

Aspergillus nidulans 에서의 핵전이에 의한 종내잡종 형성

양영기·박 열·이영하*·맹필재*

조선대학교 자연과학대학 유전공학과

*충남대학교 자연과학대학 미생물학과

Construction of Intraspecific Hybrids by Nuclear Transfer in *Aspergillus nidulans*

Young-Ki Yang, Yeol Park, Young-Ha Rhee* and Pil-Jae Maeng*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Choseon University, Kwangju 501-759 and

*Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 302-764, Korea

ABSTRACT: The nuclear transfer technique was employed to obtain intraspecific hybrids in *Aspergillus nidulans*. Nuclei isolated from either a wild type or an auxotrophic mutant strain (FGSC 475) were transferred into the protoplasts of a recipient strain (FGSC 514). The frequency of hybrid formation (4.8% and 10.1%, respectively) by nuclear transfer was higher than the frequency (0.6%) by protoplast fusion. Furthermore, most of the hybrids formed showed increased activity of some components of cellulase system, xylanase system, and mannanase. The hybrids were analyzed to be either diploid or aneuploid. These results suggest that nuclear transfer technique is more efficient in the formation of intraspecific hybrids than protoplast fusion method and is useful for the improvement of *Aspergillus* strains.

KEYWORDS: Nuclear transfer, *Aspergillus nidulans*, Intraspecific hybrids, Cellulase, Xylanase

Aspergillus 속 균류들은 다양한 종류의 효소와 발효산물의 산업적 생산에 널리 이용되어 왔다. 이들은 *Trichoderma* 속 균류들과 마찬가지로 cellulase 효소계를 갖추고 있을 뿐만 아니라 (Bisaria와 Ghose, 1981), 그들보다 최고 20배 정도 높은 β -glucosidase 활성을 가지고 있으며 (Woodward와 Wiseman, 1982), 높은 xylanase 생성능도 갖추고 있는 것으로 알려져 있다 (Bisaria와 Ghose, 1981). 따라서, *Aspergillus* 속 균류들은 cellulose와 hemicellulose를 주 성분으로 하는 자연계의 가장 풍부한 섬유질자원을 효율적으로 활용하는 데 유용할 것으로 사료되며, 이들로부터 섬유질 분해능이 향상된 균주를 개발하는 일도 공정의 효율성을 제고한다는 점에

서 매우 중요한 일이라 하겠다.

균류에서의 균주개량을 위하여 최근 흔히 쓰이고 있는 방법 중의 하나는 PEG (polyethylene glycol)를 이용한 원형질체 융합법으로, 이는 *Aspergillus* (Ferenczy 등, 1977; Bradshaw 등, 1983; Kevei와 Peberdy, 1977, 1984), *Penicillium* (Anné, 1982; Anné 등, 1976), *Trichoderma* (Hong 등 1984; Toyama 등, 1984; Park과 Hong, 1989), *Cephalosporium* (Hamlyn과 Ball, 1979) 및 *Saccharomyces* (Limtong 등, 1983) 등의 균류에서 활발히 시도된 바 있다. 그러나 원형질체 융합법은 새로이 형성된 잡종을 선별해 내기 위하여 두 개의 모균주에 서로 상이한 영양요구성 돌연변이 등의 유전자 표

식을 도입해야 하며, 그 과정에서 유용한 형질이 손상받을 경우 우량 잡종의 선별이 어렵게 되는 단점이 있다. 이러한 문제는 야생형 균주의 핵을 추출한 후 이를 영양요구성 돌연변이주의 원형질체에 전달하는 방법, 즉 핵전이(nuclear transfer)를 이용하여 극복할 수 있을 것이다.

균류에서의 핵전이는 Ferenczy와 Pesti(1982)에 의하여 *Saccharomyces cerevisiae*에서 처음 시도되었으며, *Trichoderma*속(Min, 1987), *Pleurotus*속(Yoo 등, 1987; You 등, 1988) 등에서도 이루어진 바 있다. 핵전이 기술은 원형질체 융합의 경우와는 달리 핵공여체 균주의 유전자 표식을 필요로 하지 않으므로 유용한 형질을 손상시키지 않고 잡종을 형성할 수 있다는 장점이 있으며, 또한 이를 이용할 경우 원형질체 융합법보다 잡종형성의 범위를 넓히고 그 빈도를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 *Aspergillus*속 균류에서의 핵전이를 통한 균주 개량 가능성을 조사하기 위하여 *Aspergillus nidulans*의 종내잡종을 핵전이법을 이용하여 얻어내고 그들의 섬유질분해 효소계 활성 및 핵형을 분석하였다.

