

핵전이에 의한 *Aspergillus oryzae* var. *oryzae*와 *Aspergillus nidulans* 514의 잡종으로부터 생산된 Xylanase의 특성

양영기* · 문명님 · 박형남 · 임채영
조선대학교 자연과학대학 유전공학과

Characterization of Xylanase from an Hybrid between *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* and *Aspergillus Nidulans* 514 by Nuclear Transfer. Young-ki Yang, Myeng-nim Moon, Hyung-nam Park and Chae-young Lim.
Department of Genetic Engineering, College of Natural Science, Chosun University, Kawangju 501-759, Korea
— Interspecific hybrids between *Aspergillus oryzae* var *oryzae* and *A. nidulans* 514 were obtained by nuclear transfer technique. Several auxotrophic mutants isolated from conidiospores of the two strains were mutagenized with ultraviolet and N-methyl-N-nitrosoguanidine. Optimal conditions for formation of intergeneric hybrids were investigated. Frequencies of hybrid formation by nuclear transfer were $3 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-5}$. From observation of genetic stability, conidial size, DNA content, and nuclear stain, it was suggested that their karyotypes are aneuploid. The hybrids showed 1.1~1.4 fold higher xylanase activities than parental strains did. The xylanase of *Aspergillus* sp. TAVD514-3 was purified and some of its enzymatic characteristics were investigated. The enzyme was purified about 85 fold with an overall yield of 17% from the culture medium by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-75 gel permeation chromatography, and CM-sephadex A-50 ion exchange chromatography. The purified enzyme functions optimally at pH 9.0 and 80°C. The enzymatic activity was increased by the presence of Mg^{2+} and Mn^{2+} ions.

Xylanase는 hemicellulose를 분해하는 대표적인 효소이다. 지구상에 존재하는 renewable resource로서 식물 biomass를 구성하는 다당류 계열은 크게 5가지로 이루어져 있는데 그것은 cellulose, hemicellulose, starch, pectin 그리고 lignin-compound 등이라 할 수 있다. 자연계에 널리 존재하는 hemicellulose는 식물 세포벽의 약 25% 정도를 차지하는 주요성분으로 인류가 직면한 주요한 문제중의 하나인 대체 에너지 및 식량자원의 확보를 위한 미래의 자원으로써 경제적 활용 방안이 절실히 요구되고 있다.

Hemicellulose는 다양한 분자와 측쇄를 가지고 있으며, 기본골격도 6탄당으로 이루어진 복합 중합체인 cellulose와는 달리 주로 5탄당으로 이루어졌을 뿐만 아니라, 식물의 종류와 존재부위에 따라 현저한 차이를 보인다. 이들 hemicellulose중 xylan은 endoxylanase(endo-1,4-β-D-xylanase, EC. 3.2.1.8)와 β-xylosidase(exo-1,4-β-xylobiase, EC. 3.2.1.27)의 작용에 의해 xylose와 소량의 arabinose로 가수분해된다. Xylanase의 생합성은 induction, catabolite repression 의해 조절됨이 밝혀져 있다. 그러나 hemicellulase에 관한 연구는 그 다양성과 반응 특이성 때문에 cellulase와 hemicellulase의 균형있는 생산과 그 효과에 대한 보고등 몇가지 초보적인 연구 외에는 극히

미미한 실정이다.

xylanase는 많은 미생물에서 분비되는 것으로 보고되어 있는데, 지금까지는 미생물 효소에 의한 가수분해(8)를 통하여 xylose 등의 가수분해 산물을 획득하고, 이것을 발효기질로 하여 단세포 단백질, 여러종류의 사료, 그리고 대체 에너지를 생산하기 위한 연구(7)가 이루어져 왔다. 또한 돌연변이에 의한 균주개발(17), 효소 생성의 유도 및 조절에 관한 연구도 집중적으로 이루어져 왔다. 그 결과 *Trichoderma*속, *Aspergillus*속, *Penicillium*속 등이 xylanase 분해능이 우수한 균주로 알려져 있다. *Aspergillus*속과 *Penicillium*속의 균류들은 여러가지 효소와 각종 유기산 등의 발효 산물의 산업적 생산에 많이 이용되어 왔다. 특히, *Aspergillus*속 균류들은 다른 균류 보다도 β-glucosidase 활성이 높으며, 또한 xylanase 활성도 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 *Aspergillus*속 균류 사이의 잡종 생산은 섬유소 분해에 효과적인 복합 효소계(cellulase 및 hemicellulase 효소계 등)를 고루 갖춘 균주의 개발과 이 균주를 이용하는 발효 공정의 개발을 통하여 효소 또는 당의 대량생산을 가능케 해준다는 점에서 매우 의미있는 일로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 cellulase 및 hemicellulase 활성을 갖는 *Aspergillus*속의 두 균주를 대상으로 핵전이를 시도하여 xylanase 활성이 증진된 우수형질의 잡종을 획득하고자 한다. 또한 이 잡종들의 효소 활성도, 핵형, 세포의 단백질의 양상등을 분석하고, 나아가 xylanase를 정제하여 그 특성을 조사하고자 한다.

*Corresponding author.

Key words: *Aspergillus oryzae* var *oryzae*, *Aspergillus nidulans* 514, nuclear transfer, xylanase, purification

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 실험에 사용된 균주인 *Aspergillus oryzae* var *oryzae* KCTC 2114, *Aspergillus nidulans* FGSC 514(Ade⁻, Sos⁻)는 PDA(Difco) 사면배지에 각각 접종하여 30°C에서 4일간 계대배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였다. 완전배지로는 PDA 배지를 사용하였으며, colony 크기를 제한하기 위해 0.2%의 oxgall을 첨가하였다. 최소배지로는 dextrose 10 g, minimal salt stock solution 20 ml/l, 균주에 따른 영양 요구물, 그리고 colony의 크기를 제한하는 sodium desoxycholate(SDC) 0.02%를 혼합하여 제조하였다. 환원용배지로는 완전배지와 최소배지에 삼투안정제 KCl을 0.6M로 되게 첨가하여 사용하였다.

