

분리 핵을 이용한 *Trichoderma koningii* 의 형질전환

민경림¹ · 박희문^{2*} · 하영철³ · 정재훈⁴

¹태평양화학 생명공학연구소 ²충남대학교 미생물학과

³서울대학교 미생물학과 ⁴과학원 생물공학과

Transformation of *Trichoderma koningii* Using Isolated Nuclei

Min, Kyung-Ryum¹, Hee-Moon Park², Young-Chil Hah³ and Jae-Hoon Joung⁴

¹Lab. Biotech. Pacific R & D. Co., ²Dept. Microbiol. Chungnam Nat'l. Univ.,

³Dept. Microbiol. Seoul Nat'l. Univ., ⁴Dept. Biol. Sci. & Engin. KAIST

When protoplasts from auxotrophic mutant of *Trichoderma koningii* CUT121(Lys⁻, Met⁻) were mixed with isolated nuclei of wild type *T. koningii* ATCC 26113 and treated with PEG solution, prototrophic colonies were produced with frequency of more than 30 percent. One of segregants from prototrophic colonies showed increased xylanase activity and other polysaccharide-hydrolyzing activities comparable to those of wild type strain. Through measurement of DNA contents, induced segregation, and analysis of isozyme patterns, it was revealed that the prototrophic colonies were transformants resulted from exchange of genetic materials between the two kinds of nuclei used. These results suggest that nuclei transfer technique is more efficient than conventional protoplast fusion technique for strain improvement of *Trichoderma* species.

원형질체 융합기술은 유전물질 전달을 위한 유용한 방법으로, 세균류 및 균류에 있어 새로운 재조합체와 산업적으로 유용한 균주의 개발에 이용되어 왔다(16). 그러나, 균주개발의 목적으로 원형질체 융합기법을 이용하려면, 융합체 선별에 필요한 영양요구성 등의 유전자 표식을 생산균주에 도입시켜야 하는데, 이 때 원하는 산물의 생산능이 손상되기 쉬워 설사 융합 결과 재조합체를 선별하였다 하더라도 생산능이 향상된 우량균주를 선별할 가능성이 줄어든다. 따라서, 융합시 생산능이 손상되지 아니한 상태로 융합산물의 선별이 가능한 유전자 표식을 갖는 균주를 융합실험에 사용함이 바람직하다 하겠다.

이러한 방법으로는 Zimmermann(22)이 시도한 전기 융합법이나, 재생능이 상실된 원형질체를 유전물질 공여체로 이용하는 법(6), 또는 색깔돌연변이주를 원형질체 융합의 모균으로 사용하는 방법(13) 등이 있을 수 있다. 본 실험에서는 Ferenczy와 Pesti(5)가 효모에 최초로

적용한 이후, 버섯류와(20, 21) 사상균(11, 19)에 적용된 바 있는 핵전이법을 섬유소 분해균으로 널리 알려진 *Trichoderma koningii* 속 균에 적용하여 균주 개량의 가능성을 검토하여 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배지

균주로는 *Trichoderma koningii* ATCC 26113 과 이로부터 유도된 영양요구성 돌연변이주인 CUT121(Lys⁻, Met⁻)을 사용하였다. 또한 실험에 사용된 배지조성은 이미 기술한 바와 동일하게 제조, 사용하였다(8, 15).

원형질체 제조 및 핵의 순수분리

원형질체의 제조는 Hong 등(8)의 방법에 의거하여 행하였고, *T. koningii* ATCC 26113의 핵을 추출하기 위한 방법으로는 효모에서 Ferenczy와 Pesti(5)가 사용한 방법을 적용하였는데, Hong 등(8)의 방법으로 원형질체를 만든 후 2ml MC(0.3M sucrose, 0.5mM

