

## Autolytic Enzyme을 이용한 *Rhizopus oryzae*의 원형질체 생성과 그 특성에 관한 연구

李 榮 河\* · 崔 榮 吉

忠南大學校 理科學科 微生物學科\* · 漢陽大學校 自然大學 生物學科

## Characteristics of Protoplast Induction by Autolytic Enzyme of *Rhizopus oryzae*

Young Ha Rhee\* and Yong-Keel Choi

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon  
300-31 and Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133, Korea

**Abstract:** The degree of autolysis and lytic enzyme production in the culture filtrate of *Rhizopus oryzae* was investigated. The formation of protoplast by using autolytic enzymes from *Rh. oryzae* was also attempted. Protoplasts were liberated from *Rh. oryzae* mycelium by lytic enzymes present in autolytic-phase culture filtrate. Maximum release of chitosanase and proteolytic enzyme into culture filtrate during autolysis was corresponded to maximum protoplast-liberating activity. High yields of protoplasts were obtained from 10 hr-age of *Rh. oryzae* mycelium with 0.5 M mannitol as osmotic stabilizer. The optimum temperature and pH for mycelium digestion were 25~30°C and 6.0~6.5, respectively. The mycelium of the 18 hours cultures were treated with autolytic enzyme in same volume of osmotic stabilizer at 30°C for 5 hours and then it was confirmed by scanning electron microscope that protoplast were produced beside the digesting cell wall of the fungi.

**Keywords:** *Rhizopus oryzae*, Autolytic enzyme, Protoplast.

분류학적으로 Mucorales 목에 포함되는 *Mucor*속 및 *Rhizopus*속의 균류들은 우유응고효소인 rennin을 비롯한 amylase, cellulase 등의 효소 생산균으로서 최근에는 효소공업, 식품공업 등의 여러 산업분야에서 광범위하게 활용되고 있는 미생물이다. 이와 같은 미생물산업에서의 이들 Mucorales균의 이용은 점차 증가되리라 예상되고 있으며 (Beppu, 1983), 이러한 관점에서 살펴볼 때 이들 균류의 균주개발은 현실적으로 대단히 중요한 과제일 것으로 사료되고 있다.

Mucorales 균류는 일반적으로 소수의 종만이 유성생식에 의한 접합포자(zygospore)를 형성할 수 있으며 이와 같이 형성된 유성포자라 할지라도 오랜 휴지기 후에는 발아율이 대단히 낮기 때문에 (Gauger, 1941) 이들에 대한 균주개발이나 유전학적 연구를 위해서는 유성생식이 결여된 불완전 균류의 경우와 마찬가지로 원

형질체융합(protoplast fusion)을 이용하는 방법이 가장 바람직하고 효과적일 것으로 기대되고 있다(Elander, 1980; Anne, 1983). 그러나 Mucorales 균류의 원형질체 형성과 융합에 관한 연구는 이들 균류의 coenocytic 한 성질과 이들 균류만이 갖고 있는 세포벽 구성성분의 특징으로 인하여 다른 filamentous fungi에 비하여 지극히 저조한 형편으로서 단지 Ohnuki등(1982)이 *Mucor pusillus*와 *M. miehei* 균에서의 원형질체 융합에 관하여 보고한 정도에 불과하며, 특히 *Rhizopus*균의 경우에는 본 유전공학 학술협회의 연구비 지원(1983년도)으로 본 연구자들(Rhee등, 1984)에 의하여 amylase 생성능이 우수한 *Rh. sinuatus*균의 원형질체 융합 방법에 의한 종내잡종(intraspecific hybridization)의 형성이 처음으로 확인되었으나 보다 효과적인 원형질체 생성 및 안정성 유지를 위한 방법과 원형질체의

본 논문은 1985년도 유전공학 학술협회의 연구비에 의하여 수행되었음.

환원(regeneration) 및 융합과 관련된 구체적인 기초 조사의 필요성이 강조된 바 있다. 본 연구에서는 최근 시도되고 있는 원형질체의 유도를 autolytic enzyme 처리로서 시행하였으며 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 균 주

*Rhizopus* 균류의 autolytic enzymes의 본질과 이 enzyme system을 이용한 원형질체의 생성에 관한 본 연구를 위하여 본래 *Rhizopus sinus* 종을 이용할 계획이었으나 연구 수행중 *Rh. sinus*는 배양중 sporulation되는데 소요되는 기간이 매우 길고 생장양상이 autolytic enzymes의 생성에 적합치 못한 것으로 밝혀져 본 실험에서는 본래의 계획을 변경하여 *Rhizopus* 균류중 amylase 생성능이 높고 산업적 응용성이 광범위한 *Rh. oryzae*종을 선정하여 사용하였다. 한편 spore suspension의 획득을 위한 *Rh. oryzae*의 배양은 증류수 1L당 malt extract; 20 g, peptone; 1 g, dextrose; 10 g, agar; 20 g이 함유된 MPG 배지를 이용하였다.

