

Cellulase를 생산하는 *Aspergillus niger* MAN-831과 *Aspergillus wentii* MAW-538의 원형질체 형성 및 융합

박석규[†] · 이상원* · 문일식** · 손봉수* · 강성구*

순천대학교 식품영양학과

*경상대학교 식품공학과

**순천대학교 화학공학과

Formation and Fusion of Protoplasts from the Cellulolytic Fungi, *Aspergillus niger* MAN-831 and *Aspergillus wentii* MAW-538

Seok-Kyu Park[†], Sang-Won Lee*, Il-Shik Moon**, Bong-Soo Shon* and Seong-Koo Kang*

Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**Dept. of Chemical Engineering, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

For the effective utilization of cellulosic biomass, conidial protoplast fusion between *Aspergillus niger* MAN-831 (β -glucosidase) and *A. wentii* MAW-538 (CMCase and avicelase), which produced potentially cellulolytic enzymes was carried out. Optimal conditions for formation and regeneration of protoplast were conidiospore age-5 days, 2-DG-30 μ g/ml, preincubation time-4 hours, osmotic stabilizer-0.7M KCl, novozyme (7.5mg/ml) + driselase (2.5mg/ml) and reaction time of enzyme-5 hours. Optimal conditions for protoplast fusion were obtained by treatment of protoplasts with 15mM CaCl₂ and 25% polyethylene glycol 4000 (pH 6~7) as fusogenic agent at 36 $^{\circ}$ C for 25~30 minutes. The frequency was then 7.94×10^{-4} . CMCase, avicelase and β -glucosidase activity of fusant F-208 strain was 1.5, 1.3, 1.2 times higher than those of parental strains, respectively.

Key words : protoplast fusion, *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, cellulase complex

서 론

자연계에 다량으로 존재하는 섬유성 biomass를 oligo-saccharide 또는 단당류로 분해시켜 식량 및 대체 에너지 등의 유용물질을 값싸게 얻기 위하여 여러 가지의 방법이 이용되고 있으나 당화경비가 고가이며 당화액 중에 발효성 당의 함량이 문제로 지적되어 아직 산업화 단계까지는 접근하지 못하고 있는 실정이다(1-3). 최근 미생물의 효소적 가수분해법은 상온상압에서 가능하고 효소의 특이성으로 부산물이 생성되지 않는 장점 때문에 많은 연구가 되고 있으나 반응속도가 늦고 분해율이 극히 낮을 뿐만 아니라 효소의 생산 단가가 전 공정

의 60% 이상을 차지하는 문제점이 있다(4).

따라서 섬유성 물질의 효소적 분해율을 증진시키기 위해서는 관련 미생물의 탐색 및 육종에 의하여 생성능을 향상시켜야 한다. 즉, C₁과 C₂의 cellulase 활성이 높아야 할 뿐만 아니라, cellobiose 및 celooligosaccharide를 glucose로 빠르게 전환시킬 수 있는 β -glucosidase 활성이 강한 cellulolytic enzyme system이 필요하게 된다(5). 또한 섬유소 분해효소 반응을 소량의 물이 포함된 유기용매계에서 실시하면 수용액상에서 보다 반응 생성물의 회수가 용이하고 고농도의 기질 혹은 반응물에서 효소 반응이 가능하며 저해작용도 덜 받는데(6), 특히 폐신문지, 톱밥과 같은 기름성분이 많거나 결정성이 강한 폐자원을 이용하는 데는 장점이 많을 것으로 생각된다.

실제, 문 등(6,7)은 *Aspergillus niger*가 생산하는 유기

[†]To whom all correspondence should be addressed

용매 내성의 β -glucosidase를 이용한 유기용매계 (Hexane-H₂O)가 수상계 보다 약 2.5배의 당화율이 향상되었다는 보고를 한 바 있다.

