

*Fusarium oxysporum*의 원형질체 융합과 polygalacturonase의 활성

하경란 · 민병례*

상명여자대학교 생물학과

Protoplast Fusion of *Fusarium oxysporum* and activity of polygalacturonase

Kyung-Ran Ha and Byung-Re Min*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sang Myung Women's University

ABSTRACT: This experiments was designed for development of *Fusarium oxysporum* strains with enhanced activity of polygalacturonase by means of mutants and protoplasts fusion. Six auxotrophic mutants of *F. oxysporum* were induced by treatment of MNNG. Protoplasts from mutants were formed from early exponential mycelium after treatment with driselase(10 mg/ml) using 0.6 M KCl as osmotic stabilizer. Fusion experiments between protoplasts of several auxotrophic mutants were done using polyethyleneglycol 8,000 and CaCl₂. The frequency of fusion was 5.0×10^{-3} as determined from several experiments. Activity of polygalacturonase was determined by the methods of modified DNS. Consequently, the polygalacturonase activities of mutants and fusant derived *F. oxysporum* were 1.4 to 3.5 times greater than that of the parental strain, and mutant Fx-2 seemed to be the best strain. Thus, the method we used seemed to be favorable for the improvement of strains.

KEYWORDS: *Fusarium oxysporum*. auxotrophic mutants. protoplast fusion. polygalacturonase activity. osmotic stabilizer. driselase. polyethyleneglycol 8,000. MNNG. DNS method.

序 論

많은 병원성미생물들의 감염의 첫단계는 숙주생물의 세포벽을 분해하는 효소를 생산해 내는 것이다(Cervone등, 1977). *Fusarium*속은 가장 중요한 식물병원성균의 하나로써 섬유소를 다당류로 분해할 수 있는 섬유소 분해효소를 생성 분비하는 균주로 알려져 있다(Hamlin과 Anagnostakis, 1977).

특히 *Fusarium oxysporum*은 많은 펙틴질분해효소를 생산해내는 균주로서 오래전부터 관심의 초점이 되어오고 있는 산업적으로 유용한 균주이다(Miller와 Macmillan, 1971; Deese와 Stahmann, 1961; Olutiola, 1978).

최근에 보고가 되어 산업적으로 높은 응용도를 나타내고 있는 원형질체 융합방법은 유용한 균주의 개량을 위해 이용되어 이미 여러종류의 미생물들에서 야생형 균주보다 여러가지 효소나 항생물질 등의 생산능이 높은 균주들이 개발, 보고되어 있다(Sakai등, 1986; Patrizia등, 1988).

또한 원형질체 형성은 특히 식물병원균에 있어서 숙주 - 기생균의 상호작용을 이해하는데 도움을 줄 수 있는 유전자 조작등에 다양하게 사용될 수 있기 때문에 중요하게 인식되고 있다.

아울러 돌연변이체는 원형질체융합이나 vector의 형질전환등에 사용될 수 있으며 유전학적 연구와 균주개발에 함께 이용되고 있다(유 등, 1985).

따라서 본 실험은 pulp 제조시 조직의 연화과정과 여러가지 식품공업에서 유용하게 사용되고 있는 po-

*Corresponding author

lygalacturonase의 생산성이 높은 균주인 *F. oxysporum*의 균주개량을 목적으로 돌연변이 유도에 의한 영양요구주를 선별하고 원형질체를 융합하여 융합주와 영양요구성 돌연변이주에 의한 효소생산능력을 야생형과 비교하고자 실시하였다.

재료 및 방법

균주

균주로는 Australia의 Sydney 대학으로부터 분양 받은 *F. oxysporum* 7500을 사용하였으며 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco) 사면배지에서 5일간 배양한 후 4°C에서 보관하였다.

배지

돌연변이 유도용 배지, 원형질체 형성·재생용 배지는 이전과 동일한 방법(하 등, 1991)으로 제조하여 사용하였다.

삼투안정제 및 세포벽분해효소의 제조

삼투안정제는 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)에 KCl을 0.6 M 되도록 첨가하여 사용하였고, 세포벽분해효소는 driselase(10 mg/ml, Sigma)를 삼투안정제에 용해하여 4°C에서 24시간 방치한 후 6,500 g에서 15분간 원심분리(Beckman JA - 20)한 뒤 그 상등액을 여과(Millipore filter, pore size 0.45 µm)하여 사용하였다.