材料 및 方法

균주 및 배지

본 실험에서는 *A. nidulans* ATCC 10074(야생형)와 FGSC 475(Rib⁻, Paba⁻), FGSC 514(Ade⁻, Sos⁻)를 균주로 사용하였으며, 37°C에서 Harsanyi 등(1977)의 방법에 따라 제조된 완전배지나 최소배지에서 배양하였다.

원형질체의 형성

A. nidulans 야생형 및 돌연변이 균주의 분생포자 현탁액을 각각 완전액체배지에 5×10^6 conidia/ml 되게 접종한 다음 37°C에서 15시간 진탕배양하여 균사체를 수확하고 멸균된 생리 식염수로 2회 세척하였다. 또한 200 mM phosphate buffer(pH 5.8)에 전체 농도가 600 mM 이 되도록 KCl를 첨가한 삼투안정제에 0.5% Novozyme 234(Novo) 효소액을 제조하고 이 효소액에 수확된 균사체를 침적시킨 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 생성된 원형질체는 sintered

glass filter(porosity 40-60 μ m)로 여과시켜 균사체로부터 분리하고 삼투안정제로 2~3차례 세척하면서 원심분리하여(700g, 15 min) 농축하였다.

원형질체 융합

영양요구성 변이주들로부터 생성된 원형질체를 각각 1×10^7 protoplasts/ml 이 되도록 동량 혼합한 후 원심분리하여(1,200g, 10 min) 상등액을 제거하고, 침전된 원형질체 덩어리에 30°C로 전처리한 PEG 용액(30% PEG 6,000, 10 mM CaCl₂, 50 mM glycine)을 1 ml 가하여 잘 혼합한 후 30°C에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액을 동일한 삼투안정제로 적당히 희석하여 삼투안정제가 첨가된 최소평판배지와 완전평판배지에 각각 도말하고 37°C에서 5~8일간 배양한 후 Park(1986)의 방법에 의하여 융합빈도를 구하였다.

핵의 분리

핵전이에 사용된 *A. nidulans* 균주의 핵은 Ferenczy와 Pesti(1982)의 방법에 의하여 분리하였다. 즉, 앞에서 기술한 바와 같이 원형질체를 형성시킨 후, 1.5×10^7 개의 원형질체에 SMC 혼합용액(300 mM sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) 2 ml를 첨가하고 homogenizer로 10분간 원형질체를 파쇄시켰다. 이 파쇄액을 원심분리하여(3,000g, 10 min) 얻은 pellet에 600 mM sucrose를 함유하는 SMC 혼합용액 2 ml을 가하여 재현탁시키고, 이를 초원심분리(90,000g, 60 min)하여 얻어진 nuclear pellet을 600 mM KCl 1 ml에 다시 현탁시켜 순수분리된 핵으로 사용하였다.

핵전이

핵전이에 의한 영양요구성 변이주의 형질전환은 sandwich method의 변형법(Ferenczy and Pesti, 1982)에 따라 시행하였다. 즉, 야생형 균주에서 분리한 핵에 영양요구성 균주의 원형질체(1.5×10^7 protoplasts)를 혼합하여 원심분리하였다(3,000g, 10 min). 여기에 다시 1.5×10^7 의 형질전환용 원형질체를 조심스럽게 첨가하고 1,200g로 10분간 원심분리하였다. 수확된 pellet에 PEG 용액(30%, M. W. 6,000, 10 mM CaCl₂, 0.05 M glycine, pH 5.8) 1 ml를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, 삼투안정제 용액(600 mM KCl)으로 적당히 희석하여 환원용 완전배

지, 환원용 최소배지, 완전배지 및 최소배지에 각각 도말하여 37°C에서 5~10일간 배양하였다.

세포의 효소용액의 제조

완전액체배지에 분생포자를 5×10^5 conidia/ml 되게 접종하고 37°C에서 15시간 진탕배양한 후, 배양액을 여과하여 균사체를 수확하고 생리식염수로 2~3차례 세척하였다. 수확된 균사체를 유도물질이 단일탄소원으로 함유된 최소액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 진탕배양하고, 이 배양액을 4°C에서 원심분리(3,000g, 20 min)하여 얻은 상등액을 세포의 효소용액으로 사용하였다. Carboxymethylcellulase(CMCase), Avicelase 및 β -glucosidase 합성을 위한 유도물질로서는 1% CMC를, endo-xylanase 및 β -xylosidase 합성의 유도물질로서는 1% xylan(Sigma)을, mannanase의 유도물질로서는 1% mannan을 각각 사용하였다.

