

핵전이에 의한 *Aspergillus oryzae* var *oryzae*와 *Penicillium verruculosum* F-3의 잡종으로부터 Amylase 생산

양영기* · 박열 · 김성준 · 문명남 · 박형남 · 임채영 · 이영하¹
조선대학교 자연과학대학 유전공학과, ¹충남대학교 자연과학대학 미생물학과

Production of Amylase from Intergeneric Hybrids between '*Aspergillus oryzae* var *oryzae* and *Penicillium* *verruculosum* F-3 by Nuclear Transfer

Yang, Young-ki*, Yeol Park, Sung-Joon Kim, Myung-Nim Moon,
Hyung Nam Park, Chae-Young Lim and Young-Ha Rhee¹

Department of Genetic Engineering, Chosun University
¹Department of Microbiology, Chungnam National University

Abstract — Intergeneric hybrids formed between *Aspergillus oryzae* var *oryzae* and *Penicillium verruculosum* F-3 were obtained by nuclear transfer technique. Several auxotrophic mutants isolated from conidio-spores of the two strains mutagenized with ultraviolet and N-methyl-N-nitrosoguanidine. Optimal conditions for formation of intergeneric hybrids were investigated. Frequencies of hybrid formation by nuclear transfer were $3 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-5}$. From observation of genetic stability, conidial size, DNA content, nuclear stain, it was suggested that their karyotypes are aneuploid. The hybrid possesses the 1.3~2.2 fold higher amylase activities than those of parental strains. It was also revealed that some hybrids had different isozyme patterns compared to those of parental strains by amylase activity assays.

Amylase는 생명체의 저장에너지원인 전분 및 글리코겐등의 글리코실 linkage에 반응하여 dextrin, oligosaccharide 및 glucose등을 생성하는 가수분해 효소로 전분의 주성분인 α -D-1,4 결합으로 된 amylose와 α -D-1,4 결합과 α -D-1,6 결합으로 구성된 amylopectin을 가수분해하며 endo 형과 exo 형으로 나누어진다. 먼저 endo 형은 α -1,4와 α -1,6 결합을 임의로 절단하는 효소로 α -amylase(EC 3.2.1.1, α -1,4-glucohydrolase)와 debranching enzyme인 isoamylase(EC 3.2.1.6.8, glucogen glucanohydrolase)와 pullulanase(EC 3.2.1.4.1, amylopectin-6-glucohydrolase)가 있으며, 비환원성 말단에서 특정수의 포도당 단위로 절단하는 exo 형에는 β -amylase(EC 3.2.1.2, α -1,4 glucoamylase)와 glucoamylase(EC 3.2.1.3, amyloglucosidase)로 구분(4)되며 생성된 당의 형태는 α 형, α 형으로 구분된다. 이러한 amylase는 동

물계, 식물계 미생물계등 효소원이 매우 다양하며, 특히 미생물계의 amylase는 다른 효소원에 비해서 산, 알칼리 및 열에 대한 안정성이 매우 높아 다량의 균일성 있는 효소를 얻는데 사용하고 있으며, 배양 조건을 조절하여 생산량을 증대시킬 수 있기 때문에 산업적으로 유용하게 사용되고 있다. 균류에 있어서 이러한 전분분해효소는 *Aspergillus* 속, *Rhizopus* 속, *Paecilomiceces* 속등이 amylase 생산능이 우수한 것으로 알려져 있으며 이들의 잡종생산은 전분분해에 효과적인 균주의 확보와 발효공정을 통한 대량생산이 가능하다는 점에서 매우 의미있는 일로 사료된다.

미생물의 우수균주 개발방법은 종래에는 돌연변이 유발이나 교잡을 통하여 이루어져 왔으나 상대적으로 효율이 낮고 특정산물의 생산에 한계가 있으므로 보다 분자적인 접근 방법이 필요하게 되어 최근에는 원형질체 융합법과 핵전이 및 유전자 재조합기술이 이용되고 있다. 산업적으로 유용한 우수균주의 육종법으로 이용이 인정(10)된 원형질체 융합기술은 잡종선택에 있어서 융합에 사용될 모균주는 서로 상이한 유전자

Key words: *Aspergillus oryzae* var *oryzae*, *Penicillium verruculosum* F-3, nuclear transfer, amylase
*Corresponding author

marker를 가진 변이주를 이용하여야 하는데 야생형 균주는 특정 유전자표지를 갖고 있지 않아 융합에 이용하는 방법이 없고 이종간에는 융합이 어렵거나 설사 융합이 이루어졌다 할지라도 생육기간이 지극히 한정되는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근 이용되고 있는 핵전이는 Ferenczy 등(6)에 의하여 최초로 시도되었는데 이 방법은 핵공여체 균주에 영양요구성 돌연변이와 같은 유전자 표지를 도입하는 번거로움과 유용한 형질이 돌연변이에 의해 저해되는 위험성을 극복할 수 있는 기술이다.

따라서 본 연구는 핵전이법(6, 13, 15)을 이용하여 *Aspergillus oryzae var oryzae*와 *Penicillium verruculosum* F-3의 잡종을 유도하고 amylase 활성이 증진된 균주를 선발함으로써 전분분해의 우수균주 개발 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 실험에 사용된 균주인 *Aspergillus oryzae var oryzae* KCTC 2114는 한국과학기술연구원 유전공학연구소 유전자원센터에서, *Penicillium verruculosum* F-3은 전남대학교 유전공학과에서 각각 분양받아 PDA (Difco)사면배지에 각각 접종하여 30°C에서 4일간 계대배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였고 완전배지로는 PDA배지에 colony 크기를 제한하기 위해 0.2%의 oxgall을 첨가하였으며, 최소배지로는 dextrose 10 g, minimal salt stock solution 20 ml에 균주에 따른 영양요구물 및 colony의 크기를 제한하기 위해 sodium desoxycholate(SDC)를 0.02% 되게 첨가하여 제조(10)하였다. 환원용배지로는 완전배지와 최소배지에 삼투안정제 KCl을 0.6 M로 되게하여 사용하였다.

