

Trichoderma koningii 의 종내 원형질 융합체의 분석

박희문* · 홍순우

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

*Lab. of Biochemistry & Metabolism, NIDDK, NIH Bethesda, MD 20852, U.S.A.

Analysis of Intraspecific Protoplast Fusion Products in *Trichoderma koningii*

Park, Hee-Moon* and Soon-Woo Hong

Department of Microbiology Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Lab. of Biochemistry & Metabolism, NIDDK, NIH Bethesda, MD 20852, U.S.A.

ABSTRACT: Intraspecific fusants, produced by protoplast fusion of auxotrophic mutants from *Trichoderma koningii* ATCC 26113, were segregated into various strains including parental types, non-parental auxotrophic hybrids, and prototrophic hybrids on complete plate. Interestingly, some of non-parental prototrophic hybrids revealed to have enhanced cellulolytic activity incomparision with other strains of parents or hybrids derived thereafter. It was also evident that prototrophic hybrids of aneuploid could be constructed after the spontaneous segregation of complementing fusants produced through the protoplast fusion.

KEY WORDS □ Protoplast fusion, *Trichoderma koningii*, intraspecific hybrid, aneuploid.

Ferency 등(1974)이 사상균에서의 원형질체 융합을 보고한 이래, *Aspergillus* 속(Ferency 등, 1976), *Penicillium* 속(Anne와 Peberdy, 1976), *Phanerochaete* 속(Gold 등, 1983) 등에 대한 종내 원형질체 융합이 보고된 바 있다. 특히 유전학적 분석법이 정립되어 있지 아니한 균주의 경우, 재조합체의 생성에 의한 유전학적 분석법으로 원형질체 융합기법이 유용하게 쓰일 수 있음이 밝혀짐과 아울러(Hashiba와 Yamada, 1984; Silveira와 Azevedo, 1987; Layton과 Kuhn, 1988), 산업적으로 유용한 우량균주의 개발에도 유용하게 쓰일 수 있음이 밝혀진 바 있다(Hamyln와 Ball, 1979; Raymond 등, 1986).

Trichoderma 속 균의 경우 섬유소 분해효소 체계에 대한 연구(Montenecourt, 1983), 효소합성의 조절기작(Merivuori 등, 1985), 돌연변이 유

발에 의한 우수균주의 개발(Schoemaker 등, 1981; Bailey와 Nevalainen, 1981; Durand 등, 1988)에 대한 연구와 아울러, 최근에는 유전자 조작기법에 의한 섬유소 분해효소 유전자의 클로닝(Van Arsdell 등, 1987) 등도 보고된 바 있다. *Trichoderma* 속 균주는 생활사가 밝혀지지 아니한 불완전 균류이나 유전학적 연구방법론과 균주 개발법으로 원형질체 융합기술이 적용될 수 있다는 사실이 보고된 바 있다(Hong 등, 1984a, b; Toyama 등, 1984a, b; Hong과 Park, 1985; Park 등, 1986; Ogawa 등, 1987).

본 논문에서는 본인 등이 이미 보고한 바 있는(Hong 등, 1984a, b) *T. koningii* 의 종내 원형질체 융합 '결과 얻어진, 상보성 융합체로부터 종내 잡종을 분리해내고, 이들 종내 잡종의 특성을 조사하여, 균주개량 및 유전학적 가능성을 검토하

여 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

균주로는 Table 1에 제시한 바와 같이 *Trichoderma koningii* ATCC 26113, 돌연변이 유발원 처리결과, 이로부터 유래된 영양요구성 돌연변이주 및 이들 돌연변이주 상호간의 원형질체 융합결과 분리된 상보성 융합체를 사용하였으며, 돌연변이 유발 및 원형질체 융합과 융합체의 선별은 발표한 바 있는 Hong 등(1984a) 및 Park 등(1986)의 방법에 의거하여 수행하였다.

균주보관용 배지로는 potato dextrose 배지를 사용하였으며, 완전배지 (complete medium; CM), 최소배지 (minimal medium; MM), 완전환원배지 (complete regeneration medium; CRM) 및 최소환원배지 (minimal regeneration medium; MRM)의 조성 및 제법은 이미 기술한 바와 같다 (Hong 등, 1984a, b; Park 등, 1986).

원형질체의 제조 및 융합조건

원형질체의 제조, 분리 및 융합은 Hong 등(1984a, b)의 방법에 의거 수행하였다.

이형접합체의 분리 양상

최소환원배지상에 생성된 상보적인 이형접합체를 최소배지에 옮겨 보관하고 이를 완전배지에 옮겨 배양하여 포자가 생성되도록 한 후, 이들 포자

를 수득하여 완전평판배지에 도말하였다. 완전평판배지에 군체가 생성되면, 이들을 각각 완전배지, 최소배지 및 각종 영양요구물질이 첨가된 최소평판배지에 접종하여 그 유전자형을 조사하였다.

잡종의 선별 및 인위적인 분리 유도

이형접합체를 분리시킨 결과 얻어진 자손들 중 상보적인 독립영양형 균주를 선별하고 최소평판배지에 옮겨 보관한다. 이를 인위적으로 분리시키기 위하여, 군사체의 일부를 떼어서 benlate 가 1ml에 1.25 ppm의 수준으로 첨가된 완전평판배지에 옮겨 인위적인 분리를 유도하고, 분리 결과 생성된 포자들을 완전평판배지에 도말한 후 군체가 형성되면 이를 이형접합체의 분리양상에서와 마찬가지로 최소평판배지, 완전평판배지, 최소배지에 영양요구물질이 첨가된 평판배지 등을 사용하여 그 유전자형을 조사함으로써 상보적인 독립영양형 균주의 핵상 분석을 피하였다.