Key words: Isolated nuclei, protoplast, transformation, *Trichoderma koningii*

*Corresponding author

MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂)에 재현탁시키고 10 분 이상 방치하여 원형질체를 터뜨린 다음 이 현탁액을 3,000×g에서 10 분간 원심분리하여 얻은 침전물에 0.6 M sucrose 가 첨가된 MC 2 ml 를 가하여 재현탁시킨 후 5 ml tube 에 2.0 M sucrose 1.5 ml, 1.8 M sucrose 1.0 ml, 1.5 M sucrose 1.0 ml, 1.2 M sucrose 0.5 ml 을 가하여 만든 sucrose 의 불연속 농도구배용액에 시료 1 ml 를 가하여 원심분리하였다(90,000×g, 60 분). 원심분리 후 얻은 핵침전체를 적당량의 0.6 M MgSO₄에 재현탁시킨 것을 형질전환 실험을 위한 순수분리된 핵으로 사용하였다.

형질전환

형질전환실험은 Ferenczy 와 Pesti(5)의 방법에 의거하여 다음과 같이 행하였다. 형질전환시키고자 하는 영양요구성 균주(CUT 121)의 원형질체를 1,200×g로 10 분 원심분리한 후, 이 침전체에 분리한 핵과 형질전환용 원형질체를 가하여 3,000×g로 10 분 원심분리하였다. 다시 형질전환용 원형질체를 이 침전체에 조심스럽게 가한 후 1,200×g로 10 분 원심분리하여 얻은 침전체에 30% PEG (M.W. 6,000)-10 mM CaCl₂-50 mM glycine (pH 5.8) 용액 1 ml 을 가하여 조심스럽게 혼합하였다. 이를 25°C에서 10 분간 방치한 후 0.6 M MgSO₄의 삼투안정제로 적당히 희석하여 환원용 최소배지, 환원용 완전배지, 최소배지 및 완전배지에 각각 도말하였다.

인위적인 분리 유도

최소환원배지상에서 생성된 형질전환체를 완전배지에 옮겨 배양하여 포자를 수득한 후 이를 최소평판배지에 도말하여, 여기서 자라는 상보적인 독립영양형 균주를 분리하였다. 이들 독립영양형 형질전환체의 균사체 일부를 benlate 가 배지 1 ml 당 1.25 ppm 의 수준으로 첨가된 완전평판배지에 옮겨 인위적인 분리를 유도하였다. 이로부터 생성된 포자를 완전평판배지에 도말하여 얻은 균체를 최소평판배지, 완전평판배지 및 영양요구성물질이 첨가된 최소평판배지 등에 옮겨 성장 유무를 살펴 유전자형을 조사함으로써, 상보적인 독립영양형 균주의 핵상분석을 실시하였다.

DNA 량 측정

균사체로부터 제조한 원형질체를 순수분리한 후 50 mM Tris-50 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 용액 5 ml 과 sodium laurylsulfate 0.5g 을 첨가하여 65°C에서 20 분간 방치하여 원형질체를 터뜨린 후, 동량의 차가운 에탄올과 NaCl 을 최종농도 0.3 M 이 되

도록 첨가하여 -20°C에서 하룻밤 방치했다. 이를 -20°C에서 15,000 rpm 으로 30 분간 원심분리하여 얻은 침전물을 상온에서 방치하여 잔여 에탄올을 증발시킨 후 10% perchloric acid 에 재현탁시켜 diphenylamine test 로 DNA 양을 측정하였다.

Diphenylamine test 는 Burton(3)의 방법을 변형한 Giles 와 Myers(7)의 방법에 따랐는데, 앞서와 같이 얻은 DNA 용액에 10% perchloric acid 5 ml 을 가하여 65°C에서 20 분간 추출하는 과정을 두번 반복한 후, 그 상등액을 최종 DNA 추출액으로 사용하였다. 이 DNA 추출액 2 ml 에 diphenylamine 용액 2 ml 과 0.1% acetaldehyde 0.2 ml 을 가한 후 37°C에서 17 시간 이상 반응시켜 파장 600 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Diphenylamine 용액은 100 ml 의 빙초산에 diphenylamine 1.5g 과 농축(35%) 황산 1.5 ml 을 가하여 제조한 후, 암소에 보관하여 사용하였다.

