

*Aspergillus phoenicis*의 生活史를 통한 Cellulase 및 Xylanase의 活性 변화

吳 燦 錫·李 永 祿

(高麗大學校 生物學科)

The changes in the activities of Cellulase and Xylanase of *Aspergillus phoenicis* during the life cycle

Oh, Chan-Seok and Yung-Nok Lee

(Dept. of Biol., Korea University)

ABSTRACT

The changes in the activities of Cellulase and Xylanase of *A. phoenicis* during the life cycle were surveyed by using synchronized culture technique.

Avicelase activity of the fungus was reached at peak in the initial hyphal growth stage, but decreased gradually during the conidiophore formation, vesicle-phialide formation, and sporulation stages in decreasing order.

CMCase, Salicinase, and Xylanase activities were raised very high in the initial hyphal growth stage, but decreased gradually in conidiophore formation and vesicle-phialide formation stages, and then increased, more or less, in the sporulation stage.

緒 論

Morton(1961)은 *Penicillium*의 액체 培養에서 胞子の 形成을 동조적으로 이룩한 바 있고, Venzina *et. al.*(1965)은 *Aspergillus*의 포자형성을 동조적으로 유발한 바 있으나, 이들은 모두 絲狀菌의 全生活史를 통한 同調培養에는 이르지 못하였다. 그후 Stine and Clark(1967)는 *Neurospora crassa*의 生活史를 통한 전체 分化 과정을 同調化하는데 성공하였고, Anderson and Smith(1971)는 jar fermentor를 사용하여 *Aspergillus niger*의 동조화를 이룩한 바 있다.

*A. niger*의 分化에 따른 물질대사의 변화는 Galbraith and Smith(1969, a), Anderson and Smith(1971), Ng *et. al.*(1972)등에 의하여 광범위하게 연구되어, 구연산 회로, 글리옥실산 회로 그리고 해당과정 및 오탄당 인산 회로 등에 관여하는 酵素의 活性이 分化의 시기에 따라 크게 변화한다는 사실이 알려지게 되었다. 그러나

*Aspergillus*의 全生活史를 통한 가수분해 효소에 관한 研究는 그리 많지 않다.

본 研究에서는 *Aspergillus*를 同調적으로 分化시켜 培養하고, 菌體의 全生活史를 통한 cellulase 및 Xylanase의 活性 변화를 추적하여 몇 가지 소견을 얻었기에 이를 보고코자 한다.

材料 및 方法

1. 實驗 材料

本 研究室에서 분리, 동정하여 Cellulase 생성 능력이 가장 우수한 균주로 선별된 *Aspergillus phoenicis* KU. 175 (Lee and Park, 1977)를 본 研究의 실험 재료로 使用하였다.

2. 培地의 組成

Anderson and Smith (1971)의 方法에 따라 4 종류의 동조배양용 합성배지를 使用하였다. 즉, 分化 단계에 따라 菌絲 生장기에는 培地 A를, 分生子柄 形成기에는 培地 B, 梗子 形成기에는 培地 C, 그리고 分生子 形成기에는 培地 D를

Table 1. Constituents of media

Medium Constituent (Unit)	A (Glucose-ammonium M.)	B (Low-nitrogen M.)	C (Citrate-ammonium M.)	D (Nitrate-glucose M.)
KH ₂ PO ₄ (g)	1.0	1.0	1.0	13.0
K ₂ HPO ₄ (g)	—	—	—	1.13
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g)	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O (mg)	0.234	0.234	0.234	0.234
FeSO ₄ ·7H ₂ O (mg)	6.32	6.32	6.32	6.32
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (mg)	1.1	1.1	1.1	1.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O (mg)	3.5	3.5	3.5	3.5
CaCl ₂ (mg)	46.7	46.7	46.7	46.7
(NH ₄) ₂ ·SO ₄ (g)	3.96	0.66	1.98	—
NaNO ₃ (g)	—	—	—	5.1
Glucose (g)	20.0	10.0	—	20.0
Citric acid (g)	—	—	12.6	—
Silicone (ml)	—	1.0	1.0	—
D.W. (l)	1.0	1.0	1.0	1.0
pH	2.3	4.6	4.6	5.5

각각 사용하였는데, 이들 배지의 구성은 Table 1.에 각각 표시하였다.

