

핵전이에 의한 *Aspergillus niger*와 *Penicillium chrysogenum*의 잡종에서의 Lipase 고생산균주의 개발

양영기* · 문명님 · 이윤희 · 임채영

조선대학교 자연과학대학 유전공학과

*Aspergillus niger*와 *Penicillium chrysogenum*간의 lipase 우수 생성 중간 형질전환체를 획득하고, 유전분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (1) *P. chrysogenum*의 영양요구물을 확인하여 본 결과 Tyrosine 요구성임을 알 수 있었다. (2) 핵전이를 위한 원형질체 형성 및 재생 조건에서는 Novozym 234의 농도 1%, 삼투안정제는 0.6 M KCl, 효소의 처리 시간은 180분 그리고 최적 pH는 5.8로 나타났다. (3) 핵전이에 의한 형질전환의 빈도는 1.3×10^{-3} - 3.8×10^{-3} 으로 비교적 낮은 편이었다. (4) 유전적 안정성, conidia의 크기, DNA 함량의 측정 그리고 핵염색의 결과 형질전환체의 핵형은 aneuploid로 추정되었다. (5) 형질전환체의 lipase 활성은 모균주와 비교하여 1.4-2.2배 증가하였다.

KEY WORDS □ *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, nuclear transfer, lipase,

Lipase(Glycerol-ester hydrolase, Triacylglycerol lipase, E.C 3.1.1.3)는 triglyceride의 ester결합을 가수분해시켜 glycerol과 지방산으로 분해하거나 합성하는 효소로 동물, 식물, 미생물에 의해 생산된다. 이러한 상업적 잠재성이 높은 미생물 유래의 lipase는 유지 산업과 낙농제품, 유제품, 어류 및 쌀가공, 두유생산, 양조공업 등 식품산업에서 널리 쓰이는 효소로써 지방의 제거 또는 그 구조변화의 촉매로써 이용범위가 증가되고 있으며, 그 이외에도 가죽처리공정, 세제, 화장품 및 의약품 등 산업적 이용범위가 확대되고 있다. 미생물 중 lipase 생산하는 것으로 알려진 세균류로는 *Staphylococcus*속, *Chromobacterium*속, *Achromobacter*속, *Micrococcus*속, *Bacillus*속, *Pseudomonas*속, *Alcaligenes*속 등이 있으며, 효모류로는 *Candida*속, *Torulopsis*속, *Saccharomyces*속 등이 알려져 있고, 균류에 있어서는 대부분의 진균류에서 다양한 생산이 보고(18)되어 있지만, 그 중에서도 *Aspergillus*속, *Rhizopus*속, *Geotrichum*속, *Mucor*속, *Humicola*속, *Myriococcum*속, *Phycomyces*속, *Penicillium*속, *Byssochlamys*속, *Fusarium*속 등이 다량 생산하는 것으로 알려져 있다. 한편, 미생물의 우수균주 개발 방법은 종래에는 돌연변이 유발이나 교잡을 통하여 우량종을 선발하는 방법이 사용되어 왔으나 상대적으로 효율이 낮고 특정산물의 생산 증대를 이루기에는 한계가 있음이 인식(10)되었다. 따라서 보다 분자생물학적인 차원에서의 접근 방법이 필요하게 됨에 따라 유전자 재조합기술과 함께 원형질체 융합기술이 많이 이용되고 있다. 원형질체 융합기술은 Kao 등(20)에 의하여 polyethylene glycol(PEG) 사용에 의하여 식물의 원형질체 융합이 높은 빈도로 이루어짐을 보고한 이래 동식물뿐만 아니라 미생물에서도 이용되었는데 Ferenczy 등(11)은 사상균류에서 최초로 PEG를 이용 원형질체 융합에 성공하였고,

그 후 몇몇 사상균류들의 종내, 종간의 원형질체 융합이 이루어졌다(25). 이를 통하여 원형질체 융합기술이 유전물질 전달을 위한 유용한 방법임이 밝혀졌고, 또한 균류에 있어서 생활사가 밝혀지지 않은 종의 유전학적 분석이나 산업적으로 유용한 균주의 육종법으로 이용될 수 있음이 인정되었다(13, 18, 27).