DNA 표준시료로는 언어의 정소에서 추출한 sodium deoxynucleic acid type III (Sigma) 8 mg 을 20 ml NaOH 에 녹인 후, 사용직전 6.5 ml 의 DNA 용액과 동량의 20% perchloric acid 를 혼합하여 65°C에서 20 분간 처리하고 10% perchloric acid 12 ml 을 가하여 DNA 의 최종농도가 100 μg/ml 되게 만들어 사용하였다.

세포외 다당류 분해효소의 측정

세포외 다당류 분해효소의 유도 및 활성측정은 전술한 방법(15)에 의거하여 행하였다. 섬유소 분해효소인 Avicelase, CMCase, β-glucosidase 의 활성측정법은 전보(15)와 동일하며, mannanase, polygalacturonase 및 xylanase 의 활성은 0.05 M 초산완충용액(pH 5.0)에 0.5% 되도록 mannan, polygalacturonic acid sodium salt II 및 xylan from Lachwod(이상 Sigma 제품)을 각각 녹인 용액들을 각각의 기질로 사용하였다. 즉, 기질용액 0.8 ml 에 섬유소분해효소 유도배지에서 얻은 조효소용액 0.2 ml 을 각각 가하고, 50°C에서 30 분간 반응시킨 후 Somogyi 법(18)으로 파장 660 nm 에서 흡광도를 측정하여 유리된 환원당의 양을 측정하였다. 효소활성은 표준 조건하에서, 반응혼합액 1 ml 당 유리된 환원당(β-glucosidase 의 경우는 p-nitrophenol)의 양을 μg (μmol)단위로 표시하였다. 단백질 정량은 Bradford(1)의 방법에 의거하여 파장 595 nm 에서 bovine serum albumin 을 표준시료로 사용하여 시행하였다.

효소의 polyacrylamide gel 전기영동 및 염색

세포내 동위효소와 수용성 단백질의 전기영동 양상을 조사하기 위하여, 조사대상의 균주를 완전액배지에서 24-28 시간 배양하여 균사체를 수확한 후, 효소추출 완충용액인 Tris-HCl(pH 7.0)-6 mM dithiothreitol을 적당량 넣고 초음파기로 파쇄한(120 watt, 10 초간 5회) 후, 원심분리(10,000×g, 30 분)하여 그 상등액을 시료로 사용하였다.

전기영동은 Davis(4)의 방법을 변형하여 slab gel에서 행하였는데, gel의 조성은 T=7-10%, C=2.7%로 하였고, 시료가 seperating gel에 들어갈 때까지는 60V, 그 이후에는 200V로 4°C에서 전기영동하였다. Peroxidase의 활성검출은 Sato 등(17)의 방법을 적용하였는데, 0.22%의 catechol이 첨가된 0.1M Tris-HCl(pH 7.0)에 전계가 끝난 gel을 담구어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 증류수로 가볍게 세척하고 1% hydrogen peroxide에 담구어 발색시켰다. Malate dehydrogenase의 활성 검출은 Brown 등(2)의 방법에 의거하였는데, 전계가 끝난 gel을 D,L-malate(0.85%), NAD⁺(0.03%), p-nitro blue tetrazolium(0.02%) 및 phenazine metasulfate(0.004%)가 첨가된 0.1M Tris-HCl(pH 7.5)의 반응액에 담구어 37°C에서 30분간 반응시켜 그 양상을 관찰하였다.

결과 및 고찰

핵의 추출 및 전이

본 실험에서는 French press나 glass bead 등을 사용하여 균사체를 파쇄한 후 sucrose 불연속 농도구배를 이용하는 물리적인 방법과, 세포벽 가수분해 효소를 처리하여 원형질체를 얻어 핵을 추출하는 방법을 각각 적용하여 본 결과, 후자의 방법이 보다 효율적임을 알 수 있었다(자료생략). 즉, 물리적인 방법을 사용하는 경우 crude nuclei 현탁액에는 균사체의 조각이 많이 혼재하

여, 핵이 많이 trapping되게 되고, 이 현탁액을 형질전환 실험에 사용한 경우 형질전환체를 효과적으로 선별할 수 없었다. 따라서, 균사체 조각을 제거하기 위하여 원형질체를 이용한 핵의 순수분리 방법으로 Ferenczy와 Pesti(5)의 법을 적용한 sucrose 불연속 농도구배 원심분리법을 택하였다.