### Autolytic enzyme의 생성

*Rh. oryzae*로부터 autolytic enzymes의 생성을 위하여 Czapek-dox 배지를 약간 변형한 액체배지(saccharose; 10 g, NaNO<sub>3</sub>; 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.5 g, KCl; 10.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.01 g, DW 1 L)를 사용하였으며 배지 1 ml당 5 × 10<sup>6</sup>개의 spore를 접종한 후 30°C에서 1~15일간 진탕배양하였다. 배양액중에 생성된 autolytic enzymes을 확인하기 위하여는 배양액을 Whatman filter paper(No. 2)로 여과하여 균사체를 제거하고 이 여과액을 효소용액으로 사용하였다.

### Enzyme assay

proteolytic activity는 0.05 M sodium maleate buffer (pH 5.8) 용액에 0.1% Hammarsten casein을 넣고 10~15분간 boiling 한 후 이 기질용액 1 ml와 효소용액 1 ml를 혼합하여 30°C에서 1시간 반응시키고, 10% trichloroacetic acid 2 ml를 첨가한 후 280 nm에서의 absorbancy로서 측정하였다. Acid phosphatase와 Alkaline phosphatase의 활성도는 0.5 M acetate buffer(pH 5.0) 또는 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 9.0)에 4-nitrophenyl phosphate를 1 mM 되도록 녹이고 이 기질용액 0.6 ml에 효소용액 0.4 ml를 혼합하여 32°C에서 30분간 반응시켰으며 이 반응액 1 ml에 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 ml와 증류수 7 ml를 첨가하여 420 nm에서의 OD 값을 측

정함으로써 결정하였다. Endo-glucanase의 활성도는 효소용액 1 ml와 1% Na-carboxymethylcellulose 0.5 ml 및 0.05 M acetate buffer(pH 5.0) 0.5 ml를 혼합한 후 40°C에서 1시간 반응시키고 생성된 환원당의 양을 Somogyi-Nelson 법으로 정량하여 측정하였다. β-glucosidase의 활성도는 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)에 1 mM 되도록 녹인 PNPG(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside) 용액 0.6 ml와 효소용액 0.4 ml를 섞은 후 30°C에서 1시간 반응시키고, 2 ml의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣고 증류수로 10 ml 되도록 희석시킨 후 유리된 PNP의 양을 420 nm에서의 흡광도로 측정하였다. chitosanase의 활성도는 20 mg의 glycol chitosan을 함유하는 기질용액 1 ml에 효소용액 1 ml를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 glucosamine의 양을 Elson-Morgan법으로 정량하여 측정하였다.

### Autolytic activity의 측정

*Rh. oryzae*의 mycelium을 건조시켜 분말화하여 준비된 *Rhizopus* cell wall 0.1g을 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) 80 ml에 넣어 ultrasonication(20 kc, 3 min) 하고 이를 기질용액으로 사용하였으며 기질용액 4 ml를 1 ml의 효소용액과 40°C에서 1시간 반응시킨 후 660 nm에서의 OD 값을 측정하였다. autolytic activity의 1 unit는 상기 조건하에서의 본래시료의 OD 값으로부터 1% 감소시킬 수 있는 효소량으로 하였다.

### 단백질 정량

배양액내의 extracellular protein의 정량은 serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry법에 의해 측정하였다.

### 균사체의 건조량 측정

배양액을 Whatman filter paper(No. 2)로 여과한 후 여과된 균사체를 90°C에서 2시간 건조시킨 후 건조량을 측정하였다.

### 원형질체의 생성

*Rh. oryzae* 포자낭 포자를 배지 1 ml 당 5 × 10<sup>6</sup>개 되게 접종하여 28°C에서 10시간 동안 진탕배양한 후 배양액으로부터 원심분리(5,000 g/15분)하여 균사체를 얻고 0.2 M phosphate buffer(pH 5.8)에 전체 농도가 0.5 M 되도록 mannitol을 첨가한 osmotic stabilizer로 2회 세척한 후 균사체가 잠길 수 있도록 autolytic enzyme를 함유하는 *Rh. oryzae* 배양액과 osmotic stabilizer를 각각 1 ml씩 처리한 후 30°C에서 2.5시간 처리하여 생성된 원형질체를 haemocytometer로 계수하였다.