돌연변이 유도 및 영양요구주의 분리

A. oryzae var oryzae KCTC 2114 및 *P. verruculosum* F-3을 완전배지에서 30°C로 4일간 배양하여 분생포자현탁액(2×10^7 conidia/ml)을 만든 후, 10 ml의 분생포자 현탁액을 1%의 생존율이 되도록 자외선을 조사한 후, Fries 등(10)의 방법을 변형한 여과법을 사용하여 액체 최소배지에 접종하고 30°C에서 18시간 배양하여 야생형 분생포자를 발아시킨 후, 멸균된 sintered glass filter(porosity 40~60 μ m)로 여과하고 미발아 포자만을 수확하여 자외선 유도 변이주를 얻었으며, 계속해서 50 mM Tris maleic acid buffer(pH 6.0)로 현탁시킨 0.2% MNNG 용액 0.5 ml를 가해

최종농도가 200 μ g/ml 되게 하여 30°C에서 25~30분간 반응(50% 생존율)시키고 원심분리(2,600 xg, 15 min)한 후, 최소배지에 배양하여 미발아 포자만을 수확하여 자외선 및 MNNG 이중처리주로 하였다. 변이주의 영양요구성을 검토하기 위해 여지절편에 각종 아미노산을 적신 auxanotroph법에 의하여 영양요구물질을 확인하였다.

원형질체의 형성 및 재생

최소액체 배지에 분생포자 현탁액(1.0×10^7 spores/ml)을 접종한 후, 30°C에서 각각 적절한 시간 동안 배양하여 분생포자를 충분히 부풀린 후 sintered glass filter(3G-2, porosity 40~60 μ m)로 여과하여 집균한 다음 세척하고 두 균주를 각각 0.5%와 1%의 Novozym 234 용액과 2-deoxy-D-glucose(2-DG, 25 μ g/ml)로 처리하여 30°C에서 3시간 반응시키면서 haemocytometer로 원형질체 생성량을 산정하였다. 원형질체의 재생을 위해서 30%(w/v) sucrose 용액을 매체로 원심분리(400 xg, 30 min)하여 상층액을 모은 뒤 농축시키고 세척하였다. 이 순수분리한 원형질체를 삼투안정제로 적절히 희석한 후, 재생완전배지(RCM)에 접종하였고 대조구로는 원형질체에 삼투압 충격을 준 뒤 삼투안정제가 첨가되지 않고 멸균 증류수가 첨가된 완전배지에 접종하여 30°C에서 배양하고 Lee(14)의 방법에 의해 재생율을 산출하였다.

핵의 순수분리 및 핵전이에 의한 형질전환

야생형 균주로부터 핵을 추출하기 위한 방법으로서 Ferenczy 등(7)의 방법을 사용하였는데 원형질체를 형성시킨 후, 1.0×10^7 의 원형질체에 2 ml의 SMC(0.3 M Sucrose, 0.5 mM $MgCl_2$)를 첨가하여 4°C에서 10분간 보관한 후, homogenizer로 10분간 원형질체를 깨뜨리고 이 파쇄액을 원심분리하여 얻은 pellet에 0.6 M sucrose가 첨가된 SMC 2 ml을 가하여 재현탁시킨 후, sucrose discontinuous gradient에 시료 0.36 ml을 가하여 초원심분리(Ultracentrifuge; Hitachi, 90,000 xg, 60 min) 하였다. 이렇게 하여 얻은 nuclear pellet을 1 ml의 0.6 M KCl용액에 재현탁시켜 4°C에 보관하고 이 순수분리된 핵을 사용하였으며, 형질시키고자 하는 *A. oryzae var oryzae*의 야생형과 영양요구성 변이주의 원형질체와 *P. verruculosum* F-3 영양요구성 변이주의 핵을 각각 1.0×10^7 /ml 분리하여 1 ml의 핵과 0.5 ml의 원형질체를 혼합하여 원심분리한 후, 얻어진 pellet에 30% PEG 용액(M.W. 6,000, 10 mM $CaCl_2$, 0.05 M glycine, pH 5.8) 1 ml를 조심스럽게 혼합한 다음 30°C에서 10분간 반응시킨 후,

0.6 M로 적당히 세척하고 환원용 완전배지와 환원용 최소배지 및 완전, 최소배지에 각각 도말하여 30°C에서 5~10일간 배양하였다.

융합체의 자연분리 양상 및 독립영양형 집종의 선발

환원용 최소배지에서 얻어진 이형접합체의 균사체를 완전배지에 옮겨 분생포자를 형성시킨 후, 이들 분생포자를 수확하여 완전배지에 도말하고 생성된 colony를 각종 아미노산이 첨가된 최소배지에 접종하여 그 유전자형을 조사하였다. 그 결과 얻어진 colony중 상보적인 독립 영양형 균주를 선별하고 최소배지에 옮겨 보관하면서 실험에 사용하였다.

유전적 안정성

융합체의 분생포자를 멸균 생리식염수에 1.0×10^7 spores/ml가 되도록 현탁하고 알맞게 희석(30~50 colony/petri dish)하여 완전배지상에 도말한 후 30°C에서 5~6일간 배양하였다. 완전배지에 나타난 colony를 다시 완전배지와 최소배지에 replica하여 완전배지에는 나타나면서 최소배지에는 나타나지 않는 colony를 분리하고 독립영양형의 비를 구하여 colony의 유전적 안정성을 검토하였다.

Conidia의 크기, 핵염색 및 DNA 함량의 측정

Micrometer를 사용하여 *A. oryzae var oryzae*와 *P. verruculosum* F-3의 야생형 균주와 선발된 영양요구성 변이주 및 형질전환체의 conidia 크기를 측정하였으며 모균주와 형질전환체의 핵을 Fournier(7)의 방법으로 염색하여 관찰하고, 또한 형질전환체의 원형질체를 순수분리한 후 Giles와 Myers(8)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 활성도의 측정

단일 탄소원으로 wheat bran 1%를 사용한 최소액체배지에 포자를 1.0×10^7 conidia/ml 되게 접종하여 30°C에서 48시간 배양하고, 이 배양액을 4°C에서 원심분리하여 얻은 상층액을 세포외 조효소 용액으로 사용하였다. Amylase의 효소활성도 측정을 위한 기질로는 soluble starch를 사용하였으며, amylase 활성은 0.2 M 인산완충용액(pH 5.8)에 1%가 되게 제조한 기질용액 0.6 ml에 조효소 용액 0.4 ml을 섞어 30°C에서 30분간 반응시킨 후, Somogyi 방법(19)으로

파장 540 nm의 흡광도로써 유리된 환원당을 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 최종 분해산물 1 μ mole을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하여 분석하였다.

