

## 섬유소 분해균 *Aspergillus* sp. HB 1의 세포융합에 관한 연구

\* 金珠鎬·張成烈·崔榮吉

漢陽大學校 自然科學大學 遺傳工學科

漢陽大學校 自然科學大學 生物學科

### Cell Fusion of Cellulolytic Fungi, *Aspergillus* sp. HB1

\*Joo-Ho Kim, Sung-Yeoul Chang and Yong-Keel Choi

\*Department of Genetic Engineering, Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133, Korea

**ABSTRACT:** The author isolated high cellulolytic fungi from natural sources and determined optimal condition of protoplast formation and fusion as fundamental step for improvement of the isolated it's cellulolytic ability. Three different cellulolytic fungi, such as *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Trichoderma* sp., were isolated from soil. Their cellulolytic activities were compared with that of *Aspergillus niger* which was useful industrially and had cellulase activity. It was *Aspergillus* sp. that showed the highest activity of all these four fungi. And then it was followed by *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., and *Aspergillus niger* in order. An auxotrophic mutant of *Aspergillus* sp. was obtained by UV mutagenesis method. Having try to produce protoplast from mycelia, the author found that  $\beta$ -glucuronidase, at pH 6.0, was effective cell-wall lytic enzyme. And the optimal concentration of this enzyme was 5,000 unit/ml. Regeneration rates of wild type, met. auxotroph and arg. auxotroph, in presence of osmotic stabilizer, were 7.0%, 7.5% and 5.2%, respectively. PEG with M.W. 6,000 was effective stimulator for protoplast fusion in the concentration of 30% (W/V). In such a condition, we obtained 1.2% cell fusion rate.

**KEYWORDS:** *Aspergillus*, Cellulase, Cell fusion

자연계에 널리 분포해 있는 섬유소물질은 대체에너지를 지원이나 식량자원으로서 높은 활용가치를 가지는 재생자원이다.

이같은 섬유소물질을 단당류로 분해할 수 있는 섬유소분해효소 복합체는 많은 균류에서 생성 분비되는 것으로 알려졌다(Hankin, 1977). 이같은 균류에 의해 생성되는 섬유소분해효소 복합체는 적어도 3가지 다른 효소, 즉 Cellobiohydrolase(CHB: C<sub>1</sub>), Endo-glucanase(EG: C<sub>x</sub>) 그리고  $\beta$ -glucosidase를 포함하는 것으로 보고되어 있다(Bisaria, 1981). 지금까지 세계적으로 많은 섬유소분해균류에 관한 연구가 행해져 왔는데 우리나라에서도 *Aspergillus*속(Lee 등, 1977) 및 *Trichoderma*속(Huh 등, 1981)의 섬유소분해효소작용에 관

한 연구, 섬유소분해균의 분리에 관한 보고(홍 등, 1976) 등 많은 연구가 진행된 바 있다.

본 실험에서는 보다 우수한 섬유소분해능력을 갖는 균류를 여러가지 토양에서 분리하고 그 섬유소분해능력을 더욱 향상시키기 위한 기초단계로서 원형질체생성 및 융합에 필요한 최적조건을 실험하고 그 결과를 정리하였다.

#### 材料 및 方法

##### 균주 및 배지

##### 1) 균주

균주는 토양에서 분리한 *Aspergillus* sp. HB 1을 사용하였다.

## ① 섬유소분해균의 분리

섬유소분해균을 분리하기 위해 서울농대 실험농장 및 캠퍼스내의 옥수수더미, 소똥, 퇴비, 낙엽이 쌓여있는 토양 등에서 시료를 채취하여 각 시료를 멸균된 증류수에 넣고 잘 흔들어 준 후 그 상등액을 원액으로 사용해 여러번 희석시켰다. 이렇게 희석시킨 시료를 탄소원으로 Carboxymethyl cellulose (CMC)를 1.5% 포함하는 Knopp's 기본 한천배지 (Avicel 15,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25, KCl 0.12,  $\text{FeCl}_3$  trace, agar 15, g/l)에 평판도말하여 30°C에서 3일간 배양하였고 배양체 중 균체크기가 비교적 큰 것들을 무작위로 선택하여 Oxgall이 1.5% 포함된 상기의 Knopp's 기본한천배지에 복사평판을 떠서 30°C에서 3~4일간 배양시켰다. 그 평판배지에 Teather와 Wood(1982)의 방법대로 Congo-red 용액을 농도별로 (0.1%, 0.3%, 0.5%, 1%, w/v) 처리하였다. 이것을 각각 15분간 방치한 후 Congo-red 용액을 따라내고 1M NaCl로 15분간 세척한 후 진한 염산 용액을 몇방울씩 떨어뜨려 균체둘레의 투명환의 선명도와 크기로 몇가지 균을 섬유소분해능력을 가늠하여 선별하였다.