효소활성도 측정

CMCase, Avicelase, endo-xylanase 및 mannanase의 활성도 측정을 위한 기질로는 각각 CMC, Avicel, xylan 및 mannan을 사용하였으며, 50mM 초산완충용액(pH 5.0)에 0.5%되게 제조한 기질용액 0.6ml와 효소용액 0.4ml를 섞은 반응혼합물을 40°C에서 1시간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson 법(Somogyi, 1952)에 따라 파장 540nm에서의 흡광도로서 유리된 환원당을 측정하였다. 효소활성도는 위의 반응조건 하에서 1분 동안 최종 분해산물 1 μ mole을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하여 분석하였다.

β -glucosidase 및 β -xylosidase 활성은 Lee 등(1989)의 방법에 의해 측정하였으며, 효소활성도 1 unit는 1분 동안 1 μ mole의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 시행하였다.

DNA 정량

완전배지에 5×10^7 conidia를 접종, 37°C에서 15시간 진탕배양하여 수확한 균사체로부터 원형질체를 형성시켜(1×10^7 protoplasts) 순수분리한 후, 10% perchloric acid로 DNA를 추출하여 Burton 방법(1956)을 변형한 Giles와 Myers

(1965)의 diphenylamine test로 DNA 양을 측정하였다.

結果 및 考察

핵전이에 의한 형질전환

원형질체 융합 또는 핵전이 기술에 의한 균주개발 등의 효율성과 관련하여 가장 중요한 요인 중의 하나는 잡종형성의 빈도라 할 수 있다. *A. nidulans*에서 원형질체 융합과 핵전이에 의한 종내잡종 형성의 효율성을 비교하기 위하여, FGSC 475와 FGSC 514의 두 영양요구 변이주간의 원형질체 융합 및 핵전이에 의한 잡종형성 빈도와 야생균주의 핵을 FGSC 514의 원형질체로 전이시켰을 때의 잡종형성율을 조사하였다. Table I에서 보는 바와 같이 FGSC 475와 FGSC 514간의 원형질체 융합빈도는 0.6%로써 Anné 등(1976)이 보고한 *A. nidulans*의 원형질체 융합빈도 0.27%보다 다소 높은 것으로 나타났다. 반면에 FGSC 475로부터 순수분리된 핵을 FGSC 514의 원형질체로 전이시켰을 때의 형질전환율은 10.1%로써 동일 균주간의 원형질체 융합빈도 보다 약 17배 정도 높았다. 또한 야생균주의 핵을 FGSC 514의 원형질체로 전이시킴으로써 나타난 형질전환율은 4.8%로써 위의 두 영양요구 변이주간의 형질전환율 보다는 낮은 빈도를 보였지만 원형질체 융합을 보다는 상당히 높은 잡종형성 빈도를 나타냈다.

Table I. Frequencies of hybrid formation in *A. nidulans* by protoplast fusion and nuclear transfer

Technique	Cross	Frequency (%)
Protoplast fusion	FGSC 475 (Rib ⁻ , Paba ⁻) × FGSC 514 (Ade ⁻ , Sos ⁻)	0.6
	Nuclear transfer	FGSC 475 (N) × FGSC 514 (P) wild type (N) × FGSC 514 (P)
		4.8

N: nucleus P: protoplast

Table II. Extracellular enzyme activities in the parental strains of *A. nidulans* and their hybrids obtained by intraspecific nuclear transfer

Strain	Protein ($\mu\text{g/ml}$)	CMCase (units)	Avicelase (units)	β -Glucosidase (units)	Endo-xylanase (units)	β -Xylosidase (units)	Mannanase (units)
FGSC 475	360	96	48	9	92	9	55
FGSC 514	345	75	47	9	78	7	63
wild type	292	110	38	10	38	6	33
FGSC 475 (N) \times FGSC 514 (P)							
TRA - 5	374	100	63	9	57	7	84
TRA - 7	362	123	48	7	38	11	68
TRA - 8	405	132	45	6	36	5	51
TRA - 10	330	90	42	11	45	7	84
TRA - 12	373	143	57	8	38	10	74
TRA - 20	357	135	33	12	81	7	30
TRA - 21	348	50	26	6	37	8	54
wild type (N) \times FGSC 514 (P)							
TRB - 1	335	93	70	11	26	8	54
TRB - 3	340	108	27	12	48	6	39
TRB - 5	317	132	55	8	45	4	73
TRB - 6	346	65	24	14	69	5	63
TRB - 8	310	111	32	9	84	9	21
TRB - 10	306	77	25	10	84	5	69

