

## IMPROVEMENT OF GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM IN *ASPERGILLUS ORYZAE*

Jae Won Lee and Young Tae Hahm

Departments of Biotechnology, Chung-Ang University, An-Sung 456-756

Tel: (0334) 670-3064, FAX: (0334) 675-0406

*Aspergillus oryzae* is a filamentous fungus classified in the group *Aspergillaceae* *Ascomycetes*. It is an important microorganism for industrial production of enzymes and fermented food productions. The genetic transformation system in *A. oryzae* was used to protoplast mediated transformation with PEG/CaCl<sub>2</sub>. When the protoplast was used, the regeneration efficiency was decreased and then transformation frequency was also effected. In this study, fungal transformation was carried out by bypassing the protoplast isolation step, changing enzymes, such as hemicellulase and celluclast, and decreasing the culturing time for the increment of the transformation efficiency. 83 transformants/10ug of DNA with hemicellulase were obtained, compared with less than 10 transformants with novozyme234 and celluclast.

### 서론

Filamentous fungus인 *Aspergillus spp.*는 산업적으로 많이 쓰여지고 있는데 그 이유는 곰팡이가 여러 종류의 유용한 효소들을 생산하는 능력을 가지고 있기 때문이다. 유전 공학적 측면에서 보았을 때, *A. oryzae*는 발현된 단백질을 체외로 배출시키는 secretory system이 잘 발달되어 있어, 산업적으로 효용 가치가 있는 이종단백질의 생산에 이용하면, 생산된 단백질은 cell free한 배지에서 분리할 수 있는 등 많은 이점을 가진다<sup>1)</sup>. 하지만 일반적으로 형질전환 효율이 매우 낮아 그 사용에 많은 제한을 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 배양시간, 사용 효소 등 일부 형질전환 절차의 변화를 통하여 보다 높은 형질전환 효율을 얻고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### Microorganism, media and plasmid

*Aspergillus oryzae* YTH-1 strain (*argB*<sup>-</sup> mutant)와 플라스미드는 pILJ-16( wild type *argB* gene)을 사용하였다<sup>2)</sup>. 배양을 위한 media로써 *A. oryzae* 배양은

complex media로는 YPD medium(2% peptone, 2% glucose, 1% yeast extract)를 사용하며, minimal medium은 Czapek-Dox broth(3% Bacto-saccharose, 0.3% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)를 사용하였다. Transformant를 위한 선별배지로는 minimal medium에 osmotic stabilizer로써 1M sucrose를 사용하였다.

### Preparation of spore stock

single colony의 *A. oryzae* YTH-1을 YPD agar medium에 접종시킨 뒤, 30°C에서 7일간 배양하고 spore가 형성되면 dH<sub>2</sub>O를 넣고 수거한다. 이 spore solution을 cheesecloth로 여과시킨 후 8,000rpm에서 15분간 원심분리한다. Spore pellet을 20ml의 dH<sub>2</sub>O를 이용 vortex한 후 8,000rpm에서 15분간 원심분리 한다. 또 spore pellet을 10ml의 0.1%의 Triton X-100 용액에 녹인 후 다시 원심분리 한다. spore pellet을 3-5ml의 같은 용액에 녹인 후 4°C에 보관하며 사용하였다.

### Preparation of cell for transformation

10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> spore를 200mg/l D,L-arginine이 포함된 minimal media에 접종시킨 후, *A. oryzae*를 30°C에서 10시간동안 aeration(180rpm)시키며 배양한다. 발아된 mycelia를 9000rpm에서 10분간 원심분리 하여 수집한 다음, osmotically stabilized된 osmotic buffer(1.2M MgSO<sub>4</sub>, pH 5.8, 5mM 2-mercaptoethanol) 5ml에 잘 섞는다. 이것을 125ml 삼각 flask에 넣은 후 얼음 속에 저장한다. hemicellulase(50mg/gm of mycelia, Amano. co.)를 osmotic buffer 5ml에 녹여 filtration 한 후 위의 flask에 넣고 다시 5분간 얼음 속에 넣어 둔다. 30°C에서 2시간 orbital shaker(100rpm)로 흔들며 배양한다. 효소로 처리한 mycelia를 50ml의 polypropylene centrifuge tube에 옮긴 후 7000rpm에서 원심분리 한다. mycelia를 10ml의 STC buffer(1.2M sorbitol, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>)로 세척한 후 다시 9000rpm으로 원심분리 하고 pellet을 STC buffer 400ul에 녹여 얼음 속에 보관한다.