따라서, 본 연구에서는 유기용매 내성의 β -glucosidase 생산이 우수한 *A. niger* (8)와 CMCase, avicelase 활성이 높은 *A. wentii* (9)의 원형질체 형성·재생조건 및 융합을 실시한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

원형질체 형성 및 융합조건을 구하기 위하여 사용한 균주는 *A. niger* SFN-416 (8)과 일본 쓰꾸바대학 응용생물화학계 세포배양 공학실에서 분양받은 *A. wentii* L-803을 각각 UV 변이시킨 (9) MAN-831 (*his⁻ade⁻*)과 MAW-538 (*met⁻*) 변이주를 사용하였으며, 원형질체 재생은 재생배지 성분에 따라 큰 영향을 나타내는데, 전보 (4)에서 효과적인 MM (glucose 20g, K₂HPO₄ 1g, KH₂PO₄ 0.4g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, agar 20g, DW 1L), CM (MM+yeast extract 0.5g, peptone 2g) 및 CBE (CM+myoinositol 0.5g, ergosterol 0.1g 첨가) 배지를 사용하였다. 효소생성의 배지는 Mandels 배지 (10)를 사용하였다.

원형질체 형성

감자 추출물 배지에서 30°C, 5일 생육된 포자를 최소액배지 (MM) 20ml에 접종 (1×10^7 spore/ml) 하고, 2-deoxy-D-glucose (2-DG)를 최종 농도 30 μ g/ml 되게 첨가한 다음 30°C에서 4시간 전배양한 후 팽윤된 포자를 원심분리하였다. 이를 삼투압 안정제로서 0.5M NaCl이 첨가된 stabilizing buffer (50mM phosphate buffer, pH 6.0)로 두번 세척한 다음, 동일 완충액으로 용해한 novozyme을 최종 농도가 10mg/ml 되게 첨가하고 40°C에서 4시간 동안 진탕배양하여 원형질체를 형성하였다. 원형질체 형성율은 효소 처리하지 않은 포자를 완전배지에 도달한 후 나타나는 총 콜로니 수에서 0.8% 생리식염수로 처리하여 원형질체에 삼투압 충격을 가한 후 도달하여 나타나는 콜로니 수를 뺀 것에 대한 효소를 처리하지 않은 포자를 도달하여 나타나는 총 콜로니 수의 백분율로 나타내었다 (11).

원형질체의 순수분리 및 재생

유리 원심분리관에 30% sucrose-용액 7ml를 넣고, 앞의 원형질체 형성방법에 따라 준비된 현탁액 1ml를 천천히 가한 후 원심분리하여 포자와 세포단편을 침전시

키고 buffer와 sucrose층 사이로 이동된 원형질체 부분을 멸균된 pipette으로 회수하였다. 이를 다시 새로운 원심분리관에 넣고 stabilizing buffer 5ml와 혼합한 다음 원심분리하여 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 원형질체를 순수분리하였다. 삼투압 안정제를 적당히 희석한 후 0.5M KCl이 첨가된 재생용 완전배지 (CBE)에 0.6% soft agar가 함유된 동일한 재생용 배지로 중층한 다음 30°C에서 5일간 배양하여 콜로니를 형성시켰다. 원형질체 재생율은 순수분리된 원형질체를 재생배지에 도달하여 나타난 콜로니 수에 대한 효소를 처리하지 않은 포자를 도달한 후 나타난 총 콜로니 수에서 원형질체에 삼투압 충격을 가한 후 도달하여 나타난 콜로니 수를 뺀 것의 백분율로 나타내었다 (4,11).

원형질체의 융합

두 영양요구주의 원형질체를 순수분리하여 동량씩 (2.0×10^8 protoplast/ml) 혼합하고, 원심분리 (2000rpm, 10min)한 다음 최소량의 stabilizing buffer로 재현탁한 액에 10mM CaCl₂가 함유된 30% PEG-용액 (pH 6.0) 1ml를 첨가하여 35°C에서 20분간 반응시킨 후, 이 반응액을 0.5M KCl이 첨가된 MM 6ml로 희석하고 원심분리하여 얻은 원형질체를 stabilizing buffer 6ml로 두번 연속 세척한 다음 최종적으로 5ml의 stabilizing buffer에 현탁하였다. 이 현탁한 액을 MM상에서 soft agar 0.7%가 함유된 동일한 배지 5ml로 중층하고 30°C에서 5일간 배양하여 형성된 colony를 관찰하였다. 융합빈도는 MM에 나타난 콜로니 수를 CM에 나타난 콜로니 수로 나누어 나타내었다 (4,12).

