

## *Aspergillus niger*의 원형질체 융합에 관한 연구

金 武 成 · 崔 榮 吉

漢陽大學校 生物學科

## The Protoplast Fusion of *Aspergillus niger*

Moo-Sung Kim and Yong-Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133, Korea

**Abstract:** Conditions for production, fusion and reversion of protoplasts of *Aspergillus niger* were investigated, and an attempt was made to enhance fusion frequency. Auxotrophic mutants and morphological mutants were induced by U.V. irradiation (9.9 erg/mm<sup>2</sup>, 13min) on *Aspergillus niger*. Maximum yield of protoplasts was obtained from 21 hr cultured mycelia by using 1% driselase in 0.6 M KCl or 0.6 M NH<sub>4</sub>Cl as osmotic stabilizer. The optimal temperature for mycelium digestion was 30°C, and the optimal pH was 6.0. Protoplasts produced at different digestion period showed heterogeneity in size and vacuole content. Maximal frequency of protoplasts reversion was obtained on 0.6 M KCl stabilized agar medium at pH 5.0. Reversion frequencies of protoplasts produced for 3 hr and 1 hr mycelial digestion were 8.0% and 15.3%, respectively. The optimal concentration of PEG(m.w. 6000) for protoplast fusion was 30%, and that of CaCl<sub>2</sub> was 1~50 mM. The optimal pH and period for the reaction of PEG solution were 8.0 and 10 minutes, respectively. Fusion frequencies between auxotrophic protoplasts produced for 3 hr-mycelial digestion were 0.06~0.42%, and those for 1 hr-mycelial digestion were 0.09~0.54%.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, Protoplast, PEG, Fusion frequency.

1974년 Kao와 Michayluk에 의해 식물세포에서 polyethyleneglycol(PEG)의 융합 촉매 작용이 밝혀진 후 미생물 세포에서도 PEG의 융합 효과가 적용됨에 따라 (Anné, 1975, 1976; Ferenczy, 1975) 원형질체 융합에 관한 연구는 급속히 발전하여 미생물 유전학 및 산업 우량 균주 개발에 새로운 전기를 가져왔다.

사상균에 있어서 *Aspergillus*, *Penicillium* 속의 여러 종이 융합되어(Anné, 1975, 1976; Ferenczy, 1975) 인위적인 parasexual cycle의 유도가 가능케 된 이래, *Aspergillus nidulans*의 incompatible한 균주간 융합으로 incompatibility system이 밝혀졌고(Dale, 1980), *Cephalosporium acremonium*의 융합으로 cephalosporin 생산량이 증가된 재조합체의 형성이 보고되는 등 많은 종에서 원형질체 융합과 융합체의 분석이 이루어 졌다

(Anné, 1983; Ferenczy, 1984). 또 *Penicillium chrysogenum*과 *P. roqueforti* (Anné, 1976), *Aspergillus nidulans*와 *A. rugulosus*(Kevei, 1977), *Mucor pusillus*와 *M. miechei*(Ohnuki, 1982) 등 종간 원형질체 융합으로 새로운 균주형성이 가능케 되었다.

이와같이 원형질체 융합 기술은 유전자 전달의 효율적인 방법으로써 기초, 응용적 측면에서 새로운 분야를 개척하였으나, 이 때 융합체의 획득 및 분석을 위해서는 먼저 각 종에 따라 효율적인 원형질체의 형성, 환원 및 융합 조건이 확립되어야 하며 특히 융합빈도의 증가 방법이 개발되어야 할 것으로 사려된다.

본 실험에서는 원형질체 융합 기술을 이용하여 산업적으로 가장 유용한 균주의 하나인 *Aspergillus niger*의 유전자 전달 양식을 연구하고 효소 및 citric acid

생산성을 향상시킬 목적으로, *A. niger*의 원형질체 형성, 환원 및 융합에 필요한 최적 조건을 조사하였으며 아울러 융합 빈도를 높이기 위한 방법을 모색하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주

균주는 토양에서 분리된 *Aspergillus niger* (서울대 미생물학과에서 분양)를 사용하였다.

#### 배지

균주 보존 및 conidia 현탁액 준비에는 malt extract 배지 (malt extract 20, peptone 1, dextrose 10, agar 20, g/l)를 사용하였다.

돌연변이 유도용 최소배지로는 Czapeck 배지를 변형하여 사용하였으며 (NaNO<sub>3</sub> 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, KCl 0.5, FeSO<sub>4</sub> 0.01, dextrose 10, agar 20, g/l), 완전배지로는 최소배지에 0.2%(w/v)의 농도로 yeast extract를 첨가한 배지를 사용하였다. 균체 크기를 줄이기 위해서는 각각 0.08%(w/v)되게 sodium deoxycholate (SDC)를 첨가하였다.

원형질체 형성용 배지로는 AM 액체배지 (sodium citrate 3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, CaCl<sub>2</sub> 0.1, yeast extract 0.25, g/l)를 pH 6.0으로 조정하여 사용하였다.

원형질체 환원용 최소, 완전배지로는 돌연변이 유도용 최소, 완전배지에 각각 0.6M 되게 KCl을 첨가하고 pH 5.0으로 조정하여 사용하였다.

#### 돌연변이주의 분리

*A. niger*의 사면 배양체에 멸균된 0.01% (v/v) Tween 80 용액을 넣어 conidia 현탁액 (10<sup>6</sup> conidia/ml)을 만든 후 자외선 (9.9 erg/mm<sup>2</sup>)을 13분간 조사하였으며 이 conidia 현탁액을 최소, 완전배지에 직접 plating 하는 방법과 filtration 방법 (Fries, 1947)을 거친 후 plating하는 방법을 병행하여 영양요구성 변이주, 형태 변이주 등을 분리하였다.

#### 시약

osmotic stabilizer은 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0)에 0.6 M되게 KCl을 첨가하여 사용하였다.

