

## 핵전이에 의한 *Aspergillus niger*와 *Penicillium verrucosum* F-3의 속간 잡종형성

양영기\* · 박 열 · 김성준 · 정현숙 · 임채영 · 이영하†

조선대학교 자연과학대학 유전공학과, \*충남대학교 자연과학대학 미생물학과

*Aspergillus niger*와 *Penicillium verrucosum* F-3 균주의 돌연변이체 선발은 ultraviolet(UV) 단 일처리와 UV 및 N-methyl-N'-nitrosoguanidine(MNNG) 이중처리에 의해 얻었다. 원형질체 형성을 위한 최적조건으로는 pH 5.8, 삼투안정제로는 0.6 M KCl, 세포벽 용해효소 Novozym 234의 농도는 1.0%, 재생을 위한 삼투안정제도 역시 0.6 M KCl이 최적이었으며, *A. niger*와 *P. verrucosum*의 재생율은 각각 54.6%, 49.8%로 나타났다. 핵전이에 의한 형질전환율은  $7 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-5}$  이었고, 형질전환체의 유전적 안정성은 4.5%~66.5%, conidia의 크기와 DNA 함량의 측정결과 각각  $2.6 \pm 0.7 \sim 6.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ,  $5.7 \sim 31.3 \mu\text{g}/10^8$  conidia를 나타내어 aneuploid로 추측되었다. 모균주와 형질전환체들간의 유전적 안정성과 효소 활성도를 비교하여 선발된 5균주의 전체 수용성 단백질의 전기영동 양상은 차이가 있었으며, 동위효소의 양상은 모균주와 유사하지만 CMCase의 경우 2균주(TAPW157-6, TAPW157-7),  $\beta$ -glucosidase의 경우 5균주(TAPW157-1, TAPW157-4, TAPW157-5, TAPW157-6, TAPW157-7)에서 band의 세기가 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

**KEY WORDS** □ *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum* F-3, nuclear transfer, CMCase,  $\beta$ -glucosidase.

대체에너지 및 식량자원의 확보를 위한 미래의 자원으로써 섬유소는 자연계에서 녹말, hemicellulose, pectin, lignin 등의 다당류들과 결합된 형태로 존재하며 섬유소의 biodegradation을 촉진시키기 위해서는 여러가지 방법으로 전처리하여 lignin 장벽을 제거하는 것이 필수적으로 요구되는데, 섬유소의 효소 분해에 관여하는 cellulase system 역시 작용 특이성이 다른 세가지 이상의 성분으로 이루어진 복합효소계(multiple enzyme system)으로 구성(22)되어 있어 이들 효소가 상호보완적 작용(synergistic action)을 하였을 때 만이 가수분해가 왕성히 일어나는 것(18, 27, 15)으로 알려져 있다. 따라서 보다 경제적이고 효율적인 생산을 위해서는 cellulase 고생산성 균주의 확보가 중요한 관건이라 할 수 있다. 섬유소 분해효소는 대다수의 미생물에서 분비되는 것으로 보고되어 있는데 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속의 균류들을 여러가지 효소의 산업적 생산과 각종 유기산 등의 발효산물의 생산에도 많이 이용되어 왔다. 특히, *Aspergillus*속 균류들은 다른 균류보다도  $\beta$ -glucosidase 활성이 상당히 높으며, xylanase 활성도 비교적 높은 것(3)으로 알려져 있어 이들 잡종의 생산은 섬유소 분해에 효과적인 cellulase 및 hemicellulase 효소계 등의 복합효소계를 고루 갖춘 균주개발과 발효 공정을 통하여 대량생산이 가능하다는 점에서 매우 의미있는 일로 사료된다. 최근 이용되고 있는 핵전이(nuclear transfer)는 Ferenczy 등(8)에 의하여 *Saccharomyces*

*cerevisiae*에서 최초로 시도되었는데 이 방법은 핵공여체 균주에 영양요구성 돌연변이와 같은 유전자 표지를 도입하는 번거러움과 유용한 형질이 돌연변이에 의해서 저해되는 위험성을 극복할 수 있는 기술이며, 재조합체 형성빈도를 높일 수 있고(20) 유연관계가 멀어 원형질체 융합범으로는 잡종형성이 어려운 균주사이의 잡종형성도 가능할 것(26)으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 핵전이를 이용하여 *Aspergillus niger*와 *Penicillium verrucosum*의 속간잡종을 유도하고 cellulase 효소계의 활성이 증진된 균주를 선발함으로써 섬유소 이용에 있어 균주개발 가능성을 검토하였고, 균주의 유전적 안정성, conidia의 크기 및 DNA 함량 측정, 핵염색, 효소활성도의 검정, 세포외수용성 단백질의 전기영동 양상, 활성염색 등 생리생화학적 및 유전학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 시약

본 실험에 사용된 균주인 *Aspergillus niger* KCTC 1230은 한국과학기술원 균주 보관센터에서, *Penicillium verrucosum* F-3은 전남대학교 유전공학과에서 각각 분양받아 PDA(Difco) 사면배지에 접종하여 30°C에서 4일간 계대배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였고, 완전배지로는 PDA 배지와 콜로니의 크기를 제한하기 위해 10g의 oxgall을 증류수에 녹여 1000