DNA 양 측정

상보적인 독립영양형 균주의 핵상을 분석하기 위하여, 이들 포자를 수득한 후 포자를 완전액체 배지에 접종하여 배양한 다음, 군사체를 수득하여 1% Driselase 를 처리하여 원형질체를 생성 분리한다. 이들 원형질체를 삼투안정제로 두 번 세척한 후 50 mM Tris-50 mM EDTA 용액을 5 ml 가하고 SDS 를 0.5g 첨가하여 65°C에 20분 방치하여 원형질체를 터뜨리고 여기에 동량의 찬 absolute

Table 1. List of *T. koningii* strains used in this study.

Strain	Phenotype	Origin	Reference
ATCC 26113	prototype	wild type	
AF-1	ade	ATCC 26113	Hong <i>et al.</i> , 1984
A-7	arg	ATCC 26113	Hong <i>et al.</i> , 1984
AT-7	arg, leu	A-7	Park <i>et al.</i> , 1986
CFT-1	yel, arg	CF-1a	Park <i>et al.</i> , 1986
CUT121	whi, lys, met	C-2b	Park <i>et al.</i> , 1986
FACM 106, 143, 316, 325	prototroph	AF-1 × CFT-1	This study
FAAtM 108, 144, 206, 218	prototroph	AF-1 × AT-7	This study
FAUM 102, 230	prototroph	AF-1 × CUT121	This study
FAtUM 219	prototroph	AT-7 × CUT121	This study

a,b: These strains were also derived from ATCC 26113 by UV mutagenesis.

Abbreviation; ade: adenine, arg: arginine, leu: leucine, lys: lysine, met: methionine, whi: white, yel: yellow.

ethanol과 NaCl을 최종농도 0.3M 되게 첨가하여 -20°C 하룻밤 방치한다. 이것을 -20°C 에서 15,000rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상등액을 완전히 따라내고 침전물에 남아있는 ethanol을 상온에서 증발시킨 후 이 DNA를 10%의 perchloric acid에 재분산시켜 이를 diphenylamine test로 DNA의 양을 측정하였다.

Diphenylamine test는 Burton(1956)의 방법을 변형한 Giles와 Myers(1965)의 방법에 의거하여 시행하였다. 10% perchloric acid 5ml에 녹인 DNA 용액을 65°C 에서 20분 방치한 후 원심분리하여 상등액으로 모으고, 침전물에 다시 5ml의 perchloric acid를 첨가하여 재추출한 상등액을 1차 추출한 상등액과 혼합하였다. 이 DNA 추출액 2ml에 diphenylamine 용액 2ml 가하고, 여기에 0.1% acetaldehyde를 0.2ml 가한 후 37°C 에서 하룻밤 방치하여 파장 600nm에서 흡광도를 측정하였다. Diphenylamine 용액은 1.5g의 diphenylamine을 100ml의 빙초산에 녹인 후 1.5ml의 진한 황산을 첨가하여 암소에 보관하여 사용하였다.

DNA 양을 결정하기 위한 표준시료로는 Salmon testis에서 추출한 Na-DNA Type III (Sigma 제품) 8mg을 20ml의 5mM NaOH에 녹인 후, 사용직전 6.5ml의 DNA 용액을 20%의 perchloric acid 6.5ml과 섞어 20분간 방치하여, 여기에 10% perchloric acid 12ml을 가하여 DNA의 최종농도가 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 만들어 이를 일련의 농도로 희석하여 사용하였다.

세포외 다당류 분해효소의 유도 및 활성측정

세포외 다당류 분해효소의 유도 및 활성 측정법은 이미 기술한 바와 같은데(Park 등, 1986), mannanase, polygalacturonase 및 xylanase의 활성은 0.05M 초산완충용액(pH 5.0)에 녹인 0.5% mannan(Sigma 제품), polygalacturonic acid sodium salt, grade II(Sigma 제품) 및 xylan from Lachwood(Sigma 제품) 용액 0.8ml에 섬유소 분해효소 유도배지에서 균체를 배양하여 얻은 조효소 용액 0.2ml을 각각 첨가하여, 50°C 에서 30분간 반응시켜, Somogyi 법(1952)으로 파장 660nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 환원당의 양을 측정하였고, 반응 혼합액 1ml 당

$1\mu\text{g}$ 의 환원당이 유리된 경우를 1 unit로 정의하였다.

단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry 등의 방법(1951)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