## ② 섬유소분해효소의 활성도 측정

위에서 선택한 섬유소분해균들을 탄소원으로 CMC를 1% 포함하는 Knopp's 기본액체배지 100 ml에 각각 접종한 후 30°C 항온수조에서 진탕배양하여 하루간격으로 배양액을 각각 15 ml씩 채취하여 30분 동안 5,000 rpm으로 원심분리(Beckman, Model J2-21 Centrifuge)하고 나서 그 상등액을 효소용액으로 사용하였다. 이 효소용액 0.1 ml의 기질로서 1% CMC용액 0.25 ml 그리고 acetate buffer (pH 5.5) 0.65 ml를 혼합한 반응액 1 ml를 1 시간 동안 40°C에서 반응시킨 후 유리된 환원당을 Somogyi(1952) 방법으로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 0 시간에서의 흡광도와와의 차이를 섬유소분해 효소 활성도로 잡았으며, 이때 효소활성단위는 1 시간 동안에 반응혼합액 1 ml당 1  $\mu\text{g}$ 의 환원당을 유리시킨 경우를 1 unit로 표시하였다.

## 2) 배 지

① 야생형 균주 보존에 필요한 완전 배지로는 Malt extract 한천배지 (malt extract 20, peptone 1, dextrose 10, agar 20, g/l)를 사용하였고 돌연변이체의 보존에 필요한 완전배지로는 LB(Luria-Bertani) 한천 배지 (bacto-trypton 10, bacto

-yeast extract 5, NaCl 10, agar 20, g/l)를 병행하여 사용하였다.

② 돌연변이 유도용 최소배지로는 Czapeck's 한천 배지를 변형하여 사용하였으며 ( $\text{NaNO}_3$  2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.85,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, KCl 0.5,  $\text{FeSO}_4$  0.001, dextrose 10, agar 20, g/l), 완전배지로는 최소배지에다가 yeast extract (0.2%, w/v)를 첨가시켜서 완전배지로서 사용하였다. 균체 크기를 줄이기 위해서는 1% (w/v) 농도로 Oxgall (Montenecourt 등, 1977a)을 첨가하였다.

③ 원형질체 형성용 배지로는 LB 액체배지를 사용하였다.

④ 원형질체 재생용 최소, 완전배지로는 돌연변이 유도용 최소, 완전배지에 각각 0.6 M되게 KCl을 첨가하여 사용하였다.

## 돌연변이주의 분리

1) 자외선 조사에 의한 생존율 측정

Malt extract 사면배지에 배양시킨 *Aspergillus* sp. HB1의 conidia를 멸균된 Tween-80 용액 (0.01%, v/v)으로 현탁하여 10 ml로 만든 후 ( $1 \times 10^7$  conidium/ml), Petri-dish에 부었다. 그 Petri-dish를 30분간 pre-warming 시킨 UV lamp 아래에서 천천히 회전시키면서 자외선 (12 erg/sec/mm<sup>2</sup>)을 조사한 후, 1 분간격으로 0.1 ml씩 채취하여 적당량 희석한 다음 0.1 ml씩 완전고체배지에 평판도말하고 2~3일간 30°C에서 배양한 후, 생존균체수를 자외선을 조사하지 않았을 때의 생존균체수와 비교하여 생존율을 측정하였다.