세포외 수용성 단백질의 양상분석

모균주와 형질전환체의 세포외 수용성 단백질의 양상을 알아보기 위하여 Laemmli(13)의 방법으로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 행하였다. 전기영동 gel은 10%를 이용하였고 표준 단백질로는 carbonic anhydrase(M.W. 29,000), trypsin inhibitor(M.W. 36,000), egg albumin(M.W. 45,000), bovine plasma albumin(M.W. 66,000), phosphorylase B(M.W. 97,000)를 사용하였고 stacking gel에서는 100 V, resolving gel에서는 150 V로 전개하고 coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후, 탈색하였다.

활성염색

Non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Davis(6)의 방법을 변형하여 행하였으며, amylase의 활성염색은 Beguin(2) 방법에 의거하여 시행하였다. 즉 전개가 끝난 gel을 soluble starch를 함유하는 replica 위에 밀착시켜 각각 50°C에서 2시간 반응시킨 후, 4°C로 냉각하여 반응을 정지시킨 다음 0.1% congo red로 염색하고, 1 M NaCl로 탈색한 후, 5% acetic acid 용액에 넣어 관찰하였다.

결과 및 고찰

영양요구성 돌연변이주의 분리

1%의 생존율로 자외선과 MNNG에 의해 돌연변이를 유발한 결과를 Table 1에 나타내었다. *A. oryzae var oryzae*에서는 3주 즉, MAV 23(Lys, Met), MAV 77(Leu, Val), MAV 102(Ala)를 획득하였는데 이중 MAV 102는 다른 변이주와는 달리 단일요구성을 나타내었다. *P. verruculosum* F-3의 경우는 6주 즉 MPV 17(Phe, Lys), MPV 31(Ala, Leu), MPV 69(Leu, Met), MPV 86(Ala, Leu), MPV 157(Ala, Met, Leu), MPV 201(Ala)을 획득하였는데 이들중 MPV 157은 삼중요구성을, MPV 201은 단일요구성을 나타내었다. 각각 선발된 변이주의 back mutation frequency를 조사한 결과 *A. oryzae var oryzae*에서는 $2.3 \times 10^{-6} \sim 4.1 \times 10^{-4}$, *P. verruculosum* F-3에서는 $1.1 \times 10^{-6} \sim 4.1 \times 10^{-6}$ 의 수준으로 나타나 안정성이 비교적 낮았지만 이들 변이주중 몇몇은 안정

Table 1. List of mutant strains isolated from *A. oryzae* var *oryzae* and *P. verruculosum* F-3.

Strains	Phenotype	Mutagen	Back mutation frequency
<i>A. oryzae</i> var <i>oryzae</i>			
MAV 23	Lys ⁻ , Met	UV, MNNG	2.4×10^{-5}
MAV 77	Leu ⁻ , Val	UV, MNNG	2.3×10^{-6}
MAV 102	Ala ⁻	UV, MNNG	4.1×10^{-4}
<i>P. verruculosum</i> F-3			
MPV 17	Phe ⁻ , Lys	UV, MNNG	2.3×10^{-6}
MPV 31	Ala ⁻ , Gly ⁻	UV, MNNG	3.2×10^{-8}
MPV 69	Leu ⁻ , Met	MNNG	4.1×10^{-6}
MPV 86	Ala ⁻ , Leu	UV, MNNG	2.4×10^{-7}
MPV 157	Ala ⁻ , Met ⁻ , Leu	UV, MNNG	1.1×10^{-8}
MPV 201	Ala	UV, MNNG	1.7×10^{-6}

Abbreviation used as follows: ¹MAV; Mutant of *A. oryzae* var *oryzae*, MPV; Mutant of *P. verruculosum* F-3.

성이 있는 것으로 생각되었으며, 이들중 성장상태가 좋은 균주를 선발하여 핵전이에 사용하였다. 영양요구성의 검토는 auxonotroph법과 여과법을 병행하여 최종적으로 영양요구성을 결정하였다.

원형질체 형성과 재생

MPV 31은 전배양 약 4시간 후부터 시작하여 약 10시간 후에는 완전히 swollen 되었으며, swollen 되지 않은 분생포자에서는 원형질체가 형성되지 않았고 10시간 전 배양시킨 분생포자에서 최고의 원형질체의 생성을 보였다. MAV 77에서는 약 5시간 후부터 완전히 부풀기 시작하여 약 12시간 후에는 완전히 부풀어 최고의 원형질체 생성율을 보였다. 따라서 공시균주의 분생포자상태를 유지하면서 발아가 시작되기 전인 전배양 후 약 10~12시간 정도가 효소처리의 적정시간임을 알 수 있었다. 세포벽 분해효소로 Novozym 234를 사용한 결과를 Fig. 1에 나타내었는데 MAV 77 및 MPV 31 둘다 1% Novozym 234의 농도에서 가장 높은 원형질체 생성을 보여 원형질체 수는 4.3×10^7 , 1.7×10^7 개로 나타나 Kim(12)의 보고와 유사하게 나타났다. 따라서 두 균주의 세포벽조성은 chitin의 glucosamine에 β -1,3- 또는 β -1,6-glucan이 연결되어 있을 것으로 추측된다(9, 17). 2-Deoxy-D-glucose(2-DG)가 원형질체 형성에 미치는 효과를 알아 본 결과 MAV 77의 경우 무처리시에 약 35%의 생성율을 보였으나 25 μ g/ml 처리시에 약 2배의 상승율을 보였으며, MPV 31의 경우 무처리시에 약 25%의 생성율을 보였으나 25 μ g/ml로 처리할 경우 약