따라서, 본 연구는 균주의 육종에서 우수한 방법으로 판명된 핵전이를 이용하여 *Aspergillus niger*와 *Penicillium chrysogenum* 사이에서 잡종을 유도하고, 원형질체 형성과 재생조건 및 재생양상을 관찰하고, 잡종의 유전적 안정성, 분생자의 크기 및 DNA정량 등을 통하여 잡종의 분석을 행하고, 아울러 lipase 활성 및 단백질 함량을 측정하여 lipase 고생산 균주 선발을 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 실험에 사용된 균주인 *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*(Tyr)는 PDA(Difco) 사면배지에 각각 접종하여 30°C에서 4일간 계대배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였다. 완전배지로는 PDA배지를 사용하였으며, colony 크기를 제한하기 위해 0.2%의 oxgall을 첨가하였다. 최소 배지로는 dextrose 10 g, minimal salt stock solution 20 ml/(16), 균주에 따른 영양 요구물, 그리고 colony의 크기를 제한하는 sodium desoxycholate(SDC) 0.08%를 혼합하여 제조하였다. 환원용배지로는 완전배지와 최소배지에 0.6 M KCl을 삼투안정제로 첨가하여 사용하였다.

돌연변이의 영양요구성 유전자 지표 결정

변이주의 영양 요구성을 검토하기 위해 최소 배지에 각종 아미노산 용액을 적신 여과지 절편을 disc처럼 사용하는

*To whom correspondence should be addressed

auxanographic법에 의하여 영양 요구불질을 확인하였다.

원형질체의 형성 및 재생

최소 액체 배지에 분생포자 현탁액(5.0×10^5 spores/ml)을 접종하고, 30°C에서 배양하여 집균한 다음, 0.5%와 1%의 Novozym234 용액과 2-deoxy-D-glucose(25 µg/ml)로 처리하여 30°C에서 3시간 반응시키면서 haemocytometer로 원형질체 생성량을 계수하였다. 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 도말하고 배양한 다음 Lee(20)의 방법에 따라 재생을 산출하였다.

핵의 순수분리 및 핵전이에 의한 형질전환

야생형 균주로부터 핵을 추출하기 위한 방법으로, Ferency 등(12)의 방법을 사용하였다. 즉, 원형질체를 형성시킨 후, 2 ml의 SMC I(0.3 M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂)를 첨가하여 homogenizer로 원형질체를 깨뜨리고, 이 파쇄액을 원심분리 하였다. 분리된 pellet에 0.6 M sucrose가 첨가된 SMC II(0.6 M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) 2 ml를 가하여 재현탁시킨 후, sucrose discontinuous gradient에 시료 0.36 ml를 가하고 초원심분리(Hitachi, 90,000 ×g, 60 min)하였다. 이렇게 하여 얻은 nuclear pellet을 1 ml의 0.6 M KCl용액에 재현탁시켜 4°C에 보관하고 이를 순수 분리된 핵으로 사용하였다. 형질전환시키고자 하는 *A. niger*의 야생형과 영양요구성 변이주의 핵과 *P. chrysogenum*의 원형질체를 각각 1 ml씩 혼합하여 원심분리하였다. 이리하여 얻어진 pellet에 30% PEG용액(M.W. 6,000, 10 mM CaCl₂, 0.05 M glycine, pH 5.8) 1 ml를 조심스럽게 혼합한 다음 30°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.6 M KCl로 세척하여 환원용 완전배지와 환원용 최소배지 및 완전, 최소배지에 각각 도말하여 30°C에서 5-10일간 배양하였다.

융합체의 자연분리 및 독립 영양형 잡종의 선발

환원용 최소 배지에서 얻어진 이형접합체의 균사체를 완전배지에 옮겨 분생포자를 형성시킨 후, 이들 분생포자를 수확하여 완전배지에 도말하고 생성된 colony를 각종 아미노산이 첨가된 최소배지에 접종하여 그 유전자형을 조사하였다.