2) 영양요구성 돌연변이주의 분리

Conidia 현탁액 10 ml ( $10^7$ /ml)를 0.1~1% 생존율을 보이는 시간인 4 분 30초 동안 자외선을 조사한 후, 100 ml의 Czapeck's 최소액체배지에 넣은 다음 30°C에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 그 배양액을 sintered glass filter (pore size 40~60  $\mu\text{m}$ , KIMAX)로 여과시켜 여과액내의 발아하지 못한 conidia는 원심분리 (5,000 rpm, 20 min)하여 침전시켰다. 침전된 conidia는 멸균된 2 차 증류수 2 ml로 재현탁하여 완전고체배지에 0.1 ml씩 평판도말한 후 2~3일간 30°C에서 배양한 뒤 생성된 균체들을 완전배지와 최소배지에 각각 접종하여 30°C에서 2~3일간 다시 배양함으로써 영양요구성 돌연변이주를 판별하였다.

이들 영양요구주들의 영양요구물질을 결정하기 위해서는 Holliday 방법 (Clowes 등, 1968)을 변형하여

사용하였다.

#### 삼투안정제의 제조 및 세포벽분해효소의 제조

삼투안정제는 0.1M phosphate buffer(pH 6.0)에 0.6 M되게 KCl을 첨가하여 사용하였고, 세포벽분해효소로는  $\beta$ -glucuronidase(Sigma, G 0876)를 삼투안정제에 5,000 unit/ml되게 용해시켜 사용하였다.

#### 원형질체의 생성

25 ml의 LB 액체배지에 conidia를  $1.0 \times 10^5$ /ml 되게 접종하여 30°C에서 18시간 진탕배양시킨 후 원심분리(4,000 rpm, 20 min)하였고 삼투안정제로 두 번 세척한 뒤  $\beta$ -glucuronidase(5,000 unit/ml)를 첨가하여 30°C에서 4 시간 동안 반응시켰다. 생성된 원형질체는 균사체와 순수분리하기 위해 sintered glass filter로 그 반응물을 여과시켜 원형질체가 함유된 여과액을 원심분리(2,300 rpm, 15 min)한 뒤 삼투안정제로 두 번 세척하여 원형질체만을 얻어냈다. 이때 원형질체 생성의 최적조건을 조사하기 위해 균사체배양시간, 효소용액의 종류 및 농도, pH 등을 각각 달리하면서 반응시켜 1 시간 간격으로 생성된 원형질체의 수를 측정하였다.

#### 원형질체의 재생

순수분리시킨 원형질체를 삼투안정제에 희석시켜 재생용 최소, 완전고체배지에 각각 평판도말하여 3~4일간 배양한 후 재생빈도를 다음과 측정하였다.

$$\text{재생률 (\%)} = \frac{\text{생존균체수}}{\text{접종한 원형질체 수}} \times 100$$

#### 원형질체 융합

융합하고자 하는 두 영양요구주 각각으로부터 원형질체를 만든 다음 서로 동일량(각각  $1.2 \times 10^6$  pts)을 섞어서 원심분리(2,300 rpm, 15 min)하고 삼투안정제로 한번 세척한 후 상등액을 제거하였다.

침전된 pellet을 0.01 M  $\text{CaCl}_2$ 와 0.05 M glycine 용액(pH 8.0)에 용해시킨 후 사용전에 30°C로 전처리한 PEG(Merck)용액 1 ml를 첨가하여 28°C에서 10분간 반응시켰다. 이때 PEG용액의 분자량 및 농도를 달리 처리하여 융합율에 미치는 영향을 조사하였다. PEG 용액으로 10분간 반응시킨 후에 PEG용액의 작용을 정지시키기 위하여 삼투안정제를 4 ml 넣고 그 혼합액에서 0.1 ml를 취해 재생용 최소배지에 평판도말하였으며, 재생용 완전배지에는 그 혼합액을 10배 더 희석한 후 0.1 ml를 취해 평판도말하여 3~4일간 배양시켰다. 그 후 생존균체수를 측정하여 다음과 같이 융합율을 계산하였다.

$$\text{융합율 (\%)} = \frac{\text{최소평판 배지에서의 균체수}}{\text{완전평판 배지에서의 균체수}} \times 100$$