세포벽 분해 효소로는 driselase (일본 협화 공업)를 osmotic stabilizer에 1%되게 녹여 4°C에서 24시간 방치한 뒤 원심분리 (5,000 rpm, 15min, Hitachi 05 PR-22)하고 그 상등액을 membrane filter (pore size 0.45 μm, Gelman)로 여과하여 사용하였다.

PEG 용액은 PEG (M.W. 6,000, Sigma)를 0.01M

CaCl<sub>2</sub>와 0.05 M glycine 용액 (pH 8.0)에 30%(w/v)되게 녹여 사용하였다.

#### 원형질체 형성

25 ml의 AM 액체배지에 2.3×10<sup>8</sup> conidia를 접종하여 30°C에서 21 시간 진탕배양 한 뒤 원심분리 (5,000 rpm, 30 min)하여 균사체를 수확하고 osmotic stabilizer로 2번 세척한 후, 세포벽 분해 효소를 1 ml 가한 뒤, 30°C에서 3시간 진탕시켜 원형질체를 형성시켰다. 원형질체 형성 조건 조사시에는 각각 균사체 배양시간, 효소 용액의 농도 및 반응온도, osmotic stabilizer의 종류, 농도, pH 등을 달리하여 반응시켰다.

형성된 원형질체의 분리, 농축을 위해서는 반응된 효소 용액을 sintered glass filter (pore size 40~60 μm, Kimax)로 여과해 균사체를 제거하고 원심분리 (2,300 rpm, 15 min) 한 뒤 osmotic stabilizer로 2번 세척하여 원형질체만을 획득하였다.

영양요구주 증포자 형성능이 결여된 #1(His<sup>-</sup>) 균주는 균사체를 직접 AM 액체배지에 접종하고 40 시간 진탕배양한 뒤 이 균사체를 사용하여 일차 원형질체를 형성시켰으며, 형성된 원형질체는 0.6 M KCl이 첨가된 AM 액체배지에 접종, 40 시간 진탕배양하여 원형질체를 환원시켰으며 환원된 균사체로 다시 원형질체를 형성시키는 방법을 2~3회 반복하여 충분한 양의 원형질체를 형성시켰다.

#### 원형질체 환원

분리된 원형질체는 osmotic stabilizer로 10<sup>2-3</sup> pts/ml 되게 희석한 뒤 환원용 배지에 0.3ml씩 접종하였으며, 이때 환원 조건 조사시에는 배지의 pH, KCl과 NH<sub>4</sub>Cl의 농도 등을 조절하여 사용하였다. 환원률의 계산은 다음 식에 의하였다.

$$\text{환원률(\%)} = \frac{\text{생존 균체 수}}{\text{접종한 원형질체 수}} \times 100$$

#### 원형질체 융합

융합하고자 하는 두 영양요구주의 원형질체를 충분히 형성, 분리시켜 각각 5×10<sup>6</sup> pts/ml 씩 섞은 후 원심분리 (2,300 rpm, 15 min) 하여 상등액을 제거하고 30°C로 전처리한 PEG 용액 1 ml을 가하여 30°C에서 10분간 반응시켰으며, 이때 융합 조건을 조사하기 위해서는 PEG 용액의 PEG 농도, CaCl<sub>2</sub> 농도, pH, 반응 시간 등을 각각 달리하여 반응시켰다. 융합 반응 후 5 ml의 osmotic stabilizer를 가하여 반응을 정지시키고 1~5×10<sup>3</sup> pts/ml로 희석하여 환원용 완전, 최소배지에 각각 0.3 ml 씩 접종하였으며 융합률의 계산은 다음 식에 의하였다.

$$\text{융합 빈도(\%)} = \frac{\text{최소배지에서의 균체 수}}{\text{완전배지에서의 균체 수}} \times 100$$

**결과 및 고찰**

**원형변이주의 분리**

원형질체 융합에 의해 형성된 융합체의 식별을 위해서는 적절한 표시이 필요하며 일반적으로 영양요구성의 상보성에 의해 식별되고 있다. 따라서 영양요구주를 유도하기 위해 모 균주인 *A. niger*에 자외선(9.9 erg/mm<sup>2</sup>)을 13 분간 조사시켜 0.1~1%의 생존률을 유도하였다. 자외선 조사된 conidia 현탁액을 직접 또는 filtration 법을 거친 뒤 완전배지에 접종, 완전히 conidiation 되었을 때 완전배지와 최소배지에 동시에 옮겨 심어 최소배지에서는 자라지 못하는 영양요구주와 직접 형태로서 판별 가능한 포자 색깔 변이주, 포자 형성 변이주, 균사색소 형성주 등을 골라내었다. 선택된 변이주는 5 회 이상 계대배양하여 변이의 안정성을 확인하고 영양요구주는 영양요구 물질을 결정하였다. 분리된 변이주의 특성은 Table I에 나타난 바와 같다.

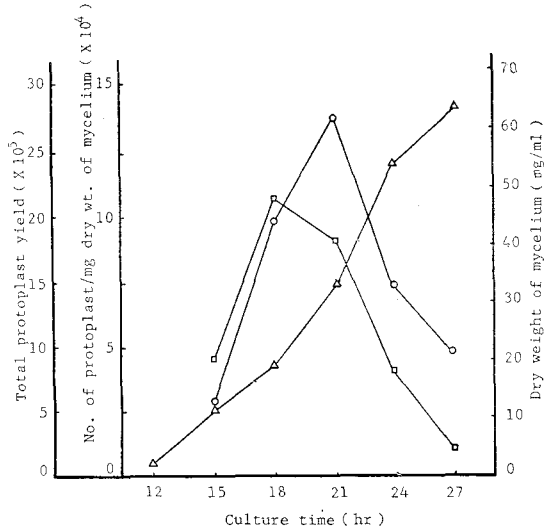
**원형질체 형성**

사상균의 원형질체 형성량은 성장 조건 및 생장기에 따라 현격한 차이를 보이며(Peberdy, 1979), 특히 *A. niger*는 malt extract 첨가 배지, NH<sub>4</sub>Cl을 질소원으로 사용한 배지 등에서 자랐을 때 75%이상 원형질체 형성량의 감소를 나타내는 것으로 보고 되었다(Musilkova, 1968). 이에 따라 본 실험에서는 비교적 원형질체 형성률이 좋은 AM 배지를 사용하였다.

