

섬유소 분해효소를 생성하는 *Aspergillus wentii* 와 *Aspergillus nidulans* 의 원형질체 융합

성낙계* · 이상원 · 정영철 · 강신권 · 노종수

경상대학교 식품공학과

Protoplast Fusion of Cellulolytic *Aspergillus wentii* and *Aspergillus nidulans*

Sung, Nack-Kie*, Sang-Won Lee, Young-Chul Jung, Shin-Kwon Kang and Jong-Su Rho

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National
University, Jinju, 660-701, Korea

Regeneration of protoplast was effective by preincubating spore suspension containing 30 $\mu\text{g/ml}$ of 2-DG for 4 hours, and CBE medium containing casamino acid, bovine serum albumin, ergosterol and myoinositol was found to be more efficient than any other regeneration medium tested in this experiment. The regeneration frequency was about 30%. Optimal conditions for conidial protoplast fusion were obtained by treatment of protoplasts with 10 mM CaCl_2 and 30% polyethylene glycol 4000 (pH 7.5) as fusogenic agent at 37°C for 10 minutes. The fusion frequency was 8.2×10^{-4} . The higher productivity of enzyme of fusant FWN-56 was achieved: 2.3-fold for CMCase, 1.5-fold for avicelase, 1.8-fold for β -glucosidase and 2.5-fold for xylanase compared to that obtained in two parental strains. The genetic stability of fusant after maintenance on minimal medium for more than 4 weeks was high because segregant rate was below 1%. The conidial DNA content of fusant was 1.4-1.6 times higher than that of the parental strains. The nucleus size of fusants were also higher than that of each parental strains.

섬유성 biomass를 bioenergy, 식품, 의약품 및 식재료 생산시의 발효기질로서 이용성이 큰 glucose, xylose 또는 oligosaccharide로의 효소적 전환에는 효소의 생산 단가가 전공정에 60% 이상을 점유하는 문제점이 있는데, 이를 해결하기 위하여 여러 연구자들은 *Trichoderma*속 등의 곰팡이(1-4), *Cellulomonas*속, *Clostridium*속 등의 세균(5-7), 그리고 *Thermomonospora curvata* 등의 방선균(8, 9)을 분리하여 효소생합성 조절기구의 해체에 의한 유도효소의 구성화(3-5), catabolite repression의 해체(2, 8), 그리고 재조합 DNA 기법으로 cellulase 유전자(6, 7) 및 xylanase 분해효소 유전자(10, 11)의 특성 및 구조를 밝히는 등으로 효소활성 증진

실험을 진행해 왔다. 그런데 섬유성 물질을 효율적으로 이용하기 위해서는 cellulase와 xylanase 분해효소를 동시에 대량 분비하는 균주가 유용한데, 원형질체 융합은 이런 균주 육종에 좋은 방법으로 이용될 수 있다(12). 곰팡이의 원형질체 융합은 균사나 포자에서 행해지고 있는데, 균사는 핵의 형태와 수가 불균일하여(13, 14) 유전물질 교환과 융합주의 유전분석에 적당하지 않으므로 최근에는 포자를 이용한 융합이 진행되고 있다(15-17). 이에 본 연구자들은 cellulase complex와 xylanase의 생성능을 동시에 증가시키고자 자연계로부터 효소의 생성량이 우수한 곰팡이를 분리한 다음 영양요구성 변이주를 얻어 그 분생포자로부터 원형질체 형성조건을 보고하였다(18). 본 보에서는 *Aspergillus wentii* MW-289와 *Asp. nidulans* MN-124의 원형질체 재생 및 융합조건을 구하고, 융합주의 성질에 대하여 검토하였다.

Key words: Cellulase complex, xylanase, protoplast fusion
*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주 및 배지

이미 보고(18)된 *Asp. wentii* L-803과 *Asp. nidulans* L-1002를 변이시켜 얻은 MW-289(*lys*⁻, *met*⁻)와 MN-124(*pro*⁻)를 공시균주로 사용하였다. 각 실험을 위한 배지는 Table 1과 같은데 삼투압 안정제로서 0.6M NaCl을 첨가하였고, 융합시에는 MM 및 CBE를 사용하였으며 그외 사용된 배지와 배지의 첨가물은 전보(18)와 동일하다.

효소활성도 측정

CMCase, avicelase, xylanase 및 β -1,4-glucosidase 활성은 전보(18)의 방법에 따라 측정하였다.

원형질체 형성

최소배지에 포자현탁액(1×10^7 conidiospore/ml)을 접종하고 2-deoxy-D-glucose($30 \mu\text{g/ml}$)를 첨가한 다음 30°C에서 4시간 전배양한 후 팽윤된 포자를 원심분리(5,000 rpm, 10분)하여 수확하였다. 이를 삼투압 안정제로서 0.6M NaCl이 첨가된 50 mM phosphate buffer(pH 5.0)로 두번 세척한 다음 동일 완충액으로 용해한 Novozyme을 최종농도가 10 mg/ml 되게 첨가하고 40°C에서 3시간 동안 진탕배양(120 rpm)하여 원형질체를 형성시켰다(15, 16).