효소활성 측정

Carboxymethylcellulase (CMCase), β -glucosidase 및 avicelase의 효소활성은 전보 (4)에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

원형질체의 형성 및 재생조건

전배양 시간의 영향

포자의 성숙도는 분생포자의 수득 및 원형질체 형성율을 고려하여 4일간이 적당하였으며, 또한 분생포자는 세포벽이 견고한 구조로 되어 있어 분해효소인 cellulase, novozyme, driselase의 작용이 쉽도록 전배양을 시켜 적당하게 팽윤시켜야 한다 (11).

전배양 시간에 따른 분생포자의 팽윤 및 응집현상이

원형질체 형성 및 재생율에 미치는 영향을 알아본 결과 (Fig. 1), 원형질체 형성율은 4시간까지는 현저히 증가하다가 그 이후는 완만하게 증가하였으며, *A. niger*가 *A. wentii* 보다 전반적으로 원형질체 형성이 양호하였다. 두 균주의 원형질체 형성을 위해서 최적 전처리 시간은 분생포자가 발아관을 많이 형성하기 직전인 4~5시간이 적당하였는데, 이는 여러 연구자의 보고와 유사하였다 (4,11).

분생포자의 전배양시간이 원형질체 형성율에는 현저한 차이를 보였으나, 원형질체 재생율은 전체적으로 큰 변화를 나타내지 않았으며, 전배양 3시간까지는 원형질체의 재생율이 약간씩 감소하는 경향을 나타내었고, 그 이후는 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 분생포자의 과도한 세포벽 분해가 원형질체의 재생에 나쁜 영향을 준 것으로 생각된다 (Fig. 1).

삼투압 안정제의 영향

원형질체 형성에 미치는 가장 적당한 삼투압 안정제를 조사한 결과 (Table 1), 대체로 형성율은 36~65% 범위였으며, 두 공시균주 모두 0.5M-KCl이 양호하였다. 무기염이 당 혹은 당알콜에 비하여 형성에 효과적이었고, *A. niger* 균주가 *A. wentii* 보다 대부분의 안정제에 효과적이었다. 원형질체 형성에 유리한 KCl의 농도는 *A. niger*와 *A. wentii*의 경우 각각 0.5, 0.7M이 양호하였는데 (data생략), Ushijima 등 (13,14)의 *A. oryzae*의 경우는 0.8 M sorbitol이 KCl 보다 효과적이라고 한 것과는 상이하

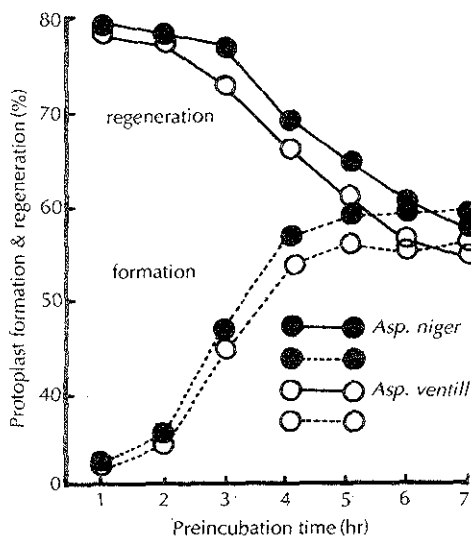


Fig. 1. Effect of preincubation time on the protoplast formation and regeneration.