융합체의 자연분리양상

*T. koningii*의 영양요구성 돌연변이주간에 원형질체 융합을 시도한 결과 최소화원배지상에 생성된 융합체의 균사를 완전평판배지에 옮기고 포자가 생성되게 한 후, 포자의 유전자형을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서 보듯이 포자의 유전자형은 융합에 사용된 모균과 동일한 유전자형과 독립영양형 및 모균의 유전자형과는 다른 재조합체 등으로 분리되었다. 따라서, 영양요구주간의 원형질체 융합에 의하여 유전자의 재조합이 이루어짐을 알 수 있다. 그런데 이들 융합체가 분리될 때 융합에 사용된 모균의 유전자형으로 분리되는 비율이 동일하게 나타나는 것이 아니라, 한쪽이 편중되게 나타나는 경향이 있다. 이는 원형질체 융합시 두 가지 모균이 동일한 비율로 융합되지 아니하였거나, 동일한 비율로 융합되었다 하더라도 융합체를 형성하는 모균의 정상세포로의 환원율이 차이가 나기 때문에 그 성장속도의 차이에 의하여 이러한 결과가 나타날 수 있을 것이다. 실제 상호비교가 가능한 경우의 모균의 환원율과 분리비율을 비교하여 보면, 이러한 가능성을 시사해주고 있다. 즉, AF-(ade)과 CFT-1(arg)을 상호 융합시킨 경우, 융합모균의 환원율은 $1.2 \times 10^{-1} : 2.8 \times 10^{-2}$ 으로 약 4:1의 비를 갖는데, 여기서 분리된 포자의 유전자형을 살펴보면 ade:arg의 비가 3.3:1이다. 또한 AF-1(ade)과 CUT 121(lys, met)을 융합시킨 경우는 모균들의 환원율비는 $1.2 \times 10^{-1} : 4.5 \times 10^{-2}$ 으로 2.7:1의 수치를 나타내는데 실제 포자의 분리비는 ade:lys, met가 4.2:1이며; CFT-1(arg)과 CUT 121(lys, met)을 융합시킨 경우의 융합모균의 환원율은 각각 2.8×10^{-2} 와 4.5×10^{-2} 으로 1:1.6의 비율인데, 분리된 포자의 유전자형으로 arg:lys, met이 1:1.5이다. 나머지 A-7(arg)과 AT-7(arg, leu)이 융합모균의 한

Table 2. Spontaneous segregation of intraspecific fusants obtained from protoplast fusion between various auxotrophic mutants of *T. koningii* ATCC 26113

Cross (genotype)	No. of Colonies tested	Genotype of conidia from heterokaryons							
		ade	arg	met	ade, lys	arg, leu	lys, met	proto.	rec
AF-1(ade)× CFT-1(arg)	260	189	57					14	—
A-7(arg)× C1U1(met)	215		99	103				13	
A-7(arg)× AF-1(ade)	221	72	141					18	—
AF-1×AT-7 (arg, leu)	140	94				38		8	—
AF-1(ade)× CUT121(lys, met)	219	169					40	9	1
CFT-1(arg)× CUT121(ade, lys)	241		29				43	30	139
AT-7(arg, leu)× AFT-1(ade, lys)	130				23	93		13	1
AT-7(arg, leu)× CUT121(lys, met)	240					6	11	16	195

쪽 배우자로 사용된 경우에는 이들 두 균의 정상 균사체로의 환원이 거의 검출되지 아니하므로, 이들 경우를 제외한 앞서의 세가지 경우는 융합에 사용된 두 모균종 환원율이 높은 쪽의 유전자형과 동일한 유전자형을 갖는 포자가 더 많은 비율로 생성됨을 알 수 있다.

또한 융합모균의 유전자형이 아닌 독립영양형이나 모균과는 다른 영양요구성의 유전자형을 갖는 재조합체가 형성되는 비율도 교배의 종류에 따라 각기 다른 양상을 보여주고 있다. 즉, CFT-1과 CUT121 및 AT-7과 CUT121을 상호 원형질체 융합한 경우 각기 검증한 포자의 70% 및 88%가 모균과 다른 유전자형으로 나타났는데, 이러한 결과는 현단계에서 명확한 규명은 불가능하나 현상적으로 볼 때 이들 두가지 교배의 경우 모균의 유전자형을 갖는 포자가 분리되는 비율이 다른 경우에 비하여 비교적 균등하다. CFT-1과 CUT121의 경우 모균의 유전자형인 arg형 포자와 lys, met형 포자의 생성비가 1:1.5이며, AT-7과 CUT121의 경우에는 arg, leu형 포자와 lys, met형 포자의 생성비가 1:1.8로 다른 경우에 비하여

비교적 고른 분포를 나타낸다. 따라서, 융합체가 이형핵체(heterokaryon) 상태에서 서로 다른 두 종류의 핵이 비교적 균등한 비율로 존재할 때 핵융합(karyogamy) 또는 유전자의 재조합이 잘 이루어지는 것이라 추정하여 볼 수 있다.

그런데, 원형질체 융합에 의하여 생성된 융합체를 최소평판배지에 옮긴 후, 생성된 포자의 영양요구성을 조사한 결과 Table 2와 같이 융합모균과 동일한 영양요구성의 포자외에 모균과는 다른 영양요구형과 독립영양형 포자가 얻어진 사실에서 다음과 같은 추론이 가능할 것이다. 즉, 최소환원배지상에 생성된 융합체의 균사체는 대부분 이형핵체(heterokaryon) 상태로 존재하며, 부분적으로 두 종의 핵간에 핵융합이 일어나는 부위가 있고, 융합된 핵이 유전자의 재조합(또는 염색체의 분리) 과정을 거침으로써, 융합모균과는 다른 독립영양형 포자와 영양요구성의 포자가 생성될 것이다.

또다른 접근방법으로 최소환원배지상에 형성된 융합체의 균사를 두 차례에 걸쳐 최소평판배지로 옮겨 배양한 후, 생성된 포자의 유전자형을 검증

Table 3. Genetic traits of regenerated protoplasts derived from the stable fusant of the strain AT-7 (*arg, leu*) and strain CUT121 (*lys, met*).