원형질체의 순수분리 및 재생

원형질체의 순수분리는 Boss 등(15)이 사용한 방법에 따라 투명 원심분리관에 30% sucrose 용액 7 ml를 넣고, 준비된 원형질체 현탁액 1 ml를 천천히 가한 후 원심분리(400×g, 20 min)하여 포자와 세포벽 단편을 침전시키고 buffer와 sucrose 층 사이로 이동된 원형질체 부분만을 멸균된 피펫으로 회수하였다. 이를 stabilizing buffer 5 ml와 혼합한 다음 세척하여 원형질체를 순수분리하고, 세포벽을 재생시키기 위해서는 삼투압 안정제로 적당히 희석한 후 재생용 배지 각각에 0.7% soft agar가 함유된 동일 재생배지로 중층한 다음 30°C에서 5~6일간 배양하여 콜로니를 형성시켰다(16). 원형질체 재생물은 순수분리된 원형질체를 재생배지에 도말하여 나타난 콜로니 수에 대한 효소를 처리하지 않은 포자를 도말한 후 나타나는 총 콜로니 수에서 원형질체에 삼투압 충격을 가한 후 도말하여 나타난 콜로니 수를 빼 것의 백분율로 나타내었다.

Table 1. Composition of the media used for the regeneration and fusion of protoplast

Compound	Media (g/l)						
	MM	CM	CYM	CCB	CSC	CME	CBE
Glucose	20	20	20	20	20	20	20
Sucrose					20	20	20
Yeast extract		0.5	10	2	2	2	2
Peptone		2	2	2	2	2	2
K ₂ HPO ₄	1	1	1	1	1	1	1
KH ₂ PO ₄	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Casamino acid				5	5		5
Bovine serum albumin	5	5		5			
Myoinositol						0.5	0.5
Ergosterol						0.1	0.1
Bacto agar	20	20	20	20	20	20	20

원형질체의 융합

순수분리된 두 원형질체를 동량씩(2×10^8 protoplast/ml) 혼합하고 원심분리한 다음 최소량의 stabilizing buffer로 재현탁한 액에 10 mM CaCl₂가 함유된 30% PEG 용액(pH 7.5) 1 ml를 첨가하여 37°C에서 10분 반응시킨 후 0.6M NaCl이 첨가된 최소액체배지 6 ml로 희석함으로써 PEG의 독성을 감소시키고 stabilizing buffer 6 ml로 세척한 다음 최종적으로 5 ml의 stabilizing buffer에 현탁하였다. 이를 CBE와 MM 배지상에서 soft agar 0.7%가 함유된 동일한 배지 5 ml로 중층하고 30°C에서 5~6일간 배양하여 형성된 콜로니를 관찰하였다. 융합빈도는 MM에 나타난 콜로니 수를 CM에 나타난 콜로니 수로 나눈 값으로 나타내었다(19, 20).

융합주의 유전 안정성

MM 배지에서 1개월간 보존된 균주와 새로운 MM 배지에 계속 계대배양한 균주를 CM에 접종하여 30°C에서 3일간 배양한 후 분생포자를 멸균 생리식염수로 현탁하고 CM에 다시 배양시켜 나타난 콜로니를 CM과 MM에 replica하여 CM상의 콜로니 수에 대한 MM에 나타난 콜로니 수를 구하여 유전안정성을 segregant 백분율 $[(1 - \text{MM colony 수} / \text{CM colony 수}) \times 100]$ 로서 나타내었다.