3. 배 양

A. *phoenicis*의 생활사에 따라菌絲 생장기(培地 A), 분生子柄 형성기(培地 B), 梗子 형성기(培地 C), 그리고 분生子 형성기(培地 D)로 구분하여, 진탕배양기와 Fermentor에서 각각 배양조건을 달리하여 배양하였다.

菌絲의 생장은 250ml 삼각 플라스크에 培地 A를 50ml씩 넣은 다음, 수확된 분生子를 접종 (5×10^5 spore/ml) 하여, 35°C에서 100rpm으로 48시간 동안 진탕 배양하였다. 이와같이 발육시킨 균사체는 여과지로 걸러 멸균수로 여러 번 씻은 다음, 培地 B가 담겨있는 Fermentor에서 35°C, 500rpm, pH 4.6으로 배양하여 분生子柄 형성을 유도하였다. 이때 처음 14시간 동안은 진탕배양에서 덜 자란 균사의 생장을 위하여 통기 조건을 0.04 lpm(liter/min.)으로 하고, 그以後는 분生子柄의 형성을 유도하기 위해 0.3lpm으로 조절하였다. 계속하여 培地 C로 같은 Fermentor에서 배양(접종 후 104시간 까지)하여, 梗子の 형성을 유도하였고(Anderson and Smith, 1971), 최종적으로 분生子의 형성을 위해서는 Galbraith and Smith(1969, b)의 방법에

따라 菌體를 Fermentor로부터 진탕배양기로 옮겨서 배양하였다.

4. 酵素液의 調劑

菌體의 生長 및 酵素의 活性을 測定하기 위하여, 각 단계별로 추출한 液體 배양액을 Sartorius Membran Filter(0.45μ)로 여과시킨 後, 배양액을 酵素源液으로 使用하였다.

5. 生體量의 測定

菌體는 여과하여 증류수로 3~4회 씻은 다음, 100°C에서 2시간 동안 완전 건조시켜, 건조중량으로 生體量을 測定하였다.

6. 酵素活性의 測定

Cellulase와 Xylanase의 活性 測定은 Somogyi-Nelson法(Somogyi, 1952)으로 하였으며, 기질은 Avicel, CMC (Carboxymethyl cellulose), Salicin, 그리고 Xylan 등을 使用하였다.

1) Avicelase活性의 測定

기질 용액으로 0.2% Avicel을 使用하여, 이 용액의 1ml에 0.4M acetate buffer(pH 5), 0.5 ml, 그리고 酵素液 0.5ml를 넣고, 50°C에서 1시간 반응시킨 다음, Somogyi's low-alkalinity Copper시약 2ml를 加하고 100°C에서 30分間 가열한 後 물로 냉각하고, Nelson's molybdate시약 1ml씩을 넣고, 20分間 실온에 방치한 다음, 20

ml의 증류수를 加하여 500 μ 의 파장에서 흡광도를 測定하였다.

Avicelase의 活性은 酵素液 1ml가 Avicel을 기질로 사용하여 生成된 환원당의 量을 glucose로 환산하여 표시하거나, 단위 질량 당의 효소 활성으로 각각 표시 하였다.

2) CMCase, Salicinase, Xylanase活性도 Avicelase와 같은 方法으로 測定하였으며, 기질 용액으로는 0.2% CMC, Salicine, Xylan을 사용하였고, 酵素液의 반응시간은 각각 30分으로 하였다.

結果 및 考察

1. 菌體의 同調培養

*Aspergillus phoenicis*의 同調의 分化에 따른 형태변화를 관찰한 결과는 Fig. 1~5에 나타내었다.