### 원형질체의 생성과정 및 세포학적 특성조사

*Rhizopus*는 알러지다시피 무적막 균사체이며 따라서 다핵체이다. 이러한 균사체에 osmotic stabilizer와 autolytic enzyme을 처리할 때 enzyme이 균사체의 세포벽에 어떻게 작용하며 원형질체의 생성이 어떻게 이루어지는가를 주사 전자현미경으로 확인하기 위하여 균체를 MPD 배지에서 18시간 배양하여 수확한 후 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)와 0.6 M KCl 용액을 첨가하여 3,000 rpm으로 수차 세척한 후 autolytic enzyme을 1:1이 되도록 주입한 후 30°C에서 5시간 incubation하여 원형질체를 유도하고 광학현미경으로 이를 확인하고 osmotic stabilizer 및 buffer를 다시 첨가하여 3,000 rpm에서 10분 동안 세척한 후 원형질체를 농축하였다. 농축한 원형질체를 3% glutaraldehyde 용액에서 2시간 고정한 후 critical end point에서 건조시킨 후 금속분말로 coating 한 후에 주사현미경으로 원형질체의 형성 과정을 확인하였다.

결 과 및 고 찰

Autolytic enzyme의 생성시기와 Autolysis

배양시간에 따른 *Rh. oryzae* 균사체 전체량의 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 48시간 이후 최대량을 보였으나 4일 이후에는 autolysis에 의하여 전체량이 감소되기 시작하였으며 9일 이후에는 최대 전체량의 70% 이상이 감소되는 것으로 나타났다.

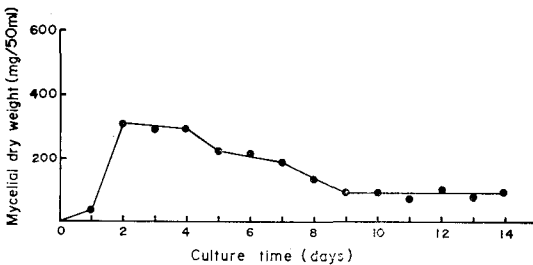


Fig. 1. Variation in dry weight during growth and autolysis of *Rhizopus oryzae*.

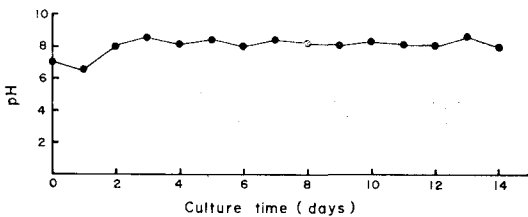


Fig. 2. Variation of culture medium pH during growth and autolysis of *Rh. oryzae*.

*Rh. oryzae* 배양액의 pH는 본래 배지의 pH 7.13으로부터 시작하여 배양초기에는 pH 8.05~9.60 수준에서 계속 안정성을 나타냈다(Fig. 2).

배양액내 protein 함량의 배양시간에 따른 변화는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 2일 이후 급격히 증가한 후 5일째까지는 대체로 높은 함량을 보였다.

*Rh. oryzae*의 culture filtrate내에 존재하는 *Rh. oryzae* cell wall lytic activity의 변화는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 4~6일 사이의 배양액에서 최대로 나타났다.

이러한 경향성은 대체로 Fig. 1의 균사체 전체량의 변화와 부합하는 것으로 이는 4일 이후의 균사체 전체량의 감소가 *Rh. oryzae*가 생성하는 autolytic enzymes의 작용에 의해 일어남을 시사하고 있다. 이와같은 *Rh. oryzae* 균사체의 autolysis에 관여하는 autolytic enzyme system에 대한 보다 구체적인 성질을 규명하기 위하여 일반적으로 fungal cell wall 성분의 분해효소로 알려진 몇가지 주요 효소활성도의 생성시기에 대하여 조사하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 배양액내의 chitinase와 proteolytic activity는 2일 이후 급격히 증가하기 시작하여 5일째에 최대의 활성도를 보였다. 이러한 결과는 *Rh. oryzae*의 autolysis와 대단히 긴밀한 상관관계를 나타내는 것으로서 *Rhizopus*를 비롯한 Mucorales목 균류의 주요세포벽 성분이 chitin임을 고려해 볼 때

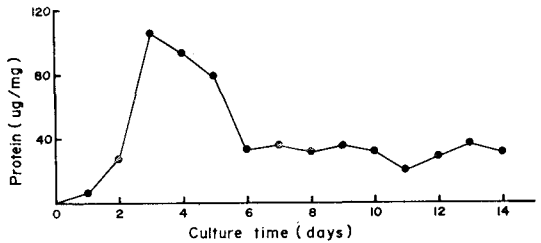


Fig. 3. Concentration of protein in culture filtrate during growth and autolysis of *Rh. oryzae*.