## 結果 및 考察

#### 섬유소분해균의 분리 및 동정

토양에서 채취한 시료원액으로부터 유일한 탄소원으로 CMC가 첨가된 배지에서 자란 많은 균들중에서 균체크기가 비교적 큰 36개의 균들을 선택하여 균체둘레의 투명환의 선명도가 진하고 크기가 큰 3개의 균을 분리하여 동정한 결과 이 3개의 균은 각각 *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. 등이었다. 이때 균류의 균체둘레의 투명환을 보기위해 Teather와 Wood의 방법대로 처리한 후 진한 염산용액 몇방울을 떨어뜨리면 배지색깔이 푸른색으로 변하면서 진한 투명환이 관찰되었는데, 이 환의 진한 정도와 크기를 비교하였다(Plate A). 위에서 분리된 3개의 균과 함께 산업적으로 유용하며 cellulase activity가 있는 *Aspergillus niger*를 비교균주로 하여 섬유소 분해효소의 활성도를 측정하였다(Fig. 1). 효소활성도는 *Aspergillus* sp.가 가장 높았으며 그다음 *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger*의 순으로 나타났고 따라서 *Aspergillus* sp.를 실험균주로 선택하였으며 이를 *Aspergillus* sp. HB 1이라 명명하였다.

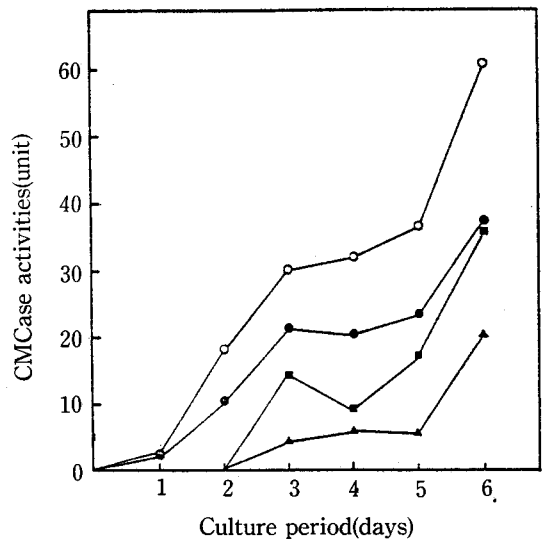


Fig. 1. Enzyme activities of CMCCase prepared from CMC-culture media of 4 species.

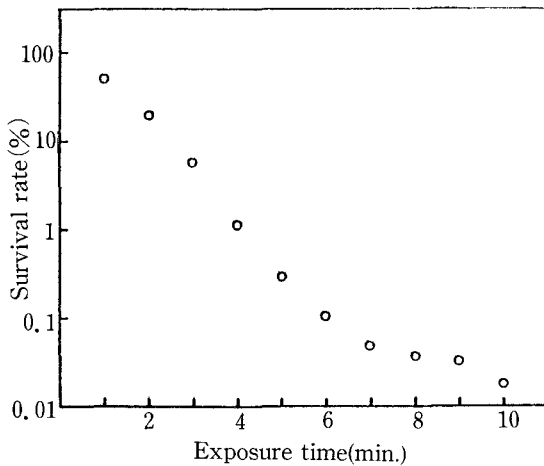


Fig. 2. Effect of UV irradiation (12 erg/sec/mm<sup>2</sup>) on survival rate of *Aspergillus* sp. HB1.

#### 돌연변이주의 분리

일반적으로 융합체의 식별을 위해 적당한 표식으로서 돌연변이를 유발하여 영양요구주나 항생제내성에 대한 돌연변이체를 만든다. 이와같은 돌연변이의 유발이 이용되는 돌연변이원으로는 일반적으로 UV와 NTG(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)를 많이 사용하는데 본 실험에서는 UV를 돌연변이원으로 이용하여 *Aspergillus* sp. HB1에 12 erg/sec/mm<sup>2</sup> 세기로 1 분간격으로 조사하여 Fig. 2와 같은 생존율곡선을 얻었다.

흔히 생존율이 0.1~1% 수준을 보일때 돌연변이가 많이 일어나며(Miller, 1974) UV를 조사할 때 세포현탁액의 ml당 세포수가  $1 \times 10^8$  이상일 때는 모든 세포가 충분히 UV조사를 받지 못하는 것으로 알려져 있다(Clowses, 1968). 따라서 포자현탁액( $10^7$  conidia/ml)을 10 ml 만들어 0.1~1% 생존율을 보이는 시간인 4 분 30초 동안 자외선을 조사한 후 영양요구주를 농축하기 위해 여과법(Fries, 1947)을 이용하여 여러개의 영양요구주를 얻었다. 이들의 영양요구물질들 각각 결정된 다음, 잘 성장하며, 포자형성률이 좋고, 명확한 영양요구주인 두개의 변이주

Table I. Characteristics of isolated mutants.