돌연변이 유도 및 영양 요구주의 분리

A. oryzae var *oryzae*의 분생포자 현탁액(2×10⁷ conidia/ml) 10 ml에 1%의 생존율이 되도록 자외선을 조사하고, 액체 최소 배지에 접종하여 30°C에서 18시간 배양한 후, 멸균된 sintered glass filter(porosity 40~60 μm)로 여과하여 미발아 포자만을 수확하였다. 수확된 포자현탁액을 50 mM Tris maleic acid buffer(pH 6.0)에 녹인 0.2% MNNG 용액 0.5 ml과 혼합하여 최종농도가 200 μg/ml 되게 하여 30°C에서 25~30분간 반응(50% 생존율)시킨 다음 원심분리(2,600×g, 15 min) 하였다. 수확된 포자를 최소 배지에서 배양한 다음 미발아 포자만을 수확하여 자외선 및 MNNG 이중 처리주로 하였다. 변이주의 영양 요구성을 검토하기 위해 최소배지에 각종 아미노산 용액을 적신 여지 필터를 disc처럼 사용하는 auxanotroph 법에 의하여 영양 요구물질을 확인하였다.

원형질체의 형성 및 재생

최소 액체 배지에 분생포자 현탁액(1.0×10⁷ spores/ml)을 접종하고, 30°C에서 배양하여 집균한 다음, 0.5%와 1%의 Novozym 234 용액과 2-deoxy-D-glucose(25 μg/ml)로 처리하여 30°C에서 3시간 반응시키면서 haemocytometer로 원형질체 생성량을 산정하였다. 원형질체의 재생을 위해서 30%(w/v) sucrose 용액을 매체로 원심분리(400×g, 30 min)하여 상층액을 모은 뒤 농축시키고 세척하였다. 이 순수 분리한 원형질체를 삼투안정제로 적절히 희석하여 원형질체 재생용 배지에 도달하고 배양한 다음 Lee(14)의 방법에 따라 재생율을 산출하였다.

핵의 순수분리 및 핵전이에 의한 형질전환

야생형 균주로부터 핵을 추출하기 위한 방법으로서, Ferenczy 등(10)의 방법을 사용하였다. 즉, 원형질체를 형성시킨 후, 2 ml의 SMC(0.3M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂)를 첨가하여 homogenizer로 원형질체를 깨뜨리고, 이 파쇄액을 원심분리 하였다. 분리된 pellet에

0.6M sucrose가 첨가된 SMC 2 ml을 가하여 재현탁시킨 후, sucrose discontinuous gradient에 시료 0.36 ml을 가하고 초원심분리(Hitachi, 90,000×g, 60 min) 하였다. 이렇게 하여 얻은 nuclear pellet을 1 ml의 0.6M KCl 용액에 재현탁시켜 4°C에 보관하고 이를 순수분리된 핵으로 사용하였다. 형질전환시키고자 하는 *A. oryzae* var *oryzae*의 야생형과 영양요구성 변이주의 핵과 *A. nidulans* 514의 원형질체를 각각 1 ml씩 혼합하여 원심분리 하였다. 이리하여 얻어진 pellet에 30% PEG 용액(M.W. 6,000, 10 mM CaCl₂, 0.05M glycine, pH 5.8) 1 ml를 조심스럽게 혼합한 다음 30°C에서 10분간 반응 시킨 후, 0.6M로 세척하여 환원용 완전배지와 환원용 최소배지 및 완전, 최소배지에 각각 도달하여 30°C에서 5~10일간 배양하였다.

융합체의 자연분리 및 독립 영양형 집중의 선발

환원용 최소배지에서 얻어진 이형 접합체의 균사체를 완전배지에 옮겨 분생포자를 형성시킨 후, 이들 분생포자를 수확하여 완전배지에 도달하고 생성된 colony를 각종 아미노산이 첨가된 최소배지에 접종하여 그 유전자형을 조사하였다.

Conidia의 크기, 핵염색 및 DNA 함량의 측정

Micrometer를 사용하여 *A. oryzae* var *oryzae*의 야생형 균주와 선발된 영양 요구구성 변이주 및 형질전환체의 conidia 크기를 측정하였으며, 모균주와 형질전환체의 핵을 염색하여 관찰하였다. 또한 형질전환체의 원형질체를 순수분리한 후 Giles와 Myers(12)의 diphenylamine test 법에 따라 DNA의 함량을 측정하였다. 표준 DNA 시료로는, salmon testis에서 추출한 Na-DNA type III(Sigma)를 5 mM NaOH에 순차적으로 용해한 후 10% perchloric acid로 추출하여 사용하였다.

세포외 효소용액의 제조 및 활성도의 측정

Wheat bran 1%를 사용한 최소 액체 배지에 포자를 1.0×10⁷ conidia/ml 되게 접종하여 30°C에서 48시간 배양하고, 이 배양액을 4°C에서 원심분리하여 얻은 상층액을 세포외 조효소 용액으로 사용하였다. xylanase의 효소 활성도 측정을 위한 기질로는 1% xylan를 사용하였으며, xylanase 활성은 0.2M 인산완충용액(pH 5.8)에 1%가 되게 제조한 기질용액 0.6 ml와 조효소 용액 0.4 ml을 섞어 30°C에서 30분간 반응시킨 후, Somogyi-Nelson 방법에 따라 유리된 환원당을 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 최종 분해산물 1 μmole을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하여 분석하였다.

세포외 수용성 단백질의 양상분석

모균주와 형질전환체의 세포외 수용성 단백질의 양상을 알아보기 위하여, SDS-polyacrylamide gel electro-

phoresis(SDS-PAGE)를 행하였다. 전기영동 gel로는 10% polyacrylamide gel을 사용하였고, 표준 단백질로는 carbonic anhydrase(M.W. 29,000), trypsin inhibitor(M.W. 36,000), egg albumin(M.W. 45,000), bovine plasma albumin(M.W. 66,000), phosphorylase B(M.W. 97,000)를 사용하였다. 전원은 시료가 stacking gel을 통과하기까지는 100 V로, 그 후로는 150 V로 공급하였으며, 전기가 끝난 후에는 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색하였다.

Ammonium sulfate 분획

세포의 조효소 용액내의 수용성 단백질을 침전시키기 위하여 ammonium sulfate를 각 농도별로 포화시켜 활성을 조사하였다.