Table 1. Effect of osmotic stabilizer on the protoplast formation¹⁾

Osmotic stabilizer (0.5M)	Protoplast formation (%)	
	<i>A. niger</i>	<i>A. wentii</i>
Dextrose	51.4	42.7
Mannitol	47.8	46.8
Sorbitol	49.4	51.3
Sucrose	48.2	44.9
MgCl ₂	50.9	45.1
MgSO ₄ · 5H ₂ O	36.2	43.3
NH ₄ Cl	58.7	52.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	45.4	41.2
NaCl	57.5	54.6
KCl	65.1	63.4

¹⁾(number of intact cells-number of osmotic resistant cells in plate after osmotic shock) × 100 / number of intact cells

Table 2. Effect of enzyme on the protoplast formation¹⁾

Enzyme ²⁾	Protoplast formation (%)	
	<i>A. niger</i>	<i>A. wentii</i>
Cellulase Onozuka R-10	54.7	55.7
Novozyme 234	68.3	63.2
Driselase	58.2	56.4
Cellulase + Novozyme	59.4	57.4
Novozyme + Driselase	70.4	65.2
Cellulase + Driselase	58.5	59.1

¹⁾(number of intact cells-number of osmotic resistant cells in plate after osmotic shock) × 100 / number of intact cells

²⁾Single treatment (10mg/ml), mix treatment (5mg/ml+5mg/ml)

였다. 이는 균주의 특성과 원형질체 형성을 위한 반응 조건에 따라 삼투압 안정제의 종류와 농도에 있어서 약간씩 차이가 나는 것으로 생각된다.

세포벽 분해효소의 농도 및 처리시간의 영향

원형질체 형성에 가장 효과적인 분생포자의 세포벽 분해효소를 조사하기 위하여 4일간 생육된 포자를 35°C, 4시간 전배양하여 각각의 효소 농도로 40°C, 5시간 반응시킨 결과 (Table 2), 원형질체 형성율은 단독처리의 경우 novozyme, driselase, cellulase 순으로 높았으며, 혼합 처리할 때는 단독 처리할 때 보다 대체로 효과적이었는데, 특히 novozyme (7.5mg/ml) + driselase (2.5mg/ml)의 비율로 처리할 때는 단독 처리할 때 보다 15% 정도 원형질체 형성율이 상승되었다 (data생략). 이는 Ushijima 등 (13,14)의 *A. sojae*의 경우, 원형질체 형성에 zymolyase 10mg/ml 농도가 효과적이라고 한 것과는 다른데, 균주의 종류와 생육도에 따라 차이가 나타나는 것으로 생각된다. 한편 전배양시킨 분생포자에 앞서 효소 농도로 40°C에서 6시간 까지 효소반응시킨 결과, 원형질체 형

성율은 1시간 이후 부터 급격히 증가하기 시작하여 4~5 시간 이후에 거의 일정한 수준까지 도달하였다. 과도한 세포벽 제거는 이후의 원형질체 재생 및 융합에 좋지 못한 영향을 미치므로 반응 4시간이 적당한 것으로 생각되는데 (data생략), 이는 Sung 등 (9)과 Moore와 Peberdy (15)의 보고와는 비슷한 시간이나 Toyama 등 (16)의 6시간 보다는 짧은 시간이었는데, 효소종류와 농도, 반응 처리조건에 따라 차이가 나는 것으로 생각된다.

2-Deoxy-D-glucose의 영향

세포벽 합성저해제로 많이 사용되고 있는 2-DG의 효과를 조사하기 위하여 10~50µg/ml를 첨가한 MM에 4일 성숙한 분생포자를 접종하여 전배양시킨 후, 앞서의 효소처리조건으로 처리하여 원형질체 형성 및 재생율을 알아 본 결과 (Fig. 2), 형성율은 2-DG의 농도가 증가됨에 따라 약간씩 형성율이 상승하였으며, 무첨가에 비하여 30µg/ml 첨가할 때는 10% 이상 증가하였다. 재생율은 30µg/ml 이상 첨가할 때 오히려 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