Conidia의 크기, 핵염색 및 DNA 함량의 측정

Micrometer를 사용하여 *A. niger*의 야생형 균주와 선발된 영양 요구구성 변이주 및 형질전환체의 conidia 크기를 측정하였으며, 모균주와 형질전환체의 핵을 염색하여 관찰하였다. 또한 형질전환체의 원형질체를 순수분리한 후 Giles와 Myers(14)의 diphenylamine test법에 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

Dextrose 0.5%, Olive oil 0.5%를 사용한 최소 액체 배지에 포자를 1.0×10^7 conidia/ml되게 집중하여 30°C에서 48시간 배양하고, 이 배양액을 4°C에서 원심분리하여 얻은 상층액을 세포외 조효소 용액으로 사용하였다. lipase의 효소 활성도 측정을 위한 기질로는 10 mM p-nitrophenyl butylate를 사용하였으며, lipase 활성은 0.2 M 인산 완충용액(pH 5.8)에 1%가 되게 제조한 기질용액 0.6 ml와 조효소 용액 0.4 ml를 섞어 30°C에서 60분간 반응시킨 후, 1 M Na₂CO₃를 넣어 반응을 정지시키고 유리된 p-nitrophenol양을 405 nm의 흡광도로 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 1 µmole의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하여 분석하였다.

세포외 수용성 단백질의 양상분석

모균주와 형질전환체의 세포외 수용성 단백질의 양상을 알아보기 위하여, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 즉, 전기영동 gel로는 10% polyacrylamide gel을 사용하였고, 표준 단백질로는 carbonic anhydrase(M.W. 29,000), egg albumin(M.W.45,000), bovine plasma albumin(M.W.66,000), phosphorylase B(M.W. 97,000)를 사용하였다. 선원은 시료가 stacking gel을 통과하기까지는 100 V로, 그 후로는 150 V로 공급하였으며, 전개가 끝난 후에는 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색하였다.

결과 및 고찰

영양요구성 유전자 지표 결정

모균주로 사용될 *P. chrysogenum*는 한국과학기술원 균주 보관센터에서 분양받았으며, UV-induced mutant이나 영양요구성 marker가 알려져 있지 않아 본 실험에서 각종 amino acid pool 제조하여 그것이 첨가된 최소배지에서 성장시켜 확인하고, 여지절편법을 병행하여 영양요구불질을 결정하였다. 그 결과 *P. chrysogenum*의 영양요구물은 tyrosine이었다. 따라서, 본 실험에서는 최소배지에 tyrosine을 첨가하여 배양하여 본 결과, 이들 변이주는 tyrosine에 안정성이 있어 tyrosine 요구성으로 판단되어 그것을 핵전이 실험에 사용하였다.

원형질체 형성

균류 원형질체 형성에 있어서 가장 많이 이용되고 있는 세포벽 분해효소인 Novozym 234를 사용하여 최적농도를 조사하였다(Fig. 1). 그 결과 두 균주 모두 1%의 Novozym 234에서 최적이었다. 이는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *A. oryzae*에서 0.5%(21), *A. nidulans*에서 0.5%의 Novozym 234를 처리하였을 때, 최적이라는 보고(26) 등과 비교하여 높았다. 또한 세포벽 분해효소에 따른 원형질체 형성율을 보면, 1%의 Novozym 234로 처리하였을 때, *A. niger*와 *P. chrysogenum*에서 각각 1.25×10^8 , 1.31×10^8 pts/ml로 가장 높게 나타났다. *Candida pseudotropicalis*에서는 0.1-0.3%의

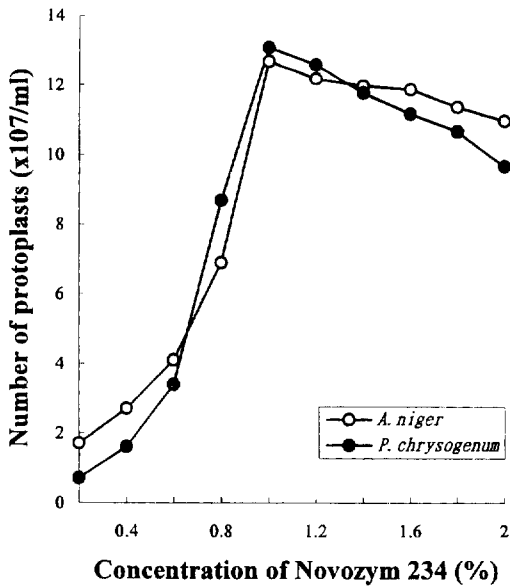


Fig. 1. Effect of Novozym 234 concentration on the formation of protoplasts from *A. niger* (○) and *P. chrysogenum* (●). The reaction was performed for 2 hrs at 30 °C with gentle shaking.

