

## 화학적 돌연변이원에 의한 *Rhizopus nigricans*의 돌연변이주 분리

신혜란 · 김명희 · 김말남\*  
상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

### Isolation of Mutants in *Rhizopus nigricans* by Chemical Mutagens

Hae-Rhan Shin, Myung-Hee Kim, and Mal-Nam Kim\*  
Department of Biology, Sangmyung Women's University, Seoul 110-743, Korea

**ABSTRACT:** In order to isolate mutants in *Rhizopus nigricans*, the optimal treatment conditions for the chemical mutagens, N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine(MNNG) and Ethyl Methane Sulphonate(EMS), were explored. When MNNG was used as the chemical mutagen, the optimum concentration and treatment time for the best mutation frequency were 125 µg/ml and 60 minutes, respectively. Under the optimum conditions for MNNG, the survival rate was 0.1-1.0%. The leucine auxotroph could be isolated. The phenotypic characteristics of the three mutants prepared are as follows; shortened sporangiophore, spiral sporangiophore, and reduced size of sporangium and sporangiospore. However, EMS as the chemical mutagen was ineffective for this species.

**KEYWORDS:** *Rhizopus nigricans*, MNNG, EMS, auxotrophic mutant, morphology.

#### 序 論

산업적으로 유용한 미생물의 생산성을 증대시키기 위하여 균주의 개발 및 육종이 필요하다. 우량균주의 개발을 위해서는 자외선(고, 1980)이나 화학물질(Deorukhakar와 Murthy, 1991)을 사용하여 우수 돌연변이주를 유도하는 방법과 상호 교배 가능한 균주간의 유성생식을 통한 육종법(Demain, 1976)에 의하여 우량균주를 선별하는 방법이 주로 이용되어 왔다. Kao와 Michayluk(1974)에 의해 식물세포에서 polyethylene glycol의 융합 촉매 작용이 밝혀진 이후 미생물 세포에도 이 융합 촉매제를 적용함으로써(Arne와 Peberdy, 1975) 원형질체 융합에 관한 연구가 급속히 진행되어 미생물 유전학 및 우량균주 개발에 새로운 전기를 가져왔다. 원형질체 융합에 의해 우량 균주를 개발할 때 융합체를 확인하기 위하여 가장 널리 이용되는 것이 영양 요구성 돌

연변이주의 이용이다(Homolka 등, 1988).

Mucorales 목, Mucoraceae 과에 속하는 *R. nigricans*는 Ehrenberg에 의하여 처음으로 발견되었으며, 성장이 빠르고 서식처가 다양하며 생육온도의 범위가 광범위하여 자연계에 널리 분포하고, 유성 혹은 무성 포자로 증식한다. 종간 분류의 기준은 포자낭병, 포자낭 및 포자의 크기와 모양이다(Inui와 Takeda, 1965). *R. nigricans*의 기균사인 포자낭병의 길이는 1500-3000 µm가 일반적이며 간혹 500 µm 또는 3500 µm의 크기도 있으나, 1000 µm 이상일 때 이 종으로 분류하고 있다. 포자낭병의 모양은 직선형을 나타낸다. *R. nigricans*는 *Rhizopus* 속의 다른 종들보다 포자낭과 포자낭포자의 크기가 큰 종에 속하며, 포자낭의 직경은 100-200 µm, 포자낭포자의 장경은 4-12 µm로 알려져 있다(Inui와 Takeda, 1965).

*R. nigricans*는 steroid의 미생물적 전환 반응(Kim, 1987), acetyl methyl carbinol과 2,3-butylene glycol의 생성(Fields와 Richmond, 1987) 및 유기산

\*Corresponding author

생성(유 등, 1986) 등의 산업분야에서 중요한 역할을 하는 부가가치가 높은 균주이다. 그러나, 이 균주에 대한 유전적 연구는 미흡한 실정으로써 *R. nigricans*의 돌연변이주에 대하여는 거의 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 화학적 돌연변이 유발원인 MNNG와 EMS에 대한 *R. nigricans*의 감수성을 조사하고, 이들 화학물질을 사용하여 *R. nigricans*의 영양 요구성 돌연변이주와 형태적 돌연변이주를 분리하여 그 특성을 조사하였다.