Sephadex G-75 gel permeation chromatography

Sephadex G-75 gel을 column(1.45×73 cm)에 충전하고 50 mM acetate buffer(pH 4.0)으로 세척한 다음 염을 제거시킨 조효소 용액을 적하하고 50 mM acetate buffer(pH 4.0)로 용출시켰다. 용출 속도는 시간당 3 ml로 하고, 3 ml씩 분획하였다.

CM-Sephadex A-50 ion exchange chromatography

CM-Sephadex A-50을 column(1.0×20 cm)에 충전한 다음 Sephadex G-75 column에서 xylanase 활성이 높은 분획만을 모아 농축하여 적하하였다. gel에 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위하여, 50 mM acetate buffer(pH 4.0) 200 ml로 세척한 후, 0.4M NaCl이 포함된 50 mM acetate buffer(pH 4.0) 50 ml과 동량의 50 mM acetate buffer(pH 4.0)을 이용하여 직선 농도의 기울기로 용출하였다. 용출속도는 시간당 4.5 ml로 하고, 3 ml씩 분획하였다.

Xylanase의 특성

정제된 xylanase의 특성을 조사하기 위하여, CM-sephadex A-50 column에서 용출된 분획중 효소활성이 높은 분획만을 모아 centricon으로 염을 제거하고 농축시킨 후, 효소 역학, 분자량, 효소 활성에 미치는 온도의 영향, pH의 영향, 금속이온의 영향 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

영양요구성 돌연변이주의 분리

1%의 생존율로 자외선과 MNNG를 처리하여 돌연변이를 유발한 결과를 Table 1에 나타내었다. *A. oryzae* var *oryzae*에서는 3개의 돌연변이주, 즉, MAV 23(Lys⁻, Met⁻), MAV 77(Leu⁻, Val⁻), MAV 102(Ala⁻)를 획득하였는데, 이중 MAV 102는 다른 변이주와는 달리 단일

Table 1. List of mutant strains isolated from *A. oryzae* var *oryzae*

Strains	Penotype	Mutagen	Back mutation frequency
MAV 23	Lys ⁻ , Met ⁻	UV, MNNG	2.4×10 ⁻⁵
MAV 77	Leu ⁻ , Val ⁻	UV, MNNG	2.3×10 ⁻⁶
MAV 102	Ala ⁻	UV, MNNG	4.1×10 ⁻⁴

Abbreviation used as follows: 1) MAV; Mutant of *A. oryzae* var *oryzae*.

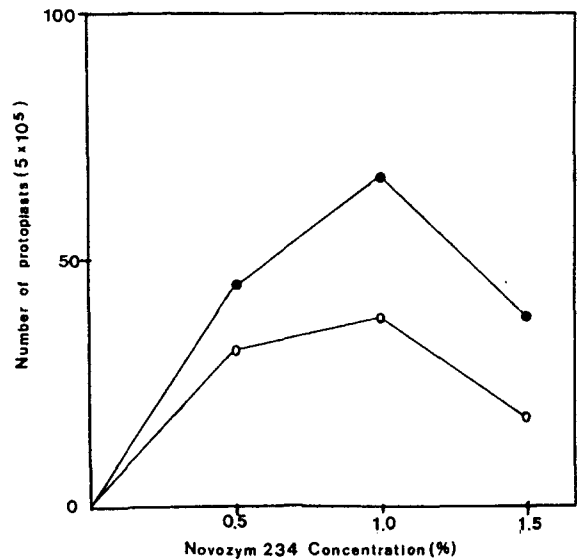


Fig. 1. Effect of Novozym 234 concentration on the formation of protoplasts from *A. oryzae* var *oryzae* (●) and *A. nidulans* 514 (○).

The reaction was performed for 2 hrs at 30°C with gentle shaking.

영양 요구성을 나타내었다. 선발된 각 변이주의 back mutation frequency를 조사한 결과, *A. oryzae* var *oryzae*에서는 2.3×10⁻⁶~4.1×10⁻⁴의 수준으로 나타나 안정성이 비교적 낮았지만 이들 변이주 중 몇몇은 안정성이 있는 것으로 판단되어, 이들중 성장상태가 좋은 균주를 선발하여 핵전이에 사용하였다.

원형질체 형성

세포벽 분해효소의 농도 균류 원형질체 형성에 있어서 가장 많이 이용되고 있는 세포벽 분해효소인 Novozym 234를 사용하여 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 1%의 Novozym 234에서 최적이었다. 이는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Aspergillus oryzae*에서 0.5%(14), *Aspergillus nidulans*에서 0.5%의 Novozym 234를 처리하였을 때, 최적(18)이라는 보고 등과 비교하여 높았다. 또한 세포벽 분해효소에 따른 원형질체 형성율을 보면, 1%의 Novozym 234로 처리하였을 때, 8×10⁷ pts/ml로 가장 높게 나타났다. 이는 *Penicillium chrysogenum*와 *As-*

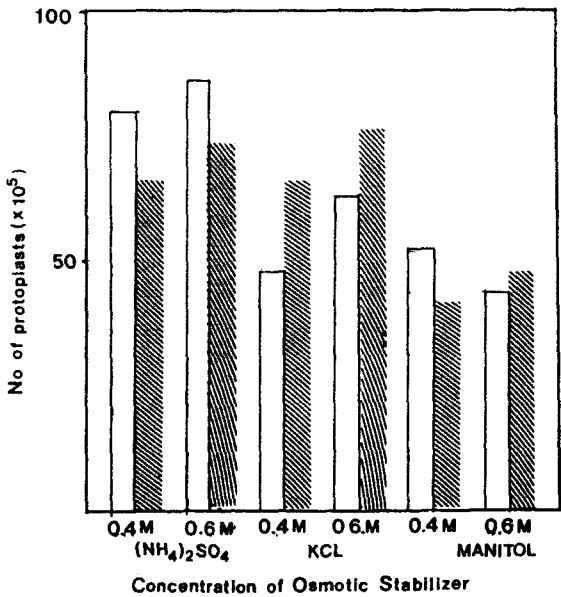


Fig. 2. Effect of concentration of different osmotic stabilizer on the formation of protoplast of *A. oryzae var oryzae* (□) and *A. nidulans 514* (▨). The reaction was performed with 1% Novozym 234 for 2 hrs at 30°C with gentle shaking.