효소를 처리하여 60분간 반응시켰을 때, 97.6%로 가장 높은 형성율을 보였으며, 0.3% 이상의 농도에서는 약간 감소(7)한다는 것과 유사하게, 최적 형성율을 보인 1% 이상의 농도에서는 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 원형질체 형성에 영향을 미치는 삼투안정제의 종류와 농도별 효과는 Fig. 2에 나타내었다. 일반적으로 사상균류의 경우 삼투안정제는 무기염류, 효모의 경우에는 당 및 당알콜류가 효과적인 것(23)으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 1% Novozym 234를 2시간 동안 반응시켰을 때, 두 균주 모두 0.6 M KCl이 가장 좋은 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 *Aspergillus*속, *Geotrichum*속, *Penicillium*속 등의 경우에 0.6-1.2 M KCl이 가장 효과적이라는 보고(11, 29, 31)와 *T. reesei*와 *P. verruculosum*의 경우에 0.6 M (NH₄)₂SO₄가 가장 효과적이라는 보고(5)와 차이가 있었다. 이상의 결과를 보면 모든 균사에서 원형질체를 형성시키고 안정성을 유지시켜 주는데 공통적으로 효과적인 삼투안정제는 존재하지 않으므로 본 실험에서는 두 균주에서 모두 비교적 원형질체 형성율이 좋은 0.6 M KCl을 핵전이를 위한 삼투안정제로 선정하였다. 효소의 처리시간에 따른 원형질체 생성율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 반응시간을 60분 간격으로 늘려가며 60, 120, 180, 240분까지 반응시키면서 원형질체 형성양상을 비교하여 본 결과, *A. niger*, *P. chrysogenum*에서 각각 180, 240분에서 최대의 형성율을 보였으나, 세포벽 분해효소의 처리시간을 오래할수록 원형질체 재생율이 낮아진다는 보고(5)를 고려하여 효소처리 시간을 180분으로 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(23)와 유사한 경향을 보였으며, *A. nidulans*에서

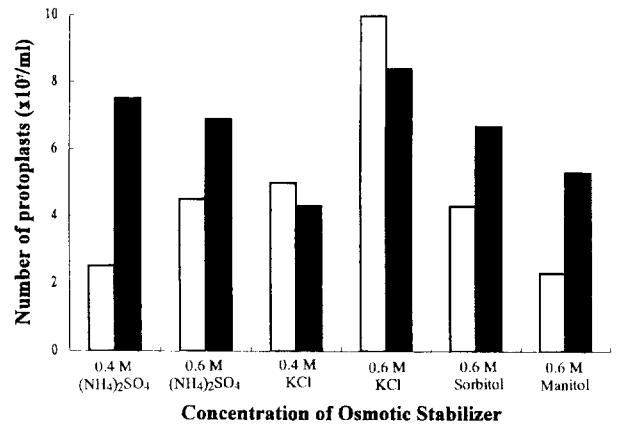


Fig. 2. Effect of different osmotic stabilizers on the protoplast formation from *A. niger* (□) and *P. chrysogenum* (■). The reaction was performed with 1% Novozym 234 for 2 hrs at 30 °C with gentle shaking.

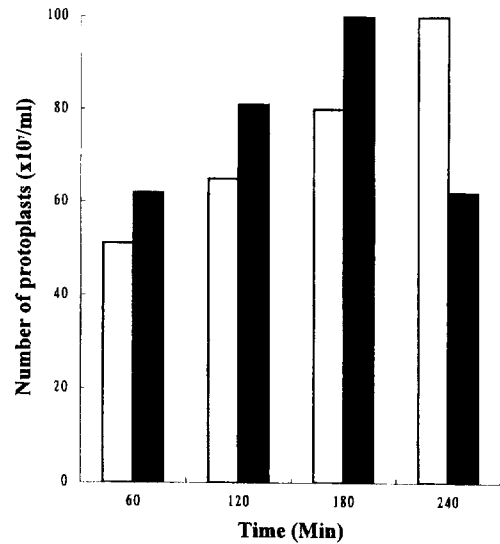


Fig. 3. Effect of digestion time on the formation of protoplast from *A. niger* (□) and *P. chrysogenum* (■). The reaction was performed with 1% Novozym 234 at 30 °C with gentle shaking.