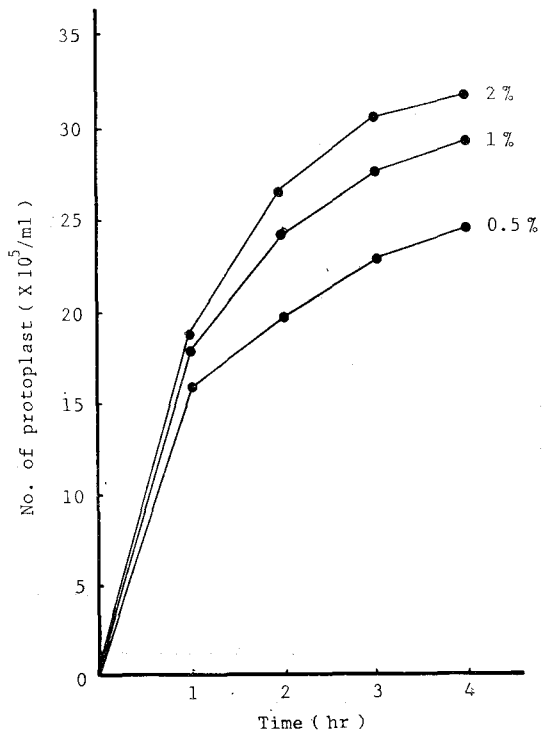
균사체 배양시간에 따른 원형질체 형성량을 보면

**Table I.** Characteristics of isolated mutants.

Mutant number	Characteristics
# 1	Histidine requirement and conidiation defective
# 2	Arginine requirement
# 3	Methionine requirement
# 4	Arginine requirement
# 5	Lysine requirement
# 6	Arginine requirement
# 7	Lysine requirement and conidiation defective
# 8	Leucine requirement and brown conidia
# 9	Light brown conidia
#10	Brown conidia
#11	Yellow pigment formation in mycelia



**Fig. 1.** Effects of mycelial age on the yield of protoplast for 3 hr incubation time.  
 ○-○ : Total protoplast yield  
 △-△ : Dry weight of mycelium  
 □-□ : No. of protoplast/mg dry wt. of mycelium



**Fig. 2.** Effects of concentration of driselase on the yield of protoplast.

(Fig. 1) 균사체 건조 중량당 형성량은 18 시간 배양 시, 전체적인 형성량은 21 시간 배양시 각각 최대치를 나타내었다. 이 때의 18~21 시간은 생장기중 exponential phase로 환산되며 이는 *Aspergillus* 속 균주의 경우 일반적으로 exponential phase에서 최대 형성량을 보인다는 Peberdy(1976)의 결과와 유사하였다. exponential phase에서 원형질체 형성이 용이한 이유는 아직 밝혀지지 않았으나 이 시기의 세포내 wall-bound lytic enzyme의 활성도가 높다는 것(Bartiniki-Garcia, 1972), melanin의 부재 또는 저 농도에 의한 세포벽분해 용이성(Bull, 1970)등 세포벽의 물리 화학적 성질 변화가 관여하는 것으로 판단된다(Fig. 1).

원형질체 형성에 가장 효율적인 driselase의 농도 및 반응시간은 1% 농도로 약 3 시간 반응시켰을 때로 나타났다(Fig. 2), 이 후 이러한 조건으로 원형질체를 형성시켰다. 그러나 이때의 최고 형성량인  $2.75 \times 10^8$  pts/ml 수준은 *A. nidulans*에 oerskovia 분해효소를 처리하여 얻은  $2.5 \times 10^8$  pts/ml이나(Van den Broek, 1970), *Trichoderma koningii*에 driselase를 처리하여 얻은  $1.6 \times 10^7$  pts/ml에(Cho, 1981) 비해 상당히 낮은 수준으로 driselase 단독 사용에 의한 *A. niger*의 세포벽 분해는 비교적 효율적이지 못한 것으로 판단되었다(Fig. 2). 미생물의 종류 및 반응 효소에 따라 osmotic stabilizer의 종류와 농도는 원형질체 형성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Benitez, 1975; Peberdy, 1976, 1979; De Vries, 1972). 이에 따라 여

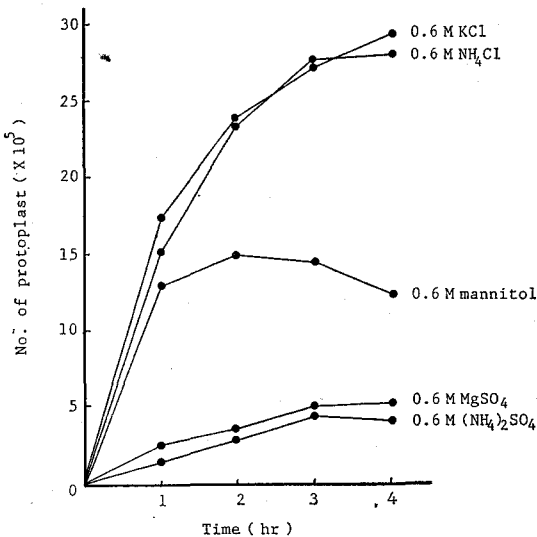


Fig. 3. Effects of different osmotic stabilizer on the formation of protoplast.