## 핵전이에 의한 *Aspergillus niger*와 *Penicillium verrucosum* F-3의 속간 집중형성

양영기\* · 박 열 · 김성준 · 정현숙 · 임채영 · 이영하<sup>†</sup>

조선대학교 자연과학대학 유전공학과 \*충남대학교 자연과학대학 미생물학과

*Aspergillus niger*와 *Penicillium verrucosum* F-3 균주의 돌연변이체 선발은 ultraviolet(UV) 단 일처리와 UV 및 N-methyl-N'-nitrosoguanidine(MNNG) 이중처리에 의해 얻었다. 원형질체 형성을 위한 최적조건으로는 pH 5.8, 삼투안정제로는 0.6 M KCl, 세포벽 용해효소 Novozym 234의 농도는 1.0%, 재생을 위한 삼투안정제도 역시 0.6 M KCl이 최적이었으며, *A. niger*와 *P. verrucosum*의 재생율은 각각 54.6%, 49.8%로 나타났다. 핵전이에 의한 형질전환율은  $7 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-5}$  이었고, 형질전환체의 유전적 안정성은 4.5%~66.5%, conidia의 크기와 DNA 함량의 측정결과 각각  $2.6 \pm 0.7 \sim 6.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ,  $5.7 \sim 31.3 \mu\text{g}/10^8$  conidia를 나타내어 aneuploid로 추측되었다. 모균주와 형질전환체들간의 유전적 안정성과 효소 활성도를 비교하여 선발된 5균주의 전체 수용성 단백질의 전기영동 양상은 차이가 있었으며, 동위효소의 양상은 모균주와 유사하지만 CMCase의 경우 2균주(TAPW157-6, TAPW157-7),  $\beta$ -glucosidase의 경우 5균주(TAPW157-1, TAPW157-4, TAPW157-5, TAPW157-6, TAPW157-7)에서 band의 세기가 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

**KEY WORDS** □ *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum* F-3, nuclear transfer, CMCase,  $\beta$ -glucosidase.

대체에너지 및 식량자원의 확보를 위한 미래의 자원으로써 섬유소는 자연계에서 녹말, hemicellulose, pectin, lignin 등의 다당류들과 결합된 형태로 존재하며 섬유소의 biodegradation을 촉진시키기 위해서는 여러가지 방법으로 전처리하여 lignin 장벽을 제거하는 것이 필수적으로 요구되는데, 섬유소의 효소 분해에 관여하는 cellulase system 역시 작용 특이성이 다른 세가지 이상의 성분으로 이루어진 복합효소계(multiple enzyme system)으로 구성(22)되어 있어 이들 효소가 상호보완적 작용(synergistic action)을 하였을 때 만이 가수분해가 왕성히 일어나는 것(18, 27, 15)으로 알려져 있다. 따라서 보다 경제적이고 효율적인 생산을 위해서는 cellulase 고생산성 균주의 확보가 중요한 관건이라 할 수 있다. 섬유소 분해효소는 대다수의 미생물에서 분비되는 것으로 보고되어 있는데 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속의 균류들이 여러가지 효소의 산업적 생산과 각종 유기산 등의 발효 산물의 생산에도 많이 이용되어 왔다. 특히, *Aspergillus*속 균류들은 다른 균류보다도  $\beta$ -glucosidase 활성이 상당히 높으며, xylanase 활성도 비교적 높은 것(3)으로 알려져 있어 이들 잡종의 생산은 섬유소 분해에 효과적인 cellulase 및 hemicellulase 효소계 등의 복합효소계를 고루 갖춘 균주개발과 발효 공정을 통하여 대량생산이 가능하다는 점에서 매우 의미있는 일로 사료된다. 최근 이용되고 있는 핵전이(nuclear transfer)는 Ferenczy 등(8)에 의하여 *Saccharomyces*

*cerevisiae*에서 최초로 시도되었는데 이 방법은 핵공여체 균주에 영양요구성 돌연변이와 같은 유전자 표지를 도입하는 번거러움과 유용한 형질이 돌연변이에 의해서 저해되는 위험성을 극복할수 있는 기술이며, 재조합체 형성빈도를 높일 수 있고(20) 유연관계가 멀어 원형질체 융합법으로는 집중형성이 어려운 균주사이의 잡종형성도 가능한 것(26)으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 핵전이를 이용하여 *Aspergillus niger*와 *Penicillium verrucosum*의 속간잡종을 유도하고 cellulase 효소계의 활성이 증진된 균주를 선발함으로써 섬유소 이용에 있어 균주개발 가능성을 검토하였고, 균주의 유전적 안정성, conidia의 크기 및 DNA 함량 측정, 핵염색, 효소활성도의 검정, 세포의 수용성 단백질의 전기영동 양상, 활성염색 등 생리 생화학적 및 유전학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 시약

본 실험에 사용된 균주인 *Aspergillus niger* KCTC 1230은 한국과학기술원 균주 보관센터에서, *Penicillium verrucosum* F-3은 전남대학교 유전공학과에서 각각 분양받아 PDA(Difco) 사면배지에 접종하여 30°C에서 4일간 계대배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였고, 완전배지로는 PDA 배지와 팔로니의 크기를 제한하기 위해 10g의 oxgall을 증류수에 녹여 1000

Micrometer를 사용하여 *A. niger*와 *P. verruculosum* F-3의 야생형 균주와 선발된 영양요구성 변이주 및 형질전환체의 conidia의 크기를 측정하였으며, 모균주와 형질전환체의 핵을 Fournier(9)의 방법으로 염색하여 관찰하고, 또한 형질전환체의 원형질체를 순수분리한 후 10% perchloric acid로 DNA를 추출한 후 Giles와 Myers(11)의 diphenylamine test로 DNA의 함량을 측정하였다. 표준 DNA 시료로는 salmon testis에서 추출한 Na-DNA type III(Sigma)를 5 mM NaOH에 순차적으로 용해한 후 10% perchloric acid로 추출하여 사용하였다.