Novozym 234를 37°C에서 2시간(31), *A. awamori* var. *kawachi*와 *A. usami* mut. *shirousami*는 35°C에서 1시간 반응시켰을 때 최적이라는 결과(28)보다는 길었다. 이러한 효소처리의 온도 및 처리 시간의 차이는 사용 균주의 세포벽 조성분, 세포벽 분해효소의 특성과 처리 온도 등에 기인한 것으로 생각된다. 삼투안정제의 종류 및 농도와 함께 원형질체 형성에 중요한 요인으로 알려진 pH는 *Aspergillus*속의 경우 pH 5.5-6.0 사이의 범위가 적합한 좋은 것으로 나타났는데 그 중에서도 pH 5.8이 최적인 것으로 나타났다(Fig. 4). 이는 *A. nidulans*의 경우 pH 5.5-6.8 범위에서 원형질체 형성이 잘 이루어진다고 하는 보고(24, 31)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 원

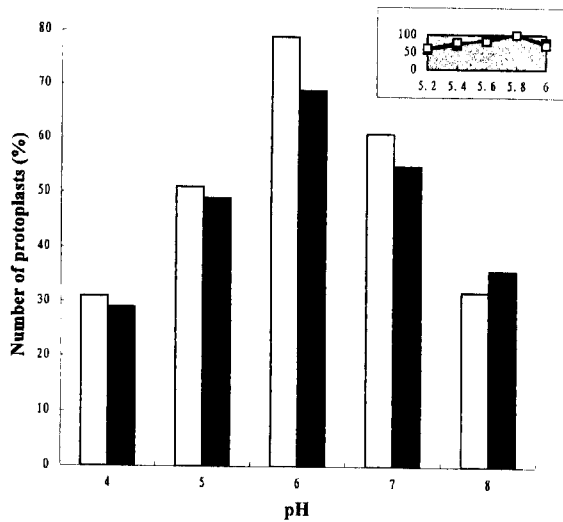


Fig. 4. Effect of pH on the formation of protoplast from *A. niger* and *P. chrysogenum*. Reaction was performed with 1% No-vozyme 234 and 0.6 M KCl at 30°C.

형질체 형성 및 안정성 유지가 가능한 것으로 추정된다.

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 1에서 나타난 바와 같이, 본 실험에서는 원형질체 형성에 적합했던 0.6 M KCl에서 높은 재생율을 보였으며, 그 재생율은 39.1-56.4%였다. 이러한 재생율은 0.6 M sorbitol을 사용하였을 경우 *T. harzianum*은 0.68%, *A. niger*는 15.3%, 0.6 M KCl을 사용하였을 경우 *A. oryzae* 1.46-13% 결과(21) 등보다 높은 경향을 나타내었으며 *A. oryzae*에서 0.6 M KCl을 사용하였을 경우 15-25%의 재생율을 나타내었다는 결과(22)보다도 높았다. 이러한 결과는 균주에 따른 재생율이 삼투안정제의 종류에 따라 각기 다를음을 말해준다.

또한 원형질체가 정상세포로 재생되어지는 과정을 광학현미경으로 Fig. 5에 나타내었다. 약 6시간부터 Pyriform을 형성되다가 약 8시간 효모같은 형태의 변체관을 형성하였다. 그 후 변체관 반대편에서 정상적인 균사가 형성되어 시간이 지남에 따라 균사체로 성장한다. Park(25)은 *P. verruculosum* F-3의 균사체 원형질체 재생 양상에서는 크게 팽창한 원형질체의 한 쪽면에 돌출부가 형성되고, 시간이 흐름에 따라 점차적으로 효모모양의 구조체가 세포사슬을 형성하며, 그 세포사슬 끝에서 불규칙한 변체관(aberrant tube)이 형성되었다가 그것이 소실되어 반대편에 균사가 형성되고 24시간 뒤에 완전한 균사체 모양을 볼 수 있다고 하였다. 그러나 포자 원형질체의 재생 양상에서는 Cho 등(6), Park(25)와 같은 일반적 형태의 재생과정과 Villanueva 등(30)과 같이 원형질체로부터 직접 정상 균사체로 발달이 이루어져 일방향, 양방향 그리고 방사상으로 신장이 이루어지는 형태의 두 가지 형식으로 재생이 이루어진다고 하였다. 이러한 사슬 모양의