Mutant number	Characteristics	reversion frequency
# 1	methionine requirement	$< 1 \times 10^{-7}$
# 2	arginine requirement	$< 1 \times 10^{-6}$

Table II. Effect of Driselase and  $\beta$ -glucuronidase on the yield of protoplasts.

Cell wall-lytic enzyme	The yield of protoplast produced ( $\times 10^6$ /ml)
0.5% Driselase	2.84
1% Driselase	5.69
2% Driselase	5.22
1% $\beta$ -glucuronidase	19.4

를 선택했다(Table 1).

#### 원형질체의 생성 및 환원

균류에서 원형질체를 얻기위해 여러가지 세포벽분해효소가 사용되고 있고(Anne, 1983) 이 중 *Basidiomycete*에서 추출한 Driselase는 *Aureobasidium pullulans*(Malcolm, 1980) 및 *Trichoderma koningii*(Cho, 1981)에서 원형질체를 생성하기 위해 사용되어 그 효과가 우수한 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 Driselase와 일반적으로 세포벽분해효소로 많이 사용하는 *Helix pomatia*에서 추출된  $\beta$ -glucuronidase를 사용하여 *Aspergillus* sp. HB 1의 원형질체 생성을 비교해 본 결과 Driselase보다는  $\beta$ -glucuronidase가 3 배 이상의 효율을 나타냈다(Table 2).

그리고 이  $\beta$ -glucuronidase의 농도를 달리하여 처리해 본 결과(Fig. 3) 효소농도를 5,000 unit/ml까지 증가시킬수록 원형질체 생성량이 계속 증가하나 그 이상에서는 더 이상의 큰 차이를 나타내지 않았

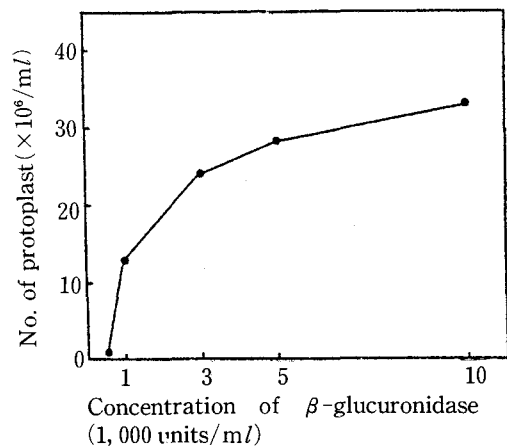


Fig. 3. Effect of concentration of  $\beta$ -glucuronidase on the yield of protoplast.

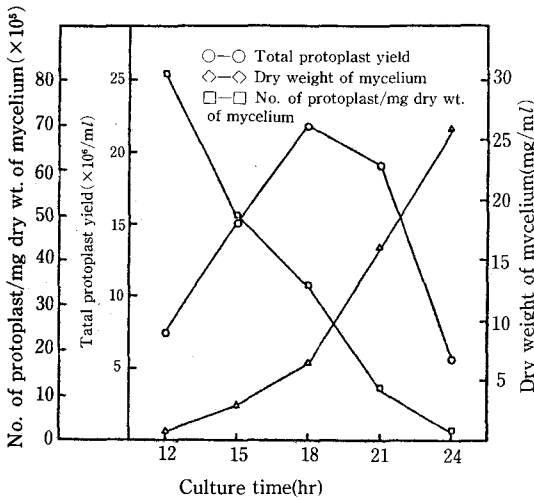


Fig. 4. The difference of protoplast yield on mycelial age for 24 hr incubation time.

다. 이 결과에서 나타내 준 최고 원형질체 생성량인  $3.6 \times 10^7$  pts/ml는 *Aspergillus niger* (Kim, 1986) 와 *Trichoderma koningii* (Cho, 1981) 등에 Driselase를 처리하여 얻은  $2.75 \times 10^6$  pts/ml,  $1.6 \times 10^7$  pts/ml보다도 더 우수한 수준이었다.