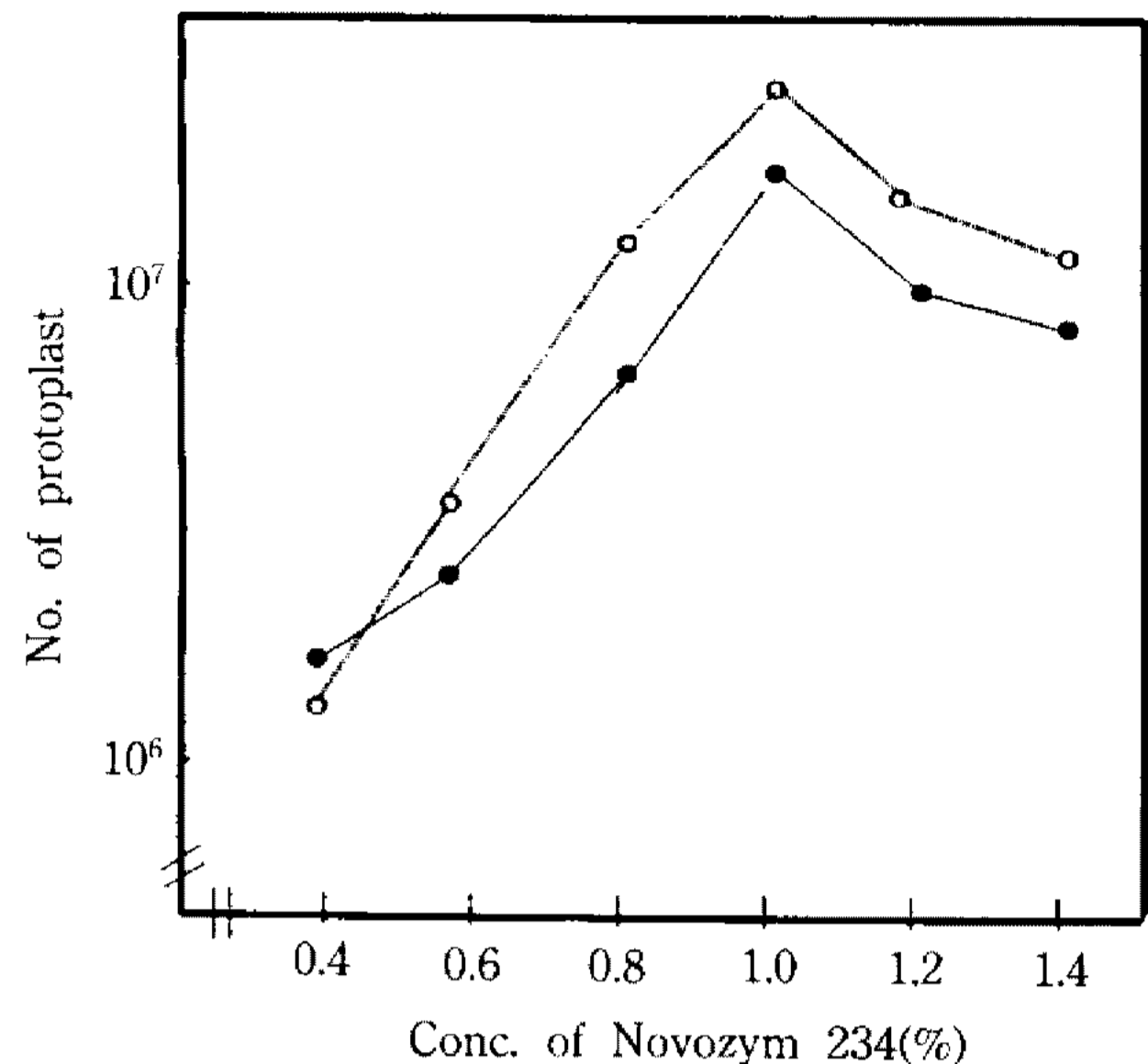


Fig. 1. Effect of Novozym 234 concentration on the formation of protoplasts from *A. oryzae* var *oryzae* (○) and MPV 31 (●).

The reaction was performed for 2 hrs at 30°C with gentle shaking.