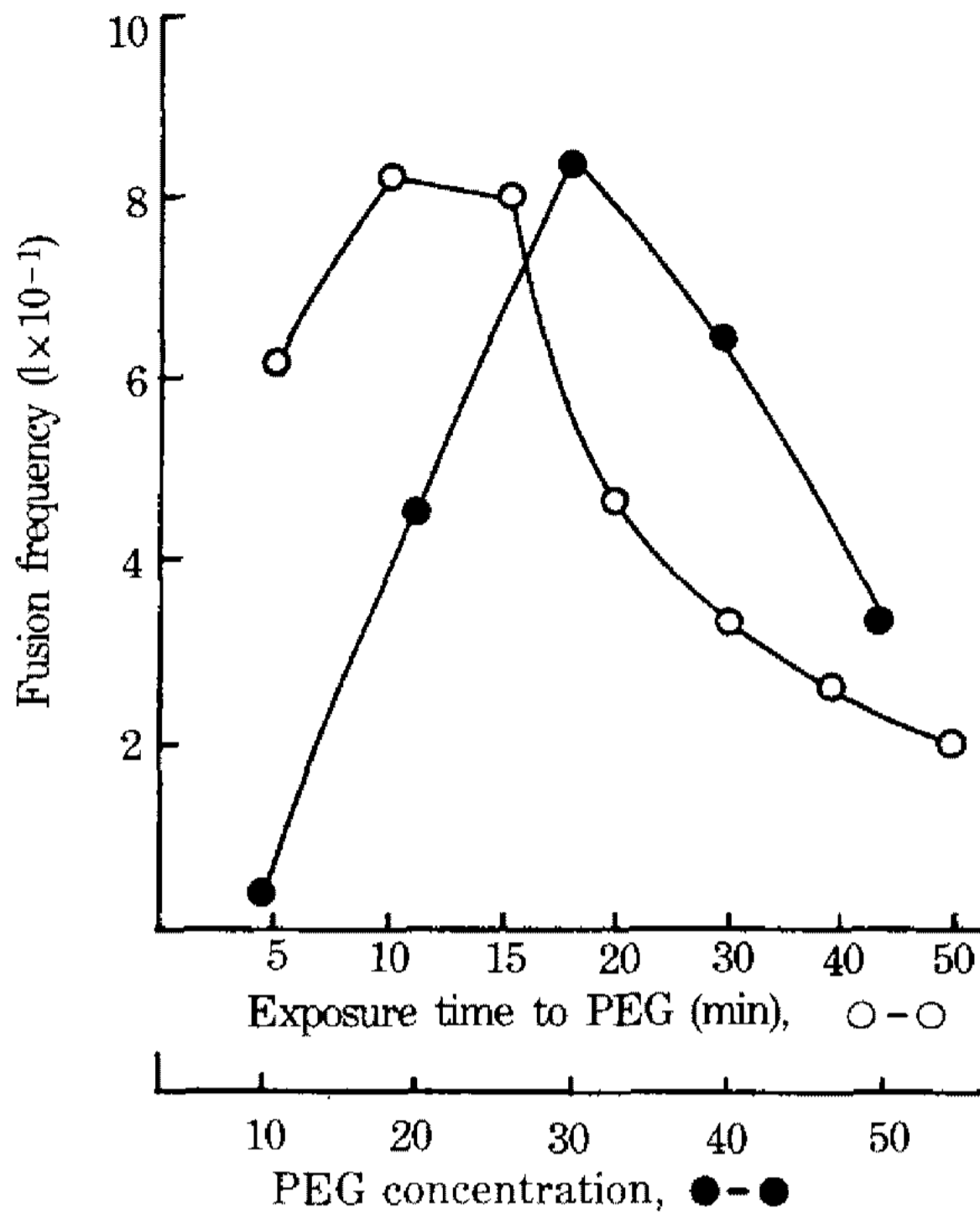


Fig. 1. Effect of PEG concentration and exposure time to PEG on the fusion frequency.

DNA 함량 측정

포자의 DNA 정량은 Herbert 등의 방법 (21)에 준하였으며 DNA 표준물질은 calf thymus DNA 를 사용하였다.

핵 염색

포자를 ethanol-glacial acetic acid (3/1) 혼합액으로 10 분간 고정하여 95% ethanol 과 증류수로 세척하고 실온에서 5 분 동안 1 M HCl 에 담가둔 후 다시 60°C 에서 7 분 동안 1 M HCl 에 침지시킨 다음 증류수, phosphate buffer (pH 6.9) 순으로 세척한 것을 Giemsa 용액에 2 시간 염색하였다. 과도한 염색액은 phosphate buffer 와 증류수로 세척한 후 자연건조하여 검정하였다 (22).

결과 및 고찰

원형질체의 융합

PEG 농도 및 처리시간의 영향: 분자량 1000~7500 의 polyethylene glycol (PEG) 이 주로 원형질체 융합에 이용되는데 본 실험에서는 PEG 4000 이 양호하였다. 10 mM CaCl₂ 가 함유된 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) 에 용해된 PEG 4000 을 농도별로 37°C, 30 분 처리하여 0.6 M NaCl 이 첨가된 stabilizing buffer 로 적절히 희석