#### 세포외 효소용액의 제조 및 활성도 측정

단일탄소원으로 wheat bran 1%를 사용한 최소액 배지에 포자를  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml로 접종하여 30°C에서 18시간 배양하고, 이 배양액을 4°C에서 원심분리(3,000×g, 15 min)하여 얻은 상층액을 세포외 조효소 용액으로 사용하였다. Avicelase, carboxymethylcellulase(CMCase),  $\beta$ -glucosidase의 효소활성도 측정을 위한 기질로는 각각 avicel, CMC 그리고 p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside(pNPG)를 사용하였으며, avicelase, CMCase 활성은 0.2 M 인산완충용액(pH 5.8)에 1%로 되게 제조한 기질용액 0.6 ml에 조효소 용액 0.4 ml를 섞어 30°C에서 30분간 반응시킨 후, Somogyi 등(24)의 방법으로 파장 540 nm의 흡광도로써 유리된 환원당을 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안 최종 분해산물 1  $\mu$ mole을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하여 분석 하였다.  $\beta$ -glucosidase 및  $\beta$ -xylosidase의 활성은 30°C에서 30분간 반응시킨 후 420 nm에서 측정하였으며, 효소활성도 1 unit는 1분 동안에 1  $\mu$ mole의 p-nitrophenyl을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

#### 세포외 수용성 단백질의 양상 분석

모균주와 형질전환체의 세포외 수용성 단백질의 양상을 알아보기 위하여 Laemmli(16)의 방법으로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 행하였다. 전기영동 gel은 8%를 이용하였고, 표준 단백질로는 carbonic anhydrase(MW 29,000), trypsin inhibitor(MW 36,000), egg albumin(MW 45,000), bovine plasma albumin(MW 66,000), phosphorylase B(MW 97,000)를 사용하였고 stacking gel에서는 100 V, resolving gel에서는 200 V로 전개하고 coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 탈색하였다.

#### 활성염색

Non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Davis(7)의 방법을 변형하여 행하였으며, CMCase와  $\beta$ -glucosidase의 활성염색은 Beguin(2) 방법에 의거하여 시행하였다. 즉, 전개가 끝난 gel을 CMC, pNPG를 함유하는 replica 위에 밀착시켜 각각 50°C에서 2시간 반응시킨 후, 4°C로 냉각하여 반응을 정지시킨 다음 CMCase의 경우 0.1% congo red로 염색하고, 1 M NaCl로 탈색한 후, 5%

acetic acid 용액에 넣어 관찰하였으며,  $\beta$ -glucosidase의 경우 반응용액(esculin 100 mg, FeCl<sub>3</sub> 30 mg, 0.5 M acetate(pH 5.0))으로 55°C에서 반응시켜 염색하였다.

## 결과 및 고찰

### 영양요구성 변이주의 분리

1%의 생존율로 자외선과 MNNG에 의해 돌연변이를 유발한 결과를 Table 1에 나타내었다. *A. niger*에서는 8주 즉, MAN 28(Phe, Tyr), MAN 42(Leu, Glu), MAN 61(Met, Glu), MAN 73(Leu, Trp), MAN 101(Ala), MAN 119(Met), MAN 124(Trp), MAN 141(Arg)를 획득하였는데 이 중 MAN 101, 119, 124, 141은 다른 두 변이주와는 달리 단일 요구성을 나타내었다. *P. verruculosum*의 경우도 마찬가지로 6주 즉, MPV 17(Phe, Lys), MPV 31(Ala, Gly), MPV 69(Leu, Met), MPV 86(Ala, Leu), MPV 157(Ala, Met, Leu), MPV 201(Ala)을 획득하였는데 이들 중 MPV 157은 삼중 요구성을, MPV 201은 단일 요구성을 나타내었다. 각각 선발된 변이주의 back mutation frequency를 조사한 결과 *A. niger*에서는  $3.6 \times 10^{-9} \sim 1.3 \times 10^{-7}$ , *P. verruculosum* F-3에서는  $2.3 \times 10^{-9} \sim 1.7 \times 10^{-6}$ 의 수준으로 나타나 몇몇개는 안정성이 비교적

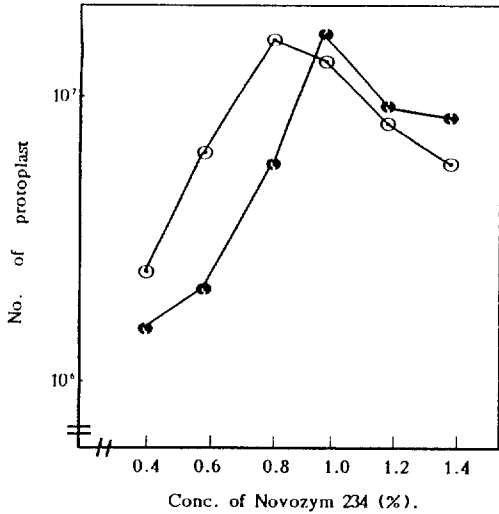
Table 1. List of isolated mutants of *A. niger* and *P. verruculosum* F-3.