핵전이 실험으로, 야생형인 *T. koningii* ATCC 26113으로부터 핵을 추출한 후, lysine과 methionine을 성장요구물질로 요구하는 영양요구성 돌연변이주인 CUT 121의 원형질체에 전이시켜 본 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 약 30% 정도의 형질전환율을 나타내었다. 이러한 수치는 통상의 원형질체 융합법에 의하여 얻을 수 있는 수치보다 월등히 높은 것이다. 형질전환율은 다음의 식에 의거하여 계산하였다. "형질전환율=[(환원용 최소배지상의 균체수-최소배지상의 균체수)÷(환원용 완전배지상의 균체수-완전배지상의 균체수)]×100". 그런데, *T. koningii* ATCC 26113으로부터 얻은 핵의 현탁액이 순수하지 못하여 균사체 조각이나 미처 발아하지 못한 분생포자(conidiospore)를 포함하고 있었다면, 대조구로 사용한 완전평판배지나 최소평판배지상에서 균체를 관찰할 수 있었어야 할 것이다. 또한 핵 수용체로 이용한 영양요구성 돌연변이주인 CUT 121의 원형질체 현탁액이 순수하지 못하였거나, 영양요구성이 독립영양형으로 재전환(reversion)되었다면, 이 경우 역시 완전평판배지와 최소평판배지상에서 균체를 관찰할 수 있어야 할 것이다. 그러나 Table 1에서 보듯이 완전평판배지와 최소평판배지상에서 균체가 관찰되지 아니하였다. 따라서 *T. koningii* ATCC 26113에서 추출한 핵이나 CUT 121에서 분리해낸 원형질체 현탁액은 순수하고 안정한 것이며, 환원용 최소배지상에 생성된 균체는 추출한 핵이 영양요구성 돌연변이주의 원형질체로 전이된 결과 생성된 형질전환체임을 알 수 있었다.

환원용 최소배지상에 생성된 형질전환체를 임의 선정

Table 1. Transformation of the protoplasts from *T. koningii* CUT 121 using the isolated nuclei from wild type *T. koningii* ATCC 26113

Cross	Number of colonies on				Transformation frequency (%)
	RMM (×10 ³)	RCM (×10 ³)	CM	CM	
ATCC 26113 (n)					
×	20.3	66.0	0	0	31.3
CUT 121 (p)					

Abbreviation: RMM; regeneration minimal medium, RCM; regeneration complete medium, CM; complete medium, MM; minimal medium, n; nuclei, p; protoplast

하여 완전평판배지에 옮긴 후, 자연분리시켜 생성된 포자에 대한 영양요구성을 조사하여 본 결과 모두 독립영양형으로 나타났다(자료생략). Hong과 Park(9), Park 등(15)에 의하여, 원형질체 융합시 환원용 최소배지상에 형성된 독립영양형 균체의 포자 중에는 이미 재조합체가 존재함이 밝혀진 바 있다. 따라서 본 실험에서 얻어진 독립영양형의 형질전환체들은 재조합체 또는 이배체일 것임을 추측할 수 있다. 그러나 자연분리 결과 나타난 독립영양형 형질전환체가, 한 원형질체내에 존재하는 두 가지 핵간의 유전물질교환에 의하여 생성된 것이 아니라, 상대적으로 최소배지에서 발현될 가능성이 높은(또는 상대적으로 보다 빨리 발현된) 독립영양형인 야생형(ATCC 26113)의 핵이 선택적으로 증폭되어(gene dosage effect) 얻어진 것일 수도 있다. 따라서 이들이 두 핵간의 유전물질교환에 의하여 생성된 진정한 형질전환체인지 확인하기 위하여 다음과 같이 조사하였다. 즉, 환원용 최소배지상에 생성된 형질전환체를 완전배지상에서 자연분리시켜 얻은 독립영양형 균체를 phosphoric acid swollen cellulose 배지에 도말한 후(15), 잘 자란 것과 자라지 않는 두 개의 균체를 무작위로 선별하여 NT-11, NT-1이라 명명하였다. 그런 다음 이들의 세포외 다당류 분해효소능, DNA 함량, 전기영동에 의한 동위효소 양상의 분석을 행하였다.