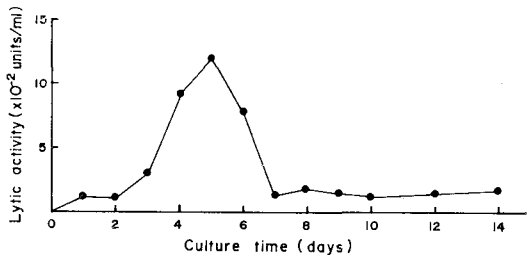


Fig. 4. Cell wall lytic activity in culture filtrate during growth and autolysis of *Rh. oryzae*.

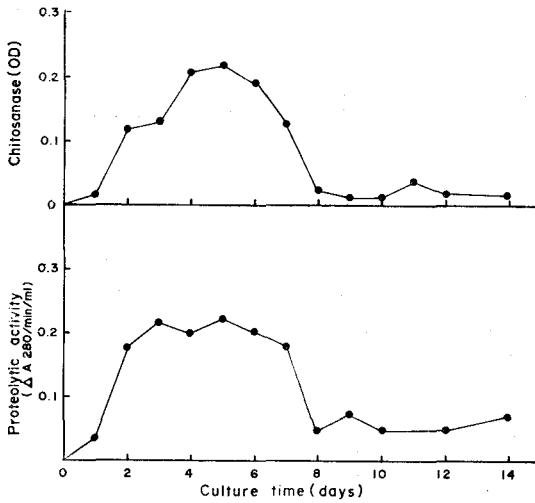


Fig. 5. Chitosanase and proteolytic activities in culture filtrate during growth and autolysis of *Rh. oryzae*.

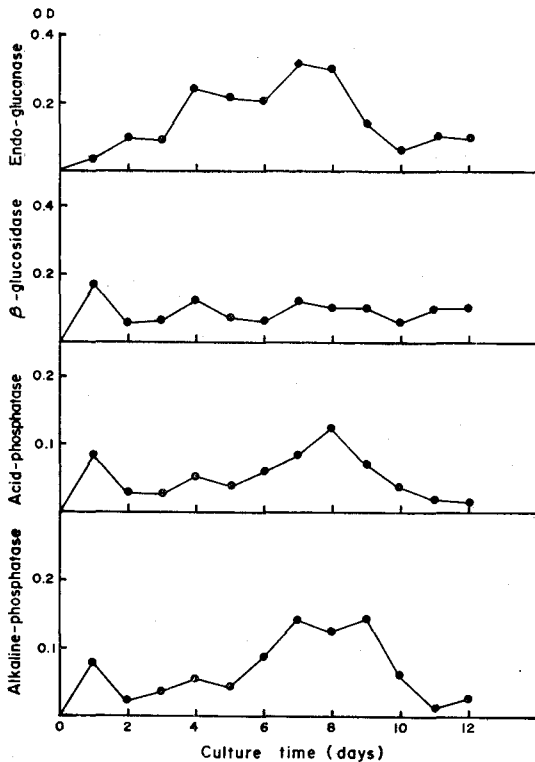


Fig. 6. Some extracellular enzyme activities in culture filtrates during growth and autolysis of *Rh. oryzae*.

*Rh. oryzae*의 autolysis 과정중의 chitosanase의 역할은 대단히 중요할 것으로 보인다. 반면에 그 밖의 다른 효소들(endoglucanase, β-glucosidase, acid-phosphatase, alkaline phosphatase)의 경우에는 일반적으로 autolysis 가 일어나는 시기보다 늦은 시간에 최대의 활성도를 보임으로써(Fig. 6) 이러한 효소들의 *Rh. oryzae*균의 autolysis 과정중의 상대적 중요도가 chitosanase 및 proteolytic activity에 비하여 뒤떨어짐을 나타냈다.