Mutants	Phenotype	Mutagen	Back mutation frequency
<i>A. niger</i>			
MAN 28	Phe, Tyr	MNNG	$2.4 \times 10^{-9}$
MAN 42	Leu, Glu	UV, MNNG	$1.9 \times 10^{-8}$
MAN 61	Met, Glu	UV, MNNG	$2.1 \times 10^{-8}$
MAN 73	Leu, Trp	MNNG	$4.0 \times 10^{-8}$
MAN 101	Ala	UV, MNNG	$1.3 \times 10^{-7}$
MAN 119	Met	UV	$3.6 \times 10^{-9}$
MAN 124	Trp	UV, MNNG	$1.7 \times 10^{-8}$
MAN 141	Arg	UV	$1.8 \times 10^{-9}$
<i>P. verruculosum</i> F-3			
MPV 17	Phe, Lys	UV, MNNG	$2.3 \times 10^{-9}$
MPV 31	Ala, Gly	UV, MNNG	$3.2 \times 10^{-8}$
MPV 69	Leu, Met	MNNG	$4.1 \times 10^{-8}$
MPV 86	Ala, Leu	UV, MNNG	$2.4 \times 10^{-7}$
MPV 157	Ala, Met, Leu	UV, MNNG	$1.1 \times 10^{-8}$
MPV 201	Ala	UV, MNNG	$1.7 \times 10^{-6}$

Abbreviations are as follows:

1) MAN, mutant of *A. niger*; MPV, mutant of *P. verruculosum* F-3.

2) Trp, Tryptophan; Lys, Lysine; Leu, Leucine; Met, Methionine; Arg, Arginine; Phe, Phenylalanine; Gly, Glycine; Ala, Alanine; Cys, Cysteine; Tyr, Tyrosine.

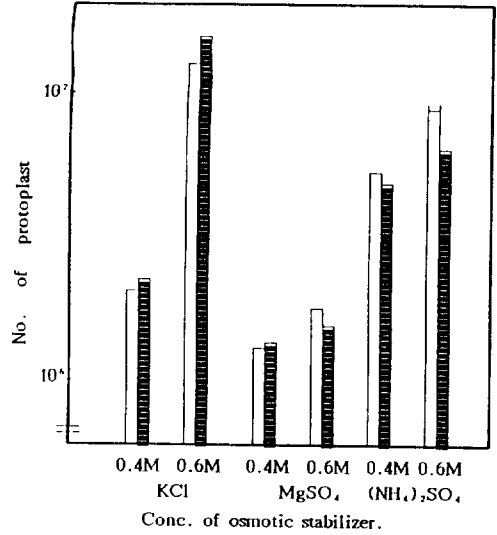


**Fig. 1.** Effect of Novozym 234 concentration on the formation of protoplasts from MAN 31 (○) and MPV 42 (●). The reaction was performed at 30°C with gentle shaking for 2 hrs.

높은 것으로 생각되었다. 영양요구성 검토는 auxotroph법과 여지절편법을 병행하여 최종적으로 영양요구성을 결정하였다.

**원형질체 형성과 재생**

MPV 31은 전배양 약 4시간 후부터 부풀기 시작했다으며, 약 10시간 후에는 완전히 부풀었으며, 부풀지 않는 분생포자에서는 원형질체가 생성되지 않았고, 10시간 전배양시킨 분생포자에서 최고의 원형질체 생성을 나타내었다. MAN 42에서는 13시간 후에 완전히 부풀었으며, 최고의 원형질체 생성을 보였다. 따라서 공시균주의 분생포자 상태를 유지하면서 발아가 시작되기 전인 전배양 후 10~13시간 정도가 효소처리의 적정시간임을 알 수 있었다. 세포벽 분해효소로 Novozym 234를 사용한 결과를 Fig. 1에 나타내었는데 MAN 42 및 MPV 31 둘 다 1% Novozym 234의 농도에서 가장 높게 나타났으며, 원형질체수는 각각  $1.3 \times 10^7$ ,  $1.7 \times 10^7$ 개로 나타나 Chung 등(5)의 보고와 유사하였다. 따라서 *A. niger*와 *P. verruculosum* F-3의 세포벽 조성은 chitin의 glucosamine에  $\beta$ -1,3- 또는  $\beta$ -1,6-glucan이 연결되어 있을 것으로 추측된다(12, 23). 2-Deoxy-D-glucose(2-DG)는 glucose 이성질체로서 다당류의 세포벽 합성 저해제로 알려져 있는데, 2-DG가 원형질체 형성에 미치는 효과를 알아본 결과 MAN 42의 경우 무처리시에 약 15%의 생성율을 보였으나 25  $\mu$ g/ml 처리시 약 3배의 상승율을 보였고, MPV 31의 경우 무처리시에 약 25%의 생성율을 보였으나 최고 효과를 나타내는 25  $\mu$ g/ml를 처리할 경우 약 2배의 생성효과를 보여 2-DG가 팽윤된 포자의 새로운 세포벽 합성을 저해하여 세포벽 분해효소의



**Fig. 2.** Effect of concentration of different osmotic stabilizer on the formation of protoplast. The reaction was performed with 1% Novozym 234 for 2 hrs at 30°C (□ for MAN 31, ■ for MPV 42).