돌연변이주의 분리

1.0×10^6 spores/ml 농도의 포자현탁액 20 ml에 MNNG(N - Metyl - N' - Nitro - Nitrosoguanidine, Sigma)를 200 µg/ml되게 가하여 28°C에서 90분간 처리한 후 하 등(1991)의 방법에 따라 영양요구성 돌연변이주를 선별하였다.

원형질체 형성 및 재생

1.0×10^6 spores/ml 농도의 포자를 50 ml의 완전액체배지에 접종하여 28°C에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 원심분리하여 균사체를 모은다. 수득한 균사체를 삼투안정제로 두번 세척한 후 driselase를 가하여 원형질체를 형성시켰다.

형성된 원형질체는 삼투안정제로 회석하여 재생

용배지에 접종하여 28°C에서 4 - 5일간 배양시켰다.

원형질체 융합

실험결과 얻어진 영양요구성 돌연변이체 중 비교적 성장율이 좋은 돌연변이체를 선택하여 Fx-1과 Fx-2, Fx-2와 Fx-3, Fx-3과 Fx-4, Fx-1과 Fx-3과 같은 조합으로 각각 융합을 실시하였다.

융합을 위하여 각 돌연변이주로부터 추출한 원형질체를 각각 1.0×10^6 cells/ml 농도로 섞은 후 30°C로 미리 가열하여 둔 Polyethyleneglycol(30%, M.W.8,000, Sigma) - 0.01 M CaCl₂ - 0.05M glycine(pH 8.0)용액 1 ml을 가하고 잘 혼합한 후 28°C에서 10분간 반응시켰다.

Polygalacturonase 활성 측정

효소활성 측정을 위한 배지는 Czapeck Dox 배지에 1%의 pectin과 polygalacturonic acid를 각각 첨가하여 사용하였다.

배지 25 ml에 1.0×10^6 spores/ml의 포자를 접종시킨 후 28°C에서 1 - 8일간 배양시켰다.

배양체는 Whatman filter paper(No.1)로 여과한 후 13,000 g에서 25분간 원심분리하여 상등액을 조효소원으로 사용하였다.

효소활성도는 DNS법(Hancock과 Miller, 1965)에 의하여 측정하였다.

조효소액 2 ml에 0.1 M citrate buffer(pH 5.2)에 녹인 0.25% polygalacturonic acid 2 ml를 넣고 증류수로 10 ml이 되도록 채운 후 30°C에서 각각 0, 30, 60분간 반응시킨 후 이 용액 2.8 ml에 1 M Na₂CO₃ 0.2 ml, DNS(Dinitrosalicylic acid)용액 3 ml을 각각 첨가한 뒤 5분간 중탕하여 식힌 후 550 nm(Shimadzu Spectrophotometer uv-120-02)에서 측정하였다.

이 때 효소의 단위는 효소액 1 ml가 1분당 1 M의 환원당을 유리시킨 경우를 1 unit로 표시하였다.

결과 및 고찰

돌연변이주의 분리

F. oxysporum 균주에 200 µg 농도의 MNNG를 90분간 처리한 결과 9개의 영양요구성 돌연변이주를 얻었다. 이 중 3개는 back mutation이 일어나 총

Table 1. Mutants derived from *F. oxysporum* 7500

Strain	Nutritional requirement
Fx-1	Leu ⁻ , Gly ⁻ , His ⁻
Fx-2	Arg ⁻
Fx-3	Trp ⁻ , Tyr ⁻
Fx-4	Arg ⁻
Fx-5	Cys ⁻
Fx-6	Ser ⁻

Fx: Mutant of *Fusarium oxysporum* 7500

Table 2. Formation and regeneration of protoplast from various auxotrophic mutants of *F. oxysporum* 7500.

Strain	No. of protoplast formed	Regeneration frequency
Fx-1	2.0×10^7	1.4×10^{-1}
Fx-2	1.2×10^7	1.0×10^{-1}
Fx-3	2.5×10^7	8.7×10^{-2}
Fx-4	5.5×10^6	1.1×10^{-1}
Fx-5	2.0×10^6	3.2×10^{-2}
Fx-6	1.7×10^6	2.5×10^{-2}

6개의 영양요구성 돌연변이주를 얻었다(Table 1). 따라서 최종적으로 영양요구성 돌연변이주가 얻어지는율은 약 0.46%였다. 이는 *F. poae* 0.34%, *F. sporotrichioides*의 0.25%보다(하 등, 1991) 훨씬 높은 비율이었다. *F. oxysporum*의 경우 host에 따른 많은 formae speciales이 존재하며 변이가 큰 종으로 알려진 것과 관련이 있는 것으로 추정하였다.