**Autolytic enzyme를 이용한 원형질체 생성**

이와 같은 autolytic enzyme system을 이용한 *Rh. oryzae*의 원형질체 생성을 조사하기 위하여 각 배양액의 autolytic enzymes을 10시간 배양한 *Rh. oryzae* 균사체에 처리한 결과 4~6일 사이의 autolytic enzymes이 최고의 원형질체 생성율을 보였다. 이것 chitosan 등의 특수한 세포벽 성분을 가짐으로서 원형질체 생성이 어려운 *Rhizopus* 균류의 경우 autolytic enzyme system을 이용한 원형질체 생성이 가능함을 보여준다. Autolytic enzyme system을 이용한 *Rh. oryzae* 균사로부터의 원형질체의 생성을 조사하기 위하여 배양시간을 달리하여 획득한 각각의 autolytic enzyme를 MPD 액체배지에서 10시간 배양한 *Rh. oryzae* 균사에 처리한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 최대의 원형질체 생성은 4~6일 사이의 autolytic enzyme으로부터 얻을 수 있었으나 10일 이상의 autolytic enzyme의 경우 거의 원형질체 생성 효과가 없는 것으로 나타났다. 이것은 *Rh. oryzae*의 배양 시간에 따른 culture filtrate의 동일 균주 세포벽에 대한 분해 능력(Fig. 4)과 chitosanase 및 proteolytic activity(Fig. 5)의 결과와 깊은 관련을 맺는 것으로서, chitosan 등의 특수한 세포벽 구성성분으로 인하여 원형질체 생성이 어려운 *Rhizopus* 균류의 경우 autolytic enzyme system을 이용함으로써 원형질체 생성이 가능함을 보여줄 뿐 아니라 autolytic enzymes 중에서도 chitosanase와 proteolytic activity가 원형질체 생성에 보다 중요한 역할을 수행하고 있음을 시사하여 준다. 이와같은 autolytic enzyme system을 이용한 *Rh. oryzae* 균사로부터의 효율적인 원형질체 생성을 위하여 *Rh. oryzae*를 6일간 배양한 culture filtrate 내의 autolytic enzyme를 ammonium sulfate (20~85%)로 부분정제 한 후 dialysis하여 농축한 효소액을 세포벽 분해효소로 사용하고, 이러한 조건하에서 원형질체 생성에 중요하게 작용하는 몇가지 요인에 대하여 조사하였다.

삼투 안정제(osmotic stabilizer)는 원형질체 생성에 큰 영향을 미치는 주요 요인중의 하나인데, autolytic

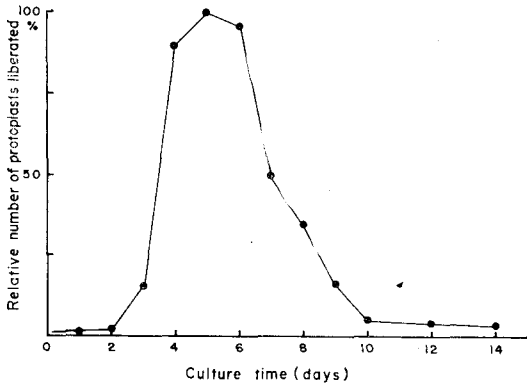


Fig. 7. Protoplast-liberating activity of culture filtrate samples.

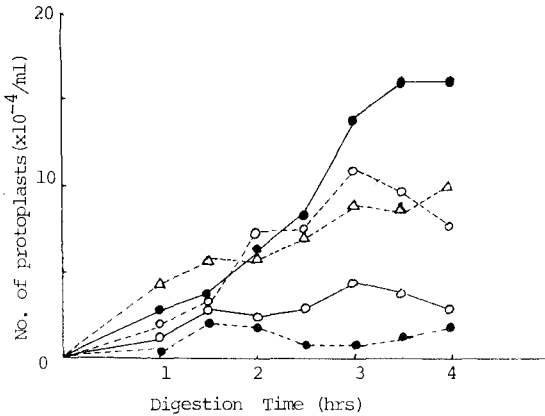


Fig. 8. Effect of different osmotic stabilizers on the formation and stability of protoplasts.

●-● : 0.5 M mannitol, ●-● : 0.5 M KCl, ○-○ : 0.5 M MgSO<sub>4</sub>, ○-○ : 0.5 M (NH<sub>4</sub>)Cl, △-△ : 0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

enzymes을 이용한 본 실험에서는 조사된 삼투압안정제중 sugar alcohol인 mannitol(0.5 M)이 가장 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 8).

일반적으로 삼투압안정제는 종류와 농도에 따라 이들이 원형질체막의 투과성에 미치는 영향이 다르기 때문에 사용되는 세포벽 분해효소와 균주에 따라 원형질체 생성을 위한 최적 삼투압안정제가 다른 것으로 알려져 있지만(Peberdy, 1976; Anné, 1983), 본 실험의 결과는 *Bacillus spp.*의 lytic enzyme을 이용한 *Rh. suinus*의 원형질체 생성에 관한 연구 결과(Rhee 등, 1984)와 거의 비슷한 경향성을 보여 주었다. MPD 액체 배지에서 배양 시간별로 획득한 *Rh. oryzae* 균사에 autolytic enzyme을 3시간 처리한 후 생성된 원형질체

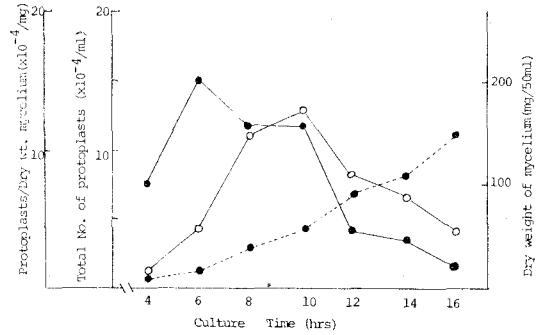


Fig. 9. Effect of mycelial ages on the formation of protoplasts for 3hrs digestion.