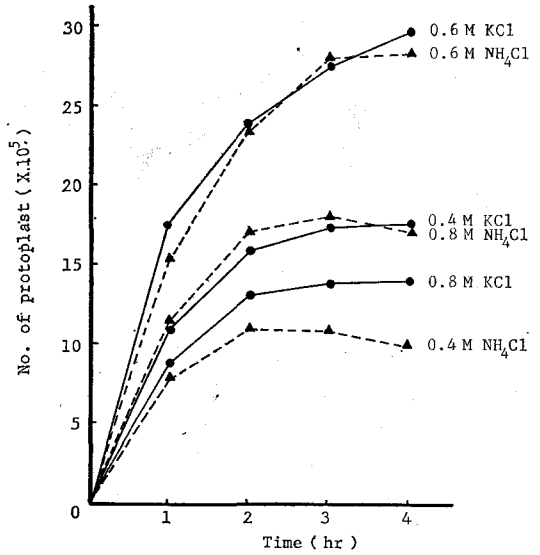


Fig. 4. Effects of concentration of osmotic stabilizer KCl and NH<sub>4</sub>Cl on the formation of protoplast.

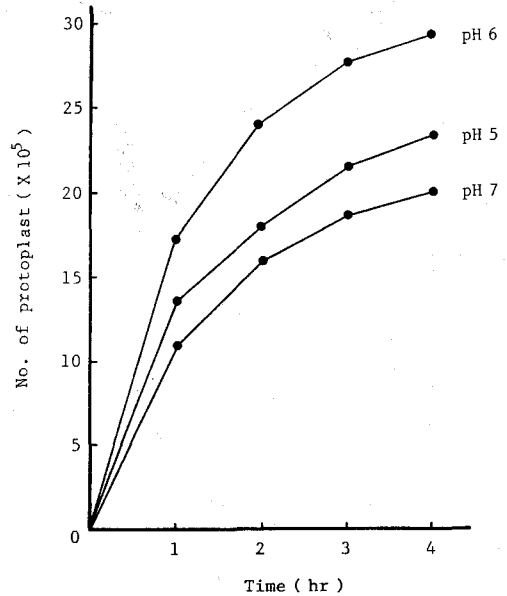
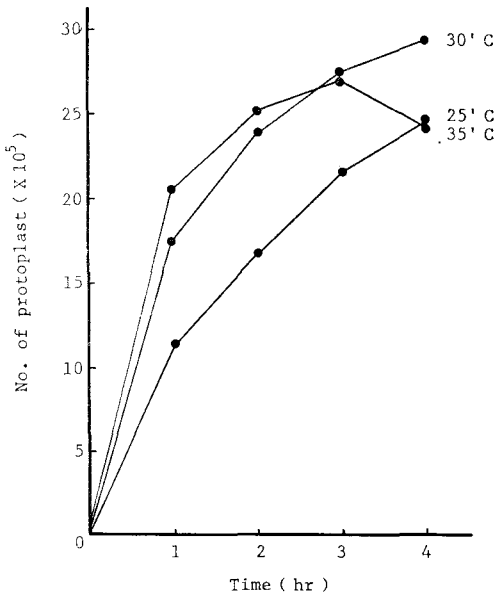


Fig. 5. Effects of pH on the formation of protoplast.

러 종류의 무기염류와 sugar alcohol을 일반적으로 효과가 좋은 0.6M 농도로 처리한 결과(Fig. 3), KCl과 NH<sub>4</sub>Cl이 가장 osmotic stabilizer로 적합하였으며, 두 종의 무기 염류를 농도별로 처리한 결과(Fig. 4), 0.6 M 농도에서 비슷한 최대 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 *A. nidulans*의 0.4 M NH<sub>4</sub>Cl, *Penicillium chrysogenum*의 0.6 M KCl, *Neurospora crassa*의 0.6 M



**Fig. 6.** Effects of reaction temperature of driselase on the formation of protoplast.

NH<sub>4</sub>Cl이 최고 효과를 가진다는 Peberdy(1976)의 결과나 *Aspergillus* 속 균주의 경우 0.6 M KCl이 최고 효과를 가진다는 Ferenczy(1976)의 결과와 유사하였다 (Fig. 3, 4).

원형질체 형성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 (Fig. 5) pH 6.0에서 가장 효과적이었으며, 온도의 영향을 조사한 결과 (Fig. 6) 30°C이하에서는 지속적인 형성량의 증가를 가져왔으나 35°C에서는 시간이 경과함에 따라 형성량의 감소를 나타내었다. 이러한 pH와 온도의 효과는 Cho(1981), Rhee(1984) 등이 driselase를 사용하여 실험한 결과와 비교적 유사하였으나 본 실험에서 30°C에서도 형성량이 감소하지 않은 것은 Rhee의 결과와 차이를 나타내었으며, 이것은 원형질체 형성시 pH와 온도의 효과가 분해효소의 특성뿐 아니라 균종에 따른 원형질체의 자체 특성에 의해서도 결정되기 때문인 것으로 판단된다 (Fig. 5, 6).

이상과 같이 모 균주인 *A. niger*를 사용하여 확정된 조건하에서 각 영양요구주의 원형질체 형성량을 조사한 결과 (Table II) 각 변이주간에 형성량의 차이를 나타내었다. 이것은 변이주의 세포벽 구성 및 성장 속도 등의 차이에 의한 것으로 판단되며 따라서 효율적인 원형질체 획득을 위해서는 각 변이주에 따라 조건이 조절되어야 할 것으로 판단된다.