세포외 다당류 분해효소능

본 실험의 주된 목적 중의 하나가 원하는 산물(이 경우 cellulase 등의 다당류 분해효소)의 생산능이 손상되지 아니한 즉, 특정유전자 표식을 갖지 않는 균주의 핵을 사용하여, 이로부터 우량균주의 선별가능성을 높이고자하는 것이다. 따라서 이들 형질전환체의 세포외 다당류 분해효소능을 조사하였다. 그 결과, Table 2에서 보듯이 phosphoric acid swollen cellulose 평판배지에서 잘 자라는, 즉 균체주변의 투명한 크기가 큰 NT-11의 경우, CMCase와 mannanase의 활성은 ATCC 26113보다 다소 낮으나, 그 외의 효소활성은 거의 비슷한 수준이었으며, 특히 xylanase의 활성은 3배 가량 높게 나타났다. 반면 phosphoric acid swollen cellulose 평판배지에서 잘 자라지 못하는 NT-1의 경우, β -glucosidase와 xylanase를 제외한 나머지 효소의 활성이 ATCC 26113보다 낮음을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 분리핵을 이용한 형질전환법에 의하여, 원하는 산물의 생산능이 높은 균주의 개발이 가능함을 알 수 있고, 최종적으로 얻어진 독립영양형 형질전환체는, 그 효소능 양상이 실험에 사용된 모균들(ATCC

Table 2. Activities of extracellular polysaccharide-hydrolyzing enzymes in *T. koningii* and transformations obtained by nuclei transfer

Activities	Strains			
	ATCC 26113	CTU 121	NT-1	NT-11
Avicelase ^a	32.1	9.4	15.1	39.1
CMCase ^a	80.7	18.3	18.3	25.5
β -glucosidase ^b	360	282	306	353
Mannanase ^a	18.2	6.6	1.3	4.1
Polygalacturonase ^a	6.3	5.4	4.7	5.1
Xylanase ^a	35.5	18.8	91.0	111.6
Protein ^c	226.9	186.2	118.2	179.1

^a: Activity was expressed by the amount (μ g) of glucose equivalents released in 1 ml of reaction mixture under standard assay condition.

^b: Activity was expressed by the amount (μ mol) *p*-nitrophenol equivalents released in 1 ml of reaction mixture under standard assay condition.

^c: Amount of protein secreted into growth medium (μ g/ml)

Table 3. Induced segregation of transformants obtained from the transfer of isolated nuclei of *T. koningii*

Strains	Number of colonies tested	Phenotypes	
		Lys ⁻ , Met ⁻	Prototroph
NT-1	154	0	154
NT-11	191	2	189

26113과 CUT 121)과는 다르게 나타나는 것으로 보아, 단순히 독립영양형인 야생형(ATCC 26113) 핵의 선택적인 발현에 의해 생성된 것이 아니라, 두 핵간의 유전물질교환 결과 생성된 것으로 추정된다. 그러나, 이 실험의 결과만으로는 형질전환체가 진정한 재조합체라고 단정하기는 어려우므로 다음과 같은 몇 가지 보완실험을 행하였다.