●-● : dry weight of mycelium, ○-○ : total number of protoplasts liberated, ●-● : protoplasts/dry weight of mycelium

의 수를 비교한 결과는 Fig. 9에서 보는 바와 같다. digestion mixture 1 ml 당 전체 원형질체 수는 10시간 배양한 초기 대수기 (early exponential phase) 상태의 균사체에서  $13 \times 10^4$  pts/ml로 가장 높게 나타났으나 균사체의 건조 중량당 생성된 원형질체 생성율은 6시간 배양한 균사체에서 최고 값을 보였다. 이러한 결과는 *Aspergillus*속 (Peberdy 등, 1976; Hendrikus 등, 1979), *Trichoderma*속 (Benitez 등, 1975; Cho 등, 1981) 및 *Rh. suinus*(Rhee 등, 1984) 균류등의 타 균류에서 조사된 균사체의 최적배양시간(12~20시간)과 다소의 차이를 보이는데 이는 *Rh. oryzae*의 성장 과정 중 특정 시기 이후의 균사체 세포벽의 구성성분 또는 기계적 지지력의 증가와 관련되어 있을 것으로 사료된다. 한편 원형질체 생성을 위한 digestion mixture의

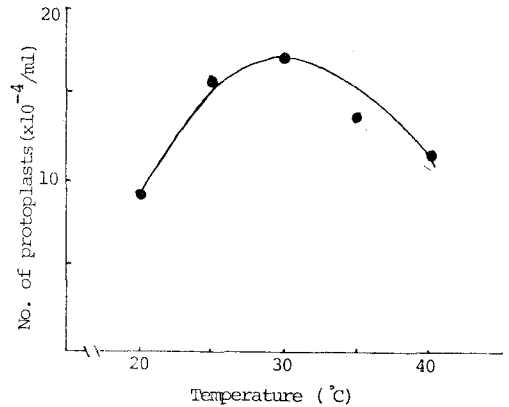


Fig. 10. Effect of digestion temperature on the formation of protoplast for 3 hrs incubation.

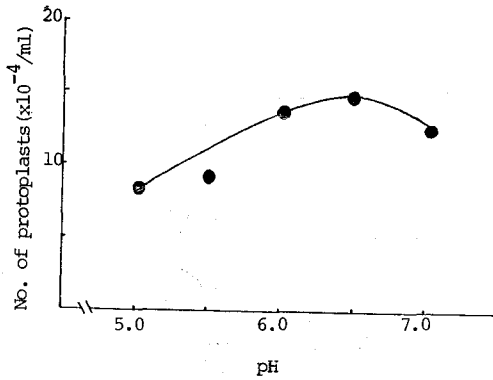


Fig. 11. Effect of pH on the formation of protoplast for 3 hrs digestion at 28°C.

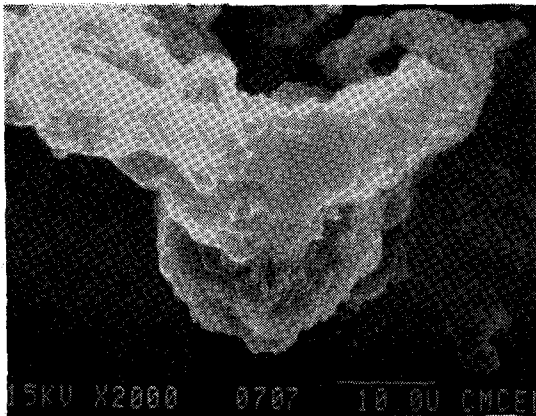
온도 및 pH에 의한 영향은 각각 Fig. 10과 Fig. 11에서 보는 바와 같으며 원형질체 생성을 위한 최적온도는 25~30°C, 최적 pH는 6.0~6.5로 나타났다.