**Table 2.** Effect of osmotic stabilizers on regeneration of protoplasts of *A. niger* M-42(MAN 42) and *P. verruculosum* M-31(MPV 31)

Strains	Stabilizer*	Regeneration frequency(%)
MAN 42	0.4M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11.3
	0.6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19.1
	0.4M KCl	36.1
	0.6M KCl	54.6
	0.7M Sorbitol	16.4
	0.4M MgSO <sub>4</sub>	21.1
	0.6M MgSO <sub>4</sub>	19.1
	0.4M NH <sub>4</sub> Cl	12.7
	0.6M NH <sub>4</sub> Cl	14.2
	MPV 31	0.4M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0.6M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		18.7
0.4M KCl		36.2
0.6M KCl		39.1
0.7M Sorbitol		24.1
0.4M MgSO <sub>4</sub>		21.2
0.6M MgSO <sub>4</sub>		52.3
0.4M NH <sub>4</sub> Cl		13.4
0.6M NH <sub>4</sub> Cl	17.8	

\*Each stabilizer added into RCM.

작용을 보다 쉽게 하도록 한다는 보고(4)와 일치하였다. MAN 42와 MPV 31의 원형질체 형성에 대한 삼투안정제의 종류별(KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>) 및

**Table 3.** Frequency of hybrids formation between *A. niger* and *P. verruculosum* F-3 by nuclear transfer.

Crosses		Frequency (×10 <sup>-5</sup> )
<i>A. niger</i> (wild)	x MPV 31 (Ala <sup>-</sup> , Gly <sup>-</sup> ) (P)	3
(N)	MPV 157(Ala <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Leu <sup>-</sup> ) (P)	7
MAN 42(Leu <sup>-</sup> , Glu <sup>-</sup> )	x MPV 31 (Ala <sup>-</sup> , Gly <sup>-</sup> ) (P)	1
(N)	MPV 157(Ala <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Leu <sup>-</sup> ) (P)	4
MAN 73(Leu <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> )	x MPV 31 (Ala <sup>-</sup> , Gly <sup>-</sup> ) (P)	2
(N)	MPV 157(Ala <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Leu <sup>-</sup> ) (P)	1

(N), donor nuclei; (P), recipient protoplast.

**Table 4.** Genetic stability of transformants

Transformants	Genotype	No. of colony Segregant mean		
		CM	MM	(%)
TAPW31-1	Ala	153	38	24.8
TAPW31-2	Gly	133	6	4.5
TAPW31-3	Ala	131	11	8.4
TAPW157-1	Ala	136	81	59.6
TAPW157-2	Leu	136	54	39.7
TAPW157-3	Met	164	109	66.5
TAPW157-4	Met	111	17	15.3
TAPW157-5	Ala	161	99	61.5
TAPW157-6	Ala	157	98	62.4
TAPW157-7	Ala	108	53	50.9
TAPA31-1	Gly	101	24	23.8
TAPA157-1	Leu	129	18	13.9
TAPA157-2	Ala	136	54	39.7
TAPA157-3	Met	122	9	7.4
TAPA157-4	Met	167	29	17.4
TAPB31-1	Ala	141	27	19.1
TAPB31-2	Ala	139	27	19.4
TAPA157-1	Leu	129	51	39.5

TAPW31, transformants between *A. niger* and MPV 31; TAPW157, transformants between *A. niger* and MPV 157; TAPA31, transformants between MAN 42 and MPV 157; TAPA157, transformants between MAN 42 and MPV 157; TAPB31, transformants between MAN 73 and MPV 31; TAPB157, transformants between MAN 73 and MPV 157.

농도별(0.4 M, 0.6 M) 효과를 Fig. 2에 나타내었는데 1%의 Novozym 234를 3시간 반응시켰을 때 0.6 M KCl이 MAN 42의 경우 3.2×10<sup>7</sup>, MPV 31의 경우는 1.1×10<sup>7</sup>으로 가장 최적이었으며, MgSO<sub>4</sub>가 가장 낮은 효율을 나타내었다. 또한 효소의 처리시간과 pH는 *Penicillium*과 *Aspergillus*속에서 연구된 Chung(5)과 Rho(23)의 보고에 준하여 2시간, pH 5.8로 하여 행하였다. 원형질체 재생 비율을 구한 결과를 Table 2에 나타내었는데 MAN 42의 경우 원형질체의 재생에 있어서도 원형질체 형성에 효과적이었던 0.6 M KCl이 54.6%로 가장 높은 효율을 나타내어 원형질체 형성과 재생시 최적 삼부안정제이며 나머지도 11.3~36.1%로 비교적 좋은 효율을 나타낸 반면 MPV 31

**Table 5.** Conidial size and DNA content of hybrids obtained by intergeneric nuclear transfer between *A. niger* and MPV 157

Strains	Mean conidia size	DNA content/ 10 <sup>8</sup> conidia (μg)
<i>A. niger</i>	5.3±0.5	13.2
MPV 157	2.6±0.7	5.7
TAPW157-1	5.6±0.5	14.1
TAPW157-2	5.1±0.7	27.3
TPAW157-3	5.3±0.5	17.0
TAPW157-4	6.5±0.5	16.4
TAPW157-5	5.4±0.7	11.2
TAPW157-6	5.9±0.7	31.3
TAPW157-7	3.2±0.5	6.3

에서는 0.6 M MgSO<sub>4</sub>가 52.3%로 최고 효율을 나타내었음에 반하여 KCl과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 효율이 저조하였다. 이는 Hong 등(14)이 *Trichoderma koningii*의 분생자로부터 원형질체 형성과 재생에 각각 0.6 M NH<sub>4</sub>Cl과 0.6 M MgSO<sub>4</sub>로 최적 삼부안정제가 다음을 보고한 것과 유사하였다.