형질전환체의 인위적인 분리유도 및 DNA 함량조사

*Trichoderma*속 균류의 종내, 종간 원형질체융합 결과 얻어진 독립영양형 잡종의 핵형분석에 유용하게 적용될 수 있음이 확인된 유전자의 인위적인 분리양상조사법(14)으로 조사하여 본 결과(Table 3), NT-1의 경우 조사한 154개의 형질전환체 모두가 독립영양형의 형태로만 분리되었고, NT-11의 경우에는 영양요구성과 독립영양형의 분리비가 1:94로 나타났다. 그러나, 본 실험

Table 4. DNA contents of parental strains and transformants obtained from nuclei transfer in *T. koningii* ATCC 26113

Strains	Number of protoplasts ($\times 10^7$)	Amount of DNA (μg)	DNA contents per 10^6 of protoplast(ng)
ATCC 26113	7.0	8.3	118.6
CUT 121	4.4	5.9	134.1
NT-1	2.8	4.1	146.4
NT-11	3.4	4.0	117.6

의 경우에는, 두 종류의 영양요구성 돌연변이주를 융합 모균으로 사용하였던 경우(14)와는 달리 독립영양형인 야생형의 핵을 사용하였기에, NT-과 NT-11이 실험에 사용된 두 핵간의 유전물질 교환에 의해 생성된 재조합체인지, 아니면 NT-1과 NT-11을 얻기 위해 자연분리시켰던 독립영양형의 재조합체가 원래 ATCC 26113의 핵(또는 형질)만 갖고 있었기에 이러한 결과를 보여주었는지 정확히 판정할 수 없었다. 다만 NT-11의 경우 아주 낮은 빈도이기는 하나, 영양요구성균주가 검출되는 것으로 보아, 형질전환체가 종내, 종간잡종의 경우와 마찬가지로 이수체(aneploid)일 가능성을 배제할 수는 없다(14). 그런데 이들 형질전환체의 DNA 양을 조사한 결과(Table 4), NT-11은 ATCC 26113과 유사한 수준의 DNA 함량을 보여주었고, NT-1은 CUT 121에 가까운 양상을 보여주고 있어, 이들 형질전환체가 유전물질 교환에 의해 생성된 재조합체(잡종)일 가능성을 보여주었다.

전기영동분석

저자 등은 원형질체 융합결과 생성된 종내, 종간잡종을 분석함에 있어, 각종 효소의 동위효소 양상을 전기영동법으로 분석 조사하면 간편하게 잡종들을 비교, 동정할 수 있음을 보고한 바 있다(12). 따라서 이 분석법을 사용하여 형질전환체의 분석을 시도한 결과 Fig. 1에서 보듯이, 자연분리 후 얻어진 독립영양형 형질전환체가 유전물질의 교환이 이루어져 생성된 재조합체임을 쉽게 판정할 수 있었다. 즉, peroxidase의 경우(Fig. 1a), NT-1은 CUT 121과 유사한 양상을 나타내었으나, NT-11의 경우에는 ATCC 26113이나 CUT 121과는 전혀 다르게 최소한 4가지 이상의 동위효소가 존재하는 재조합체임을 알 수 있었다. Malate dehydrogenase의 경우(Fig. 1b)에는 NT-1과 NT-11 공히 ATCC 26113이나 CUT 121과는 다른 동위효소 양상을 보여주고 있어, 이들이 유전자교환 결과 생성된 재조합체임을 확인할 수 있었다. 또한 결과를 보이지는 아니하였으나 세포