원형질체의 생성과정 및 세포학적 특성

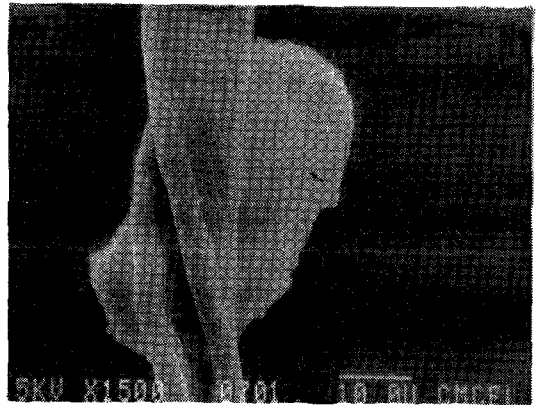
무격막 균사체이며 다핵체인 *Rh. oryzae*로부터 유도된 원형질체는 광학현미경으로 조사한 결과 핵이 3~4개 함유된 개체가 가장 많으며 최소한 1개 이상의 핵을 가지고 있다. 대체로 *Rhizopus*는 25시간을 전후한 1세대 생활환을 가지며 *Rh. oryzae*의 경우 접종 후 16~19시간 후에 최대의 핵분열을 나타내는 까닭에 (Min, 1981) 이때에 최대의 수많은 핵을 가지므로 원형질체 내에도 하나 이상의 핵을 함유하는 것으로 해석된다. 원형질체가 어느 정도의 핵을 함유하게 될 것인가는 이들의 생활환을 참고할 때 균사체의 배양시간에 따라 전적으로 좌우되는 것으로 보이며 최소한 1개 이상의 핵을 가지는 원형질체는 원형질 용합 후에 재생능력이

있는 개체의 경우는 균사의 분화과정에 따라서 핵의 행동과 분포가 autonomous하게 조절 되어지고 다핵체일수록 생리기능이 왕성한 것으로 보고되어 있다(Flanagan, 1969). 원형질체의 핵의 수가 일정하지 않으므로 핵산의 함량조사는 의미가 없으며 핵의 수에 따라 또는 원형질체의 크기에 영향이 있을 것으로 생각된다. Plate 1, 2, 3의 사진은 18시간 배양된 균사체에 osmotic stabilizer, buffer 용액에 autolytic enzyme을 1:1 volume으로 첨가하고 30°C에서 5시간 incubation 처리했을 때의 원형질체 생성 과정을 나타낸 것이다. 사진 (1)은 균사의 세포벽이 효소에 의하여 용해되어 화살표 부분으로 원형질이 유출되는 모양이며 (2)는 완전히 유출된 원형질이 구형의 원형질체를 형성한 모습을 보여준다. 사진 (3)과 (4)는 세포벽이 부분적으로 용해되어 원형질이 균사체 밖으로 유출되어 나오는 것과 동시에 세포의 공간적 구조가 비틀리는 현상으로 해석된다. 이는 균사의 세포벽이 구조적으로 일정하지 않다는 사실과 부분적으로 용해된 세포벽을 통하여 원형질이 유출되는 것을 나타낸다. *Aspergillus niger*의 경우 hyphal tip로부터 원형질체가 형성되는 것과는 대조적인 사실이라 하겠다. 사진 (5)는 *Rhizopus*의 경우 hyphal tip으로 부터도 원형질체가 유출되어 나오는 모습을 보여준다. 그러므로 *Rhizopus*는 기존 균사체벽의 용해된 부분과 끝부분에서도 원형질체가 형성될 수 있음을 보여주며 사진 (6)은 autolytic enzyme에 의해 균사체벽의 용해 후에 나타난 세포벽의 잔해와 원형질의 유출 후의 공간적 구조를 보여준다. 그리고 그 배경은 원심분리 과정에서 붕괴된 원형질의 집합과 전자현미경적 처리물의 혼합물로 판명되었다.

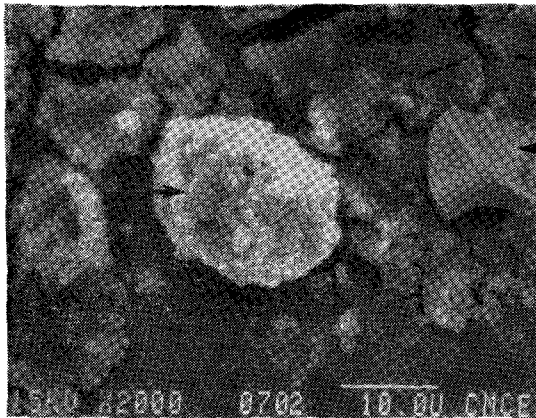
PLATE



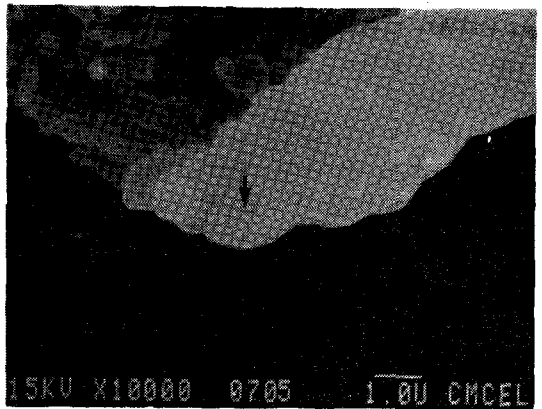
(1) Scanning electron-microscope of protoplast formation from digested cell wall of *Rh. oryzae*.