원형질체 형성 과정은 plate 1,2에 나타난 바와 같이

**Table II.** Efficiencies of protoplast yield and reversion for strains of *Aspergillus niger*.

Strains	Dry weight of mycelium (mg)	Total yield of protoplast ( $\times 10^8$ )	Reversion frequency of protoplast (%)
Wild type	31.8	2.75	8.0
#1(His <sup>-</sup> )	*	*	0.9*
#2(Arg <sup>-</sup> )	8.7	0.20	1.4
#3(Met <sup>-</sup> )	35.0	2.79	7.2
#4(Arg <sup>-</sup> )	31.6	2.01	5.9
#5(Lys <sup>-</sup> )	32.0	1.60	4.9
#6(Arg <sup>-</sup> )	28.6	2.53	6.0
#7(Lys <sup>-</sup> )	Not tested	Not tested	Not tested
#8(Leu <sup>-</sup> )	33.3	3.05	9.0

2.2~2.4  $\times 10^8$  conidia for each strain were inoculated in 25 ml AM broth and incubated for 21 hr at 30°C.

\*: Protoplast was prepared in other way

효소반응 15 분경 균사체 첨단 부위에서 bud like 방식으로 원형질체가 나오기 시작하여 반응시간이 경과함에 따라 급격한 형성량의 증가를 보였으며, 균사 기부에서도 형성되었다. 반응 시간에 따라 형성된 원형질체는 크기와 액포 함유량에 있어서 차이를 보여 반응 1 시간 경의 원형질체는 평균 7.1  $\mu$ m 크기로 액포 함유량이 적거나 없었으며, 3시간 경의 원형질체는 평균 9.0  $\mu$ m 크기로 큰 액포를 가진 것이 많이 나타났다. 이러한 원형질체 형성 양상은 Isaac(1978), Gibson(1972) 등이 *A. nidulans*에서 관찰한 것과 비교적 유사한 결과를 보였으며 원형질체의 불균일성은 생성 부위에 의한 것으로서 원형질체의 생리 및 환원 능력에 영향을 미칠 것으로 판단된다 (Isaac, 1978; Necas, 1980; Peberdy, 1971) (Plate 1, 2).

**원형질체 환원**

원형질체는 적당한 조건하에서 세포벽을 재생하여 다시 정상적인 균체로 환원될 수 있으며, 이 때의 재생 및 환원력은 각 종과 환원 조건에 따라 큰 차이를 보이는 것으로 보고 되었다 (Benitez, 1975; Garcia-Acha, 1966; Peberdy, 1971).

배지에 첨가된 osmotic stabilizer의 효과를 조사하기 위해 KCl과 NH<sub>4</sub>Cl을 농도별로 처리한 결과 (Fig. 7) 각각 0.6 M 농도에서 가장 높은 환원률을 나타내었다. 두 무기 염류의 환원률 차이는 근소하였으나 NH<sub>4</sub>Cl을 첨가한 배지에서 자라는 균체는 형태적으로 원래의 균체와 차이를 보여 이후 KCl을 처리한 배지만을 사용

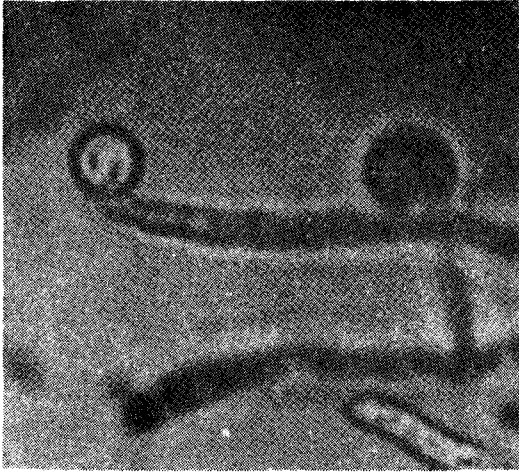


Plate 1

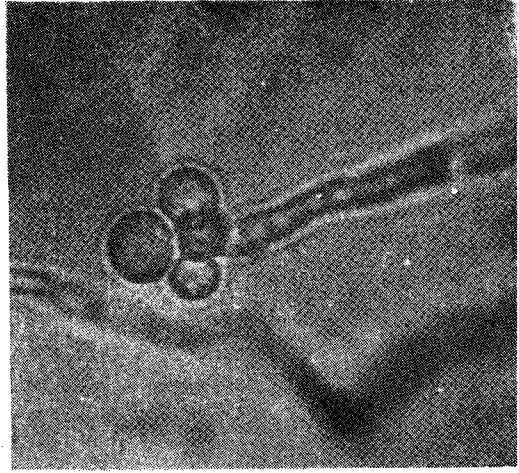


Plate 2

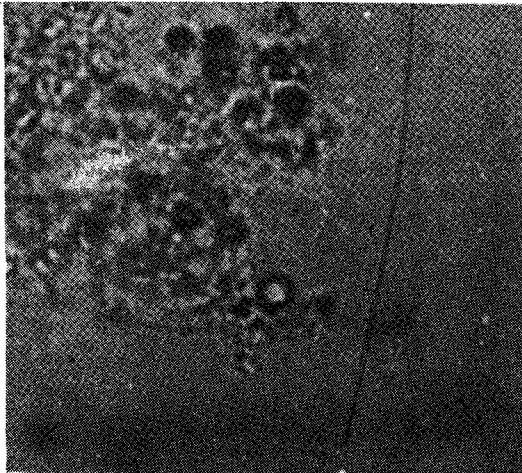


Plate 3

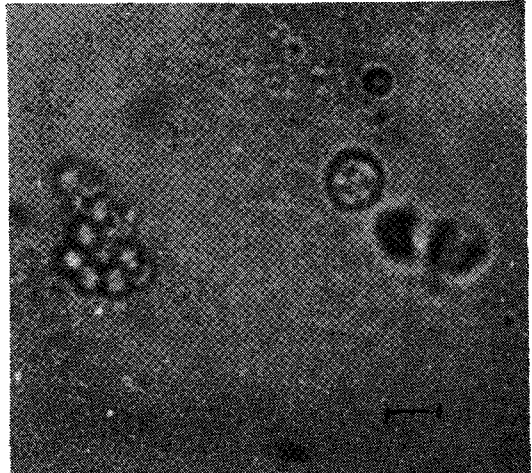


Plate 4

**Plate 1.** Protoplast protruding from hyphal tip.

**Plate 2.** Protoplasts protruding sequentially.

**Plate 3.** Aggregation of protoplasts after PEG treatment.

**Plate 4.** Aggregation of protoplasts PEG treatment. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

하였다(Fig. 7). 환원배지의 pH는 5.0일때 가장 환원률이 높았으며(Fig. 8) 이는 *A. niger*가 산성에서 비교적 잘 자라는 균인 것과 관계가 있는 것으로 판단된다. 환원용 완전배지와 최소배지에 따른 환원률의 차이는 나타나지 않았다(Fig. 8).