**잡종의 형성 및 분석**

*A. niger*와 *P. verruculosum* 및 그들 변이주 사이의 원형질체 융합과 핵전이에 의한 속간 잡종의 유도 효율을 Table 3에 나타내었는데 원형질체 융합에 의한 잡종의 형성은 전혀 이루어지지 않는 반면 핵전이에 의한 속간 잡종 유도 효율은 7.0×10<sup>-5</sup>~1.0×10<sup>-6</sup>로 나타났다. 이는 *A. usami*와 *A. oryzae*사이의 종간 잡종의 유도에서 원형질체 융합은 이루어지지 않는 반면 핵전이는 2.0×10<sup>-5</sup>~7.0×10<sup>-6</sup>의 효율을 보였다는 보고(23)와 유사하였다. 따라서 핵전에서도 원형질체 융합과 마찬가지로 유연관계가 큰 영향을 미치는 것(1, 19, 23)으로 생각된다. 획득된 돌립 영양형 잡종을 여지 절편법으로 genotype을 조사하고 유전적 안정성을 검토한 결과를 Table 4에 나타내었는데 자연 형질분리가 일어나는율이 50% 이내인 균주 TAPW157-1(Ala<sup>-</sup>), TAPW157-3(Met<sup>-</sup>), TAPW157-5(Ala<sup>-</sup>), TAPW157-6(Ala<sup>-</sup>), TAPW157-7(Ala<sup>-</sup>) 5종을 최종 선발하였다. 본 실험에서 모균주로 사용된 *A. niger* 및 MPV 157과 그 형질전환체의 DNA 함량과 conidia의 크기를 비교한 결과를 Table 5에

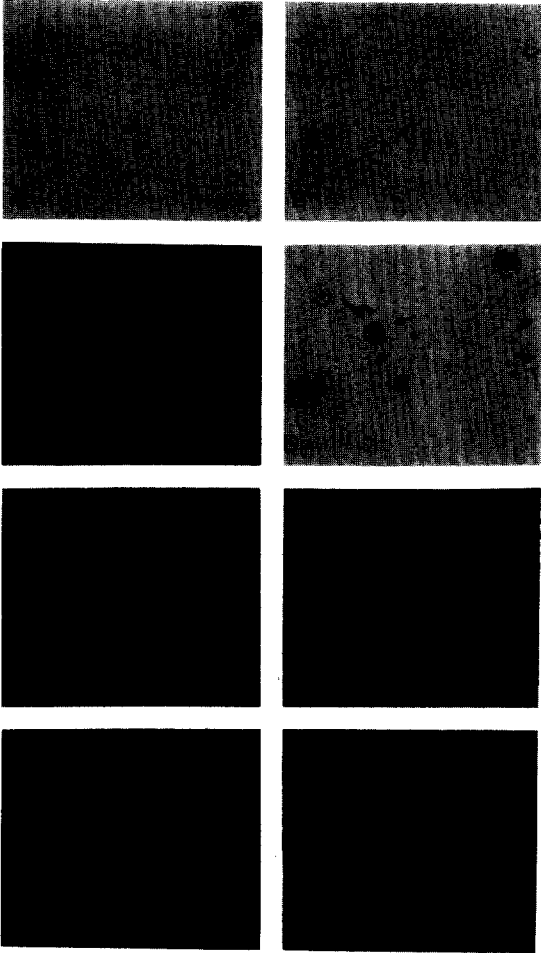


Fig. 3. Photography of nuclei of parental strains and their transformants.

A. *A. niger*; B. MPV 157; C. TAPW157-1; D. TAPW157-3; E. TAPW157-4; F. TAPW157-5; G. TAPW157-6; H. TAPW157-7.

The bar scale is 10  $\mu\text{m}$  and arrows indicate nuclei.

나타내었는데 모균주와 형질전환체의 conidia의 크기는  $2.6 \pm 0.7 \sim 6.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 로서 1.2~1.8배 정도 증가하였으며, 형질전환체 사이의 DNA 함량은  $5.7 \sim 31.3 \mu\text{g}/10^8$  conidia로서 큰 차이를 나타내지는 않았지만 TAPW157-6의 경우는 모균주인 *A. niger*보다 약 2.5배 정도 함량이 높은 것으로 나타났으며, 나머지 형질전환체의 DNA 함량은 모균주에 비해 1.2~2.1배의 증가를 보였고, 또한 핵염색의 결과를 Fig. 3에 나타내었는데 이상의 결과로부터 형질전환체의 핵형은 다음과 같이 추정할 수 있었다. TAPW157-1,3,4,5,7은 반수체에 가까운 aneuploid로 생각되며, TAPW157-2,6은 배수체에 가까운 aneuploid로 추정할 수 있으며, 이는 *A. nidulans*와 *A. rugulosus* 및 그 융합체에서 2.0~2.3배로 되어 aneuploid 이었다는 보고와는 차이가 있었으나 *A. niger*와 *A. ficuum* 및 그 융합체에서 1.6~2.2배 증가되어 aneuploid 이었다는 보고(19)와는 유사하였다. 핵전이에 의하여 얻어진