菌絲의 生長을 위한 진탕배양에서는, Pirt (1966)의 균체 pellet에 해당하는 직경 약 1.4mm의 균체 pellet가 관찰되었고 (Fig. 1), 培養 48시간 후에는 약 85%의 同調的 菌絲體를 얻을 수 있었다. (Fig. 2)

分生子柄의 形成을 위하여, 菌體를 Fermentor로 옮긴 後, 처음 14시간 동안에는 진탕배양에서 덜 자란 균사의 生長을 위해 통기율을 0.03 lpm으로 낮게 유지했으며, 그 以後 통기율을 0.3lpm으로 높혀 分生子柄의 形成을 유도하였고 80시간 후에는 약 75~80%의 同調的 分生子柄이 유도되었다. 이때의 分生子柄은 lactophenol cotton blue에 질게 염색되었고, 이 시기의 分生子柄의 細胞質에는 카로티노이드 색소가 풍부하며, 이들 사이에 엷은 틈이 관찰되었다. (Fig. 3)

梗子 形成을 유도하기 위하여 배지를 같은 Fermentor에서 培地 C로 대체하였을 때, 약 86시간부터 梗子가 나오기 시작하여, 104시간 후에는 약 80%의 동조적 경자 및 소낭이 유도되었다. (Fig. 4)

分生子 形成을 위한 진탕배양에서는, 130시간부터 分生子가 나오기 시작하여, 150시간 후에는 약 85% 정도의 동조적 分生子 形成이 유발되었다. (Fig. 5)

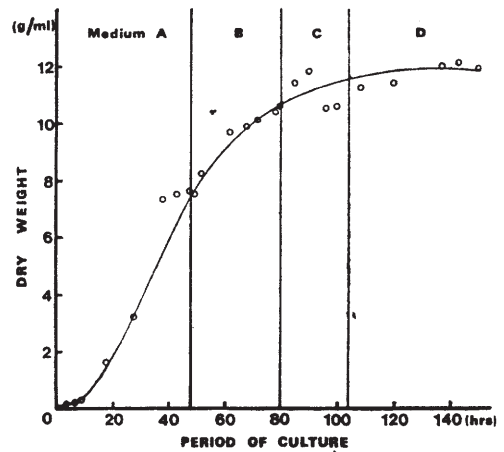


Fig. 6. Growth curve of *A. phoenicis* during the synchronous differentiation. The vegetative mycelial growth was conducted in "Medium A", conidiophore formation in "Medium B", vesicle-phialide formation in "Medium C", and sporulation occurred in "Medium D".

이와같은 동조적 分化 과정에 따른 *A. phoenicis*의 生長률을 Fig. 6에 표시하였다.

2. 菌體의 生活史에 따른 Cellulase活性의 변화

菌體의 生活史를 통한 Avicelase活性의 변화는 Fig. 7에 표시하였다.

菌體의 生育시기에 따른 단위 질량 당의 Avicelase의 活性은 培養 18시간 후인 군사 生長 초기에 가장 높았으나, 그 후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. (Fig. 7)

菌體의 生育時期에 따른 단위 培地 당의 Avi-

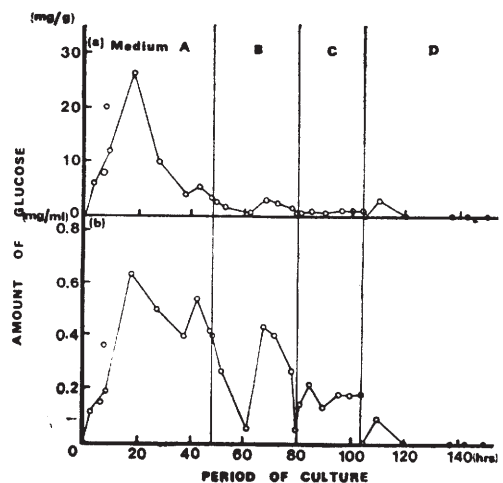


Fig. 7. Avicelase activities of *A. phoenicis* at different growing stages in submerged culture.

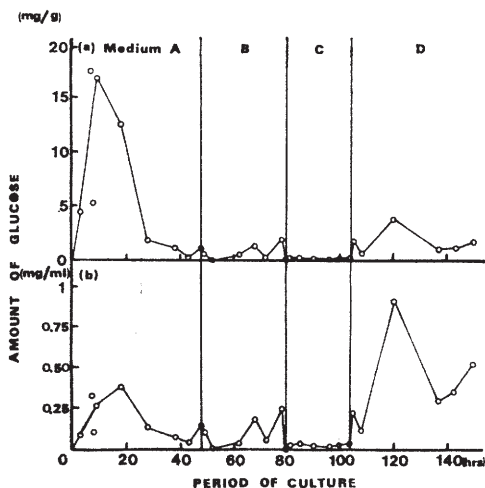


Fig. 8. CMCase activities of *A. phoenicis* at different growing stages in submerged culture.