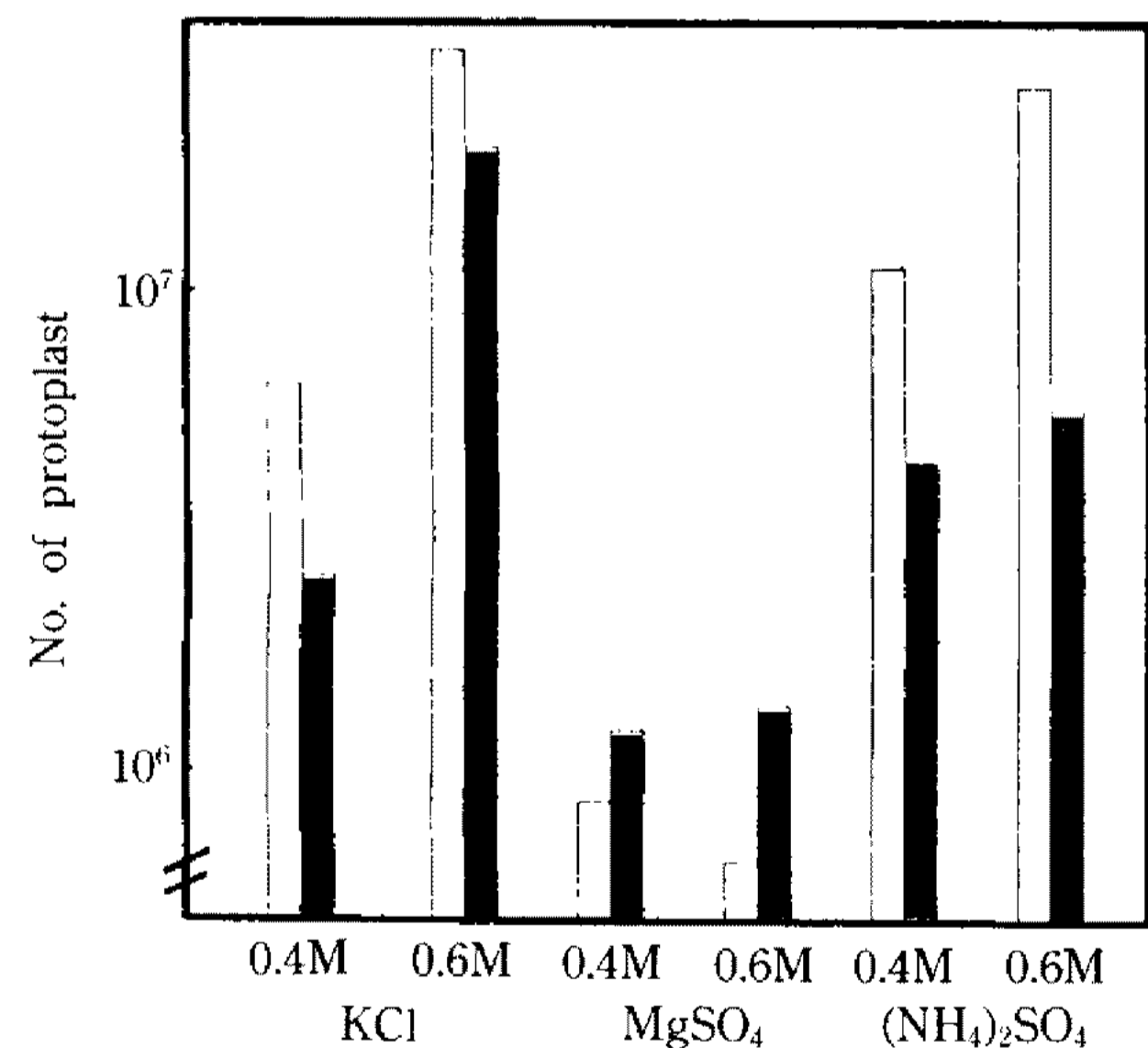


Fig. 2. Effect of concentration of different osmotic stabilizer on the formation of protoplast of *A. oryzae* var *oryzae* (□) and MPV 31 (■).

The reaction was performed with 1% Novozym 234 for 2 hrs at 30°C.

2배의 원형질체 생성 효과를 보여 2-DG가 팽윤된 포자의 새로운 세포벽 합성을 저해하여 세포벽 분해효소의 작용을 보다 쉽게 하도록 한다는 보고(3)와 일치하였다. MAV 77과 MPV 31의 원형질체 형성에 대한 삼투안정제의 종류별(KCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄) 및 농도별 효과를 Fig. 2에 나타내었는데 1% Novozym 234로 2시간 반응시켰을 때 0.6 M KCl이 MAV

77의 경우 4.6×10^7 , MPV 31의 경우는 3.2×10^7 으로 가장 최적이었고, $MgSO_4$ 가 가장 낮은 효율을 나타내었다. 또한 원형질체의 재생비율을 구한 결과를 Table 2에 나타내었는데 MAV 77의 경우 원형질체 재생에 있어서도 원형질체 형성에 효과적이었던 0.6 M KCl이 56.4%로 가장 높은 효율을 나타내어 원형질체 형성과 재생시 최적 삼투안정제이며 나머지도 9.1~53.2%로 $(NH_4)_2SO_4$ 는 비교적 좋은 효율을 나타내었으나 KCl, NH_4Cl 은 저조한 경향을 나타낸 반면 MPV 31에서는 0.6 M $MgSO_4$ 가 52.3%로 최고 효율을 나타내었음에 반하여 KCl과 $(NH_4)_2SO_4$ 는 효율이 저조하였다. 이는 Hong 등(11)이 *Trichoderma koningii*의 분생자로부터 원형질체 형성과 재생에 각각 0.6 M NH_4Cl 과 0.6 M $MgSO_4$ 로 최적 삼투안정제가 다름을 보고한 것과 유사하였다.

Table 2. Effect of osmotic stabilizer on protoplast regeneration of MAV 77 and MPV 31.

Strains	Osmotic stabilizer	Regeneration frequency(%)	
MAV 77	0.4 M $(NH_4)_2SO_4$	42.4	
	0.6 M $(NH_4)_2SO_4$	53.2	
	0.4 M KCl	28.3	
	0.6 M KCl	56.4	
	0.4 M $MgSO_4$	20.1	
	0.6 M $MgSO_4$	11.4	
	0.4 M NH_4Cl	9.1	
	0.6 M NH_4Cl	19.5	
	MPV 31	0.4 M $(NH_4)_2SO_4$	26.8
		0.6 M $(NH_4)_2SO_4$	18.7
0.4 M KCl		36.2	
0.6 M KCl		39.1	
0.4 M $MgSO_4$		21.2	
0.6 M $MgSO_4$		52.3	
0.4 M NH_4Cl		13.4	
0.6 M NH_4Cl		17.8	

잡종의 형성 및 분석

*A. oryzae var oryzae*와 *P. verruculosum* F-3 및 그들 변이주 사이의 핵전이에 의한 잡종의 유도 효율을 Table 3에 나타내었는데 잡종 유도에서 핵전이 효율은 $3.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ 으로 나타났다. 이는 *A. usamii*와 *A. oryzae* 사이의 종간 잡종 유도에서 핵전이가 $2.0 \times 10^{-5} \sim 7.0 \times 10^{-4}$ 의 효율을 보였다는 보고(17)보다는 낮은 경향이였다. 따라서 핵전이 방법도 원형질체 융합법과 마찬가지로 유연관계가 큰 영향을 미치는 것(1, 15, 17)으로 생각되며, 원형질체 융합법으로 잡종형성이 어려운 균주 사이의 잡종형성에 있어 핵전이가 효과적임(17)을 알 수 있었다. 균주 사이 또한 획득된 독립 영양형 잡종을 여지절편법으로 영양요

Table 4. Genetic stability of transformants.