Table 1. Effect of osmotic stabilizer on protoplast regeneration of *A. niger* and *P. chrysogenum*

Osmotic stabilizer	Regeneration frequency(%)	
	<i>A. niger</i>	<i>P. chrysogenum</i>
0.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄	42.4	26.8
0.6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	53.2	18.7
0.4 M KCl	28.3	36.2
0.6 M KCl	56.4	39.1
0.4 M MgSO ₄	20.1	21.2
0.6 M MgSO ₄	11.4	52.3
0.4 M NH ₄ Cl	9.1	13.4
0.6 M NH ₄ Cl	19.5	17.8

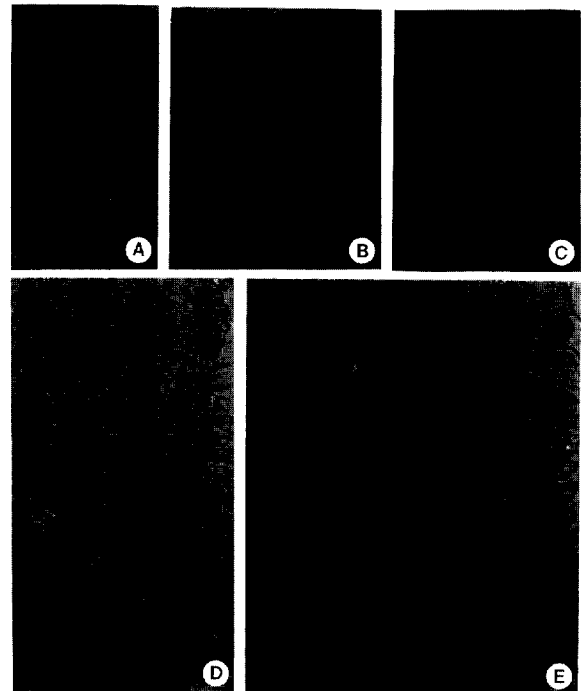


Fig. 5. Regeneration process from protoplast of *A. niger* in RCM medium. Bar equals 10 μm. A, Pyriform from protoplast after 6 hr; B, Formation of yeast-like form and aberrant tube after 8 hr; C, Normal hypha developed from the contrary site of aberrant tube; D, Well-developed hypha after 24 hr; E, growing mycelium after 30 hr.

변체관의 형성은 재생시 세포벽 성분의 결여로 형성되며, Benitez 등(4)은 이러한 변체관에 chitin 성분이 결여되어 있음을 보고하였다. 따라서 포자 원형질체는 균사체 원형질체보다 핵 및 세포소기관의 균일성으로 인하여 변체관 형성이 높은 재생율을 보임을 알 수 있었다.

핵전이에 의한 잡종의 형성

핵전이에 의한 형질전환은 Sandwich method를 변형시킨 방법으로 *A. niger*의 야생형 균주로부터 핵을 순수분리하여 형질전환시키고자 하는 *P. chrysogenum*의 원형질체를 형성시킨 후 형질전환을 행하고, 다음 식에 의하여 형질전환을

Table 2. Frequencies of hybrid formation between *A. niger* and *P. chrysogenum* by nuclear transfer

Crosses	Frequencies($\times 10^{-3}$)
<i>A. niger</i> (wild) \times <i>P. chrysogenum</i> (Tyr)	31
(N) (P)	13
	38
	10
	19

(N): donor nuclei, (P): recipient protoplast.

Table 3. Genetic stability of transformants

Strains	Genotype	No. of mean colony		Segregant(%)
		CM	MM	
HAPC-36	Leu	129	218	1.69
HAPC-38	Phe	153	338	2.21
HAPC-40	Phe	131	129	0.98
HAPC-43	Met	152	149	0.98
HAPC-44	Phe	162	161	0.99
HAPC-52	Met	136	154	1.13

Abbreviation used: HAPC, hybrid between *A. niger* and *P. chrysogenum*(Tyr)

을 산출하였다(23).

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

따라서 본 실험의 형질전환율은 약 1.3×10^{-4} - 3.8×10^{-4} 를 나타내었는데, 이는 *A. nidulans* 514와 야생형 균주간의 형질전환율 4.8%(31)와 *T. koningii* 야생주와 변이주 CUT 121 사이에서의 31%(17)보다는 낮았으나, *A. usami*와 *A. oryzae* 사이의 형질전환율 0.17%(23)보다는 높은 편이었다. 이와 같이 낮은 형질전환율은 중간 형질전환으로 인한 불안정성과 균주의 유연관계에 의한 것으로 생각된다.