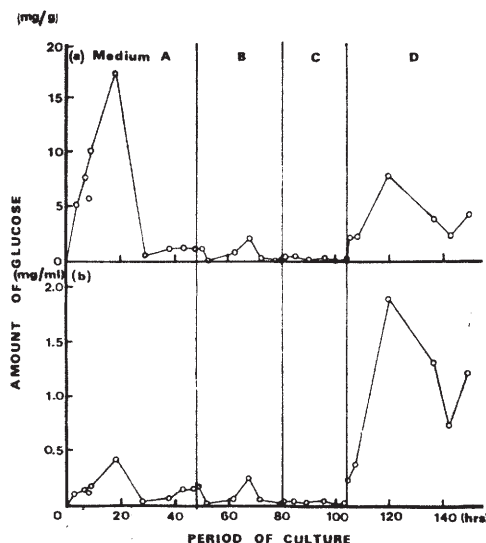


Fig. 9. Salicinase activities of *A. phoenicis* at different growing stages in submerged culture.

celase活性은 균사 성장 초기에 가장 높았고, 그 후 점차로 감소하며,培養 68시간 후인 분生子柄 성장기에는 다시 약간 증가하다가 분生子형성기까지 계속 감소하였다. (Fig. 7)

菌體의 生活史를 통한 CMCase 및 Salicinase의 活性 변화는 Fig. 8 및 Fig. 9에 각각 표시하였다.

菌體의 생육시기에 따른 단위 질량 당의 CM-Case(Fig. 8) 및 Salicinase(Fig. 9)의 活性 변화는 균사 성장 초기인 培養 18시간에서 가장 높았으며, 그 후 점차 감소하다가 분生子형성기

인 培養 120시간 후에는 약간 상승하는 경향을 나타내었다.

菌體의 生育時期에 따른 단위 培地 당의 CM-Case(Fig. 8) 및 Salicinase(Fig. 9)의 活性 변화는 接種 18시간 후인 균사 성장기와 分生子柄 형성기(接種 68시간 후)에 약간 상승하였으나, 接種 120시간 후인 分生子 형성기에 가장 높았다.

Cellulase活性이 培養 18시간에서 급격한 상승을 보였는데, 이는 分生子의 발아 이후 균사체의 대수 성장기에 Cellulase가 細胞 밖으로 많이 분비된다고 하는 Ikeda *et. al.*(1973) 및 Lighton and Stock(1970)등의 보고와 일치된다. 또한 이 시기에 유리 아미노산의 분비가 왕성하며 alkaline protease (Leighton and stock, 1970)나 Glucoamylase(Kim, 1972)의 活性도 높아진다고 한다.

胞子 형성 과정에서는 많은 새로운 단백질 생성이 요구되며, 이 中에는 exo-enzyme 역시 많이 방출된다고, Urey(1971)는 보고하였다. 分生子가 형성되기 시작하는 137시간 이전인 培養 120시간에, Avicelase를 제외한 다른, Cellulase 活性이 높아지는 경향은 分生子의 分化가 일어나기 前에 Cellulase가 축적된다는 Hume and Stranks(1971), Loginova *et. al.*(1978)의 보고와 일치된다.

3. 菌體의 生活史에 따른 Xylanase活性의 변화

菌體의 生活史를 통한 Xylanase活性의 변화는 Fig. 10표에 시하였다.