Transformants	Genotype	No. of mean colony		Segregant (%)
		CM	MM	
TAVPW 31-1	Ala ⁻	137	82	59.6
TAVPW 31-2	Gly ⁻	154	38	24.7
TAVPW 31-3	Gly ⁻	129	49	39.3
TAVPW 157-1	Val ⁻	111	17	15.3
TAVPW 157-2	Leu ⁻	101	24	23.8
TAVPA 31-1	Ala ⁻	142	28	19.1
TAVPA 31-2	Ala ⁻	129	51	39.5
TAVPA 157-1	Met ⁻	137	55	39.7
TAVPA 157-2	Ala ⁻	162	99	61.6
TAVPB 31-1	Gly ⁻	136	54	39.7
TAVPB 157-1	Met ⁻	109	10	12.9
TAVPB 157-2	Leu ⁻	123	10	7.4
TAVPB 157-3	Met ⁻	157	98	62.4

Abbreviation used as follows: ¹⁾TAVPW 31: transformant between *A. oryzae var oryzae* and MPV 31, TAVPW 157: transformant between *A. oryzae var oryzae* and MPV 157, TAVPA 31: transformant between MAV 77 and MPV 31, TAVPA 157: transformant between MAV 77 and MPV 157, TAVPB 31: transformant between MAV 102 and MPV 31, TAVPB 157: transformant between MAV 103 and MPV 157.

Table 3. Frequencies of hybrid formation between *A. oryzae var oryzae* and *P. verruculosum* by nuclear transfer.

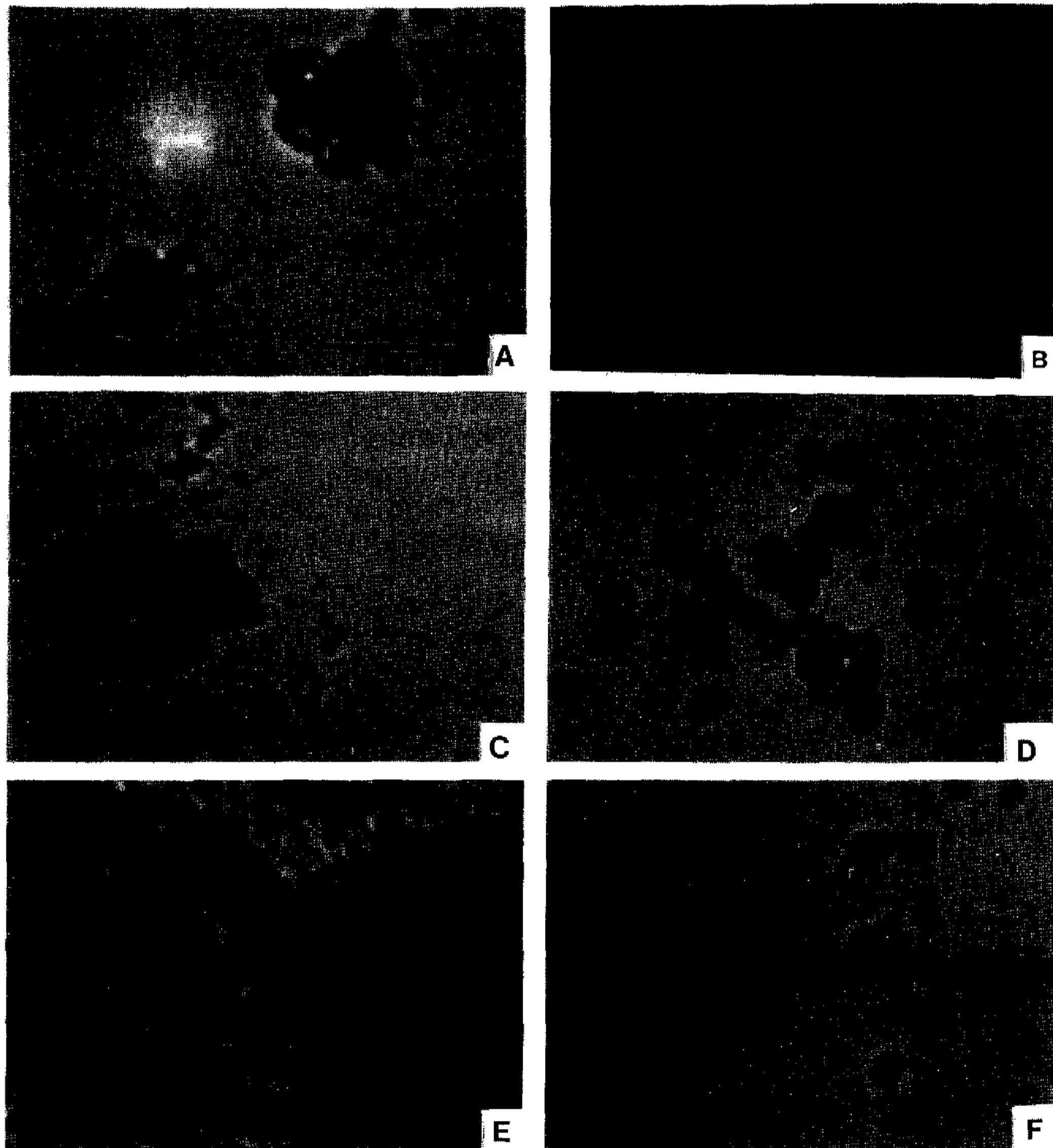
Crosses		frequency($\times 10^{-5}$)
<i>A. oryzae var oryzae</i> (wild)	\times MPV 31 (Ala ⁻ , Gly ⁻) (P)	3
	MPV 157 (Ala ⁻ , Met ⁻ , Leu ⁻) (P)	2
MAV 77 (Leu ⁻ , Val ⁻)	\times MPV 31 (Ala ⁻ , Gly ⁻) (P)	2
	MPV 157 (Ala ⁻ , Met ⁻ , Leu ⁻) (P)	2
MAV 102 (Ala ⁻)	\times MPV 31 (Ala ⁻ , Gly ⁻) (P)	1
	MPV 157 (Ala ⁻ , Met ⁻ , Leu ⁻) (P)	3