Protoplasts from the mycelium grown on	Protoplasts were regenerated on	No. of colonies tested	% growth value of colonies on			
			CM ^a	MM + <i>lys, met</i>	MM + <i>arg, leu</i>	MM ^b
Complete medium	CRM ^c	37	100	100	100	100
	MRM + <i>lys, met</i>	48	"	"	"	"
	MRM + <i>arg, leu</i>	48	"	"	"	"
	MRM ^d	48	"	"	"	"
Minimal medium	CRM	33	100	100	100	100
	MRM + <i>lys, met</i>	48	"	"	"	"
	MRM + <i>arg, leu</i>	48	"	"	"	"
	MRM	48	"	"	"	"

^aComplete agar medium. ^bMinimal agar medium. ^cComplete regeneration agar medium. ^dMinimal regeneration agar medium.

하여 보았다. 즉, AT-7 과 CUT 121 의 융합체 중 하나를 최소배지에 두 번 옮겨 배양하고, 이때의 균사체 일부를 각각 최소배지와 완전평판배지에 옮겨 포자를 형성하게 하여 이들의 포자를 완전평판배지에 도말하여 균체가 형성되게 한 후 이들의 유전자형을 검증하였더니 검증해 본 모든 경우가 독립영양형으로 판정되었다(자료 생략). 그러나, 이 경우 포자 자체의 핵형이 이형핵체일 가능성도 있으므로, 완전평판배지와 최소평판배지에서 생성된 포자를 각각 완전액체배지에서 18 시간 배양하고 이들 균사체로부터 원형질체를 추출하여, 각각의 원형질체를 최소환원배지, 최소환원배지에 각 모균의 성장요구 아미노산을 첨가한 것, 완전환원배지 등 네가지의 환원배지상에 재생시키고, 재생된 균사체의 포자를 이용하여 유전자형을 검증하여 보았다. 그 결과 시험하여 본 모든 경우가 독립영양형이었다(Table 3). 이 실험의 결과를 검토하여 보면, AT-7 과 CUT 121 을 원형질체 융합시켜 환원용 최소배지에서 골라낸 융합체를 최소평판배지에 옮기고 이를 완전평판배지에서 자연분리시켜 얻은 각 포자들의 유전자형을 조사하였을 때 검출된 독립영양형 포자의 표현형이 포자 자체의 핵상이 이형핵체이기 때문에 비롯된 것이라면, 독립영양형 포자를 배양하여 얻은 균사체 원형질체가 정상세포로 환원되어 생성된 균사체 중에는 융합모균과 동일한 영양요구성을 갖는 것이 존재하여야 할 것이나 모균과 동일한 영양요구성 균사체는 검

출되지 아니하였다. 따라서 최소한 이 경우의 포자가 독립영양형으로 나타난 것은 포자의 핵형이 이배체이거나 재조합체일 것이라 추정할 수 있다(Ferenczy, 1984). 또한 이 실험의 결과가 융합결과 형성된 융합체의 모든 경우에 적용되어, 설명 가능한 현상이라 단정지을 수 없고, 나아가 이 검증실험에 사용된 융합체의 균사가 우연히도 일배체의 독립영양형 재조합체 또는 이배체(또는 이수체)의 독립영양형 상태로 존재하는 것이었으리라 가정할지라도, 이러한 결과로부터 원형질체 융합에 의하여 생성된 이형핵체 상태의 균사체는 최소한 그 일부분에서나마 핵융합과 또는 핵융합에 이은 유전자(또는 염색체)간의 재조합 과정이 이루어진다고 할 수 있다(Anne 등, 1976 ; Ferenczy 등, 1976).

이상에서 살펴 본 융합체 포자의 유전자 분리양상 및 검증실험을 통하여 다음과 같은 추론이 가능하다. 환원용 최소배지상에 처음 생성된 독립영양형 균사체의 대부분은 한 균사체내에 두 종류의 상보적인 핵이 존재하는 이형핵체 상태로 존재하며, 이 상태에서는 핵융합이 부분적 또는 다소 낮은 빈도로 이루어진다. 최초로 환원용 최소배지상에서 생성된 융합체를 자연분리시킨 후 얻어진 두번째 단계의 독립영양형 포자(균사체)는 아마도 핵융합이 이루어진 후에 생성된 이배체(이수체) 또는 일배체(또는 이수체) 상태의 재조합체일 것이다. 그런데 최초로 형성된 상보적인 이형핵체내의 핵용

합은, 자연적인 핵융합외에도, 최소배지상에서 보 관하거나 최소배지상에서의 연속적인 배양(계대배 양)을 할 경우 이 과정이 핵융합을 촉진하는 외부 적 압력요인으로 작용하여(Kevei와 Peberdy, 1984), 그 발생빈도가 높아지고 따라서 독립영양 형 잡종의 형성 가능성이 높아질 것이다.

이러한 실험결과와 추론을 뒷받침 할만한 보고 들로는, *T. viride*의 경우 포자내의 핵은 하나로 존재하며(Rosen 등, 1974), Toyamā 등(1984a)이 *T. reesei*의 종내 잡종형성 실험을 한 경우에 융합체가 분리되는 양상도 모균과 동일한 영양요 구형외에 모균과는 영양요구성이 다른 잡종이 생 성되었다고 하였다. 융합체가 분리되어 두 종류의 융합모균과 동일한 영양요구성의 포자가 생성되는 비율 역시 본 실험결과와 마찬가지로 불균등하게 한쪽 모균의 유전자형이 많이 생성되는 현상을 보 여주고 있다. 또한 일반적으로 사상균류에서 원형 질체 융합에 의하여 생성되는 독립영양형 잡종은, 최소환원배지상에 계대배양하는 동안 비정상적 또는 왕성한 성장을 보여주는 균사체 부위(sectoe 또는 knob)로부터 얻어지며, 이 부위에서 얻어낸 잡종의 핵상은 대개가 이배체 또는 이수체임이 판 명된 바 있다(Anne 등, 1976; Ferenczy 등, 1976; Ferenczy, 1984; Toyama 등, 1984a, b).