각 영양요구주의 원형질체 환원률을 환원용 완전배지에서 측정된 결과(Table II) 균주에 따라 현격한 차이를 나타내었으며, 이것은 번이주 자체의 생리 능력 및 각 성장 시기에서 형성된 원형질체의 특성 등이 복합적으로 작용하여 나타난 결과로 판단된다(Table II).

원형질체의 재생, 환원력은 원형질체가 형성되는 균사 부위 및 원형질체 내부의 핵, 소기관 등의 존재와 수에 따라 현격한 차이가 있는 것으로 보고되었으며(Garcia-Acha, 1966; Isaac, 1978; Necas, 1980; Peberdy, 1971), 또, 세포벽 분해 효소의 반응 시간이 길 경우 효소에 첨가되어 있는 단백질 분해 효소등의 작용에 의해 원형질체의 단백질, lipoprotein 등이 파괴되어 원형질체의 재생, 환원에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고되었다(Gaupy, 1982). 이러한 환원력의 차이는 원형질체 융합 후의 생존률에도 영향을 미칠 수

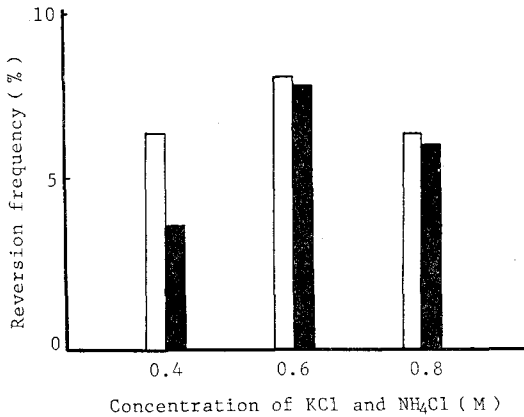


Fig. 7. Effects of concentration of KCl (□) and NH<sub>4</sub>Cl (■) on protoplast reversion.

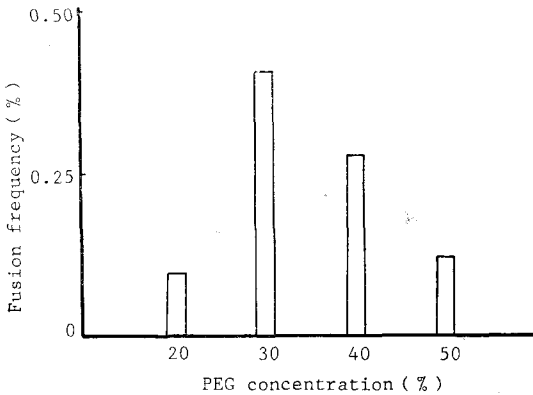


Fig. 8. Effects of pH on protoplast reversion.

있는 것으로 판단되며 이에 따라 *A. niger*의 균사 부위 및 형성시간에 따른 원형질체 환원력을 조사하기 위해 효소 반응 시간을 달리하여 원형질체를 형성, 환원시킨 결과, 1시간 반응시켜 형성된 원형질체에서 15.3%, 3시간 반응시킨 것에서 8%의 환원률을 나타내었다. 이러한 결과는 원형질체 형성시의 불균일성과 관계가 있는 것으로 보이며 균사의 첨단 부위에서 형성된, 또는 효소 반응 초기에 형성된 원형질체가 높은 재생, 환원 능력을 보이는 것으로 판단된다.

원형질체 융합

영양요구주인 #3(Met<sup>-</sup>)와 #8 (Leu<sup>-</sup>, brown)을 사용하여 *A. niger*의 원형질체 융합에 필요한 최적 조건을 조사하여 다음의 결과를 얻어내었다. PEG 농도에 따른 융합률은 30% 농도에서 가장 높았으며 (Fig. 9), 이러한 결과는 균류의 경우 일반적으로 30% 농도에서 PEG의 aggregation 능력과 osmotic stabilizing 효

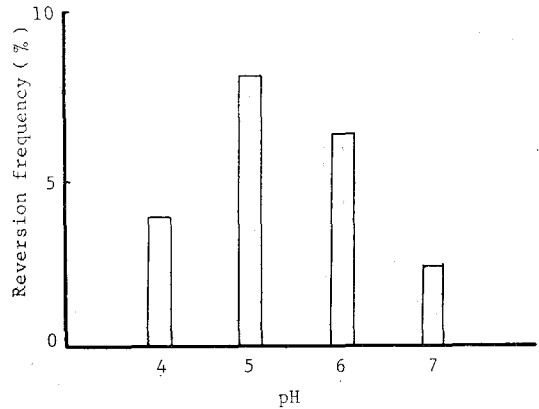


Fig. 9. Effects of PEG concentration on protoplast fusion.

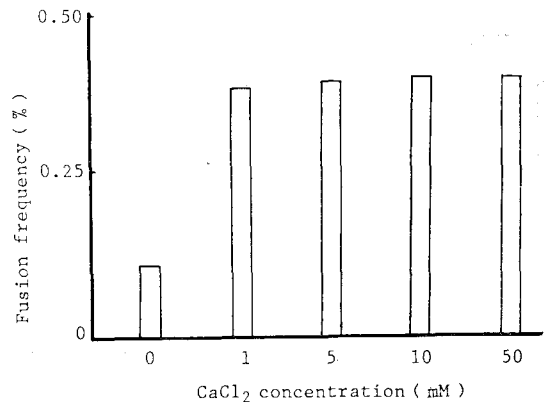


Fig. 10. Effects of CaCl<sub>2</sub> concentration on protoplast fusion.