(N): donor nuclei, (P): recipient protoplast

Table 5. Conidial size and DNA content of transformants

Strains	Mean conidial size (μm)	DNA content/ 10^8 conidia (μg)
<i>A. oryzae var oryzae</i>	3.2 ± 0.5	12.2
MPV 31	2.6 ± 0.7	5.7
TAVPW 31-1	4.0 ± 0.5	13.6
TAVPW 31-2	4.0 ± 0.7	14.1
TAVPW 31-3	4.2 ± 0.7	15.6
TAVPW 157-1	4.0 ± 0.7	11.7
TAVPW 157-2	3.3 ± 0.7	12.6
TAVPA 31-1	3.5 ± 0.7	15.1
TAVPA 31-2	3.3 ± 0.5	13.7
TAVPA 157-3	4.3 ± 0.7	17.7

구성을 조사하고, 유전적 안정성을 검토한 결과를 Table 4에 나타내었는데 자연 형질분리율이 50% 이내인 균주 TAVPW31-1(Ala⁻), TAVPA157-2(Ala⁻), TAVPB157-3(Met⁻) 3종을 최종 선발하였다. 또한 본 실험에서 모균주로 사용된 *A. oryzae var oryzae*와 MPV 31과 그 형질전환체의 DNA 함량과 conidia의 크기를 비교한 결과를 Table 5에 나타내었는데 모균주와 형질전환체의 conidia의 평균 크기는 $2.6 \pm 0.7 \sim 4.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ 로써 1.3~1.7배 정도 증가하였으며, 형질전환체 사이의 DNA 함량은 DNA 함량은 $5.7 \sim 17.7 \mu\text{g}/10^8$ conidia로써 TAVPA157-3의 경우가 가장 높게 나타났다. 또한 핵염색의 결과를 Fig. 3에 나타내었는데 이상의 결과로부터 형질전환체의 핵형은 다음과 같이 추정할 수 있다. TAVPW31-1,2, TAPW157-1,2, TA-

**Fig. 3. Photography of nuclei in parental strains and their transformant**

A, *A. oryzae var oryzae*; B, MPV 31; C, TAVPW31-2; D, TAVPW157-2; E, TAVPA31-1; F, TAVPA157-2. The bar scale is 10 μm and arrows indicate nuclei.

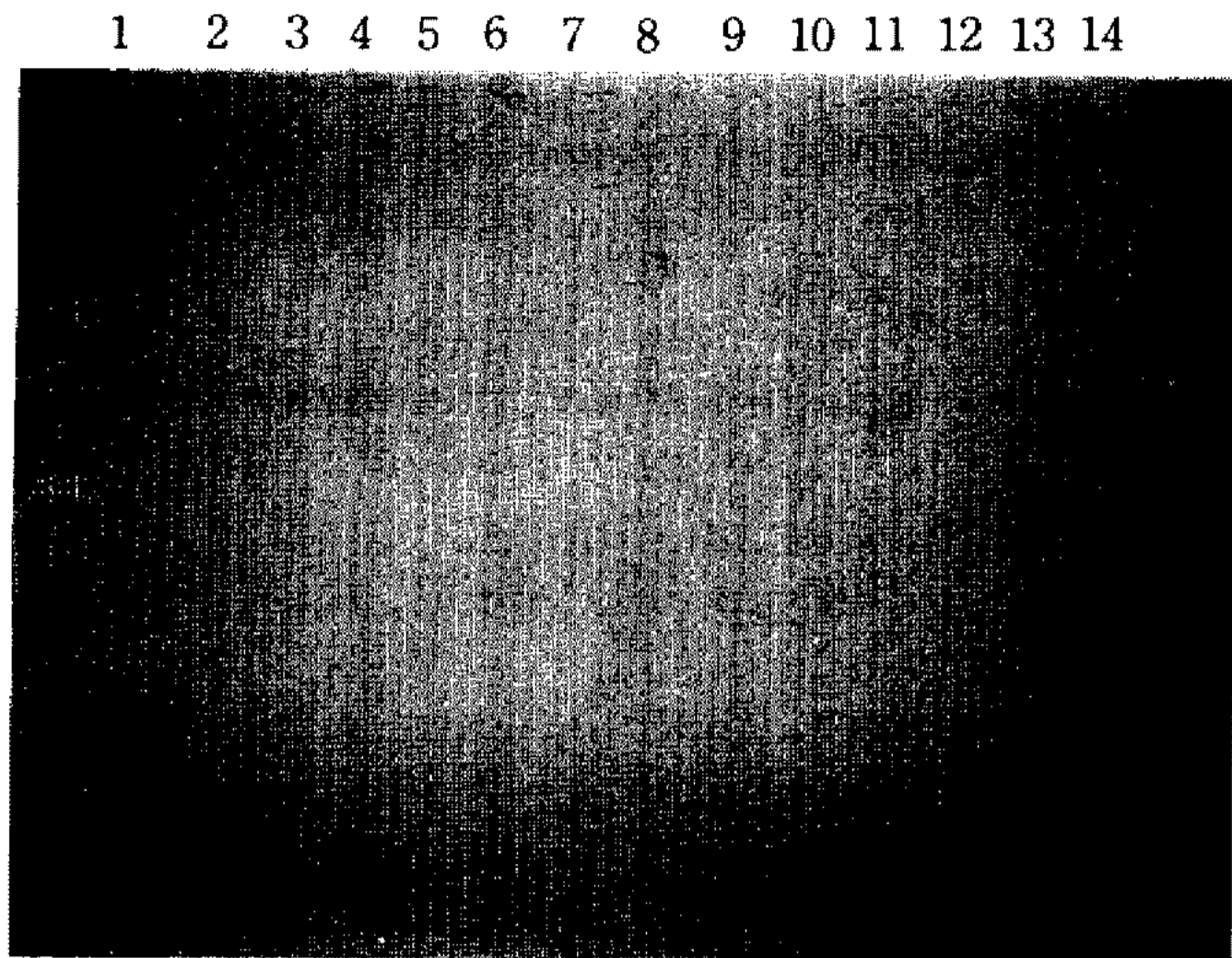


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of total soluble protein in extracellular extracts of parental strains and their transformants.