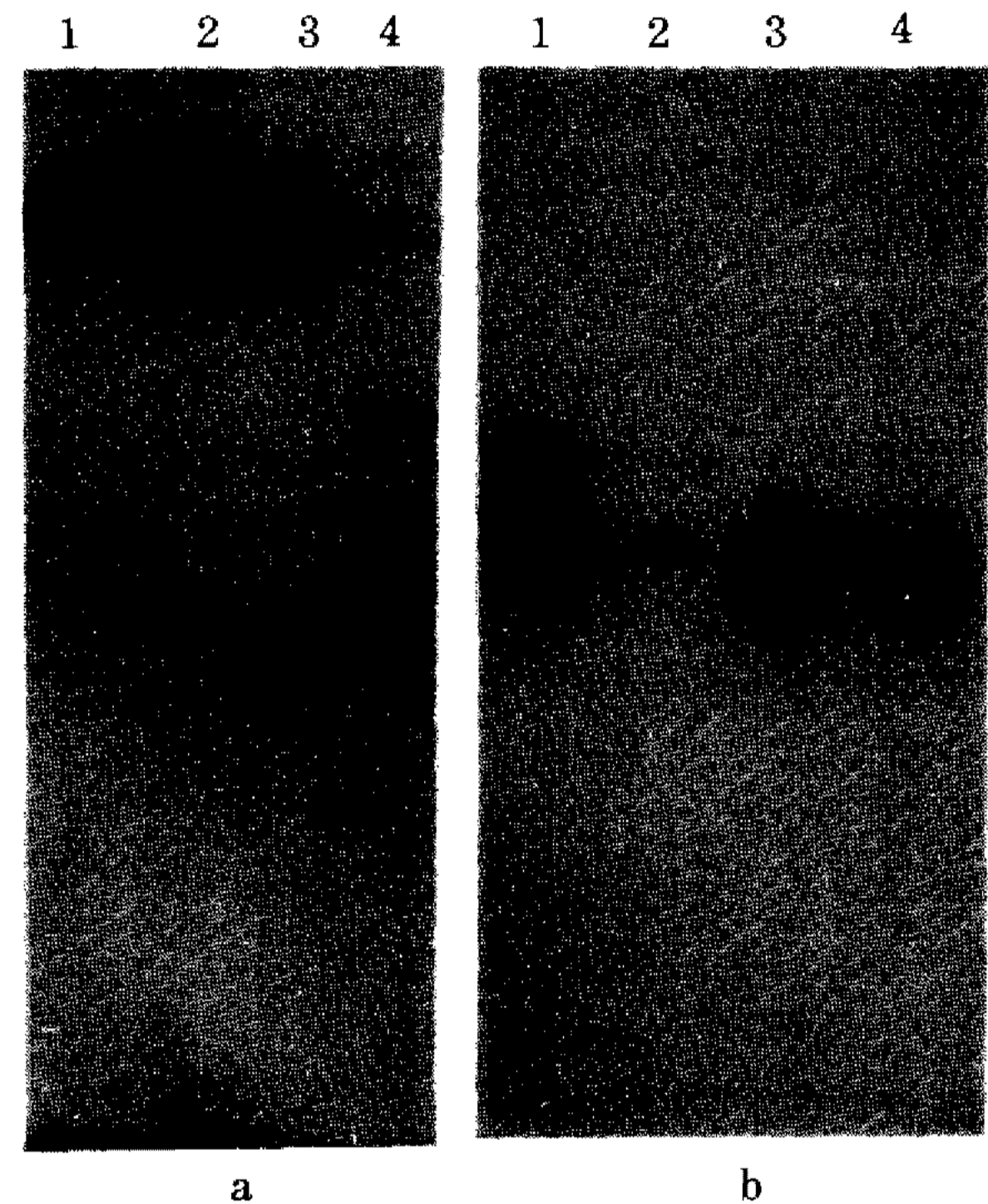


Fig. 1. Electrophoretic patterns of peroxidase (a) and malate dehydrogenase (b) in the extracts of *Trichoderma koningii* and its transformants obtained by nuclear transfer. Lane 1: *T. koningii* ATCC 26113, Lane 2: *T. koningii* CUT 121, Lane 3: NT-1, Lane: NT-11.