*pergillus niger*에 Novozym 234를 처리하였을 때, 나타난 3.97×10^7 와 1.6×10^6 pts/ml(11)보다 높은 원형질체 형성율이다. 또한 *Candida pseudotropicalis*에서는 0.1~0.3%의 효소를 처리하여 60분간 반응시켰을 때, 97.6%로 가장 높은 형성율을 보였으며, 0.3% 이상의 농도에서는 약간 감소(6)한다는 것과 유사하게, 최적 형성율을 보인 1% 이상의 농도에서는 감소하는 것을 알 수 있었다.

삼투안정제의 종류 및 농도 원형질체 형성에 영향을 미치는 삼투안정제의 종류와 농도별 효과는 Fig. 2에 나타내었다. 일반적으로 사상균류의 경우 삼투안정제는 무기염류, 효모의 경우에는 당 및 당알콜류가 효과적인 것(16)으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 1% Novozym 234를 2시간 동안 반응시켰을 때, *A. oryzae var oryzae*의 경우 0.6M (NH₄)₂SO₄, *A. nidulans 514*의 경우에는 0.6 M KCl이 가장 좋은 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 *Aspergillus*속, *Geotrichum*속, *Penicillium*속 등의 경우에 0.6M~1.2M KCl이 가장 효과적이라는 보고(9, 20, 21)와 *Trichoderma reesei*와 *Penicillium verruculosum*의 경우에 0.6M (NH₄)₂SO₄가 가장 효과적이라는 보고(4)와 일치되는 것이다. 이상의 결과를 보면 모든 균사에서 원형질체를 형성시키고 안정성을 유지시켜 주는 데 공통적으로 효과적인 삼투안정제는 존재하지 않으므로 본 실험에서는 두 균주에서 모두 비교적 원형질체 형성율이 좋은 0.6M (NH₄)₂SO₄를 핵전이를 위한 삼투안정제로 선정하였다.

효소의 처리시간 효소의 처리시간에 따른 원형질체 생성율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와

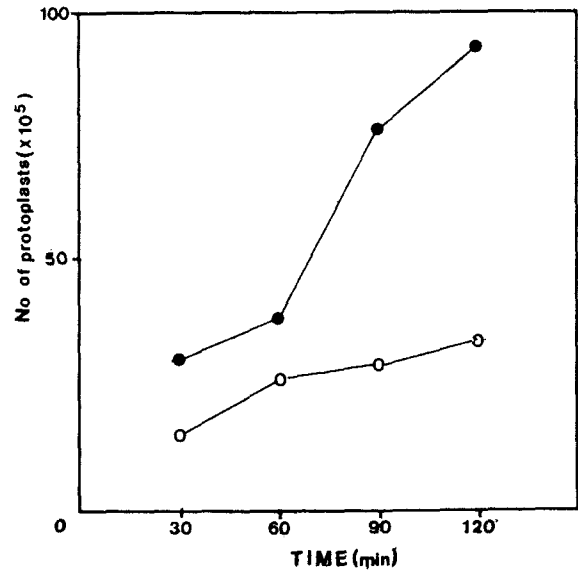


Fig. 3. Effect of digestion time on the formation of protoplast of *A. oryzae var oryzae* (●) and *A. nidulans 514* (○). The reaction was performed with 1% Novozym 234 for 2 hrs at 30°C with gentle shaking.

같다. 반응시간을 30분 간격으로 늘려가며 30, 60, 90, 120분까지 반응시키면서 원형질체 형성양상을 비교하여 본 결과, 120분에서 최대의 형성율을 보였으나, 세포벽 분해효소의 처리시간을 오래 할수록 원형질체 재생율이 낮아진다는 보고(4)를 고려하여 효소처리 시간을 90분으로 정하였다. 이러한 결과는, *A. nidulans*의 균사체에 Oerskovia 효소를 3시간 동안 처리하였을 때(2) 최대의 생성율을 보였으며, *A. niger*와 *T. reesei*에서 Dricelase를 처리한 후 각각 30°C와 28°C에서 3시간 반응시켰을 때 최대의 원형질체 형성율을 보였다는 결과(16)보다는 처리시간이 짧은 경향을 보였으며, *A. nidulans*에서 Novozym 234를 37°C에서 2시간(21), *A. awamori var. kawachi*와 *A. usami mut. shirousami*는 35°C에서 1시간 반응시켰을 때 최적이라는 결과(19)와는 유사한 경향을 보였다. 이러한 효소처리의 온도 및 처리 시간의 차이는 사용 균주의 세포벽 조성분, 세포벽 분해효소의 특성과 처리 온도 등에 기인한 것으로 생각된다.

pH의 효과 삼투안정제의 종류 및 농도와 함께 원형질체 형성에 중요한 요인으로 알려진 pH는 *Aspergillus*속의 경우 pH 5.5~6.0 사이의 범위가 적합한 것으로 나타났는데 그중에서도 pH 5.8이 최적인 것으로 나타났다. 이는 *A. nidulans*의 경우 pH 5.5~6.8 범위에서 원형질체 형성이 잘 이루어진다고 하는 보고(17, 21)와 *A. niger*의 경우도 pH 5.6~6.0 범위에서 원형질체 형성율이 높았다는 보고(19)와 유사하였다. 이러한 결과는 세포벽 분해에 관여하는 효소 성분의 최적 반응 pH와 원형질체 내부의 pH와 유사하므로서 원형질체 형성 및 안정성 유지가 가능한 것으로 추정된다.

Table 2. Effect of osmotic stabilizer on protoplast regeneration of *A. oryzae* var *oryzae* and *A. nidulans* 514.