Lanes: 1, Molecular weight marker; 2, *A. oryzae var oryzae*; 3, MPV 31; 4, TAVPW31-1; 5, TAVPW31-2; 6, TAVPW31-3; 7, TAVPW157-1; 8, TAVPW157-2; 9, TAVPA31-1; 10, TAVPA31-2; 11, TAVPA157-1; 12, TAVPA157-2; 13, TAVPB31-1; 14, TAVPB157-3.



Fig. 5. Isozyme patterns of amylase between parental strains and their transformants

Lanes: 1, MPV 31; 2, *A. oryzae var oryzae*; 3, TAVPW 31-1; 4, TAVPW31-2; 5, TAVPW31-3; 6, TAVPW157-1; 7, TAVPW157-2; 8, TAVPA31-1; 9, TAVPA31-2; 10, TAVPA157-1.

VPA31-2는 반수체에 가까운 aneuploid로 생각되며, TAVPW31-3, TAVPA31-1, TAVPA157-3은 배수체에 가까운 aneuploid로 추정할 수 있었다. 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(15)와는 유사하였

Table 6. Total amylase activities of transformants

Strains	Amylase units	Protein units/mg	Protein content $\mu\text{g/ml}$
<i>A. oryzae var oryzae</i>	64.41	188.89	341
MPV 31	13.02	39.57	329
TAVPW 31-1	89.24	264.81	337
TAVPW 31-2	69.21	191.19	362
TAVPW 31-3	63.07	176.67	357
TAVPW 157-1	71.41	213.16	335
TAVPW 157-2	74.03	165.23	327
TAVPA 31-1	63.21	182.69	346
TAVPA 31-2	78.92	221.06	357
TAVPA 157-1	81.47	253.80	321
TAVPA 157-2	71.12	119.78	356
TAVPB 31-1	69.48	188.29	369
TAVPB 157-3	79.47	227.70	349

다. 핵전이에 의하여 얻어진 잡종의 amylase 생성능을 알아보기 위하여 효소활성도를 측정하였는데 그 결과는 Table 6과 같다. 이 잡종들의 amylase 활성은 TAVPW31-1이 264.81 units/mg로 가장 높게 나타났으며, 나머지 균들에서도 176.67~253.80 units/mg로 모균주에 비해서 1.3~2.2배로 증진된 경향을 볼 수 있었다. 또한 모균주와 형질전환체 사이의 세포외 수용성 단백질의 양상을 비교하기 위하여 SDS-PAGE를 행하고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었는데 모균주와 형질전환체 사이의 단백질의 양상에서 종류와 단백질의 양에 있어 차이가 있음을 알 수 있었으며 또한 선발된 균주의 동위효소 양상을 비교한 결과를 Fig. 5에 나타내었는데 amylase의 동위효소 양상은 서로 유사하게 나타났지만 amylase 활성에 차이가 있음을 관찰할 수 있었다.

요 약

핵전이에 의해 *Aspergillus oryzae var oryzae*와 MPV 31 사이의 잡종을 획득하였고, 그 특성과 Amylase 활성 및 동위효소 양상을 조사한 결과는 다음과 같다. UV와 MNNG의 이중처리에 의해 *A. oryzae var oryzae*와 *P. verruculosum* F-3의 영양요구성 돌연변이를 각각 3주, 6주를 획득하였으며, 핵전이를 위한 원형질체 형성의 최적조건은 pH 5.8, 1.0% Novozym 234, 0.6 M KCl 그리고 효소의 처리시간은 2시간으로 하였다. 또한 원형질체 재생을 위한 삼투안정제도 역시 0.6 M KCl이었으며, 재생율은 각각 56.4%, 52.3%로 나타났다. 핵전이에 의한 형질전환율은 3.0×

$10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ 으로 나타났으며, 형질전환체의 유전적 안정성과 conidial size, 핵염색, 그리고 DNA 함량의 측정결과 핵형은 aneuploid로 추정되었고 total amylase의 측정 결과 형질전환체가 모균주에 비해 1.3~2.2배 가량 증가하였으며, 동위효소 양상은 형질전환체와 모균주에서 유사하게 나타났으나 amylase 활성에 차이가 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

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

참고문헌

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. *Anal. Biochem.* 333-336.
3. Bos, C.J., and S.M. Slakhort. 1980. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Can. J. Microbiol.* **27**: 400-407.
4. Crueger, W. and A. Crueger. 1990. *Biotechnology*, Pp. 191-198. 2nd ed. Sinauer Associates.
5. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
6. Ferenczy, L. and M. Pesti. 1982. Transfer of nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **7**: 157-160.
7. Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon, and H. Heslet. 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* **115**: 143-149.
8. Giles, K. and W. Myers. 1965. An improved diphenylamine method for estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*. **206**: 93.
9. Hamlyn, P.F., and R.E. Bradshaw. 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 321-325.
10. Harsangyi, Z., I.A. Graneck, and D.W.R. Mackenzie. 1977. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mut. Res.* **48**: 51-74.
11. Hong, S.W., Y.C. Hah, and H.M. Park. 1984. The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 207-213.
12. Kim, J.H. 1988. The protoplast fusion from conidiospore of *Penicillium verruculosum*. M. S. thesis. Chunnam National University.
13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
14. Lee, K.J. 1984. Strain development of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**: 99-104.
15. Liang, P.L. and C. Kaiying. 1987. Virus transmission through intraspecific protoplast fusion in *Aspergillus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **89**: 73-81.
16. Lörz, H. and I. Potrycus. 1978. Investigation on the transfer of isolated nuclei into protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **53**: 251-256.
17. Rho, H.S. 1991. Study on interspecific hybrid formation by nuclear transfer in *Aspergillus* sp. M.S. thesis. Chungnam National University.
18. Sivan, A., G.E. Harman, and T.E. Stasz. 1990. Transfer of isolated nuclei into protoplast of *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2404-2409.
19. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
20. Takagi, T., H. Toda, and T. Isoemura. 1971. Bacterial and mold amylase: the enzyme, Pp. 235-271. In P.D. Boyer, N.Y.(ed.) Academic press.
21. Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo, and H. Okada. 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 363-368.
22. 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.

(Received November 29, 1993)