## 材料 및 方法

**균주 및 배지** : 본 연구에 사용한 균주는 한국의 토양에서 분리 동정된 *Rhizopus nigricans*로서 고려대학교로부터 분양받아 계대 배양 후 5일 이내의 신선한 균체를 사용하였다. 완전 고체 배지는 Potato Dextrose Agar(PDA) 배지를, 최소 액체 배지는 Table 1의 E 배지를, 최소 고체 배지는 최소 액체 배지에 20 g/l의 agar를 첨가하여 사용하였다. 돌연변이주를 효율적으로 분리하고자 완전 고체 배지와 최소 고체 배지에 각각 성장 저해제로 0.1%(v/v)의 Triton X-100을 첨가하였다.

**균사체 건조량의 측정** : 최적의 최소 배지를 선정하기 위하여 Table 1의 각 최소 배지 50 ml에 포자 현탁액 1 ml( $1.0 \times 10^7$  spores/ml) 씩을 접종하고 28°C, 180 rpm의 진탕 배양기에서 24 또는 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 여과하여 균사체만을 취하고 증류수로 3-4회 세척한 다음 105°C에서 15시간 건조시켜 건조량을 측정하였다.

**돌연변이원에 대한 감수성 조사** : 완전 고체 배지에서 2~3일간 배양한 모균주에 20 mM 멸균 인산 완충액 (pH 6.0)을 넣어 포자현탁액을 준비하였다. 포자현탁액 1 ml( $2.0 \times 10^7$  spores/ml)에 MNNG 또는 EMS 용액 1 ml를 첨가하여 28°C에서 진탕하였다. MNNG 또는 EMS에 처리한 포자현탁액 0.5 ml와 0.1 M 구연산 완충액 4.5 ml를 혼합하여 원심분리하는 과정을 3~4회 반복함으로써 MNNG 또는 EMS를 제거하고 적절히 희석하여 0.1% Triton X-100이 첨가된 PDA 평판배지에 도말하였다. 28°C에서 2~3일간 배양한 후 colony 수를 측정하여 생존율을 계산하였다.

**돌연변이주의 분리** : 포자 현탁액( $1.0 \times 10^7$  spores/ml)에 MNNG 농도가 125 µg/ml 되도록 혼합하고 28°C에서 60분간 처리하였다. 20 mM 인산 완충 용액(pH 6.0)으로 4~5회 세척하면서 원심분리(6000 xg, 15분)하여 포자체를 수회하였다. 이를 최소 액체 배지에 접종하고 28°C에서 2일간 진탕 배양한 후 여과시켜 최소 액체 배지에서 발아하지 못한 포자를 농화하였다. 희석한 포자 현탁액( $1.0 \times 10^3$  spores/ml)을 0.1%의 Triton X-100이 포함된 완전 평판 배지와 최소 평판 배지에 0.1 ml 씩 도말하고 28°C에서 생성된 colony를 다시 완전 평판배지와 최소 평판 배지에 접종하여 2~3일간 배양한 후 완전 고체 배지에서는 자라지만 최소 고체 배지에서는 자라지 못하는 colony를 영양요구성 돌연변이주로 구분하였다. 영양요구성 돌연변이주의 영양요구물질의 결정은 Kim(1986)에 의하여 변형된 Holliday방법(Clowes와 Hayes, 1981)을 따랐으며, 여기에 0.1% Triton X-100을 첨가하여 사용하였다. 위와 동일한 방법으로 MNNG를 완전 고체 배지에 접종하고 배양한 후 *R. nigricans*의 야생형과 형태적으로 상이한 colony를 돌연변이주로 분리하였다. 모든 돌연변이주는 10세대 이상 계대 배양하여 변이의 안정성을 확인하였다.