Osmotic stabilizer (0.6M)	Regeneration frequency (%)	
	<i>A. oryzae</i> var. <i>oryzae</i>	<i>A. nidulans</i> 514
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.7	7.1
KCl	8.3	9.1
Mannitol	6.3	5.6
Sorbitol	5.9	6.7

원형질체 재생

일단 형성된 원형질체는 다시 원래의 균사체로 재생되어야 하는데 원형질체 재생에 중요한 것은 무엇보다도 원형질체가 안정하게 존재하면서 세포벽 합성에 좋은 조건을 만들어 줄 수 있는 삼투안정제의 선택이라 할 수 있다. Table 2에서 나타난 바와 같이, 본 실험에서는 원형질체 형성에 적합했던 0.6M (NH₄)₂SO₄보다는 0.6M KCl에서 더 높은 재생율을 보였으며, 그 재생율은 5.6~9.1%였다. 이러한 재생율은 0.6M Sorbitol을 사용하였을 경우 *T. harzianum*은 0.68%, *A. niger*는 15.3%, 0.6M KCl을 사용하였을 경우 *A. oryzae* 1.46~13% 결과(14) 등과 유사한 경향을 나타내었으나 *A. oryzae*에서 0.6M KCl을 사용하였을 경우 15~25%의 재생율을 나타내었다는 결과(15)보다는 낮았다. 이러한 결과는 균주에 따른 재생율이 삼투안정제의 종류에 따라 각기 다름을 말해 준다.

핵전이에 의한 집종의 형성

핵전이에 의한 형질전환은 Sandwich method를 변형시킨 방법으로 *A. oryzae* var. *oryzae*의 야생형 균주로부터 핵을 순수분리하고 형질전환시키고자 하는 *A. nidulans* 514의 원형질체를 형성시킨 후 형질전환을 행하고, 다음 식에 의하여 형질전환율을 산출하였다(16).

$$\text{형질전환율} = \frac{\text{재생용 완전배지상의 균체수} - \text{완전배지상의 균체수}}{\text{재생용 최소배지상의 균체수} - \text{최소배지상의 균체수}} \times 100$$

따라서 본 실험의 형질전환율은 약 0.2%를 나타내었는데, 이는 *A. nidulans* 514와 야생형 균주간의 형질전환율 4.8%(21)와 *T. koningii* 야생주와 변이주 CUT 121 사이에서의 31%(13)보다는 낮았으나, *A. usarii*와 *A. oryzae* 사이의 형질전환율 0.17%(16)보다는 높은 편이었다. 이와같이 낮은 형질전환율은 중간 형질전환으로 인한 불안정성과 균주의 유연관계에 의한 것으로 생각된다.

잡종의 분석**Table 3. Genetic stability of transformants.**

Transformants	Geno- type	No. of mean colony		Segre- gant (%)
		CM	MM	
TAVD514-1	Ade ⁻	137	55	39.7
TAVD514-2	Ade ⁻	154	38	24.7
TAVD514-3	Ade ⁻	162	99	61.6
TAVD514-4	Ade ⁻	111	17	15.3
TAVD514-5	Ade ⁻	101	24	23.8
TAVD514-6	Ade ⁻	137	82	59.6
TAVD514-7	Ade ⁻	129	51	39.5
TAVD514-8	Sos ⁻	137	55	39.7
TAVD514-9	Sos ⁻	113	17	15.1

Abbreviation used as follows: 1) TAVD514: transformant between *A. oryzae* var. *oryzae* and *A. nidulans* 514

Table 4. Conidial size and DNA content of transformants

Strains	Mean conidial size (μm)	DNA content/ 10 ⁷ conidia (μg)
<i>A. oryzae</i> var <i>oryzae</i>	7.6±0.5	0.52
<i>A. nidulans</i> 514	4.2±0.7	0.56
TAVD514-1	7.8±0.5	0.61
TAVD514-2	7.6±0.7	0.71
TAVD514-3	4.6±0.7	0.77
TAVD514-4	6.8±0.7	0.32
TAVD514-5	8.4±0.7	1.26
TAVD514-6	7.6±0.7	1.28
TAVD514-7	8.7±0.5	1.25
TAVD514-8	4.6±0.7	1.30
TAVD514-9	6.8±0.5	0.96

핵전이에 의하여 얻어진 잡종의 유전성 안정성을 검토한 결과를 Table 3에 나타내었는데 인위적 분리비에 의한 유전적 안정성이 50% 이상인 형질전환체 두 균주 즉, TAVD514-3과 TAVD514-6을 획득하였다.

또한 모균주와 형질전환체의 conidia의 크기와 DNA 함량을 측정하여 Table 4에 나타내었는데 모균주에 비하여 형질전환체들은 conidia의 크기가 1.09~2.09배 정도 컸으며, 핵염색 및 DNA 함량을 비교하여 본 결과 1.09~2.32배 정도 증가하여 형질전환체의 핵이 모균주에 비하여 유사하거나 약간 큰 경향을 보였다. 이상의 결과로부터 형질전환체의 핵형은 aneuploid로 추정할 수 있었다. 이러한 것은 *A. nidulans*와 *A. rugulosus* 및 그 융합체에서 2.0~2.3배로 되어 aneuploid이었다는 보고와는 차이가 있었으나 *A. niger*와 *A. ficuum* 및 그 융합체에서 1.6~2.2배 증가되어 aneuploid이었다는 보고(15)와는 유사하였다. 또한 모균주와 형질전환체 사이의 세포의 수용성 단백질의 양상을 비교하기 위하여 SDS-

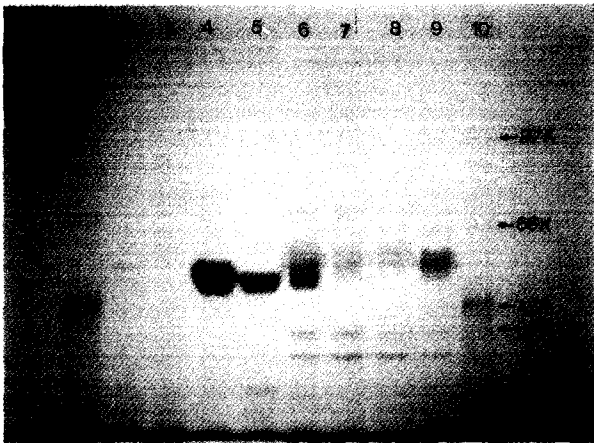


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of total soluble protein of parents and their hybrids.

