Induction of colonial growth of the cellulolytic fungus, genus *Trichoderma*. *Kor. J. Microbiol.*, **22**, 143-150.
- Robson, G.D., P.J. Kuhn, and A.P.J. Trinci, 1988. Effects of validamycin A on the morphology, growth and sporulation of *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 3187-3194.
- Robson, G.D., P.J. Kuhn, and A.P.J. Trinci, 1989. Effects of validamycin A on the inositol content and branching of *Rhizoctonia cerealis* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 739-750.
- Skone, E.J. and P.A. Dixon, 1981a. Growth kinetics of *Ceratocystis adiposa*. *Microbios.*, **32**, 89-98.
- Skone, E.J. and P.A. Dixon, 1981b. The effect of paramorphogens on growth kinetics of *Ceratocystis adiposa*, *Botrytis fabae* and *Aspergillus chevalieri*. *Microbios.*, **32**, 189-202.
- Tatum, E.L., R.W. Barratt, and V.M. Cutter, 1949. Chemical induction of colonial paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*. *Science*, **109**, 509-511.

14. **Trinci, A.P.J.** 1971. Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. *J. Gen. Microbiol.*, **67**, 325-344.
15. **Trinci, A.P.J.** 1984. Antifungal agents which affect hyphal extension and hyphal branching. In: Mode of action of antifungal agents. (eds. by A.P. J. Trinci, and J.F. Ryley) pp. 113-134. Br. Mycol. Soc. London.
16. **Trinci, A.P.J. and A. Collinge**, 1973. Influence of L-sorbose on the growth and morphology of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.*, **78**, 179-192.
17. **Wiebe, M.G., G.D. Robson, , and A.P.J. Trinci**, 1989. Effect of choline on the morphology, growth and phospholipid composition of *Fusarium graminearum*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2155-2162.
18. **Yoon, H.-J., Y.-K. Choi, K.-S. Cho**, 1986. The change of mycelial composition according to differentiation of *Rhizopus oryzae*. *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 45-50.
19. **Yoon, H.-J. and Y.-K. Choi**, 1985. Enhancement of surfactant of release of α -amylase and phosphatase in submerged culture of *Rhizopus oryzae*. *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 403-408.

(Received October 20, 1991)

(Accepted November 10, 1991)