N: nucleus P: protoplast

핵전이에 의한 이와 같은 형질전환율은 Min (1987)에 의해 보고된 *Trichoderma koningii*에서의 야생균주와 돌연변이주간의 형질전환율 31.1%보다는 낮은 것이지만, 원형질체 융합기술에 비하여 핵전이 기술이 *A. nidulans*의 종내잡종 형성에 훨씬 효율적임을 보여준다.

세포의 섬유질 분해효소의 활성

야생균주 또는 FGSC 475로부터 분리한 핵을 FGSC 514에 전이시켜 얻은 형질전환체를 최소평판배지에서 계대배양하여 확인된 안정한 상태의 독립영양형 잡종을 무작위로 선발하고, 이들의 섬유질 분해효소 활성을 모균주의 효소활성과 비교함으로써 섬유질 분해능이 향상된 균주의 선발 또는 균주개량의 가능성을 조사하였다(Table II). FGSC 475와 FGSC 514 사이에 형성된 잡종 중 7개 균주들의 효소활성을 조사한 결과, 측정된 모든 효소의 활성이 모균주에 비하여 증진된 잡종은 나타나지 않았다. 그러나, 대부분의 효소활성이

모균주에 비하여 감소된 TRA-21을 제외한 나머지 잡종들의 경우, 몇몇 효소의 활성이 부분적으로 향상되는 양상을 보였다. 특히, TRA-12의 경우에는 xylanase system(endo-xylanase와 β -xylosidase) 이외의 모든 cellulase system(CMCase, Avicelase 및 β -glucosidase)과 mannanase 활성이 모균주의 118~149%에 달하였다. 야생균주와 FGSC 514 사이에서 선발된 잡종의 경우에도 cellulase system, xylanase system 또는 mannanase의 활성이 부분적으로 증진되는 현상을 보였다.

Nevalainen과 Palva(1978)는 *T. viride*의 cellulase, xylanase 및 mannanase의 생합성이 공통적인 조절기작에 의해 영향을 받는 반면에 β -glucosidase의 생합성은 이들 효소와 독립적으로 조절됨을 보고한 바 있으며, 또 다른 섬유질 분해균인 *Polyporus adustus*의 경우에도 cellulase, xylanase 및 mannanase의 생합성 과정

에 공통적인 조절기작이 작용하는 것으로 알려지고 있다(Eriksson 과 Goodall, 1974). 이에 따라 미생물에서의 섬유질 분해효소, 특히 cellulase와 xylanase의 생합성이 동일 유전자에 의하여 제어되는지 등의 조절기작에 대한 관심이 고조되고 있다(Montenecourt 등, 1981; Rho 등, 1982; Lee 등, 1989). 이와 관련하여 본 연구에서 획득한 잡종들의 섬유질 분해효소 활성의 양상을 살펴보면, 모균주와 대비한 cellulase, xylanase 및 mannanase 활성의 증감이 서로 일치하지 않을 뿐만 아니라, cellulase system의 성분인 CMC-ase, Avicelase 및 β -glucosidase 활성의 증감도 다양한 양상을 보였다. 이러한 결과는 *T. viride* 및 *P. adustus* 등에서 밝혀진 바와는 달리 *A. nidulans*에서는 각 섬유질 분해효소 성분의 생합성 조절기작이 독립적으로 존재함을 보여 주는 것으로서, 이는 최근 종내 원형질 융합체에 대한 효소 활성의 분석을 통하여 *T. koningii*에서의 cellulase, xylanase 및 mannanase 생합성이 독립적인 조절기작에 의하여 이루어짐을 보고한 Park 과 Hong(1989)의 결과와 부합한다.