잡종의 세포의 섬유소 및 다당류 분해효소의 활 성

이미 융합에 의하여 생성된 융합체의 자연분리 양상을 검토하여, 이들 융합체가 이형핵체 상태로 존재하며, 부분적으로 핵융합이 일어남을 살펴 보 았다. 그런데 이형핵체인 융합체를 자연분리시킨 후, 생성된 독립영양형 잡종의 특성을 규명하기 위하여 다음과 같은 몇가지 실험을 시도하였다. 즉, 섬유소 분해능이 향상된 균주의 선별 또는 균 주개량의 가능성을 검토하기 위하여 잡종이 세포 의 섬유소 분해효소 활성 및 각종 다당류 분해효소 의 활성을 조사하였다.

융합체를 자연분리시켜 얻은 독립영양형 잡종을 무작위로 선정하여 이들을 섬유소 분해효소 유도 배지에서 배양하여, 배양여액을 조효소원으로하여 Avicelase, CMCCase, β -glucosidase 및 단백질의 양 등을 조사하였다. 이들 잡종의 경우에도 배양 5일내지 6일째에 섬유소 분해효소능이 최대에 달

하였는데, 잡종의 효소활성도와 융합모균 및 야생 형 균주의 효소활성도를 비교하여 본 바, Table 4 와 같았다.

이를 살펴보면, AF-1과 CFT-1을 융합시켜 얻 은 융합체로부터 네가지의 잡종에 대하여 조사하 였는데, 이 중 FACM325와 FACM143은 그 활 성이 융합모균인 AF-1과 CFT-1보다 높을 뿐 아 니라, 융합모균을 얻는데 사용한 *T. koningii* ATCC 26113보다도 Avicelase, β -glucosidase 및 CMCCase의 활성이 모두 증진된 것으로 나타났다. 특히 FACM325가 세가지 효소활성이 월등히 신 장되었으며 세포의 단백질의 생성량도 ATCC 26113에 비하여 약 159%수준이었다. 나머지 두 가지 잡종인 FACM106과 FACM143은 융합모 균에 비하여 CMCCase 활성이 증대되었고, FACM316은 Avicelase 효소능이 상당히 증대된 잡종으로 나타났다.

AF-1과 CUT121의 융합체에서 유래된 잡종 중 FAUM230은 융합모균의 하나인 CUT121과 유사한 양상을 보여주는 것이었으며, FAUM102는 기본적으로는 CUT121과 유사하나 CMCCase는 다소 증가되었고 β -glucosidase는 오히려 융합 모균보다 감소한 수준의 것이었다.

AF-1과 AT-7의 융합체에서 유래된 네가지의 잡종은 기본적으로 융합모균의 하나인 AT-7과 유 사한 양상을 보여주나 FAATM206의 경우에는 세가지 효소능이 융합모균 뿐만 아니라 ATCC 26113보다 증진된 잡종이 있었으며, FAATM107의 경우에는 Avicelase가 가장 높은 수준으로 증 진되었고 CMCCase 활성도 ATCC26113보다 증 진된 것이었으나 β -glucosidase 활성은 AF-1과 유사한 수준의 활성을 나타내었다.

그외 AT-7과 CUT121에서 유래한 FATUM 219, A-7과 CIU1의 융합체에서 유래한 FAF-4, A-7과 CIU1에서 유래한 AFC1 등도 CMCCase 활성이 증대된 현상을 나타내었는데, 특히 AFC1의 경우 CMCCase 활성이 융합모균 뿐만 아니라 ATCC26113보다 월등히 높아 ATCC26113의 수준에 비하여 약 두배가량 증진된 것이었다.

이상의 결과에서 살펴보면, 융합실험에 사용된 모균들의 효소활성은 AT-7의 Avicelase, CUT 121의 β -glucosidase 등을 제외하고는 야생형인

Table 4. Extracellular cellulase activity in various parental strains of *T. koningii* and their hybrids obtained from intra-specific protoplast fusion.

Strain	Avicelase (units) ^a	CMCase (units) ^a	β -glucosidase (units) ^b	Protein (μ g/ml)
ATCC26113	40.47	202.97	690	102.42
AF-1	24.84	38.72	650	97.88
CFT-1	6.09	71.09	180	138.79
AT-7	50.47	191.09	450	187.27
CUT121	18.97	109.29	690	85.35
AF-1 \times CFT-1				
FACM 106	6.09	133.59	630	96.36
FACM 325	58.59	232.34	1050	163.06
FACM 143	41.72	256.72	720	141.82
FACM 316	53.28	197.34	480	108.48
AF-1 \times CUT121				
FAUM 102	20.47	201.09	490	102.42
FAUM 230	20.47	147.97	730	100.91
AF-1 \times AT-7				
FAAtM 218	37.97	197.97	780	113.03
FAAtM 108	60.47	245.47	670	149.09
FAAtM 206	52.03	251.72	740	114.54
FAAtM 144	32.97	222.97	810	120.61
AT-7 \times CUT121				
FAtUM 219	9.22	216.09	470	102.42

^aUnit was expressed by the amount of glucose equivalent produced (μ g/ml).