과가 가장 좋기 때문인 것(Ferenczy, 1976; Peberdy, 1979)으로 판단된다(Fig. 9).

PEG 용액에 첨가된 CaCl<sub>2</sub>의 농도에 따른 융합효과는 (Fig. 10) CaCl<sub>2</sub> 처리했을 경우와 처리하지 않았을 경우의 차이는 현격하였으나 CaCl<sub>2</sub>의 농도(1~50 mM)에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 10). PEG 용액의 pH에 따른 융합률은 pH 8.0에서 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 11). 이는 알칼리 상태에서 PEG와 Ca<sup>2+</sup>이온에 의해 원형질체 막 구조가 변화하여 쉽게 융합될 수 있는 상태로 되기 때문인 것으로 판단된다 (Fig. 11).

PEG 용액의 반응 시간에 따른 융합률은 (Fig. 12) 반응 후 10분경에 가장 좋았으며 30분을 지남에 따라 지속적으로 감소되었다. 이것은 반응 시간이 진행됨에 따라 PEG에 의한 원형질체의 aggregation이 계속되어 균체 수가 감소되거나, PEG 용액내에서 원형질체가

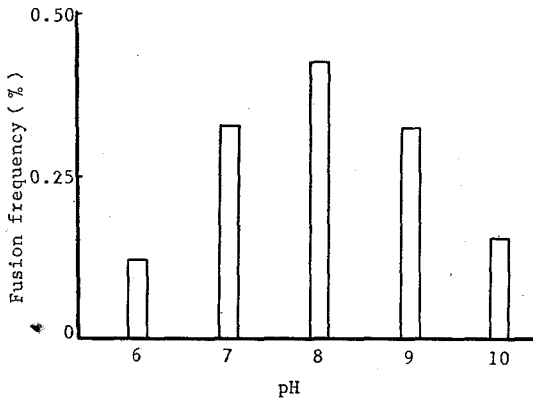


Fig. 11. Effects of pH of PEG solution on protoplast fusion.

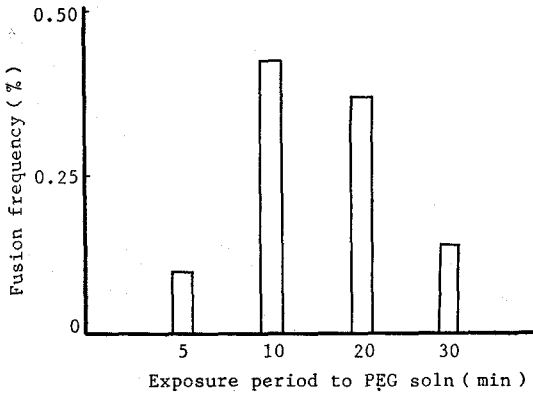


Fig. 12. Effects of exposure period to PEG solution on protoplast fusion.

lysis되기 때문인 것으로 판단된다(Fig 12).

이상의 실험으로 결정된 융합조건에 따라 여러 영양 요구주간의 원형질체 융합을 실행한 결과 0.06~0.42%의 융합률을 나타내었다(Table III).

원형질체 융합에 의한 유전적 연구와 종 개발을 위해서는 보다 효율적인 융합 방법으로 융합률을 높일 필요가 있으며, electrofusion(Zimmerman, 1981), spore protoplast fusion(Toyama, 1984) 등의 방법이 개발되고 있으나, 이러한 방법은 일부 종에 국한되며 까다로운 조건을 가지고 있다. 일반적으로 효율적인 융합을 위해서는 빠른 시간내에 생성된 원형질체를 사용하는 것이 좋을 것으로 알려져 있으며(Ferenczy, 1976), 이는 원형질체의 생리, 환원 능력 및 media내 불순물의 영향과 관계되는 것으로 판단된다. 본 실험에서는 다른 *Aspergillus* 종에 비해 비교적 융합 빈도가 낮은(Ferenczy, 1976) *A. niger*의 융합빈도를 높이기 위해

Table III. Fusion frequencies between protoplasts of auxotrophic strains of *Aspergillus niger*.

Protoplast pairs	Fusion frequency(%)	
	Pts from 3 hr digestion	Pts from 1 hr digestion
#3(Met <sup>-</sup> ) × #8(Leu <sup>-</sup> )	0.42	0.54
#3(Met <sup>-</sup> ) × #4(Arg <sup>-</sup> )	0.30	
#4(Arg <sup>-</sup> ) × #8(Leu <sup>-</sup> )	0.20	
#6(Arg <sup>-</sup> ) × #8(Leu <sup>-</sup> )	0.06	0.09
#1(His <sup>-</sup> ) × #8(Leu <sup>-</sup> )	Not detected	

원형질체간 불균일성이 비교적 적고 환원력이 강한 것으로 판단되는, 효소 반응 후 1 시간 경의 원형질체간 융합을 시도하여(Table III) 3 시간 경의 원형질체 융합률보다 1.29~1.50배 증가된 융합률을 얻어내었다(Table III).

이상의 실험 결과로써 *A. niger*의 원형질체 융합에는 세포벽 분해효소의 반응 초기에 형성된 원형질체를 사용하는 것이 효율적인 것으로 판단되며, 이러한 경향성은 다른 종의 사상균에 있어서도 적용 가능성이 있을 것으로 기대된다.

### 적 요

본 실험은 *Aspergillus niger*의 원형질체 형성, 환원 및 융합 조건을 조사하였으며 아울러 융합 빈도를 높이기 위한 방법을 모색하였다.

*A. niger*에 자외선(9.9 erg/mm<sup>2</sup>)을 13분간 조사하여 영양요구성 변이주 및 형태 변이주를 유도, 분리하였다.