원형질체 융합조건

PEG농도 및 처리시간의 영향

10mM CaCl₂가 함유된 50mM phosphate buffer (pH

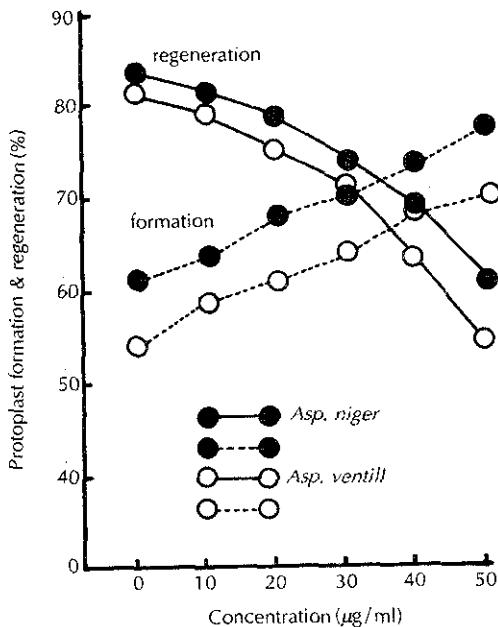


Fig. 2. Effect of 2-DG concentration on the protoplast formation and regeneration.

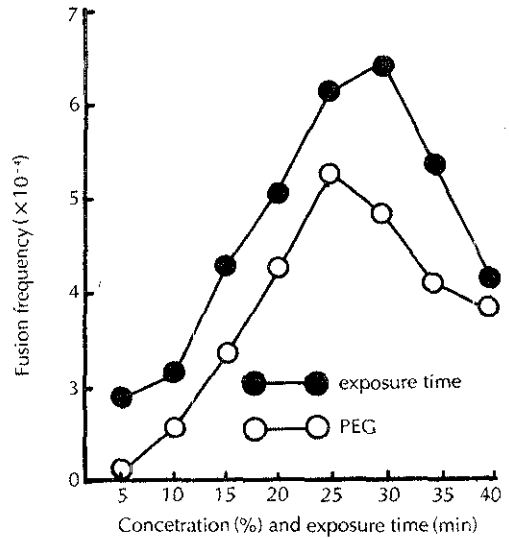


Fig. 3. Effect of PEG concentration and exposure time on the fusion frequency.

6.0)에 용해된 PEG 4000을 농도별로 35°C, 20분간 처리하여 0.7M KCl이 첨가된 stabilizing buffer로 적절히 희석한 후 CM 재생배지에 중층의 방법으로 재생시킨 결과, 융합율은 25% 농도에서 가장 양호하였으며 25% 이하에서는 PEG가 원형질체의 안정화에 부족하였고 (Fig. 3), PEG 처리 시간도 30분 동안 처리하는 것이 융합에 효과적이었는데, 그 이상의 농도와 시간은 원형질체에 shrink를 초래하여 osmotic damage가 일어날 수 있으며, 또한 독성을 유발함으로써 융합빈도가 감소된다는 Anne 과 Perberdy의 보고 (17)와 일치하였다. 그러나 Baltz와 Mastushima (18)와 Ogawa 등 (19)의 35~60% 보다는 상당히 낮은 농도였는데, 이는 분생포자의 생육도와 세포벽 분해효소의 처리 등 원형질체 형성 조건에 따라 융합촉진제인 PEG의 농도 및 처리시간이 약간씩 상이한 것으로 생각된다.

CaCl₂ 농도의 영향

적당량의 Ca⁺⁺는 융합촉진제로서 PEG의 응집효과를 증대시켜 complementation을 상승시킨다고 알려져 있어 25% 농도의 PEG 4000에 여러 가지 농도의 CaCl₂를 첨가하여 융합빈도를 조사한 결과 (Fig. 4), 15mM 일 때가 가장 양호하였고, 그 이상에서는 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 융합촉진제로서 Ca⁺⁺를 적당하게 첨가하면 응집효과를 증대시켜 융합을 증가시키게 된다는 Freczy 등 (20)의 결과와 비슷하였다.