^bUnit was expressed by the amount of *p*-nitrophenol produced (μ mol/ml).

ATCC 26113의 수준에 훨씬 미치지 못하는 것이었으나, 융합체로부터 얻어진 집중종에는 융합모균 뿐만 아니라 야생형인 ATCC 26113보다 섬유소 분해효소능이 증진된 균주들이 선별되었다. 또한 세가지 섬유소 분해효소 성분 중 Avicelase나 β -glucosidase보다 CMCase의 활성이 증진된 경우가 많았으며, 세가지 성분중 한가지라도 증진된 경우에는 대부분 단백질 생성량도 함께 증진된 양상을 보여주고 있다.

그런데, *T. koningii*의 돌연변이주들중 융합모균으로 사용된 균주들의 세포외 섬유소 분해효소 생산능을 조사한 결과, Eriksson과 Goodell (1974) 및 Nevalainen과 Palva(1978)의 보고와 유사하게, 거의 대부분의 섬유소 분해능이 손상되어 있었으며 크게 세가지 유형으로 분류되었다. 첫째, Avicelase와 CMCase만 손상된 유형으로는 AF-1과 CUT 121, 둘째 Avicelase, CMCase

및 β -glucosidase의 세가지 효소능이 모두 손상된 유형인 CFT-1, CUT1의 균주와, 세째 β -glucosidase 효소능만이 손상된 유형인 AT-7으로 분류된다.

그런데, Nevalainen과 Palva(1978)에 의하면 *T. viride*의 경우 cellulase, mannanase 및 xy-lanase의 세가지 효소들의 합성과정은 공통적인 조절기작을 갖고 있으며, 또 다른 섬유소 분해균인 *Polyporus adustus*의 경우에도 동일한 결과를 보고한 바 있다(Eriksson과 Goodell, 1974). 또한 β -glucosidase는 cellulase 등과는 다른 조절기작에 의하여 합성될 것이라 하였다(Nevalainen과 Palva, 1978). 따라서 본 실험에서 얻어진 돌연변이주들의 특성을 살펴볼 때 Avicelase와 CMCase는 동시에 손상되나, β -glucosidase는 독립적임을 알 수 있으므로, cellulase 구성성분 중 Avicelase와 CMCase는 동일 조작기작에 의하여 영

향반을 가능성이 있다 하겠다.

이상에서 살펴본 잡종의 세포의 섬유소 분해효소 생성의 특징은 효소를 전기영동법 등의 방법으로 조사 비교하여 볼 때보다 확실한 분석이 가능할 것이나 (Min 등, 1988a), 앞서 융합체에서 얻어진 포자의 영양요구성 조사실험의 결과와 더불어 원형질체 융합에 의하여 종내 또는 종간에 유전자의 교환 및 재조합이 이루어짐을 확인할 수 있다.

종내 원형질체 융합에 의하여 얻어진 종내 잡종 중 전체적으로 세포의 섬유소 분해효소능이 증진된 네가지 균주를 선별하여, 세포의 mannanase, polygalacturonase, xylanase의 활성을 조사하였다. 그 결과 Table 5에서 보듯이, FACM325, FACM143, FAAtM206은 야생형인 ATCC 26113에 비하여 각종 다당류 분해효소능이 증진되지 못한 것이었으나, FAAtM108의 경우, mannanase와 pectinase의 일종인 polygalacturonase의 활성이 증진된 양상을 나타내었다. 그런데, Nevalainen과 Palva (1978), Eriksson과 Goodell (1974)의 보고에 의하면, 섬유소 분해능이 있는 사상균의 cellulase, mannanase, xylanase의 생체내 합성에는 공통적인 조절기작이 작용할 것이라 하였으며, *Polyporus adustus*의 경우, 이들 세가지 효소는 cellulose와 glucomannan에 의하여 모두 그 생성이 유도된다고 하였다 (Eriksson과 Goodell, 1974). 그러나 본 실험의 결과, 네가지 종내 잡종들이 모두 Avicelase와 CMCase가 높은 수준이었음에 반하여 mannanase와 xylanase의 활성은 높지 않았다. 이는 Nevalainen과

Palva (1978)나 Eriksson과 Goodell (1974)이 주장하였던 바와는 달리 cellulase, mannanase, xylanase의 합성 조절기작이 독립적으로 존재할 것으로 추측되기도 하나, 현단계로는 이러한 추론을 뒷받침 할만한 결과가 부족하다 하겠다. 한편 본 실험에 사용된 균주가 앞서 연구자들이 사용한 균주와는 달리, 융합 결과 얻어진 잡종이므로 다른 결과가 나왔을 수도 있으며, 효소 유도배지의 탄소원으로 Avicel과 CMC를 함께 사용하였기에 다른 결과가 나왔던 것일 수도 있으므로, 본 실험에만 국한된 현상일 수 있다. 이러한 결과 및 추론을 확실히 하기 위하여서는 융합에 사용된 각종 돌연변이주들의 mannanase, xylanase, pectinase에 대한 활성조사 등의 연구가 더 진행되어야 할 것이나, cellulase의 활성을 조사하여 본 바에 의하면 (결과는 보이지 않음), 야생형인 ATCC 26113과 거의 동일한 수준으로 생성됨이 확인되었다. 따라서, 최소한 polygalacturonase의 조절기작은 cellulase (Avicelase, CMCase)와는 다를 것으로 판단된다.