## 結果 및 考察

**최적의 최소 배지** : 진균의 최소배지는 주로 Czapeck Dox 배지(Baudri와 Morpurgo, 1990)와 Mandels 배지(Mandels, 1975)가 이용되어 왔으나, 본 연구에서 *R. nigricans*는 두 배지 모두에서 성장이 활발하지 못하였다.

*R. nigricans*는 질소원으로  $\text{NaNO}_3$ 를 이용하지 못하고  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  또는  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 이용한다고 보고되어 있다(Inui와 Takeda, 1965). 최소배지의 조성에 따른 균체량의 변화를 조사한 결과(Fig. 1), Table 1의 E 배지가 최적의 최소배지로 나타났다.

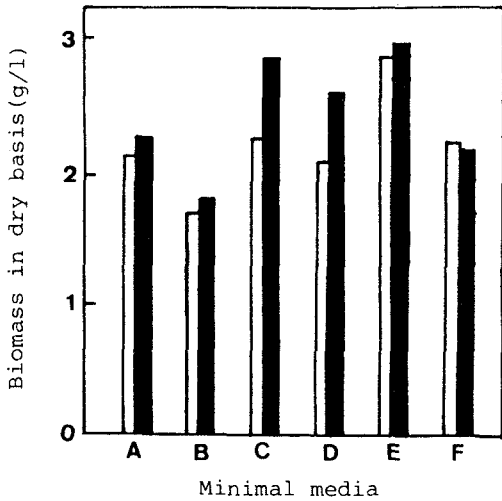
**돌연변이원에 대한 감수성** : MNNG는 돌연변이 유도능력이 우수한 화학적 돌연변이원으로 알려져 있다. 균주의 종류, MNNG 농도 및 처리시간 등에 따라 MNNG에 대한 감수성에는 큰 차이를 보이며(이, 1988), MNNG의 처리시 돌연변이가 가장 잘 유도될 수 있는 균체의 생존율은 0.1-1.0% 범위로

보고되어 있다(Miller, 1974).

Fig. 2에서 MNNG 농도를 125 µg/ml로 하고 처리시간은 60분으로 하였을 때 *R. nigricans*의 생존율은 0.1-1.0%를 나타내었다. 돌연변이 유도에 가장 효과적인 생존율 범위에 있는 MNNG 처리 조건은 그 농도와 시간에 따라 약간의 변화가 있으나, Hopwood(1970)는 MNNG의 처리시간보다는 농도가 더 중요하다고 지적하였다.

Fig. 3은 *R. nigricans*에 MNNG를 처리하였을 때 그 농도와 처리시간에 따른 생존율의 변화를 보여 준다. EMS는 MNNG의 경우와는 달리 높은 수준의 생존율을 보이며, 이는 Freeze(1963)의 결과와 유사하다.