### Electroporation을 이용한 transformation

10ug의 plasmid DNA를 25ul의 STC buffer에 녹인 후 100ul의 non-protoplast에 넣고 25분간 실온에 놓아 둔다. 이것을 전극간의 길이가 2mm되는 cuvette에 넣고 electro-mediated field transformation한다 (EASYJECT PLUS, EquipBio. Co.). *A. oryzae*에서는 electroporation의 조건을 2,500 voltage, 0.5 capecitance, 1,540 ohm으로 한 후 25분간 얼음 속에 넣어둔다. Mixture에 YGS medium(0.5% yeast

extract, 2% D-glucose, 1.2M sorbitol)를 넣은 후, 30°C에서 2시간 동안 aeration(100rpm)시키며 배양한다. 다시 원심분리 하여 spore pellet을 STC buffer로 두 번 세척한 다음 STC buffer 0.2ml에 녹인다. 1.0M sucrose가 함유된 minimal media plate에 접종 한 후 30°C에서 배양하며 transformant들을 선별한다.

### 결과 및 고찰

본 연구에서는 *A. oryzae*에서 일부 절차를 수정 및 생략한 방법을 적용하였고, 기존의 곰팡이 형질전환에 주로 사용하던 *novozyme234* 대신 *hemicellulase*와 *celluclast* (*cellulase*의 상품명)를 사용하여 각각의 형질전환 효율을 비교하였다.

#### Partial digestion for protoplast preparation

일반적인 배양 시간은 18시간이나, 본 연구에서는 배양시간을 12시간 또는 10시간으로 단축하여 형질전환을 시도하여 형질전환체를 얻었다. 이러한 배양시간은 계속적으로 단축하여 spore가 발아하는 순간에 효소 처리를 하여 cell wall이 부분적으로 파괴된, 형질전환 가능한 non-protoplast를 만들고자 하였다. *Aspergillus* species에서는 발아하는 conidia나 mycelia를 protoplast의 제조에 사용하는데, 본 연구에서는 부분적으로 세포벽이 분해된 세포를 형질전환에 이용함으로써 protoplast의 용해에 의한 형질전환 효율의 감소를 방지하고자 하였다. 이러한 시도에는 고농도의 알칼리성 metal ion으로 competency를 갖게 할 수 있다는 보고로 *Saccharomyces cerevisiae*의 calcium chloride처리 (Limura et al., 1983), lithium acetate처리<sup>3)4)</sup> (Ito et al., 1983) 등이 있다. 본 방법은 형질전환 효율에 영향을 주는 문제점을 피할 수 있으며, 형질전환 시간을 단축시킬 수 있다.

#### Transformation efficiency

곰팡이 형질전환을 할 때 여러 가지 효소를 사용할 수 있는데 glucanase, helicase, glucanase와 zymolyase 등의 효소를 사용하며 곰팡이에서 가장 많이 사용하는 효소는 *Novozyme234*이다. 본 실험에서는 *novozyme234*(20mg/g of mycelia) 대신 *hemicellulase*(50mg/g of mycelia)와 *celluclast*(50ul/g of mycelia, Novonordisk. co)를 이용하여 형질전환을 하였다. Table1과 같이 *novozyme234* 보다 *hemicellulase*를 사용하였을 때 더 많은 transformants를 얻었다.

### 요약

*A. oryzae*에 있어서 protoplast를 이용한 형질전환이 아닌 세포벽이 부분적으로 분

해된 cell을 이용하여 electroporation으로 형질전환시켰고, novozyme234, hemicellulase와 celluclast를 사용하여 형질전환 효율이 어떻게 다른지를 비교 분석하였다. Hemicellulase를  $\sim 10^8$  cell에 처리하여 *A. oryzae*에서 83 transformants/10ug of DNA를 얻었고, novozyme234와 celluclast를 사용하였을 때는 4.3 transformants/10ug of DNA를 얻었다.

#### 참고문헌

1. Hahm, Y.T. and C.A. Batt, "Expression and Secretion of Thaumatin from *Aspergillus oryzae*"(1990), Agric. Biol. Chem., 54:2513.
2. Hahm, Y.T. and C.A. Batt, "Genetic Transformation of on argB Mutant of *Aspergillus oryzae*"(1988), Appl. Environ. Microbiol., 54: 1610-1611.
3. Ito, H., Y. Fuluda, K. Murata and A. Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations"(1983), J. Bacteriol., 153: 163.
4. Venancio A, Domingues L, Lima N,"Transformation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* using lithium acetate and pYAC4"(1999), J. Basic Microbiol., 39: 37-41.

Table 1. 각 효소에 따른 형질전환 효율(10시간 배양시)

Enzyme	Transformation efficiency transformants/10ug DNA
Novozyme234	4.3
Hemicellulase	83
Celluclast	4.3