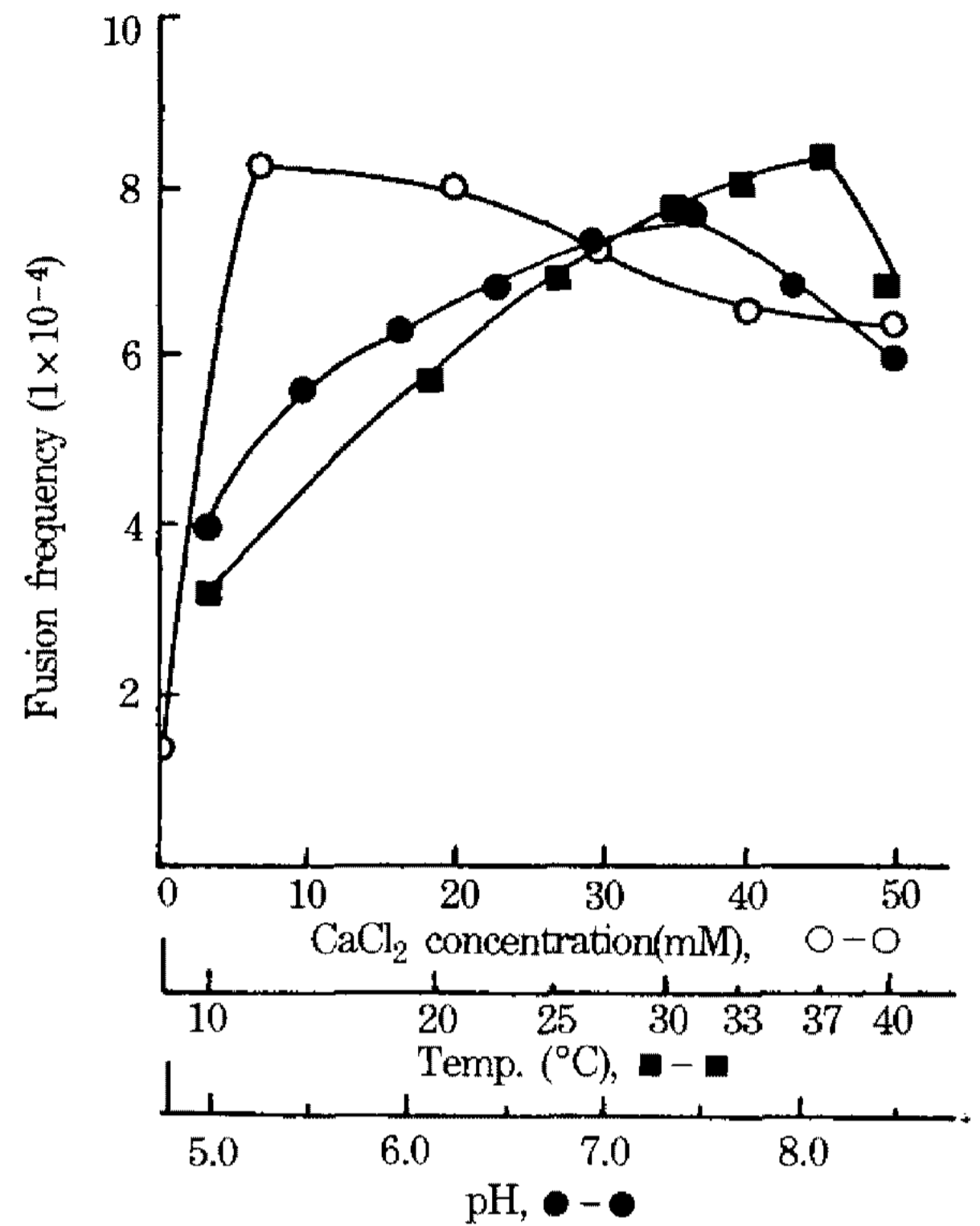


Fig. 2. Effect of CaCl₂ concentration, temperature and pH on the fusion frequency.

pH 5.0-6.5: 50 mM Citrate buffer
 pH 7.0-7.5: 50 mM Phosphate buffer
 pH 8.0-9.0: 50 mM Tris-Cl buffer

한 후 CBE 와 MM 의 재생배지에서 증충하여 재생시켰을 때 30% 농도에서 가장 양호하였으며 처리시간은 10~15 분에서 융합률이 우수하였다 (Fig. 1). 20% 이하에서는 PEG 가 원형질체의 안정화 효과가 부족하고, 40% 이상에서는 원형질체의 shrink 를 초래하여 osmotic damage 가 일어날 수 있으며, 또한 PEG 자체가 원형질체에 독성을 유발함으로써 30 분 이상 처리시에는 급격한 감소를 보인다는 Anne 과 Perberdy 의 보고 (29) 와 일치하였다.

CaCl₂ 농도의 영향: 30% PEG 4000 에 여러 농도의 CaCl₂ 를 첨가하여 융합빈도를 조사한 결과 융합빈도는 Fig. 2 와 같이 CaCl₂ 가 10 mM 일 때 가장 좋았고, 20 mM 이상 첨가시에는 약간 감소하는 경향을 보였다. 적당량의 Ca²⁺ 첨가는 융합 촉진제로서 응집 효과를 증대시켜 융합을 증가시키며 또한 Ca²⁺ 의 첨가량은 PEG 의 분자량과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고한 Freczy 등의 결과 (30) 와 비슷하였다.

pH 및 온도의 영향: 10 mM CaCl₂ 가 함유된 30% PEG 4000 용액에 pH 가 상이한 각종 완충용액을 첨가하여 pH 에 따른 융합빈도를 조사한 결과 (Fig. 2), 융합을 위한 최적 pH 는 7.0~7.5 범위였고 pH 5.0 이하와

Table 2. Effect of composition of media on the regeneration of protoplast

Media	Regeneration rate (%)	
	<i>Asp. wentii</i> L-803	<i>Asp. nidulans</i> L-1002
CM	8.38	8.54
MM	1.24	1.39
CYM	8.52	8.82
CCB	14.93	16.02
CSC	18.83	20.42
CME	26.54	24.48
CBE	32.13	34.54

pH9.0 이상에서는 다소 감소하였다. 원형질체 형성시 완충용액의 최적 pH는 5.8인데 반해 이 pH에서는 융합빈도가 감소하는 현상을 볼 수 있었으며, 융합시 PEG의 활성과 균의 특성에 따라 최적 융합 pH와 원형질의 형성 pH는 상이한 것으로 사료된다. 또한 여러 온도범위에서 10분간 반응시 최적 융합온도는 37°C였고, 40°C 이상과 25°C 이하에서는 융합빈도가 상당히 낮았다(Fig. 2).