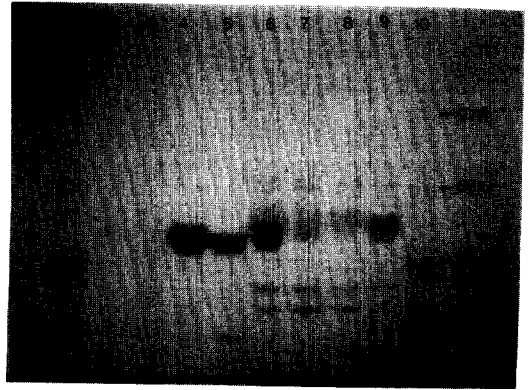


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of total soluble protein in extracellular extracts of parental strains and their transformants.

Lanes: 1, 10, molecular weight marker; 2, *A. niger*; 3, MPV 157; 4, TAPW157-1; 5, TAPW157-3; 6, TAPW157-4; 7, TAPW157-5; 8, TAPW157-6; 9, TAPW157-7.

Table 6. Extracellular enzyme activities of hybrids obtained by intergeneric nuclear transfer between *Aspergillus niger* and *Penicillium verruculosum* M-157.

Strains	Avicelase		CMCase		$\beta$ -Glucosidase		Protein content ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
			(units)	(units/mg)			
<i>A. niger</i>	0.14	0.48	0.51	1.75	2.61	8.94	292
MPV 157	0.18	0.55	0.41	1.26	1.15	3.53	326
TAPW157-1	0.37	1.10	0.54	1.61	5.29	15.79	335
TAPW157-2	0.30	0.88	0.43	1.26	5.07	14.91	340
TAPW157-3	0.28	0.88	0.89	2.81	5.30	16.72	317
TAPW157-4	0.27	0.87	0.68	2.19	5.01	16.16	310
TAPW157-5	0.24	0.76	0.67	2.11	4.99	15.74	336
TAPW157-6	0.28	0.92	0.84	2.75	5.23	17.09	306
TAPW157-7	0.19	0.56	0.87	2.55	5.34	15.16	341

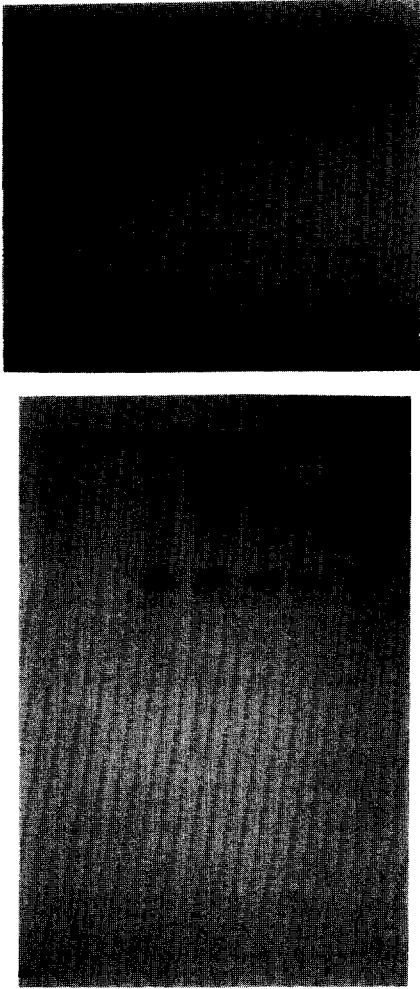


Fig. 5. Isozyme patterns of hybrids obtained by intergeneric nuclear transfer between *A. niger* and MPV 157.

Enzymes: A. CMCase; B.  $\beta$ -glucosidase.  
Lanes: 1. *A. niger*; 2. MPV 157; 3. TAPW157-1; 4. TAPW157-4; 5. TAPW157-5; 6. TAPW157-6; 7. TAPW157-7.

속간잡종 즉, TAPW157-1,2,3,4,5,6,7의 섬유소 분해능을 알아보기 위하여 효소활성도를 측정하였는데 그 결과는 Table 6과 같다. TAPW157-4,6의 경우 avicelase, CMCase,  $\beta$ -glucosidase의 활성은 모균주에 비해 약 2배 이상 높은 것으로 나타났으며, TAPW157-1은 CMCase 활성은 별로 높지 않는 반면 avicelase와  $\beta$ -glucosidase의 활성은 약 2배 정도 높았다. 이는 *T. reesei* QM 9414의 융합체중 cellulase 생산능이 2배 이상 향상된 융합체를 획득한 Toyama 등(25)의 보고와 유사하였으며, 또한 본 실험에서 cellulase 효소활성이 증진된 것으로 나타난 것은 *T.*

*viride*에서 cellulase, mannanase, xylanase 등 세 가지 효소의 합성과정은 공통된 조절기작을 갖는다고 한 Nevalainen 등(21)의 보고와 비슷하였다. 따라서 유전적 안정성이 높고 활성도 비교적 높은 TAPW157-1,3,5,6,7 균주를 최종 선발하였고, 또한 모균주와 형질전환체의 세포외 단백질의 양상을 비교하기 위하여 SDS-PAGE를 행하고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었는데 세포외 단백질의 양상에서 서로 차이가 있음을 알 수 있었으며 또한 선발된 균주의 동위효소 양상을 분석한 결과를 Fig. 5에 나타내었는데 CMCase와  $\beta$ -glucosidase의 동위효소 양상은 서로 비슷하게 나타났지만 band의 세기가 차이가 있음을 관찰할 수 있었고, 두개의 모균주의 특성을 겸비한 잡종은 확인되지 않았다.