또한 균사체 배양시간에 따른 원형질체 생성량을 비교한 결과(Fig. 4) 균사체 건조중량당 원형질체 생성량은 시간이 경과할수록 계속 줄어들었고 총 원형질체 생성량에 있어서는 18시간 배양했을 때 가장 우수하였다.

그리고 pH를 달리하여 처리해 준 결과(Fig. 5) pH 6.0에서 가장 많은 원형질체를 얻을 수 있었다.

이상과 같은 모균주인 *Aspergillus* sp. HB1의 최적조건으로 돌연변이주의 원형질체 생성량을 비교한 결과, 모균주와 큰 차이를 나타내지 않았으며 이는 UV 조사에 의한 돌연변이과정에서 세포벽 구성성분에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

원형질체 생성과정은 효소반응 30분경에 원형질체가 hypha의 말단부위(Plate B)와 균사체의 중간부위(Plate C)에서 생성되는 것을 볼 수 있고 원형질체가 빠져나간 자리는 세포벽만이 얇게 남아있는 것을 볼 수 있다(Plate D). 또한 1시간 이상 경과한 후에는 균사체 내부에 원형질체들이 집합적으로 배열되어 있음을 볼 수 있는데(Plate E) 이것은 효소가 반응초기에 극소부위를 용해시켜 그 부분을 통해 원형질체가 빠져나오다 시간이 경과할수록 세포벽의 상당부위가 용해되면서 이미 형성되었던 원형질체들이 빠져나오는 것으로 사료된다.

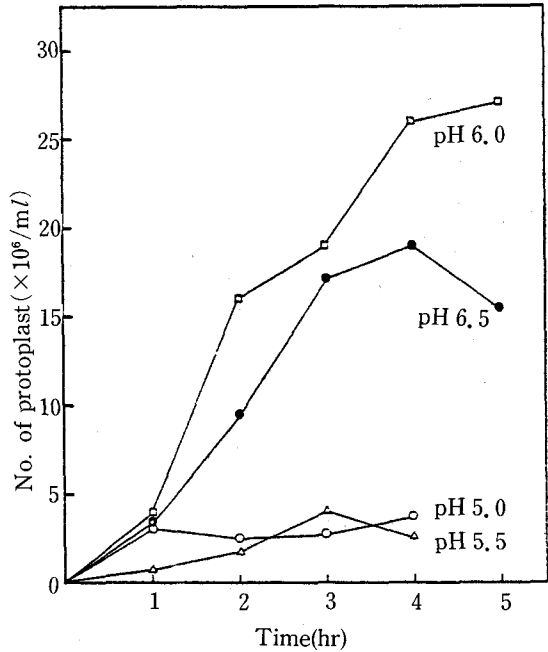


Fig. 5. Effect of pH on the formation of protoplast.

원형질체의 재생은 (Table 3) *Aspergillus* 속에서 가장 효율적인 삼투안정제로 알려진 0.6M KCl (Ferenczy, 1976)을 배지에 첨가한 후 검정한 결과 5.0~8.0%의 재생률을 보였다.

원형질체의 융합

Polyethylene glycol (PEG)은 세포막간의 융합을 촉매하는 기능을 가지며 (Ferenczy, 1975) 삼투안정제로서 무기염류나 sugar, sugar alcohol 등을 사용하고 있다 (Peberdy, 1979). 또한 융합할 때 Ca<sup>++</sup> 이온의 역할이 상당히 중요한 것으로 알려졌는데 (Ferenczy, 1975), CaCl<sub>2</sub>의 농도가 10 mM부터 100 mM까지의 수준에서 융합율에 큰 차이를 보이지 않기 때문에 자낭균류와 불완전균류에 속하는 수많

Table III. Efficiencies of protoplast yield and regeneration for strains of *Aspergillus* HB1.