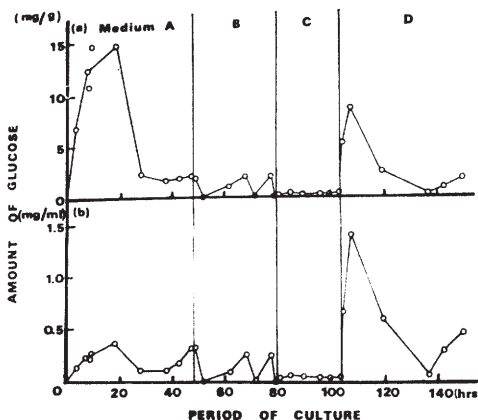


Fig. 10. Xylanase activities of *A. phoenicis* at different growing stages in submerged culture.

菌體의 생육시기에 따른 단위 질량 당의 Xylanase活性(Fig. 10)은 군사 생장 초기에 가장 높았다가, 그 후 점차 감소되며, 분生子 형성기에서 급격한 상승 현상을 보였다.

菌體의 生育時期에 따른 단위 培地 당의 Xylanase活性(Fig. 10)은 군사 생장기인 培養 18시간, 48시간, 分生子柄 형성기 중반인 68시간과 78시간에서 약간 높았다가 감소하며, 分生子 형

성기인 108시간에서 급격히 상승되는 경향을 보였다.

Xylanase活性의 변화 역시 CMCase 및 Salicinase의 活性 변화와 비슷한 경향을 나타내었는데, 특징적인 차이는 分生子 형성기에서 이들 효소보다 약간 빠른 접종 후, 108시간에 높은 활성을 나타내었다.

摘 要

*Aspergillus phoenicis*의 生活史를 통한 Cellulase 및 Xylanase의 活性 변화를 동조배양법을 사용하여 추적하였다. Avicelase活性은 군사 생장 초기에 가장 높았으나, 그 이후의 分化 과정에서는 점차로 감소하였다. CMCase, Salicinase 및 Xylanase의 活性은 군사 생장 초기에 높았으나, 그 후 점차로 감소하다가 分生子 형성기에서 다시 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

REFERENCES

- Anderson, J.G., and J.E. Smith, 1971. Synchronous initiation and *Aspergillus niger* conidiophore in culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 56(1):9-29.
- Galbraith, J.C., and J.E. Smith, 1969, a. Changes in activity of certain enzymes of the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate cycle during the initiation of conidiation of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 15:1207-1212.
- Galbraith, J.C., and J.E. Smith, 1969, b. Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. *J. Gen. Microbiol.* 59:31-45.
- Hulme, M.A., and D.W. Stranks, 1971. Regulation of cellulase production by *Myrothecium verrucaria* grown on non-cellulosic substrates. *J. Gen. Microbiol.* 69:145-155.
- Ikeda, R., T. Yamamoto, and M. Funatsu, 1973. Chemical and enzymatic properties of acid-cellulase produced by *Aspergillus niger*. *Agr. Biol. Chem.* 37(5):1169-1175.
- Kim, J.H., 1972. Ribonucleic acid metabolism in *Aspergillus niger* during synchronized differentiation in submerged culture. Ann. Report of Atomic Energy Institute of Korea.
- Lee, Y.N. and Y.K. Park, 1977. Cellulase activities of *Aspergilli* distributed in South Korea. *Kor. J. Microbiol.* 15:113-121.
- Leighton, T.J., and J.J. Stock, 1970. Biochemical changes during fungal sporulation and sporulation and sporulation and spore germination *J. Bacteriol.* 101(3):931-940.
- Loginova, L.G., E.P. Guzhova, D. Yu. Ismailova, and L.G. Burdenko, 1978. Biosynthesis of cellulosytic enzymes and xylanase under conditions of submerged culturing of the Fungus *Aspergillus terreus* 17p. *Applied Biochemistry & Microbiol.* 14:383-389.
- Morton, A.G., 1961. The induction of sporulation in mould fungi. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.* 153: 548-569.
- Ng, W.S., J.E. Smith, and J.G. Anderson, 1972. Changes in carbon catabolic pathways during synchronous development of conidiophores of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* 71:495-504.
- Pirt, S.J., 1966. A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* 12:369-373.
- Stine, G.J., and A.M. Clark, 1967. Synchronous production of conidiophores and conidia of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.* 13:447-453.
- Somogyi, M., 1952. Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.
- Urey, J.C., 1971. Enzyme patterns and protein synthesis during synchronous conidiation in *Neurospora crassa*. *Developmental Biol.* 26:17-27.
- Venzina, C., J. Singh, and S.N. Sehgal, 1965. Sporulation of filamentous fungi in submerged culture *Mycologia.* 57:722-736.