분생포자 크기와 DNA 함량

*A. nidulans*는 반수체 genome 당 총 4.1×10^7 bp(2.6×10^{10} dalton)에 해당하는 양의 DNA를 가지며(Heagy 와 Roper, 1952), 핵형에 따라 분생포자(conidia)의 크기가 달라서 이배체의 분생포자는 반수체 분생포자보다 약 1.3배의 크기를 갖는 것으로 알려져 있다(Hong, 1982).

본 연구에서 분리된 잡종의 핵형을 조사하기 위하여 모균주와 잡종의 분생포자 크기와 DNA 함량을 비교하였다(Table III). 사용된 모균주 중 야생균주는 FGSC 475와 FGSC 514에 비하여 약 1.4배의 분생포자 크기와 약 1.3배의 DNA 함량을 보였으며 잡종의 분생포자 크기와 DNA 함량은 모균주와 다소 차이가 있었다. 특히 FGSC 514와 FGSC 475간에 형성된 잡종과 FGSC 514와 야생균주 사이에 형성된 잡종의 분생포자 크기는 각각 $2.9 \sim 3.2 \mu\text{m}$ 와 $3.9 \sim 4.3 \mu\text{m}$ 의 분포범위를 보임으로써, 핵 수용균주 FGSC 514의 분생포자 크기인 $2.8 \mu\text{m}$ 보다 증가되었으나 동일한 핵 수용균주라 할지라도 핵 공여균주의 영향에 의해 분생포자의 크기가 달라질 수 있음을 보여주었다.

Table III. Conidial size and DNA content of parental strains of *A. nidulans* and their hybrids

Strain	Mean conidial size (μm)	DNA content / 10^7 pts (μg)
FGSC 475	2.9 ± 0.2	0.89
FGSC 514	2.8 ± 0.3	0.96
Wild type	4.0 ± 0.4	1.17
TRA - 7	3.2 ± 0.3	1.70
TRA - 8	2.9 ± 0.4	1.82
TRA - 20	3.0 ± 0.5	1.91
TRB - 1	4.2 ± 0.4	1.75
TRB - 3	4.2 ± 0.6	1.85
TRB - 8	4.3 ± 0.5	1.59
TRB - 10	3.9 ± 0.4	1.56

또한 형질전환체의 DNA 함량은 10^7 원형질체당 $1.56 \sim 1.91 \mu\text{g}$ 으로 모균주의 1.4~2.1배에 달하는데 이는 *A. nidulans*의 원형질 융합체의 DNA가 융합 모균주의 2~2.3배 정도임을 보고한 Peberdy(1979)의 결과와 비슷하다. 분리된 잡종에서의 DNA 함량은 생성시기에 따라 원형질체 내 DNA 함량 차이가 있기 때문에(Lim 등, 1983) 핵전이 또는 DNA 함량 측정을 위해 사용된 원형질체의 성상에 따라 그 차이가 나타날 수도 있으나, 본 연구에서 분리된 잡종의 DNA 함량은 이들 잡종의 핵형이 이배체이거나 또는 이배체에 가까운 이수체(aneuploid)일 가능성이 높음을 보여준다.

摘 要

핵전이 기술을 이용하여 *Aspergillus nidulans*에서의 종내잡종들을 얻어내고 이들의 섬유질 분해효소계 활성 및 핵형분석을 통하여 이 방법에 의한 균주개량의 가능성을 조사하였다.

A. nidulans 야생균주와 영양요구성 돌연변이주 FGSC 475로부터 추출한 핵을 FGSC 514의 원형질체에 각각 전이시킨 결과 4.8% 및 10.1%의 잡종형성율을 나타냄으로써, 0.6%의 융합빈도를 보인 원형질체 융합법보다 핵전이법이 잡종형성에 더 효과적임을 알 수 있었다. 또한 형성된 잡종들에서 cellulase 및 xylanase system과 man-

nanase 중 일부분의 효소성분의 활성이 향상된 균주가 분리되어 이 방법에 의한 우수 섬유질분해 균주개발의 가능성을 확인할 수 있었으며, 형성된 잡종의 핵형은 이배체 또는 이수체로 분석되었다.