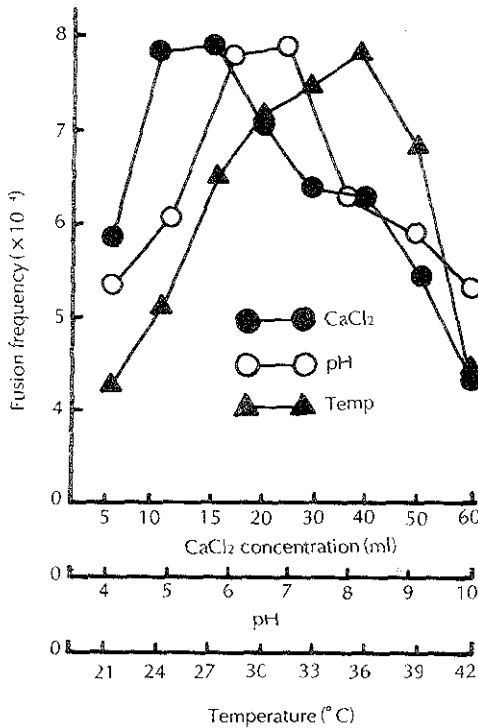


Fig. 4. Effect of CaCl₂ concentration, pH and temperature on the fusion frequency.

pH 및 온도의 영향

15mM CaCl₂가 함유된 25% 농도 PEG 4000용액에 pH가 다른 buffer를 첨가하여 pH에 따른 융합빈도를 조사한 결과 (Fig. 4), 융합을 위한 최적 pH는 6.0~7.0 부근이 효과적이었으며, 9.0 이상과 4.0에서는 융합빈도가 약 30% 정도 낮아졌다. 15mM CaCl₂가 함유된 25%농도 50mM phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 PEG 4000용액을 여러 온도 범위에서 30분간 반응시켰을 때 융합빈도를 조사한 결과 (Fig. 4), 융합을 위한 최적 온도는 36°C 부근이 효과적이었으며, 39°C 이상과 24°C 이하에서는 융합빈도가 각각 약 30~40% 정도 낮아졌다. 이상의 최적 조건에서의 *A. niger*와 *A. wentii*의 원형질체 융합빈도는 7.94×10^{-4} 였으며, 이는 *A. oryzae*와 *A. sojae*간의 융합빈도 보다는 약간 높았는데 (13), 이는 관련 균주의 원형질체의 크기, 표면형태 및 융합조건에 따라 차이가 나타나는 것으로 생각된다.

융합주의 효소활성

검토된 최종 융합조건에서 얻어진 융합주가 친주로의 복귀되는 것을 방지하기 위하여 최소배지에서 2주간 연속 계대배양한 후, 생육이 왕성한 균주를 효소생산용

Table 3. Comparison of CMCase, avicelase and β -glucosidase activity in wild type, mutants and representative fusant strains

Strains	Enzyme activity (U/ml)		
	CMCase	Avicelase	β -Glucosidase
Wild type			
<i>A. niger</i>	3.13	1.34	9.53
<i>A. wentii</i>	4.08	1.67	1.59
Mutants			
MAN-831	4.35	1.24	12.46
MAW-598	6.91	2.28	4.85
Fusants			
FA-13	5.31	1.40	9.83
FA-83	4.82	1.21	10.22
FA-158	5.71	2.26	8.54
FA-208	6.14	2.17	11.47
FA-283	5.96	1.76	10.52

배지 (10)에서 CMCase, avicelase 및 β -glucosidase의 활성을 조사한 결과 (Table 3), FA-208 융합주는 친주에 비하여 각각 1.5, 1.3, 1.2배 효소활성의 증가를 나타내었다.