균사체 배양 시간에 따른 원형질체 형성량은 21 시간 배양한 균사체에서 최대치를 나타내었다. 세포벽 분해효소인 driselase는 1%농도로 3 시간 처리했을 때 가장 효과적이었으며 osmotic stabilizer로는 0.6 M KCl과 0.6 M NH<sub>4</sub>Cl이 가장 좋았다. 효소 반응 시간에 따라 형성된 원형질체는 크기와 액포 함유량에 있어 불균일성을 나타내었다.

원형질체의 환원률은 0.6 M KCl이 첨가된 pH 5.0의 배지에서 가장 높았다.

세포벽 분해효소의 반응시간에 따라 형성된 원형질체의 환원률은, 3 시간 반응시켜 형성된 원형질체에서 8.0%, 1 시간 반응시킨 것에서 15.3%였다. 영양요구성 변이주간의 원형질체 융합에 필요한 PEG (M.W. 6,000)의 최적 농도는 30%였으며 CaCl<sub>2</sub>의 농도는 1~



50 mM에서 비슷한 최대 효과를 나타내었다. 융합 반응의 최적 pH는 8.0, 최적 반응 시간은 10 분이였다.

효소 반응 시간에 따라 형성된 원형질체간 융합률은 차이를 보여, 3 시간 반응시켜 형성된 원형질체를 사용했을 때 0.06~0.42%, 1 시간 반응시킨 것을 사용했을 때 0.09~0.54%였다.

## 文 獻

- Anné, J. and Peberdy, J.F. (1975): Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in PEG solutions. *Arch. Microbiol.* 105:201-205.
- Anné, J., Essen, H. and De Somer, P. (1976): Somatic hybridization of *Penicillium roqueforti* and *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature* 262:719-721.
- Anné, J. and Peberdy, J.F. (1976): Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with PEG. *J. Gen. Microbiol.* 92:413-417.
- Anné, J. (1983): Protoplasts of filamentous fungi in genetics and metabolite production. In *Protoplast* 1983 (Lecture), ed. Potrycus I., Basel. p.167-178.
- Bartinicki-Garca, S. and Lippman, E. (1972): The bursting tendency of hyphal tips of fungi. *J. Gen. Microbiol.* 73:487-500.
- Benitez, T., Ramos, S. and Carcia-Acha, I. (1975): Protoplasts of *Trichoderma viride*. *Arch. Microbiol.* 103:199-203.
- Bull, A.T. (1970): Chemical composition of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. *J. Gen. Microbiol.* 63:75-94.
- Cho, N.J., Rhee, Y.H. and Hong, S.W. (1981): Formation of protoplast from *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* 19:186-191.
- Dale, R.B.G. and Croft, J.H. (1980): Protoplast fusion and the genetical analysis of vegetative incompatibility in *Aspergillus nidulans*. In *Advances in Protoplast Research*. ed. Ferenczy, L. and Farkas, G.L. p.73-84. Pergamon Press, Oxford.
- Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M. (1975): High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia* 31:1028-1030.
- Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M. (1976): Fusion of fungal protoplast induced by PEG. In *Microbial and Plant Protoplasts*. ed. Peberdy, J.F. et al. Academic Press, London. p.177-187.
- Ferenczy, L. (1984): Fungal protoplast fusion. In *Cell Fusion*. ed. Beers, F. Jr. and Bassett, E.G. Raven Press, New York. p.145-170.
- Fries, N. (1947): Experiment with different methods of isolating physiological mutation of filamentous fungi. *Nature* 159:199.
- Garcia-Acha, L., Lopez-Belmonte, F. and Villanueva, J.R. (1966): Regeneration of mycelial protoplasts of *Fusarium clumorum*. *J. Gen. Microbiol.* 45:515-523.
- Gaupy, D. and Ferve, M. (1982): Protoplast production from *Saprolegnia monoica*. *Microbios* 34:89-98.
- Gibson, R.K. and Peberdy, J.F. (1972): Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 72:529-538.
- Isaac, S., Ryder, N.S. and Peberdy, J.F. (1978): Distribution and activation of chitin synthetase in protoplast fractions released during the lytic digestion of *Aspergillus nidulans* hyphae. *J. Gen. Microbiol.* 105:45-50.
- Kao, K.N. and Michayluk, M.R. (1974): A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115:355-367.
- Musilkova, M. and Fencel, Z. (1968): Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica* 13:235-239.
- Necas, O. (1980): Regeneration of protoplasts. In *Advances in Protoplast Research*. ed. Ferenczy, L. and Farkas, G.L. Pergamon Press, Oxford. p. 151-161.
- Ohnuki, T., Etho, Y. and Beppu, T. (1982): Intra-specific and interspecific hybridization of *Mucor pusillus* and *M. miehei* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* 46:451-458.
- Peberdy, J.F. and Gibson, R.K. (1971): Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 69:325-330.
- Peberdy, J.F., Buckley, C.E., Daltrey, D.C. and Moore, P.M. (1976): Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Tran. Br. Mycol. Soc.* 67:23-26.
- Peberdy, J.F. (1979): Fungal protoplasts-Isolation,

- reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21-39.
- Rhee, Y.H., Kim, M.S. and Choi, Y.K. (1984): Protoplast fusion of *Rhizopus suinus*. *Chung Nam J. Sciences* 11(2).
- Toyama, H., Yamaguchi, K., Shinmyo, A. and Okada, H. (1984): Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:363-368.
- Van den Broek, H.W.J., Stunnenberg, H.G. and Wennekes, L.M.J. (1979): Protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microbios* 26:115-128.
- De Vries, O.H.M. and Wessels, J.G.H. (1972): Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* 73:13-22.
- Zimmerman, V. and Scheurich, P. (1981): High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 151:26-32.

<Received June 11, 1986; Accepted July 1, 1986>