잡종의 인위적인 분리양상 및 DNA 함량

앞서 조사한 네가지 종내 잡종의 핵형분석을 위하여, 이들의 균사체를 반수체화 유도물질인 benlate가 첨가된 완전평판배지에 배양한 후 그 포자를 수득하여, 포자들의 영양요구성을 조사하였다. 그 결과 융합모균의 유전자형으로 분리되는 비율이, FACM143의 경우 두가지 모균형과 재조합형이 ade : arg : rec = 29 : 1 : 5 이고 FACM325는 ade : arg : rec = 1 : 0 : 99로 거의 모든 포자가 독립영양형의 재조합체였으며, FAAtM206은 ade : arg, leu : rec = 46 : 1 : 154로 전체 분리포자의 77%가 독립영양형이었다. 그런데 FAAtM108은 ade : arg, leu : rec = 35 : 1 : 15로 나타나며, 독립영양형의 재조합체 뿐만 아니라 모균과 다른 영양요구성을 나타내는 재조합체가 두 개 얻어졌다 (Table 6). 즉, 잡종의 종류마다 융합모균의 유전자형과 동일한 유전자형 및 재조합체가 얻어지는 비율이 상당히 불균일하며, 재조합체의 생성비율 또한 차이를 보여주고 있다. 이들 잡종의 DNA 함량을 조사한 결과 Table 7에서 보듯이, 상당히 불균일하여, FAAtM108의 경우에는 다른 잡종의 약 두배에 해당하는 함량을 보여주며

Table 5. Activity of extracellular polysaccharide hydrolytic enzymes in hypercellulolytic hybrids obtained from intraspecific protoplast fusion in *T. koningii*.

Hybrid strain	Mannanase	Polygalacturonase	Xylanase
FACM 325	—	6.90(90.1)*	14.22(47.7)
FACM 143	—	3.28(42.8)	1.72(5.8)
FAAtM 108	2.40	9.21(120.2)	22.97(77.0)
FAAtM 206	—	0.15(2.0)	4.84(16.2)
ATCC 26113	—	7.66(100)	29.84(100)

* relative activity; Activity was expressed by the amount of glucose equivalents released ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

Table 6. Induced segregation of intraspecific hybrids using haploidizing agent, benlate.

Strain	No. of colonies tested	ade	arg, leu	arg	Recombinant	
					prototype	non-parental
FACM 143	68	59		2	7(10)*	—
FACM 325	191	2		—	189(98)	—
FAAtM 108	212	48	1		163(77)	—
FAAtM 206	108	74	2		30(28)	2

*: percent value

Table 7. DNA contents of parental strains and intraspecific hybrids obtained from spontaneous segregation of intraspecific fusants.

Strain	DNA contents per 10 ⁶ of protoplast (ng)
ATCC 26113	156.8
AF-1	166.5
AT-7	97.0
CFT-1	103.2
FACM 143	93.0
FACM 325	124.7
FAAtM 108	208.8
FAAtM 206	99.1

야생형인 ATCC 26113의 1.5 배에 달하는 것이었다. 즉, FACM 143은 융합모균인 CFT-1과 유사한 수준이었고, FACM 325는 융합모균의 하나인 AF-1 수준, FAAtM 108은 융합모균의 하나인 AF-1의 1.5 배이며 또 다른 융합모균인 AT-7과 거의 비슷한 수준의 DNA 함량을 보여주고 있다. 이상의 결과에서 볼 수 있는 것은 다른 분리된 잡종이, 핵형이 아닌 이수체임을 알 수 있다. 즉, FACM 143, FACM 325, FAAtM 206은 반수체에 가까운 이수체이며, FAAtM 108은 이배체에 가까운 이수체라 추정할 수 있다. 그런데 융합모균의 DNA 함량을 보면 AF-1은 야생형인 ATCC 26113과 거의 비슷한 수준이나, AT-7과 CFT-1

은 각각 ATCC 26113의 62%, 66% 수준이었다. 이러한 DNA 함량의 차이는 DNA 함량 측정을 위하여 각 돌연변이주의 균사체로부터 원형질체를 분리하여 사용하였는데, 이때 사용된 원형질체의 DNA 함량이 각기 차이가 나게 생성되었을 가능성에 기인하는 것일 수 있다. 또 한가지 가능성은 이미 불완전균류에 속하는 효모인 *Candida albicans*에 주로 밝혀지고 현재 한참 연구 진행중인 추론과 마찬가지로 (Olaiya와 Sogin, 1979; Whelan 등, 1980; Whelan과 Magee, 1981; Suzuki 등, 1982), 자연계에 존재하는 *Trichoderma*속 균류가 이배체로 존재할 가능성이 있다. 즉, 최소한 *T. koningii* ATCC 26113의 자연상태의 핵형은 2n이며, 여기에 돌연변이 유발원 처리에 의하여 2n과 n상태의 돌연변이주가 생성될 수도 있다. 즉, AF-1은 2n상태의 돌연변이주이고, AT-7과 CFT-1은 n상태의 돌연변이주이다. 따라서 AF-1, AT-7, CFT-1을 융합모균으로 사용하여 얻어낸 잡종 중 FACM 325는 n상태보다는 몇개의 염색체를 더 갖는 이수체일 수 있으며, FACM 143과 FAAtM 206보다, 인위적인 분리실험에 의하여 더 높은 비율의 독립영양형 재조합체가 생성되는 양상과 일치한다. 이러한 추론은 물론 ATCC 26113과 이로부터 얻어진 각종 돌연변이주의 핵형분석을 시도해 보아야 할 것이며, 다양한 융합체의 분석실험이 보다 더 행하여져야 확실한 결론이 가능할 것이다.