원형질체형성 및 재생

미생물의 원형질체 형성은 각 세포벽의 구성성분에 따라 차이가 나는데 *Fusarium*속의 경우 driserase가 가장 효과적이었다는 이전의 실험결과(하 등, 1991)에 따라 대수기 초반에 해당하는 24시간동안 균체를 배양시켜 효소를 처리하고 재생률을 비교해본 결과 다음과 같았다(Table 2).

그 결과 원형질체 형성량은 $1.7 \times 10^6 - 2.0 \times 10^7$ 수준으로 이미 *Fusarium*속에서 보고되어 있는 결과(하 등, 1991; Billich 등, 1988; Harris, 1982)와

Table 3. Comparison of polygalacturonase activity

Strain	Culture time(day)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>F. oxysporum</i>	38	23	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.2
Fx-1	7	14	53	48	30	117	87	17
Fx-2	10	26	74	30	41	134	110	38
Fx-3	25	17	34	11	9	7	7	5
Fx-4	12	14	102	49	23	18	21	15
Fx-5	13	9	40	21	18	25	21	12
Fx-6	10	25	87	38	30	35	31	17
Fusant	10	20	25	37	45	52	51	4

비교할 때 우수하거나 비슷한 수준임을 알 수 있었다. 원형질체 재생률은 1.0×10^{-1} 에서 8.7×10^{-2} 으로 *Aspergillus*속에서 얻은 결과(Das, 1989)보다는 낮은 수준이었으나 Kitamoto(1988)가 보고했던 *F. velutipes*의 결과와 비교할 때 유사한 수준이었다.

원형질체 융합

몇몇 돌연변이주를 대상으로 융합시켰을 때 Fx-1과 Fx-2의 융합이 가장 잘 되었으며 5.0×10^{-3} 의 융합빈도를 나타내었다. 이 결과는 *Saccharomyces cerevisiae* 종내의 결과(Brigidi 등, 1988)와 비교할 때는 다소 높은 수준이었으나 *Micromonospora rosaria*(Kim 등, 1983)나 *Aspergillus niger*(Das 등, 1989)의 결과보다는 낮은 수준이었다.

Polygalacturonase 활성비교

야생형 균주와 돌연변이주, 융합주의 효소활성을 측정하여 Table 3에 나타내었다. 그 결과 야생형 균주의 경우는 1일간 배양한 것이 38 units로 가장 높은 활성치를 보였다.

돌연변이주의 경우는 평균적으로 3일간 배양시켰을 때 안정적으로 높은 활성을 나타내어 야생형 균주의 결과와 비교할 때 야생형 균주와 유사한 활성치를 나타낸 Fx-3과 Fx-5를 제외한 모든 균주가 약 1.5배에서 3배까지 활성이 증가하였다. 또한 Fx-1, Fx-2의 경우는 4 - 5일 째에는 활성이 저하되다가 6일째에 이르러서는 오히려 활성이 증가하여 야생형 균주와 비교하였을 때 활성치가 약 3.5 배 이상

증가하였다.

돌연변이주 중 가장 높은 활성을 나타낸 균주는 Fx-2로서 배양 1일째에는 야생형균주보다 활성이 낮았으나 배양 3일째에는 야생형균주의 활성최고치보다 약 2배 가량 활성치가 증가하였으며, 배양 후 6 - 7일째에는 야생형균주에 비하여 약 3.5배 이상의 높은 활성을 나타내었다.

그러나 Fx-3과 Fx-5의 경우는 야생형 균주보다 전반적으로 향상된 결과를 보였지만 최고치는 야생형과 거의 동일한 수준이었다.

융합주의 경우는 배양 3일째 부터 효소활성이 증가하기 시작하여 배양 6일째에 가장 높은 활성을 보여 야생형균주의 최고치와 비교하였을 때 약 1.5배 가량 증가된 결과를 보였다. 그러나 융합 모균주인 Fx-1과 Fx-2의 결과와 비교하였을 때는 오히려 효소활성치가 저하된 양상을 띠었다.

또한 조효소원의 반응시간을 0, 30, 60분간 처리하여 비교해 본 결과 30분간 반응시킨 것이 가장 좋은 결과를 보였다.