원형질체의 재생

배지조성의 영향 : 원형질체 재생에 미치는 재생배지조성의 효과를 조사한 결과, Table 2와 같이 0.05% 이상의 yeast extract 첨가는 재생률에 효과가 인정되지 않았다. 한편, 세균의 세포벽 재생에 중요한 역할을 하는 casamino acid와 bovine serum albumin(BSA) (23)을 각각 0.5% 첨가한 CCB에서는 *Asp. wentii* L-803이 14.93%, *Asp. nidulans* L-1002가 16.02%의 재생률을 보여 이 물질들이 세포벽 재생에 필요한 효소의 생합성에 중요한 인자로 작용하여 정상세포로의 전환을 촉진시키는 것으로 생각된다. 또한 세포막 안정성을 향상시키는 물질로 알려진 myoinositol과 ergosterol(24-26)을 각각 0.05%, 0.01% 첨가한 CME에서는 재생률이 두 균주 모두 24% 이상의 증가를 보였는데, L-1002보다 L-803의 세포벽 재생에 효과가 큰 것으로 나타났다. 이는 두 물질이 세포의 생존력과 세포막의 안정성 유지는 물론 균의 대사와 분열을 촉진하여 원형질체를 안정화시키고 재생을 증가시키는 것으로 추측된다. Casamino acid, BSA, myoinositol, ergosterol이 혼합 첨가된 CBE에서는 두 균주 모두 30% 이상의 재생률을 보여 재생을 위한 배지는 CBE를 사용하였다. 이런 결과는 Stephen 등이 myoinositol, ergosterol 및 BSA를 첨가