Strains	Total yield of protoplast (X10 <sup>7</sup> )	Regeneration frequency of protoplast (%)
wild type	2.89	7.0
# 1 (met <sup>-</sup> )	2.77	7.5
# 1 (arg <sup>-</sup> )	2.4	5.2

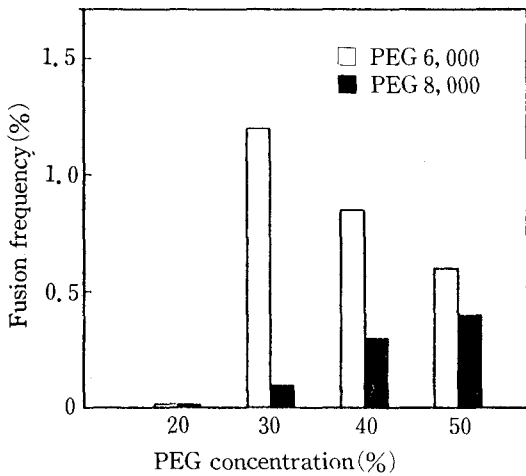
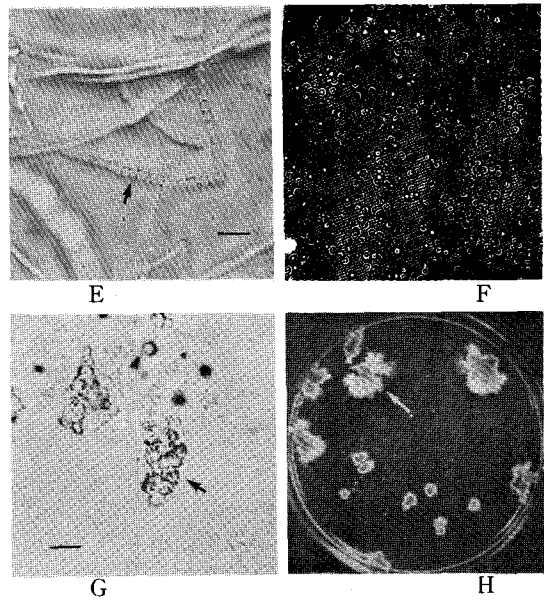


Fig.6. Effect of concentration between PEG 6,000 and PEG 8,000 on protoplast fusion.

은 균류들의 융합에서 CaCl<sub>2</sub>는 10mM을 사용하여 왔다(Ann 1983). 본 실험에서는 CaCl<sub>2</sub> 농도를 10mM로 고정하고 PEG의 분자량이 6,000인것과 8,000인것 각각에서 농도에 따라 융합율을 조사한 결과(Fig.6) PEG 6,000의 30% 농도에서 1.2%의 융합율을 보여 가장 높은 융합율을 나타냈다.

일반적으로 최소 재생배지에서 자란 균체가 진정한 융합체인지 아닌지는 균체모양으로 간접적으로 더 확실히 알 수 있다. 즉, heterokaryon colony는



E. Process of protoplast formation.  
 F. Purified protoplast.  
 G. Aggregation of protoplast after PEG treatment.  
 H. Configuration of heterokaryon grown after protoplast fusion.

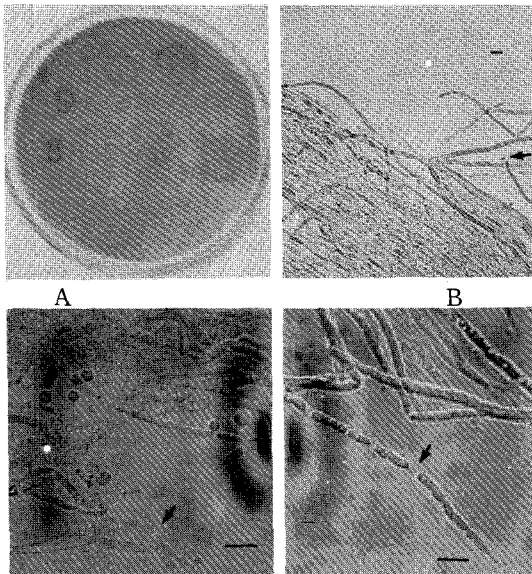
plate H에서 보는 것처럼 불규칙적이며 이질적인 모양을 갖는다(Ferenczy, 1977).

이상의 실험결과를 통하여 우수한 섬유소 분해균인 *Aspergillus* sp. HB1을 분리하였고 영양요구주를 유도하여 영양요구주간의 융합조건을 결정하였으며 앞으로 중간융합을 통해 섬유소분해능력이 더 우수한 균주를 개량해 얻을 수 있을 것으로 본다.

摘 要

자연계에서 섬유소분해능이 우수한 균을 분리하였고 섬유소분해능을 더욱 증진시키기 위한 기초단계로서 그 분리균주의 원형질체 생성과 융합의 최적조건을 조사하였다.