요 약

섬유성 biomass의 효율적 이용을 위하여 CMCase, avicelase 분비력이 높은 균주 (*A. wentii* MAW-598)와 β -glucosidase (*A. niger* MAN-831) 분비력이 우수한 균주의 포자를 이용한 원형질체 형성·재생조건 및 융합을 실시하였다. 원형질체 형성 및 재생의 최적조건은 5일 성숙한 포자를 30 μ g/ml 농도의 2-DG로 4시간 전배양하여 0.7M KCl 삼투압 안정제, novozyme (7.5mg/ml) + driselase (2.5mg/ml) 혼합효소로 5시간 반응시키는 것이 효과적이었다. 원형질체 융합 조건은 CaCl₂ 15mM, 25% PEG 4000, pH 6~7, 36°C에서 25~30분간 처리하였을 때 효과적이었으며, 융합빈도는 7.94×10^{-4} 로 나타났다. FA-208 융합주는 친주에 비하여 각각 1.5, 1.3, 1.2배 효소활성의 증가를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 상공자원부의 대체에너지 기술개발 사업연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

1. Kurosawa, K., Hosoguchi, M., Hariantono, J., Sasaki, H. and Takao, S. : Degradation of tough materials by cellulase from *Corticium rolfsii*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 931 (1989)
2. Chosh, A. : Cellulase secretion from a hypercellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* Rut-C 30. *Arch. Microbiol.*, **140**, 126(1981)
3. Yoichi, K. : Purification and properties of two endo-cellulase from *Penicillium purpurogenum*. *Agri. Biol. Chem.*, **50**, 1989 (1986)
4. Sung, N. K., Lee, S. W., Jung, Y. C., Kang, S. K. and Rho, J. S. : Protoplast fusion of cellulolytic *Aspergillus wentii* and *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 460(1990)
5. Trivedi, S. M. and Desai, J. D. : Cellulase and β -glucosidase production by mix shake cultivation of *Scytalidium lignicola* and *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Ferment. Technol.*, **62**, 211 (1984)
6. Moon, I. S. and Park, S. K. : Enzymatic hydrolysis of sawdust in hexane-H₂O system. *J. Industrial Technol. Institute (Suncheon Nat'l. Univ.)*, **8**, 135 (1994)
7. 문일식, 임한진, 이광열 : 유기용매계 당화공정에 의한 목질계 연료용 알콜 제조공정 개발. 동자쿠 대체에너지 개발사업보고서 92/C202-617API (1992)
8. 박석규, 문일식, 최옥자, 성낙계 : β -Glucosidase를 생산하는 균주의 분리 및 조효소의 특성. *산업미생물학회지*, **21**, 440(1993)
9. Sung, N. K., Lee, S. W., Shim, K. H., Jung, Y. C. and Rho, J. S. : Isolation and protoplast formation of cellulolytic *Aspergillus* sp. *J. Inst. Agr. Res. Util.* (Gyeongsang Nat'l. Univ.), **23**, 137 (1989)
10. Mandels, M. and Reese, E. T. : Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, **73**, 269 (1957)
11. Bos, C. J. and Slakhorst, S. M. : Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 400(1981)
12. Toyoma, M., Shinmyo, A., Okada, H. and Yamaguchi, K. : Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 362 (1984)
13. Ushijima, S., Nakadai, T. and Uchida, K. : Breeding of new Koji-molds through interspecific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1667 (1990)
14. Ushijima, S. and Nakadai, T. : Breeding by protoplast fusion of Koji mold, *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1051 (1987)
15. Moore, P. M. and Peberdy, J. F. : Release and regeneration of protoplast from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **66**, 421 (1976)
16. Toyama, H., Shinmyo, A. and Okada, H. : Protoplast formation from conidia of *Trichoderma reesei* by cell wall-lytic enzymes of a strain of *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 409 (1983)
17. Anne, J. and Perberdy, J. F. : Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.*, **92**, 413 (1973)
18. Baltz, R. H. and Matsushima, P. : Protoplast 1983. Proceedings of the 6th International protoplast symposium, p.143 (1983)
19. Ogawa, K., Ohara, H. and Toyama, N. : Interspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1985 (1988)
20. Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M., Franko, A. and Rohik, F. : Factors affecting high-frequency fungal protoplast fusion. *Experientia*, **32**, 1156 (1976)

(1995년 9월 29일 접수)