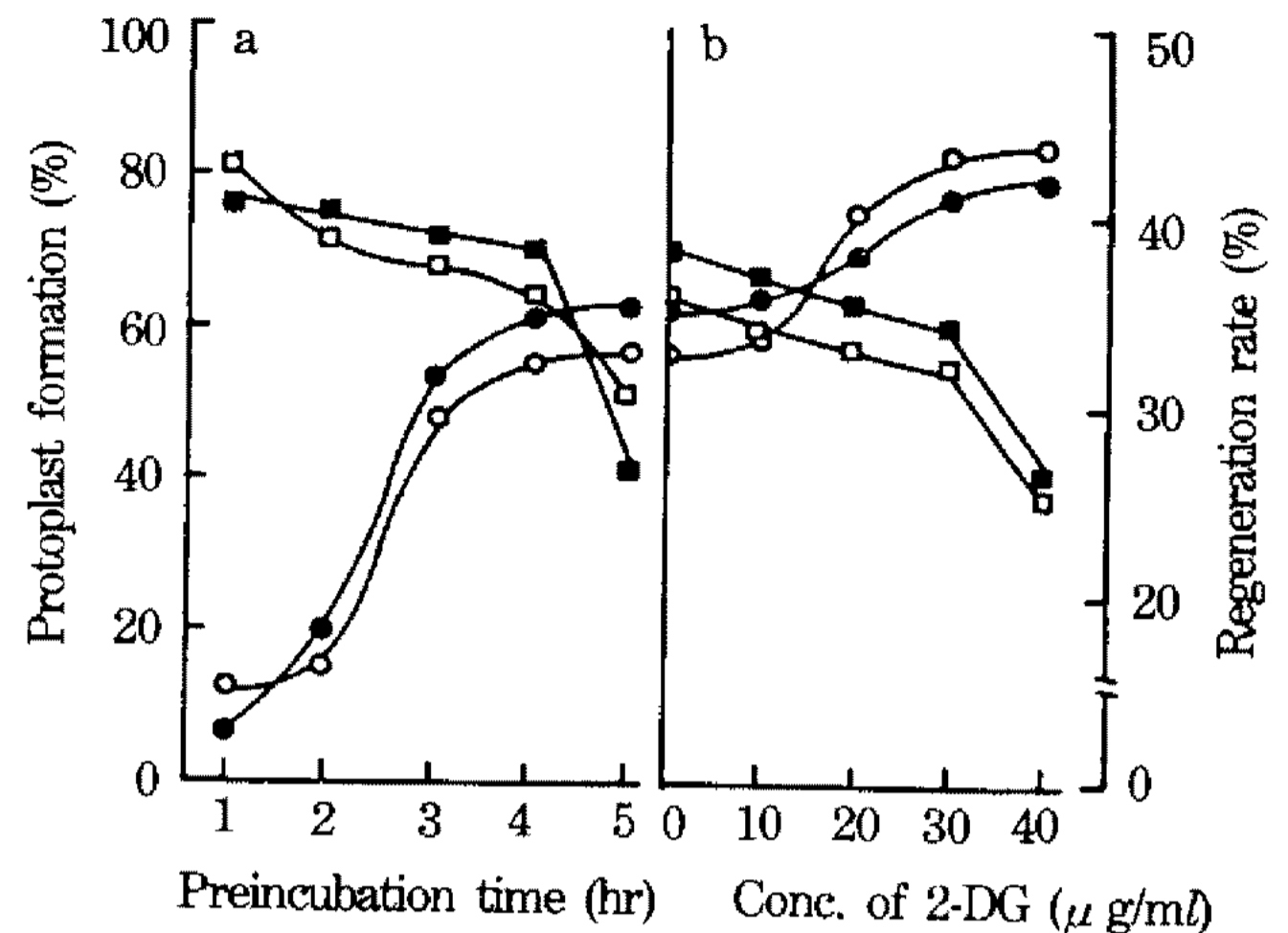


Fig. 3. Effect of preincubation time (a) and conc. of 2-DG (b) on the regeneration of protoplast.

Protoplast formation (%) Regeneration rate (%)
 ○—○: *Asp. wentii* L-803 □—□: *Asp. wentii* L-803
 ●—●: *Asp. nidulans* L-1002 ■—■: *Asp. nidulans* L-1002

했을 때 10~18%의 재생률이 증가되었다는 보고(27)에 비하여 좋은 결과를 보여주었다.

전배양 시간의 영향 : 전배양 시간이 원형질체의 재생에 미치는 효과를 조사한 결과, 원형질체 형성률은 전배양 시간에 따라 현저한 차이를 보이나 재생률은 전체적으로 큰 변화가 없었고, 단지 4시간 이상의 전배양을 할 때에는 세포벽 재생에 좋지 못한 영향을 보였는데 이는 과도한 세포벽의 분해에 기인한 것으로 사료된다. 특히 이런 경향은 *Asp. nidulans*에서 더욱 현저히 나타났다(Fig. 3a).

2-Deoxy-D-glucose의 영향 : 분생포자 현탁액의 2-DG 질체 형성률은 농도가 증가함에 따라 현저한 효과가 있었지만, 재생률은 30 μg/ml 이상 처리시 오히려 급격히 감소하였다(Fig. 3b). 2-DG는 곰팡이와 효모의 세포벽 합성을 저해하는 물질로서 전배양시 첨가하면 원형질체 형성은 증가되나 재생시 호흡활성의 저해와 대사과정에서 이상을 유발할 가능성이 있어 주의가 요구된다(28).

융합주의 선발 및 성질

융합주의 선발 : 최적 융합조건에서 융합시킨 융합주를 친주로 전환되는 것을 방지하기 위하여 최소배지에 7일간 연속 계대배양하여 안정화를 시킨 다음 최소배지에서 생육이 왕성한 균주를 선발하였고, 이를 효소 생산용 배지에서 cellulase complex와 xylanase 활성을 최종 선정된 결과는 Table 3과 같다. 융합주 FWN-56은 모 균주에 비하여 CMCase, avicelase, β-glucosidase 및 xylanase 활성이 각각 2.3배, 1.5배, 1.8배, 2.5배 중

Table 3. Comparison of various enzyme activity in wild types, mutants and fusants selected

Strains	Enzyme activity (units)			
	CMCase	Avicelase	Glucosidase	Xylanase
Wild types				
<i>Asp. wentii</i>	2.13	1.69	0.88	4.38
<i>Asp. nidulans</i>	1.58	0.68	1.22	5.27
Mutants				
MW-289 (lys-met-)	3.06	1.83	0.86	4.82
MW-124 (pro-)	1.50	1.03	1.81	7.05
Fusants				
FWN-18	3.61	1.91	1.64	5.70
FWN-56	4.89	2.56	2.17	13.39
FWN-132	3.12	1.08	1.30	9.62
FWN-149	2.56	1.53	0.96	9.32
FWN-252	3.97	3.11	2.35	10.57

Table 4. Genetic stability of fusants selected.