(4) Scanning electron-microscope of outflowing protoplast from digested hyphae.



(2) Scanning electron-microscope of isolated protoplast and digested cell wall of fungi by autolytic enzyme.



(5) Outflowing protoplast from the tip of hyphae.



(3) Scanning electron-microscope of outflowing protoplast from digested hyphae.



(6) Digested hyphae after treatment of autolytic enzyme. Arrow indicates remains of cell wall.

적 요

*Rhizorus oryzae*의 성장 및 autolysis에 따른 여러가지 autolytic enzymes의 활성도 변화와 이 autolytic enzyme system을 이용한 원형질체 생성에 관하여 조사하였다. Autolytic-phase의 culture filtrate 내에 함유된 autolytic enzyme은 *Rh. oryzae* 균사체로부터의 원형질체 생성에 효율적인 세포벽 분해효소로 작용하였으며 Autolytic enzyme 중 원형질체 생성은 proteolytic 및 chitosanase activity와 가장 긴밀하게 관련되어 있었다.

이와같은 autolytic enzyme을 이용한 원형질체 생성은 10시간 배양한 균사체에 0.5 M mannitol을 사용하였을 때 최고의 수율을 보였으며 원형질체 생성의 최적 온도 및 pH는 각각 25~30°C 및 6.0~6.5로 나타났다 한편 18시간 배양된 균사체를 osmotic stabilizer와 autolytic enzyme을 1:1이 되도록 처리하고 5시간 동안 30°C에서 incubation하여 얻은 원형질체를 주사전자현미경으로 조사한 결과 효소에 의하여 가수분해되는 세포벽 주변으로부터 원형질체가 형성되는 것을 확인하였다.

문 헌

Ann, J. (1983): Protoplasts of filamentous fungi in genetics and metabolite production. In *Protoplasts 1983- Lecture proceeding*, ed. by I. Potrycus Birkhauser, 167-178.

Benitez, T., Ramos, S. and Acha, I.G. (1975): Protoplasts of *Trichoderma viride*. *Arch. Microbiol.* 103: 199-203.

Beppu, T. (1984): Protoplast fusion of *Mucorales* fungi producing microbial rennin. In "*Proceedings of UNESCO Regional Workshop on Protoplast Fusion in Microorganism.*" Seoul, Korea.

Binding, H. and Weber, H.J. (1974): The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 135: 273-276.

Cho, N.J., Rhee, Y.H. and Hong, S.W. (1981): Formation of protoplast from *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* 19: 186-191.

Cho, N.J. (1982): Production of protoplast and protoplast fusion in *Trichoderma koningii*. Master thesis in Seoul N. Univ.

Isaac, S. and Gokhale, A.V. (1982): Autolysis: A tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78: 389-394.

Lynch, P.T., Collin, H.A. and Isaac, S. (1985): Use of autolytic enzyme for isolation of protoplasts from *Fusarium tricinctum* hyphae. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 473-478.

Perezleblie, M.I., Copa, J.L., Arias, M.E., Reyes, F. and Laborda, F. (1985): 1,3- $\beta$ -glucanases in the autolysis of *Penicillium oxalicum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 467-471.

Rhee, Y.H., Kim, M.S. and Choi, Y.K. (1984): Protoplast fusion of *Rhizopus sinuatus*. *Chungnam J. Sciences.* 11: 193-202.

Seo, Y.H., Kim, C.S. and Kim, K.S. (1983): Ultrastructure of *Micromonospora rosaria* protoplast and their fusion. *Korean. J. Electron Microscopy* 13.

Isaac, S. and Gokhale, A.V. (1982): Autolysis: a tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78: 389-394.

Flanagan, P.W. (1969b): Nuclear division in the vegetative hyphae of *Rhizopus nigricans* and *Phycomyces blakesleenus*. *Can. J. Bot.* 48: 2069-2079.

Min, B.R. (1981): Studies on the life-cycle and chromosome numbers in the genus *Rhizopus*. Rh. D Thesis.

<Received November 4, 1986;

Accepted November 11, 1986)