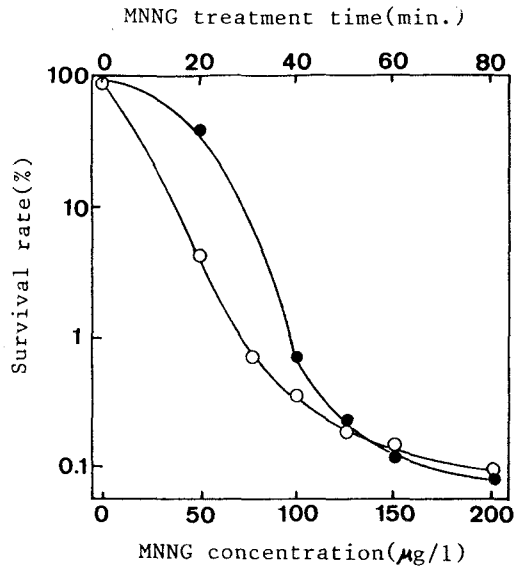
**MNNG에 의한 돌연변이주의 분리 : 영양 요구성**



**Fig. 1.** Selection of the optimum minimal medium.

□ : 24 hours of culture  
 ■ : 48 hours of culture

돌연변이주는 원형질체 융합과 유전자 형질 전환의 marker로써 유용하다. 돌연변이주 중에서 영양요구성 돌연변이주는 약 0.02-0.4% 출현한다고 보고되었다(Park, 1985). 본 연구에서는 *R. nigricans*에 돌연변이원으로써 MNNG를 사용하고 농화배양으로 여과법을 사용하여 영양요구성 돌연변이주 분리 실험을 한 결과, Leucine 영양요구주 한 주를 분리하였다. *R. nigricans* 영양요구주 분리에 대한 연구는 많이 보고되어 있지 않은 상태이며, 실제로 본 실험에서도 돌연변이주의 분리가 어려울 뿐더러 back mutation이 계속 일어나서 영양요구성 돌연변이주 분리의 확률이 매우 낮았다.



**Fig. 2.** Survival curve of *R. nigricans* treated with MNNG as a function of MNNG concentration (●) and treatment time (○).

**Table 1.** Composition of various minimal media

Media	A		B		C		D		E		F	
Composition (g)	Dextrose	10	Dextrose	5	Dextrose	20	Dextrose	10	Dextrose	20	Sucrose	30
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	NH <sub>4</sub> Cl	3	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.85	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15	KCl	0.5
							CaCl <sub>2</sub>	0.3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
							FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	KCl	0.5	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
							ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.4	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001		
							MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.56				
							CoCl <sub>2</sub>	2				

\* Each minimal medium was prepared with 1 liter of distilled water.

*R. nigricans* Ehrenberg는 Mucorales 목, Mucoraceae 과에 속하며, 중간 분류의 기준은 포자낭병, 포자낭 및 포자의 크기와 모양이 된다(Inui와 Takeda, 1965). 본 연구에서는(Table 2) 야생형에 비하여 포자낭병의 길이가 현저히 짧아진 것, 포자낭병의 모양이 나선형으로 구불구불해진 것, 포자낭의

크기가 극히 작아진 것 등 형태적인 돌연변이주 3종을 분리하여 이에 보고하는 바이다.

摘 要

*R. nigricans* Ehrenberg의 돌연변이주를 분리하기 위하여 화학적인 돌연변이원인 N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine(MNNG)과 Ethyl Methane Sulphonate(EMS)의 최적 처리 조건을 조사하였을 때, MNNG농도는 125 µg/ml, 처리시간이 60분일 때 돌연변이율이 가장 높은 생존율 0.1-1.0%를 나타내었다. MNNG를 이용하여 영양요구성 돌연변이주 Leucine auxotroph를 분리하였으며, 포자낭병의 길이가 축소된 것, 포자낭병의 모양이 나선형으로 변한 것, 그리고 포자낭과 포자낭포자의 크기가 감소된 것 등 세 가지 형태적 변이주를 분리하였다.

參考文獻

고상균, 1980. *Aspergillus flavus* K. U. 153의 강력 Protease 생성 돌연변이주에 관하여, 고려대학교 석사 학위 논문.  
 유주현 외 15인, 1986. 식품미생물학, 개문사. 69.  
 이현숙, 1988. *Fusarium moniliforme*의 원형질체 융합. 이화여자대학교 석사 학위 논문.  
 Anne, J. and J.F. Peberdy, 1975. Conditions for indu-

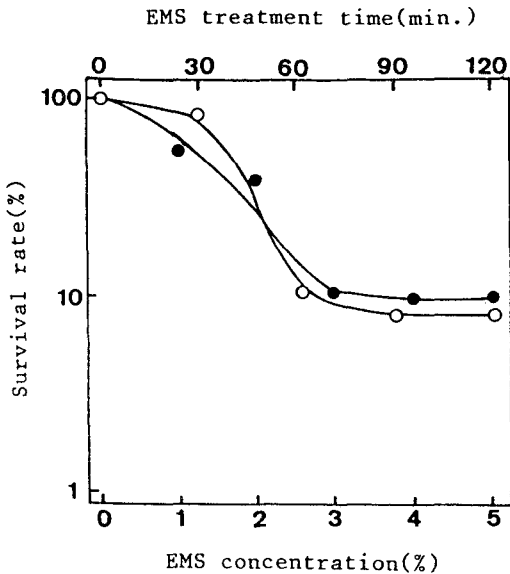


Fig. 3. Survival curve of *R. nigricans* treated with EMS as a function of EMS concentration(●) and treatment time(○).