Lanes, 1; TAVD514-1, 2; TAVD514-2, 3; TAVD514-3, 4; TAVD514-4, 5; TAVD514-5, 6; TAVD514-6, 7; TAVD514-7, 8; *A. nidulans* 514, 9; *A. oryzae* var. *oryzae*, 10; Protein size marker.

Table 5. Xylanase activities of transformants

Strains	Xylanase		Protein content $\mu\text{g/ml}$
	units	units/mg Protein	
<i>A. oryzae</i> var <i>oryzae</i>	64.41	188.89	341
<i>A. nidulans</i> 514	62.20	174.49	345
TAVD514-1	63.07	176.67	337
TAVD514-2	69.21	191.19	362
TAVD514-3	89.24	264.81	357
TAVD514-4	71.41	213.16	335
TAVD514-5	74.03	165.23	327
TAVD514-6	81.47	253.80	346
TAVD514-7	78.92	221.06	357
TAVD514-8	63.21	182.69	321
TAVD514-9	71.12	119.78	356

PAGE를 행하고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

Xylanase 활성도의 측정

모균주와 형질전환체의 xylanase 활성을 측정한 결과를 Table 5에 나타내었는데, 형질전환체들의 효소활성이 모균주보다 1.2~2.0배 높은 것으로 나타났다.

Xylanase의 정제

Ammonium sulfate 분획과 gel filtration Ammonium sulfate를 농도별로 침전시킨 후 55~75%의 농도에서 침전된 단백질을 소량의 50 mM acetate buffer (pH 4.0)로 녹인 다음 Sephadex G-25 gelfiltration을 행하여 염을 제거한 후, 활성을 측정하여 본 결과 specific activity는 210.0 unit/mg이었다.

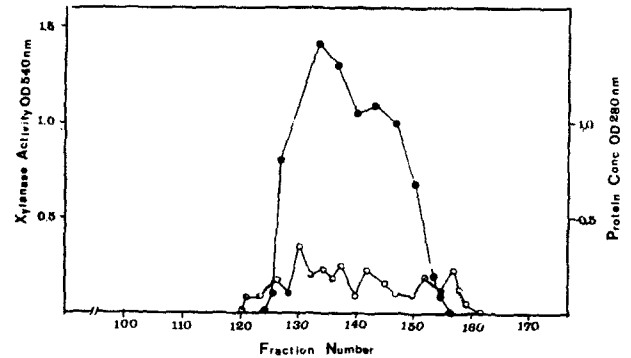


Fig. 5. Gel permeation chromatography on sephadex G-75 of 55~75% ammonium sulfate fraction.

The column (1.45×73 cm) was eluted with 50 mM acetate buffer (pH 4.0). Flow rate; 3.0 ml/hr, 3.0 ml/fraction.

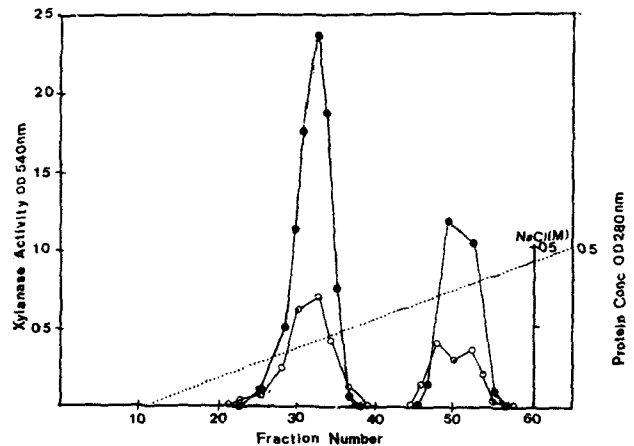


Fig. 6. Ion exchange chromatography of xylanase on CM-sephadex A-50.

The column (1.0×20 cm) was eluted with a linear gradient of NaCl (0~0.5M). Flow rate; 4.5 ml/hr, 3 ml/fraction.

Sephadex G-75 gel permeation chromatography 염을 제거한 효소용액을 Sephadex G-75 column에 적하하고 50 mM acetate buffer(pH 4.0)로 용출시킨 결과를 Fig. 5에 나타내었는데 xylanase의 활성은 No. 125~153 분획에서 효소 활성이 높게 나타났으며, specific activity는 411.5 units/mg이었다.

CM-sephadex A-50 ion exchange chromatography 효소활성이 높은 분획 No. 125~153을 모아 CM-sephadex A-50 column에 적하하고 0.4M NaCl이 포함된 50 mM acetate buffer(pH 4.0) 50 ml/과 동량의 50 mM acetate buffer(pH 4.0)을 사용하여 직선 농도 기울기로 용출시킨 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 xylanase 활성이 높은 2개의 peak가 나타났으며, 그 중에서 No. 27~37분획이 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 본 효소는 양이온 교환수지에 흡착되는 효소임을 알 수 있었고 이 때 얻어진 효소의 고유 활성도는 4325.4 unit/mg이었다.

Table 6. Purification of xylanase from *Aspergillus* sp. TAVD514-3.

Purification step	Total vol (ml)	Total enzyme activity (unit)	Total protein	Specific activity	X-fold Purity	Yield (%)
Crude enzyme	500	4236.3	83.3	50.9	1.0	100
Ammonium sulfate	3	2184.0	0.5	210.0	4.1	41
Sephadex G-75	11	1563.5	3.8	411.5	8.1	30
CM-sephadex A-50	3	1010.0	0.2	4325.4	85.0	17

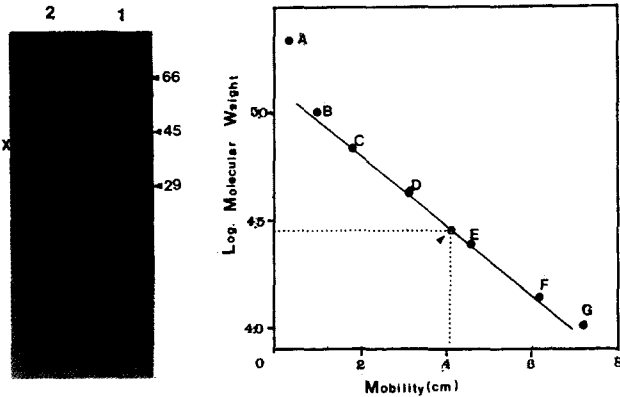


Fig. 7 Molecular weight estimation of xylanase by SDS-PAGE.