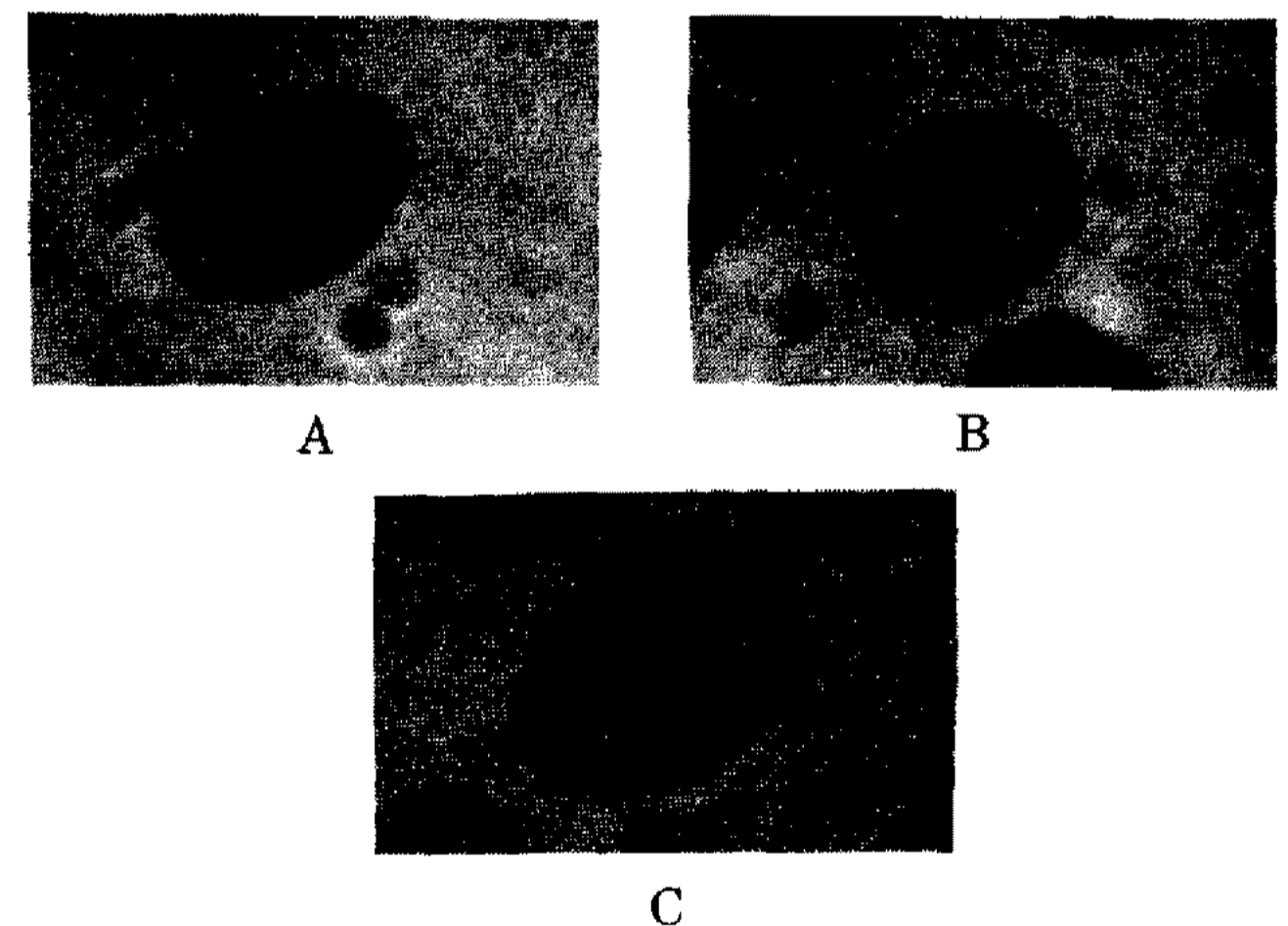
Fusants	No. of colonies ($\times 10^6$)		No. of colonies ($\times 10^5$) lys lys+met pro met Segregant (%)
	Minimal medium (mM)	Complete medium (cm)	
FWN-56	2.11	2.13	0.94
FWN-252	2.25	2.25	0

Table 5. DNA content in conidia of mutants and fusants.

Strains	DNA content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of conidia)
Parent strains	
Mw-289	6.82
Mw-124	6.33
Fusants	
FWN-56	9.25
FWN-252	10.10

가하였다.

유전적 안정성: 융합주 중 cellulase complex 및 xylanase 생성능이 다른 균주에 비해 높은 FWN-56 과 252 균주를 MM에서 7일 간격으로 2회 연속 계대배양한 것을 CM에서 30°C, 3일 배양하고 이 콜로니를 MM 과 lysine, proline, methionine, lysine+methionine

**Fig. 4. Photomicrographs of nuclei of auxotrophic mutants and fusant.**

A, *Asp. wentii* MW-289; B, *Asp. nidulans* MN-124; C, fusant FWN-56

이 각각 함유된 최소배지에 옮겨 segregation pattern을 조사하였을 때에 FWN-56은 약 34%가 FWN-252는 25%가 segregant로 전환되는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같이 segregant 되는 빈도가 높은 것은 최소배지상에서 융합주를 보존한 기간이 15일로 비교적 짧은 것에 있는 것으로 판단되어 이들 prototroph를 다시 최소배지에 1개월간 보존한 후 조사한 결과 FWN-56 균주에서 약 1%가 segregant로 되었을 뿐 FWN-252는 매우 안정된 유전적 특성을 나타내었다(Table 4).

DNA 함량: 각각의 영양요구성 변이주 및 융합주의 분생포자의 DNA 함량은 Table 5와 같다. 융합주의 분생

포자 DNA 함량은 변이주에 비해 1.4 배~1.6 배 정도 많은 것으로 나타났는데 이는 여러 연구자들의 보고(20, 31)와 일치하였다.