參考文獻

- Anné, J. (1982): Interspecific hybridization in fungi following protoplast fusion. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**: 516.
- Anné, J., Eyssen, H., and De Sommer, P. (1976): Somatic hybridization of *Penicillium roquefortii* with *P. crysogenum* after protoplast fusion. *Nature* **262**: 719-721.
- Bisaria, V.S. and Ghose, T.K. (1981): Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganism enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 90-104.
- Bradshaw, R.E., Lee, K.U., and Peberdy, J.F. (1983): Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 3533-3535.
- Burton, K. (1956): A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**: 315-323.
- Eriksson, K.E. and Goodall, E.W. (1974): Pleiotrophic mutants of wood-rotting fungus *Polyporus adustus* lacking cellulase, mannanase and xylanase. *Can. J. Microbiol.* **20**: 371-378.
- Ferenczy, L. and Pesti, M. (1982): Transfer of isolated nuclei into protoplast of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **7**: 157-160.
- Ferenczy, L., Szegedi, M., and Kevei, M. (1977): Interspecific protoplast fusion and complementation in Aspergilli. *Experientia.* **33**: 184-186.
- Giles, K.W. and Myers, A. (1965): An improved diphenylamine method for estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**: 93.
- Harsanyi, Z., Granek, I.A., and Mackenzie, D.W. R. (1977): Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mut. Res.* **48**: 51-74.
- Hamlyn, P.F. and Ball, C. (1979): Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In: Genetics of Industrial Microorganism. pp.185-191. ed. by Seneck, O.K. and Laskin, A. I., Am. Soc. Microbiol. Washington.
- Haegy, F.C. and Roper, J.A. (1952): Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus conidia*. *Nature* **170**: 713-714.
- Hong, H.J. (1982): Studies on CMCase gene in *Aspergillus nidulans*. M.S. thesis, Dept. of Microbiology, Seoul National University.
- Hong, S.W., Hah, Y.C., Park, H.M., and Cho, N.J. (1984): Intraspecific protoplast fusion in *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 103-110.
- Kevei, F. and Peberdy, J.F. (1977): Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *A. rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 255-262.
- Kevei, F. and Peberdy, J.F. (1984): Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus nidulans* group. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2229-2236.
- Lee, J.A., Maeng, J.S., Maeng, P.J., and Rhee, Y.H. (1989): Synergistic effect of substrates on the biosynthesis of cellulase and xylanase complexes from *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 57-65.
- Lim, H.M., Park, H.M., Hah, Y.C., and Hong, S. W. (1983): Electronmicroscopic study of protoplast, released from the mycelium of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Electron Microscopy.* **13**: 49-55.
- Limtong, S., Myoga, S., Uedono, S., Seki, T., Kummuaanta, J., and Taguchi, H. (1983): Genetic construction of yeast strains for high ethanol. In: UNESCO Regional Workshop on Protoplast Fusion in Microorganisms. pp.66-73. Seoul.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 251-256.
- Min, K.R. (1987): Isolation and analysis of intra- and interspecific hybrids in genus *Trichoderma*. M.S. thesis, Seoul National University.
- Montenecourt, B.S., Nhlapo, S.K. Trimino-Vazquez, H., Cusky, S., Schamhart, D.H., and Eveleigh, D.E. (1981): Regulatory controls in relation to over production of fungal cellulases. In: Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals. ed. by Hollaender, A., R.Rabson, Plenum Press. Lodon.
- Nevalainen, K.M.H. and Palva, E.T. (1978): Pro-

- duction of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride* unable to hydrolyze cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 11-16.
- Park, H.M. (1986): Intra-and interspecific protoplast fusion of cellulolytic fungi, *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei*. Ph.D. thesis. Seoul National University.
- Park, H.M. and Hong, S.W. (1989): Analysis of intraspecific protoplast fusion products in *Trichoderma koningii*, *Kor. J. Microbiol.* **27**: 98-107.
- Peberdy, J.F. (1979): Fungal protoplasts; Isolation, reversion and fusion. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**: 21-39.
- Rho, D., Desrochers, M., Jurasek, L., Driquez, H., and Defaye, J. (1982): Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: Thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* **149**: 47-53.
- Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- Toyama, H., Yamaguchi, K., Shinmyo, A., and Okada, H. (1984): Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 363-368.
- Woodward, J. and Wiseman, A. (1982): Fungal and other β -D-glucosidases: their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 73-79.
- Yoo, Y.B., You, C.H., Shin, P.G., Park, Y.H., and Chang, K.Y. (1987): Transfer of isolated nuclei from *Pleurotus florida* into protoplasts of *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **15**: 250-253.
- You, C.H., Yoo, Y.B., Byun, M.O., and Park, Y.H. (1988): Studies on the transfer of isolated nuclei from *Pleurotus sapidus* into protoplasts of *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **16**: 210-213.

Accepted for Publication 6 September 1989