Lanes, 1, molecular weight maker protein; 2, purified xylanase; A, Phosphorylase B (MW 97,400); B, Bovine serum albumin (MW 66,200); C, Ovalbumin (MW 43,000); D, Carbonic anhydrase (MW 29,000); E, β -lactoglobulin (MW 18,400); F, Lysozyme (MW 14,300).

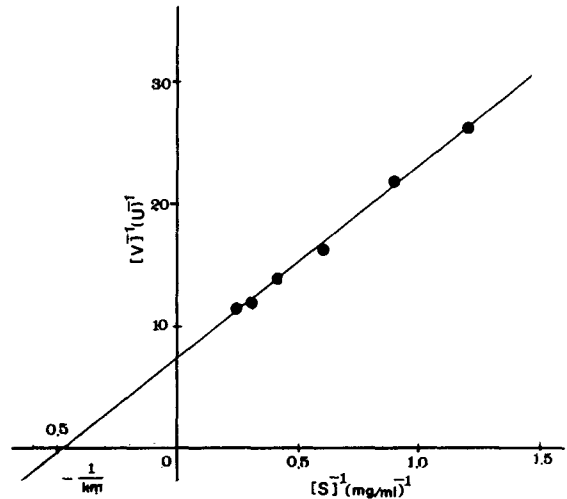


Fig. 9 Effect of substrate concentration by Lineweaver-Burk plot.

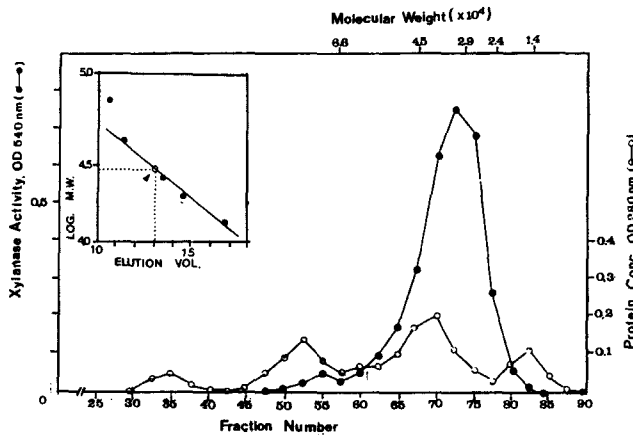


Fig. 8 Molecular weight estimation of xylanase by gel permeation chromatography on Sephadex G-150.

The column (2.0×60 cm) was eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.4). Flow rate: 3.0 ml/hr, 1.5 ml/fraction.

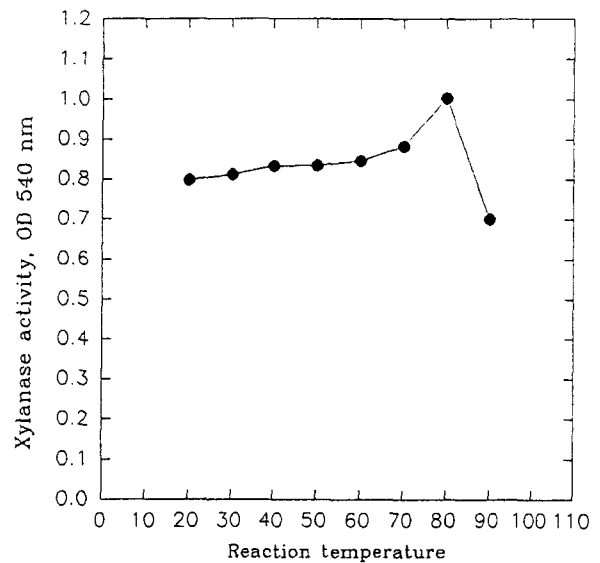


Fig. 10. Effect of temperature on xylanase activity.

정제과정의 회수율과 분자량의 측정 Table 6에서 보는 바와 같이 조효소 용액 500 ml로 부터 55~75% ammonium sulfate 분획, Sephadex G-75 gel permeation chromatography, CM-sephadex A-50 ion exchange chromatography 등의 정제과정을 통해 얻어진 결과는 조

효소 용액과 비교하여 17%의 회수율로 약 80배 정제된 효소를 얻을 수 있었다. 또한 분자량 측정결과는 Fig. 7, 8에 나타내었는데 그 결과 정제된 xylanase의 분자량은 32,000 daltons임을 알 수 있었다.

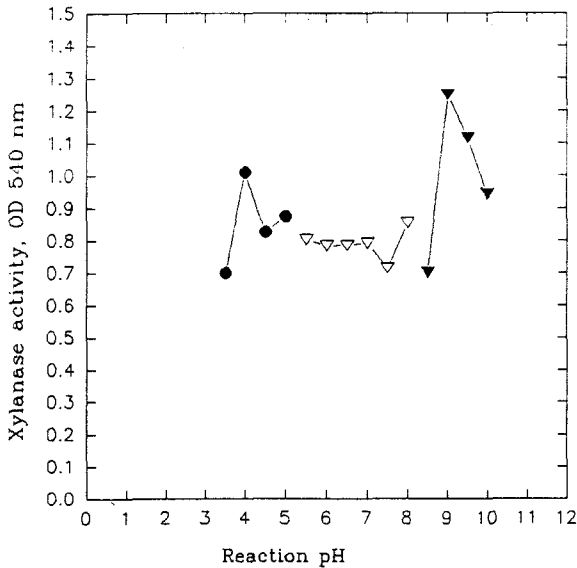


Fig. 11. Effect of pH on xylanase activity. ●-●: 100 mM acetate buffer, ▽-▽: 100 mM phosphate buffer, ▼-▼: 100 mM glycine buffer.

Table 7. Effect of divalent metal cations on xylanase activity from *Aspergillus sp.* TAVD514-3.