Table 2. Characteristics of wild type and morphological mutants in *R. nigricans*

	Wild type (Inui and Takeda, 1965)	Morphological Mutants		
		I	II	III
Length of sporangiophore	3000-3500 µm *key : ≥1000 µm	300 µm	3000 µm	3000 µm
Shape of sporangiophore	Straight form *key : Straight form	Staight form	Spiral form	Straight form
Axis of sporangium	130 - 270 µm *key : ≥ 100 µm	130-270 µm	130-270 µm	≤50 µm
Long axis of sporangiospore	6-7 µm *key : 4 - 12 µm	6-7 µm	6-7 µm	2-3 µm

\*key refers to key characteristics of classification for this species. Mutant I, II and III correspond to the mutants having shortend aerial hyphae(sporangiophore), spiral sporangiophore and reduced size of sporangia and sporangiospore, respectively.

- ced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol. *Arch. Microbiol.* **105**: 201-205.
- Baudri, N. and G. Morpurgo, 1990. Frequency of spontaneous and induced recessive mutants in a diploid strain of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* **230**: 187-195.
- Demain, A. L. 1976. Comments on cellulase production. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**: 79-81.
- Deorukhakar, V. V. and M. S. S. Murthy. 1991. Influence of anoxia and respiratory deficiency on the genotoxicity of some direct acting alkylating agents in yeast. *Mutation Res.* **262**: 7-13.
- Ferenczy L., F. Kevei and M. Szeged. 1974. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia* **3**(1): 50-52.
- Fields, M. L. and B. Richmond, 1967. Substrate effect on 2, 3-butylene glycol production by *Rhizopus nigricans* and *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* **15**(6): 1313-1315.
- Freeze, E. 1963. Methodology in Basic Genetics. p. 3-18 In: W. J. Burdette. Eds. Hoen-Day, San Francisco.
- Homolka, L., P. Vyskocil and P. Pilat, 1988. Use of protoplast in the improvement of filamentous fungi. I. Mutagenization of protoplast of *Oudemansiella mucida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 166-169.
- Hopwood, D. A. 1970. The Isolation of Mutants. p. 363-433 In: J. R. Norris and D. W. Ribbons. Eds. Methods in Microbiology Vol. 3A. Academic Press. N.Y.
- Inui, T. and Y. Takeda, 1965. Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. *J. Gen. Appl. Suppl.* **11**: 1-121.
- Kao, K. M. and M. R. Michayluk, 1974. A method for high frequency intergenetic fusion of plant protoplast. *Planta* **115**: 355-367.
- Kim, J. H., 1986. Cell fusion of cellulolytic fungi, *Aspergillus* sp. HBI. Master's Thesis of the Han Yang University.
- Kim, J. H., S. Y. Chang and Y. K. Choi, 1987. Cell fusion of cellulolytic fungi, *Aspergillus* sp. HB1. *Kor. J. Mycol.* **5**(2): 80-86.
- Kim, M. H., M. N. Kim, 1987. Progesterone hydroxylation by *Rhizopus nigricans*. I. The effects of reaction conditions. *Kor. J. Mycol.* **15**: 23-28.
- Manczinger L. and L. Frenczy, 1985. Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **22**: 72-76.
- Mandels, M. 1975. Microbiological sources of cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **5**: 81-105.
- Miller, J. H. 1974. Ultraviolet light mutagenesis. p. 121-124 In: J. H. Miller. Eds. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Park, H. M. 1985. Ph. D. thesis. University of Seoul National, Seoul.
- Toyama, H., K. Yamaguchi and A. Shinmyo., 1983. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* Using immature conidia. *Appl. and Environ. Microbiol.* **47**(2): 363-368.