토양에서 채취한 시료로부터 섬유소분해능력이 우수한 *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., 3균주를 분리·동정하였고 산업적으로 유용한 균주이며 cellulase activity가 있는 *Aspergillus niger*를 비교균주로 선택하여 각각의 효소활성도를 비교 조사한 결과, *Aspergillus* sp.가 가장 좋은 효소활성도를 보였으며 그 다음 *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., 그리고 *Aspergillus niger* 순이었다. 효소활성도가 가장 좋은 *Aspergil-*



A. Exhibition of the halo zone around colony.  
 B-D. Process of protoplast formation.

*lus* sp.에 자외선(12 erg/sec/mm<sup>2</sup>)을 4 분 30초 동안 조사하여 영양요구성 변이주를 유도, 분리하였다. 세포벽분해효소로는 pH 6.0에서  $\beta$ -glucuronidase가 효과적이었고 그 효소를 농도별로 처리해 본 결과 5,000 unit/ml가 최적농도이었다. 재생물은 삼투안정제로 0.6 M KCl을 사용하여 pH 6.0에서 보았을 때 야생형은 7.0%, met. 영양요구주는 7.5%, arg. 영양요구주는 5.2%이었다. 영양요구성 변이주간의 원형질체융합에 필요한 PEG는 분자량이 6,000인 것이 좋았으며 최적농도는 30°C 이었다. 이때 융합율은 1.2%까지 획득하였다.

### 參考文獻

- Anne, J.(1983) : Protoplasts of Filamentous Fungi in Genetics and Metabolite production. In: *Protoplast* 1983(Lecture proceeding). pp. 167-178.
- Bisaria, V.S. and Ghose, T.K.(1981) : Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3** : 90-104.
- Cho, N.J., Rhee, Y.H. and Hong, S.W.(1981) : Formation of protoplast from *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **19** : 186-191.
- Clowes, R.C. and Hayes, W.(1968) : In: Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh.
- Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M.(1975) : High-Frequency Fusion of Fungal Protoplasts. *Experientia.* **31** : 1028-1030.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M., Franko, A. and Rojik, I.(1976) : Factors Affecting High-Frequency Fungal Protoplast Fusion. *Experientia.* **32** (9) : 1156-1158.
- Ferenczy, L., Szegedi, M. and Kevei, F.(1977) : Interspecific protoplast fusion and complementation in *Aspergilli*. *Experientia.* **33** (2) : 184-186.
- Fries, N.(1947) : Experiment with different methods of isolating physiological mutation of filamentous fungi. *Nature.* **159** : 199.
- Hankin, L. and Anagnostakis, S.L.(1977) : Solid Media containing carboxymethyl cellulose to Detect Cx cellulase activity of Microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **98** : 109-115.
- Hong, S.W., Hah, Y.C., Min, K.H. and Rhee, Y. H.(1976) : Isolation of cellulolytic Microorganisms and their physiological characteristics. *Kor. Jour. Microbiol.* **14** : 17-24.
- Huh, T.L. and Lee, S.Y.(1981) : "Cellulases of *Trichoderma viride* (I)"-Induction of cellulases by CMC and their mode of action. *Kor. J. Biochem.* **14** : 55-71.
- Kim, M.S. and Choi, Y.K.(1986) : The protoplasts Fusion of *Aspergillus niger*. *Kor. J. Mycol.* **14**(2) : 165-174.
- Lee, Y.N. and Park, Y.K.(1977) : Cellulase activities of *Aspergilli* distributed in South Korea Avicelase, CMCase and Salicinase Activities of the Strains surveyed in taxonomical viewpoint. *Kor. Jour. Microbiol.* **15** : 113-121.
- Miller, J.H.(1974) : Ultraviolet Light Mutagenesis. In: Experiments in Molecular Genetics. pp.121-124.
- Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E.(1977a): Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33** : 178-183.
- Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E.(1978) : Hypercellulolytic mutants and their role in saccharification. In Second Annual Fuels from Biomass Symposium. pp.613-625.
- Peberdy, J.F.(1979) : Fungal protoplast; Isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33** : 21-39.
- Somogyi, M.(1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195** : 19-23.
- Teather, R.M. and Wood, P.J.(1982) : Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and characterization of cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(4) : 777-780.