Metal ions	Relative activity (%)
None	100.0
Ca ²⁺	86.4
Co ²⁺	70.4
Cu ²⁺	83.2
EDTA	79.4
Fe ²⁺	73.5
Mg ²⁺	150.2
Mn ²⁺	117.6
Ni ²⁺	81.4
Zn ²⁺	69.2

Xylanase의 특성

효소 역학은 Fig. 9에 나타내었으며, 효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 20~90°C까지의 온도에서 효소액과 기질을 반응시켜 xylanase 효소활성을 측정 한 결과를 Fig. 10에 나타내었는데 20°C부터 서서히 증가하다가 80°C에서 가장 높음을 알 수 있었고, 90°C부터는 급격히 감소하였다. 이는 호염기성 *Bacillus sp.*부터 분리된 xylanase I, II가 60°C에서 최적이었다는 보고(8) 보다는 높았다. 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 측정 하기 위하여 pH 3~10까지 각각의 완충용액을 만들어 pH를 조절한 다음 효소액과 기질을 반응시켜 xylanase 효소활성을 측정하고 그 결과를 Fig. 11에 나타내었다. pH 3.0~5.0까지는 100 mM acetate buffer, pH 5.5 ~8.0 까지는 100 mM phosphate buffer, pH 8.5~10까지는 glycine buffer를 사용하여 효소액과 기질을 반응시켜 xy-

lanase 활성을 측정하였다. xylanase는 중성인 phosphate buffer(pH 5.5~8.0)에서는 상대적으로 활성이 낮았으며 pH 4.0와 pH 9.0에서 활성이 높았는데 그 중에서도 pH 9.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 xylanase 활성에 미치는 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각 금속의 염화물을 10⁻³M의 농도로 pH 4.0에서 효소액과 반응시킨 후 효소활성을 측정한 결과는 Table 7와 같다.

Co²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺는 활성을 저해시키는 효과를 나타내었지만 나머지는 비교적 효소활성을 촉진시키는 경향을 나타내었고, Mg²⁺, Mn²⁺는 다른 금속이온에 비하여 촉진효과가 높았으며, 그중 Mg²⁺이 가장 높은 촉진활성을 나타내었다.

요 약

Aspergillus oryzae var *oryzae*와 *Aspergillus nidulans* 514간의 xylanase 우수 생성 종간 형질전환체를 획득하고, 유전분석과 정제를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 핵전이를 위한 원형질체 형성 및 재생 조건에서는 Novozym 234의 농도 1%, 삼투안정제는 0.6M (NH₄)₂SO₄, 효소의 처리 시간은 90분 그리고 최적 pH는 5.8로 나타났다.
2. 핵전이에 의한 형질전환의 빈도는 3×10⁻⁵~1×10⁻⁵으로 비교적 낮은 편이었다.
3. 유전적 안정성, conidia의 크기, DNA 함량의 측정 그리고 핵염색의 결과 형질전환체의 핵형은 aneuploid로 추정되었다.
4. 형질전환체의 xylanase 활성은 모균주와 비교하여 1.1~1.4배 증가하였다.
5. 형질전환체중 xylanase 활성이 가장 높은 TAVD 514-3을 정제하고 몇가지 특성을 조사하였는데 전체적인 회수율이 17%, 분자량은 32,000 그리고 효소 활성에 미치는 기질의 영향을 을 조사하였다.
6. 정제된 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 9.0과 80°C로 나타났으며, 효소활성은 Mg²⁺와 Mn²⁺의 존재시에 증가하는 경향을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1993년도 조선대학교 교내 학술연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Anne, J. and J.F. Peberdy. 1975. Condition for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solution. *Arch. Microbiol.* **105**: 201-205.

2. Anne, J., H. Eysen and P. Desomer. 1976. Somatic hybridization of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature*. **262**: 719-721.
3. Anne, J. and J.F. Peberdy. 1981. Characterization of interspecific hybrids between *Penicillium chrysogenum* and *P. roquefortii* by isoenzyme analysis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **77**: 401-408.
4. Bradshaw, R.E., K-U. Lee and J.F. Peberdy. 1983. Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *A. rugulosus* by protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 3525-3533.
5. Cho, N.T., H.M. Park and Y.H. Rhee. 1982. Protoplast reversion of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **19** (4): 192-198.
6. Chung, K.C., K. Kawai, S. Yoshima and Y. Eguchi. 1982. Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verrucosum*. *Hakkokogaku*. **60**: 355-357.
7. Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 276-352.
8. Dekker, R.F.H. 1983. Bioconversion of hemicellulose: Aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering* **115**: 1127-1146.
9. Ferenczy, L., F. Kevei, M. Franco and I. Rojik. 1976. Factors affecting high frequency fungal protoplast fusion. *Experientia*. **32**: 1156-1158.
10. Ferenczy, L. and M. Pesti. 1982. Transfer of nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **7**: 157-160.
11. Ferenczy, L. 1983. Current question of gene transfer via protoplast fusion in microorganism. *6th Inter. Protoplast symposium*. 137-142.
12. Giles, K.W. and Myers. 1965. An improved diphenylamine method for estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*. **206**: 93.
13. Hong, S.W., Y.C. Hah, and H.M. Park. 1984. The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus, *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 207-213.
14. Lee, J.A., J.S. Maeng, P.J. Maeng and Y.H. Rhee. 1989. Synergistic effect of substrate on the biosynthesis of cellulase and xylanase complexes from *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 57-65.
15. Lorz, H. and I. Potrycus. 1978. Investigation on the transfer of isolated nuclei into protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **53**: 251-256.
16. Min, K.R. 1987. Isolation and analysis of intra- and interspecific hybrids in genus *Trichoderma*. In M.S. thesis, Seoul National University.
17. Nevalainen, K.M.H. and E.T. Palva. 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**: 999-1007.
18. Peberdy, J.F., C.E. Buckley, D.C. Daltrey and P.M. Moore. 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **67**(1): 23-26.
19. Rho, H.S. 1991. Study on interspecific hybrid formation by nuclear transfer in *Aspergillus* spp. Department biology, In M.S. thesis, Chungnam Nat'l. Univ.
20. Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo and H. Okada. 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 363-368.
21. Yang, Y.K., Y. Park, Y.H. Rhee and P.J. Maeng. 1989. Study on formation of *Aspergillus nidulans* hybrids by protoplast fusion and nuclear transfer. *Kor. J. Mycol.* **17**: 154-160.

(Received 6 September 1995)