이상과 같이 돌연변이 유도와 원형질체 융합방법을 통하여 야생형 균주보다 효소 생성능이 뛰어난 돌연변이주와 융합주를 선별하였으며, 이들 방법은 모두 우량균주개발을 위한 좋은 방법임이 판명되었다. 또한 더욱 다양한 융합실험이 이루어진다면 더 많은 우수한 균주들이 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

*Fusarium oxysporum*을 재료로 하여 polygalacturonase 활성능이 좋은 우량 균주를 개발하기 위하여 돌연변이주와 원형질체융합주를 선별하였다. MNNG를 처리하여 6개의 영양요구성 돌연변이주를 유도하였다. 세포벽 분해효소로는 driselase를 이용하고 삼투안정제로 0.6 M KCl을 처리하여 돌연변이체로부터 원형질체를 얻었다. Polyethyleneglycol 8,000과 CaCl₂를 이용하여 영양요구성 돌연변이체의 원형질체 사이에 융합을 시도하여 1개의 융합주를 얻었으며 융합률은 5.0×10^{-3} 이었다. polygalacturonase 활성도를 수정된 DNS법을 이용하여 측정하였다. 결과적으로, 선별된 융합주와 돌연변이주의 polygalacturonase 활성은 모균주와 비교하여 약 1.5

배에서 3.5배 가량 증가하였으며 그 중에서도 mutant Fx-2가 가장 높은 활성도를 나타냈다. 그러므로 이 방법은 우량균주개발을 위한 유용한 방법으로 판단되었다.

謝 辭

본 연구는 1992년도 상명여자대학교 자연과학연구소 연구비로 수행되었습니다.

參考文獻

- Billich, A., U. Keller, H. Kleinkauf and R. Zocher, 1988. Production of protoplasts from *Fusarium scripi* by lytic enzymes from *Streptomyces tsusimaensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 442-444.
- Brigidi, P., D. Matteuzzi and F. Fava, 1988. Use of protoplast fusion to introduce methionine overproduction into *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 268-271.
- Cervone, F., A. Scala, M. Foresti, M. G. Cacace and C. Noviello, 1977. Endopolygalacturonase from *Rhizoctonia fragariae* and characterization of two isoenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta.* **482**: 379-385.
- Das, A., D. V. Gokhale and J. F. Peberdy, 1989. Protoplast fusion and genetic recombination in intra- and interstrain crossing in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 2-5.
- Deese, D. C. and M. A. Stahman, 1962. Pectic enzymes in *Fusarium*-infected susceptible and resistant tomato plants. *Phytopathology* **52**: 255-260.
- Hankin, L and S. L. Anagnostakis, 1977. Solid media containing carboxymethyl cellulose to detect cellulase activity of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 109 - 115.
- Hancock, J. G. and R. L. Miller, 1965. Relative importance of polygalacturonate trans-eliminase and pectolytic enzymes in southern anthracnose, spring block stem and stemphylium leaf spot of alfalfa. *Phytopathology* **55**: 346-355.
- Harris, G. M., 1982. Protoplast from *Gibberella fujikuroi*. *Phytopathology* **72**: 1403-1407.
- Kim, K. S., D. Y. Ryu and S. y. Lee, 1983. Application of protoplast fusion technique to genetic recombination of *Micromonospora rosaria*. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 273-280.
- Kitamoto, Y., N. Mori, M. Yamamoto, T. ohiwa and Y. Ichikawa, 1988. A simple method for protoplast

- formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **28**: 445-450.
- Kue, S. C. and S. Yamamoto, 1979. Preparation and growth of yeast protoplast. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 169-181.
- Miller, L. and J. D. Macmillan, 1971. Ourification and pattern of action of pectinesterase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Biochemistry* **10**(4): 570-576.
- Olutiola, P. O., 1978. Growth, sporulation and production of pectic and cellulolytic enzymes in *Fusarium oxysporum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **70**(1): 109-114.
- Sakai, T., K. I. Koo, K. Saitoh and T. Katsuragi, 1986. Use of protoplast fusion for the development of rapid starch-fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**(2): 297-306.
- 유영복, 존 페버디, 박용환, 1985. 자외선 조사에 의한 느타리버섯 과 사철느타리버섯 원형질체의 영양요구성 균주선별에 관한 연구. *한국균학회지* 13권 제2호: 75-78.
- 하경란, 장성렬, 민병래, 1991. *Fusarium poae* 와 *Fusarium sporotrichioides*간의 원형질체 융합. *한국미생물학회지* 29권 2호: 123-129.