핵의 크기: 변이주와 융합주, FWN-56 을 염색하여 광학현미경 관찰을 한 결과, 융합주의 핵은 각 변이주에 비하여 큰 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

요 약

Asp. wentii 와 *Asp. nidulans* 의 원형질체 재생은 2-DG 가 30 μ g/ml 첨가된 포자현탁액을 4 시간 전배양할 때 적당하였고 ergosterol, myoinositol, casamino acid, BSA 가 함유된 CBE 재생용 배지에서 효과적이었으며, 30% 이상 재생률을 나타내었다. 원형질체 융합은 10 mM CaCl₂가 함유된 pH 7.5 의 30% PEG 4000 으로 37°C에서 10 분간 처리했을 때 가장 양호하였으며, 융합 빈도는 8.2×10^{-4} 을 나타내었다. 가장 우수한 융합주인 FWN-56 은 CMCase, avicelase, β -glucosidase 및 xylanase 를 동시에 분비하였으며 친주에 비하여 활성이 2.3 배, 1.5 배, 1.8 배, 2.5 배 각각 증가하였고, 또한 MM 에 4 중 이상 보관 후의 segregant 율이 1% 이내였으므로 유전적 안정성은 높았으며, 분생포자 DNA 함량은 1.4~1.6 배였다. 또한 핵의 크기도 친주에 비하여 큰 것으로 보아 융합주임을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 1987 년도 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행된 연구결과의 일부입니다.

참고문헌

- David, S. and G.R. Mandels: *J. Bacteriol.* **114**(3), 1197-1199 (1980).
- Arati, G., B.K. Ghosh, H. Trimino-Vazquez, D.E. Eveleigh and B.S. Montenecour: *Arch. Microbiol.* **140**, 126-133 (1984).
- Shinsaku, H. and K. Mo: *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(5), 1041-1046 (1986).
- Saroj, M. and K. Gopalkrishnam: *J. Ferment. Technol.* **62**(6), 495-500 (1984).
- Haggett, k.D., W.Y. Choi and N.W. Dunn: *Appl. Microbiol. Biotech.* **6**, 189-191 (1978).
- Gwsennaël, J., B. Pierre and J.P. Aubert: *Nucleic Acid Res.* **14**, 6286-6294 (1986).
- Koide, Y., A. Nakamura, T. Vozumi and T. Beppu: *Agri. Biol. Chem.* **50**(1), 233-237 (1986).
- George, F., O. Neubauer and F. Stutzenberger: *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(1), 201-204 (1984).
- Rolf, G.W. and A.L. Demain: *Appl. Environ. Microbiol.* **40**(3), 675-677 (1980).
- Sung, N.K., K.H. Shim, I.S. Kang and H.K. Chun: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**(1), 17(5), 436-439 (1989).
- Panbangred, W., T. Kondo, S. Negoro and H. Okada: *Eur. J. Biochem.* **138**, 267-273 (1984).
- Sung, N.K., J.S. Rho, S.K. Park and Y.C. Chung: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**(4), 275-281 (1988).
- Kevei, F. and J.F. Perberdy: *J. Gen. Microbiol.* **102**, 255-262 (1977).
- Davis, B.: *Trans. Br. Mycol. Soc.* **69**(2), 207-212 (1977).
- Bos, C.J. and S.M. Slakharst: *Can. Microbiol.* **27**, 400-407 (1981).
- Moore, P.M. and J.F. Perberdy: *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**(3), 421-425 (1976).
- Toyoma, H., A. Shinmyo and H. Okada: *J. Ferment. Technol.* **61**(4), 409-411 (1983).
- Sung, N.K., S.W. Lee, K.H. Shim, Y.C. Chung and J.S. Rho: *J. Inst. Agri. Resouce Utilization (Gyeongsang National Univ.)* **23**, 137-144 (1989).
- Dales, R.B.G. and J.H. Croft: *FEMS Microbiol. Lett.*, **1**, 201-204 (1977).
- Toyoma, M., A. Shinmyo, H. Okada and K. Yamaguchi: *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(2), 362-368 (1984).
- Herbert, D., P.J. Phipps and R.E. Strange: *Meth. in Microbiol.* **5B**, 324 (1971).
- Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot: *Arch. Microbiol.* **115**, 143-149 (1977).
- Gabor, M.H. and R.D. Hotchriss: *J. Bacteriol.* **137**, 1346-1353 (1979).
- Hanson, B.A. and R.L. Hester: *J. Bacteriol.* **142**, 79-89 (1980).
- Atkinson, K.D. and R.M. Ramirez: *J. Bacteriol.* **160**, 80-86 (1984).
- Hossack, J.A. and A.M. Rose: *J. Bacteriol.* **127**, 67-75 (1976).
- Stehen, E.R. and A. Nasim: *Can. J. Microbiol.* **27**, 550-553 (1981).
- Kratky, Z., P. Biely and S. Bauer: *Eur. J. Biochem.* **54**, 459-467 (1975).
- Anne, J. and J.F. Perberdy: *J. Gen. Microbiol.* **92**, 413-417 (1976).
- Ferenczy, L., F. Kevei, M. Szegedi, A. Franko and F. Rohik: *Experientia*, **32**, 1156-1158 (1976).
- Chung, C.K., C.R. Park, S. Bai, S.B. Chun and K.C. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol.* **16**(3), 182-186 (1988).

(Received July 30, 1990)