내 수용성 단백질의 양상도, NT-1은 ATCC 26113이나 CUT 121과는 전혀 다른 양상을 보여주었으며, NT-11의 경우에는 ATCC 26113이나 CUT 121의 중간형인 양상을 보여주었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 분리핵을 이용한 원형질체의 형질전환법(핵전이법)을 사용하면, 일반적인 원형질체 융합기법 적용시 필요한 유전자 표식의 도입(돌연변이주의 분리)에 드는 시간과 노력을 절약할 수 있음을 알 수 있다. 또한 산업적으로 유용한 균주의 경우, 융합체 선별에 필요한 유전자 표식의 도입으로 인한 생산능의 손실을 줄일 수도 있음을 알 수 있다. 이외에도, 원형질체 융합에 의한 종간 잡종의 형성여부 및 빈도에 따른 균류의 분류학적 연관성 연구법의 경우(10), 유전자

표식을 갖는 한 가지 표준균주의 원형질체를 유전자 수용체로 사용하고, 유전자 표식이 없는 이중 핵을 유전자 공여체로 이용하여 그 적용범위를 훨씬 광범위하게 넓힐 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

*Trichoderma koningii*의 영양요구성 돌연변이주인 CUT 121로부터 얻은 원형질체를 야생형인 ATCC 26113의 핵과 혼합하여 PEG 용액을 처리한 결과, 독립 영양형의 형질전환체가 30% 이상의 빈도로 생성되었다. 이 독립영양형 균체로부터 얻은 분리체 중의 하나는 xylanase의 활성이 야생형보다 3배 가량 증진되었으며, 다른 세포의 다당류 분해효소능도 야생형과 유사한 수준을 나타내었다. 분리체의 DNA 함량, 인위적인 분리양상 및 동위효소 양상 등을 조사 분석한 결과, 독립영양형의 형질전환체는 실험에 사용된 두 핵간의 유전물질 교환에 의하여 생성된 형질전환체로 판명되었다. 이상의 결과로부터 *Trichoderma*속 균류의 균주개량법으로, 핵전이법이 통상의 원형질체 융합법보다 효율적인 것으로 판명되었다.

참고문헌

1. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
2. Brown, A.H.D., E. Nevo, D. Zohary and O. Dagan: *Genetica.* **49**, 97 (1978).
3. Burton, K.: *Biochem. J.* **62**, 315 (1956).
4. Burton, B.J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
5. Ferenczy, L. and M. Pesti: *Curr. Microbiol.* **7**, 157 (1982).
6. Fodor, K., E. Demiri and L. Alfoli: *J. Bacteriol.* **185**, 68 (1978).
7. Gile K.W. and A. Myers: *Nature.* **206**, 93 (1965).
8. Hong, S.W., Y.C. Hah, H.M. Park and N.J. Cho: *Kor. J. Microbiol.* **22**, 103 (1984).
9. Hong, S.W. and H.M. Park: *Kor. J. Nat'l. Acad.* **24**, 121 (1985).
10. Kevei, F. and J.F. Peberdy: *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2229 (1984).
11. Min, K.R. M.S.: *Thesis. Seoul Nat'l. Univ.* (1987).
12. Min, K.R., H.M. Park and Y.C. Hah: *Kor. J. Microbiol.* **27**, 27 (1989).
13. Ogawa, K., J.A. Brown and T.M. Wood: *Enzyme. Microb. Technol.* **9**, 229 (1987).
14. Park, H.M. and S.W. Hong: *Kor. J. Microbiol.* **27**, 98 (1989).
15. Park, H.M., J.M. Jeong, S.W. Hong, Y.C. Hah and C.N. Seong: *Kor. J. Microbiol.* **24**, 91 (1986).
16. Peberdy, J.F.: *Enzyme. Microb. Technol.* **2**, 23 (1980).
17. Sato, M., M. Ichinoe and O. Tsuruta: *Trans. Mycol. Soc. Japan.* **21**, 229 (1980).
18. Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.* **175**, 19 (1952).
19. Yang, Y.K., Y. Park, Y.H. Rhee and P.J. Maeng: *Kor. J. Mycol.* **17**, 154 (1989).
20. Yoo, Y.B., C.H. You, P.G. Shin and Y.H. Park and K.Y. Chang: *Kor. J. Mycol.* **15**, 250 (1987).
21. You, C.H., Y.B. Yoo, M.O. Byun and Y.H. Park: *Kor. J. Mycol.* **16**, 210 (1988).
22. Zimmermann, U.: *Trends Biotechnol.* **1**, 149 (1983).

(Received October 19, 1990)