Explanation of Plate I

PLATE I

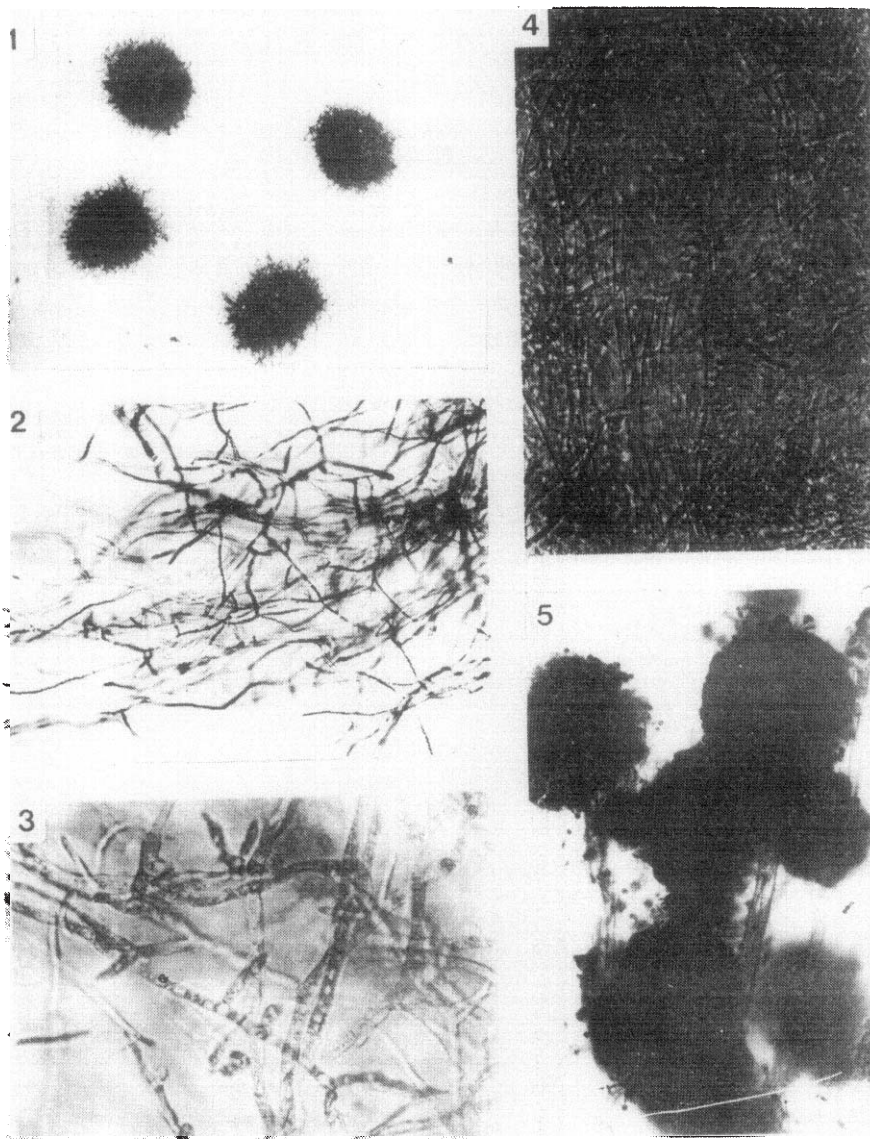


Fig. 1. Tiny colonies formation, 48hours after inoculation of Medium A. $\times 103$.

Fig. 2. Several minute colonies with radiating blind conidiophores in Medium B, 62hours after inoculation. $\times 514$.

Fig. 3. Several blind conidiophores in Medium B, 68hours after inoculation. $\times 1028$.

Fig. 4. Phialide proliferation in Medium C, 104hours after inoculation. $\times 1028$.

Fig. 5. Conidia formation in Medium D, 142hours after inoculation. $\times 514$.