적 요

Trichoderma koningii ATCC 26113으로부터 얻어진 영양요구성 돌연변이주간의 중배 원형질체 융합을 시도하여 생성된 융합체의 유전자형을 완전평판배상에서 분석하였다. 생성된 융합체 중 모균과 다른 독립영양형 균주에서 섬유소 분해능이 증진된 융합체를 얻었으며 이들이 이배체(혹은 이수체)임을 확인하였다. 또한 이들 이배체(혹은 이수체)의 독립영양형 집종의 원형질체 융합을 통하여 유전자의 교환 및 재조합에 의하여 자연분리되므로써 형성됨도 확인하였다.

REFERENCE

1. Anne, J., H. Eyssen, and P. De Sommer. 1976. *Nature* **262**: 719-721.
2. Anne, J. and J.F. Peberdy. 1976. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 413-417.
3. Bailey, M.J. and K.M. Nevalainen. 1981. *Enz. Micro. Technol.* **10**: 153-157.
4. Burton, K. 1956. *Biochem. J.* **62**: 315-323.
5. Durand, H., M. Clanet, and G. Tiraby. 1988. *Enz. Micro. Technol.* **10**: 341-346.
6. Eriksson, K.E. and E.W. Goodell. 1974. *Can. J. Microbiol.* **20**: 371-378.
7. Ferenczy, L. 1984. In: Cell Fusion: Gene Transfer and Transformation. Transformation. ed. by R.F. Beer, Jr. and E.G. Bassett. pp. 154-169. Raven Press. New York.
8. Ferenczy, L., F. Kevei, M. Szegedi, F. Franko, and I. Rojik. 1976. *Experientia* **32**: 1156-1158.
9. Ferenczy, L., F. Kevei, and J. Zsolt. 1974. *Nature* **248**: 794.
10. Giles, K.W. and A. Myers. 1965. *Nature* **206**: 93
11. Gold, M.H., T.M. Cheng, and M. Alic. 1983. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 260-263.
12. Hamlyn, P.F. and C. Ball. 1979. In: Genetics of Industrial Microorganism. ed. by O.K. Sebeck and A. I. Laskin. pp. 185-191. *Am. Soc. Microbiol.* Washington.
13. Hashiba, T. and M. Yamada. 1984. *Phytopathol.* **74**: 398-401.
14. Hong, S.W., Y.C. Hah, and H.M. Park. 1984a. *Kor. J. Microbiol* **22**: 207-213.
15. Hong, S.W., Y.C. Hah, H.M. Park, and N.J. Cho. 1984b. *Kor. J. Microbiol* **22**: 103-110.
16. Hong, S.W. and H.M. Park. 1985. *Kor. J. Nat'l. Acad.* **24**: 121-157.
17. Kevei, F. and J.F. Peberdy. 1984. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2229-2236.
18. Layton, A.C. and D.N. Kuhn. 1988. *Exp. Mycol.* **12**: 180-194.
19. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
20. Merivuori, H., K.M. Siegler, J.A. Sands, and B.S. Montenecourt. 1985. *Biochem. Soc. Trans.* **15**: 411-414.
21. Min, K.R., H.M. Park, and Y.C. Hah. 1988. *Kor. J. Microbiol.* **26**: in press.
22. Montenecourt, B.S. 1983. *Trends in Biotech.* **1**: 156-161.
23. Nevalainen, K.M.H. and E.T. Palva. 1978. *Appl. Environ. Microbiol* **35**: 11-16.
24. Ogawa, K., J.A. Brownsn, and T.M. Wood. 1987. *Enz. Micro. Technol.* **9**: 229-232.
25. Olaiya, A.F. and S.J. Sogin. 1979. *J. Bacteriol.* **140**: 1043-1049.
26. Park, H.M., J.M. Jeong, S.W. Hong, Y.C. Hah, and C.N. Seong. 1986. *Kor. J. Microbiol* **24**: 91-97.
27. Reymond, P., P. Veau, and M. Fevre. 1986. *Enz. Micro. Technol.* **8**: 45-47.
28. Rosen, K., M. Edelman, E. Galun, and D. Danon. 1974. *J. Gen. Microbiol.* **83**: 31-49.
29. Shoemaker, S.P., J.C. Raymond, and R. Bruner. 1981. In: Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and chemicals. ed. by Hollander, A. *et al.* pp. 89.-109. Plenum Publishing Co., New York.
30. Silveira, W.D. and J. L. Azevedo. 1987. *Enz. Micro. Technol.* **9**: 149-152.
31. Somogyi, M. 1952. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
32. Suzuki, T., S. Nishibayashi, T. Kuroiwa, T. Kanbe, and K. Tanaka. 1982. *J. Bacteriol.* **152**: 893-896.
33. Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo, and H. Okada. 1984a. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 363-368.
34. Toyama, H., T. Yokoyama, A. Shinmyo, and H. Okada. 1984b. *J. Biotechnol.* **1**: 25-35.
35. Van Arsdell, J.N., S. Kwok, V.L. Schweickart, M.B. Ladner, D.H. Gelfand, and M.A. Innis. 1987. *Bio/Technol.* **5**: 60-64.
36. Whelan, W.L. and P.T. Magee. 1981. *J. Bacteriol.* **145**: 896-903.
37. Whelan, W.L., R.M. Partridge, and P.T. Magee. 1980. *Mol. Gen. Genet.* **180**: 107-113.

(Received Feb. 14, 1989)