### 감사의 글

본 연구는 1990년도 학술진흥재단의 대학 부설연구소 학술연구 조성비(1990~1993)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Anné, J., H. Eyssen and P. Desomer, 1976. Somatic hybridization of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature* **262**, 719-721.
2. Beguin, P., 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo red-stained agar replicas. *Analytical biochemistry*, 333-336.
3. Bisaria, V.S. and T.K. Ghose, 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrate, microorganism, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 90-103.
4. Bos, C.J. and S.M. Slakhorst, 1980. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Can. J. Microbiol.* **27**, 400-407.
5. Chung, K.C., K. Kawai, S. Yoshima and Y. Eguchi, 1982. Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verruculosum*. *Hakkokogaku* **60**, 355-357.
6. Demain, A.L., 1976. Enzymatic conversion of cellulosic materials. p. 79-81. Technology and Application symp. No. 6.
7. Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis-II. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
8. Ferenczy, L. and M. Pesti, 1982. Transfer of nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **7**, 157-160.
9. Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot, 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* **115**, 143-149.
10. Fries, J.A., 1947. Increase fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplast. *Experientia* **31**, 50-52.
11. Giles, K. and W. Myers, 1965. An improved

- diphenylamine method for estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**, 93.
12. Hamlyn, P.F. and R.E. Bradshaw, 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 321-325.
  13. Harsanyi, Z., I.A. Granek and D.W.R. Mackenzie, 1977. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mut. Res.* **48**, 51-74.
  14. Hong, S.W., Y.C. Hah, H.M. Park, 1984. The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **22**, 207-213.
  15. Kanda, K., K. Wakabayashi and K. Nisizawa, 1976. Synergistic action of two different types of endocellulase components from *Irpex lacteus* in the hydrolysis of some insoluble cellulase. *J. Biochem.* **79**, 997-1006.
  16. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
  17. Lee, K.J., 1984. Strain development of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**(2), 99-104.
  18. Li, L.H., R.M. Flora and K.W. King, 1965. Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*. *Arch. Biochem. Bioeng. Biophys.* **111**, 439-447.
  19. Liang, P.L. and C. Kaiying, 1987. Virus transmission through interspecific protoplast fusion in *Aspergillus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **89**(1), 73-81.
  20. Iorz, H. and I. Potrycus, 1978. Investigation on the transfer of isolated nuclei into protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **53**, 251-256.
  21. Nevalainen, K.M.H. and E.T. Palva, 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**, 999-1007.
  22. Okada, G., K. Nisizawa and H. Suzuki, 1968. Cellulase components from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **63**, 591-607.
  23. Rho, H.S., 1991. Study on interspecific hybrid formation by nuclear transfer in *Aspergillus* spp. M.S. thesis. Chungnam National University.
  24. Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
  25. Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo and H. Okada, 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 363-368.
  26. Yang, Y.K., Y. Park, Y.H. Rhee and P.J. Maeng, 1989. Study on formation of *Aspergillus nidulans* hybrids by protoplast fusion and nuclear transfer. *Kor. J. Microbiol.* **17**, 154-160.
  27. Yoshigawa, T., H. Suzuki and K. Nisizawa, 1974. Bioenergies of multiple cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var *cellulosa*. I. Effect of culture conditions on the multiplicity of cellulase. *J. Biochem.* **75**, 531-540.

(Received December 9, 1992)

(Accepted January 14, 1993)

**ABSTRACT: Formation of Intergeneric Hybrids Between *Aspergillus niger* and *Penicillium verruculosum* by Nuclear Transfer**

Yang, Young-Ki\*, Yeol Park, Sung-Joon Kim, Hyeon-Suk Cheong, Chae-Young Lim and Young-Ha Rhee<sup>1</sup> (Department of Genetic Engineering, Chosun University and <sup>1</sup>Department of Microbiology, Chungnam National University)

Intergeneric hybrids formed between *Aspergillus niger* and *Penicillium verruculosum* were obtained by nuclear transfer technique. Nuclei isolated from wild type and auxotrophic mutants of donor strains were transferred into the protoplasts of different auxotrophic mutants as recipient strains. Several auxotrophic mutants were isolated from conidiospores of the two strains mutagenized with ultraviolet and N-methyl-N'-nitrosoguanidine. Optimal conditions for formation of intergeneric hybrids were investigated. Frequencies of intergeneric hybrid formation by nuclear transfer were  $7 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$ . From observations of genetic stability, DNA content, nuclear stain and conidial size, it was suggested that their karyotypes are aneuploid. In addition, the hybrids possess the 1.1~2.3-fold higher cellulase activities than those of parental strains. It was also revealed that some hybrids had different isozyme patterns compared to those of parental strains by CMCase and  $\beta$ -glucosidase activity assays.