잡종의 분석

핵전이에 의하여 얻어진 잡종의 유전적 안정성을 검토한 결과를 Table 3에 나타내었다. 즉, 각종 영양요구성 유전자 지표를 최소배지에 첨가하여 분생자를 접종(1.0×10^3 /ml)하고 성장시켜 확인하였는데 인위적 분리비에 의한 유전적 안정성이 1% 미만인 형질전환체 3균주 즉, HAPC-40, HAPC-43 및 HAPC-44을 획득하였다.

또한 모균주와 형질전환체의 conidia의 크기와 DNA 함량을 측정하여 Table 4에 나타내었는데 모균주에 비하여 형질전환체들은 conidia의 크기가 1.09-2.09배 정도 컸으며, 핵염색을 하여 핵의 크기를 비교하여 본 결과를 Fig. 6에 나타내었는데, 1.09-2.32배 정도 증가하여 형질전환체의 핵이 모균주에 비하여 유사하거나 약간 큰 경향을 보였다. 이상의 결과로부터 형질전환체의 핵형은 aneuploid로 추정할 수 있었

Table 4. Conidial size and DNA content of transformants

Strains	Mean conidial size(μm)	DNA content/ 10^7 conidia(μg)
<i>A. niger</i> (Prototroph)	6.9 ± 0.3	1.69
<i>P. chrysogenum</i> (Tyr)	3.5 ± 0.2	1.17
HAPC-36	6.8 ± 0.2	1.45
HAPC-38	7.3 ± 0.5	2.31
HAPC-40	7.5 ± 0.3	1.37
HAPC-43	7.8 ± 0.3	1.44
	4.5 ± 0.2	2.03
	6.8 ± 0.3	1.73

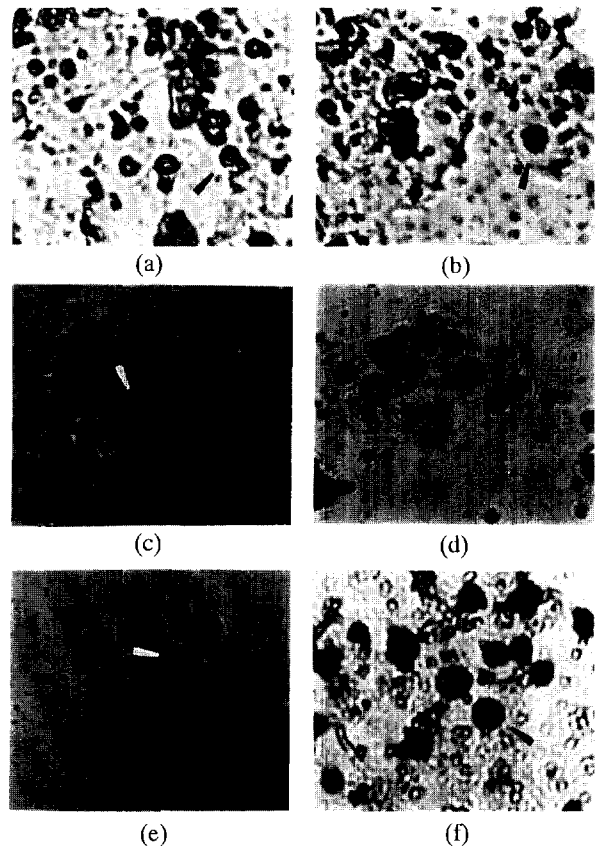


Fig. 6. Photography of nuclei of parental strains and their transformants. A, *A. niger*; B, *P. chrysogenum* 157; C, HAPC-38; D, HAPC-40; E, HAPC-43; F, HAPC-52. Equal bar is 10 μm , Arrows indicate nuclei.

다. 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(22)와는 유사하였다. 또한 모균주와 형질전환체 사이의 세포의 수용성 단백질의 양상을 비교하기 위하여 SDS-PAGE를 행하고 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 모균주와 형질전환체의 단백질의 종류와 양에서 상당히 큰 차이를 보였다.

Lipase 활성도의 측정

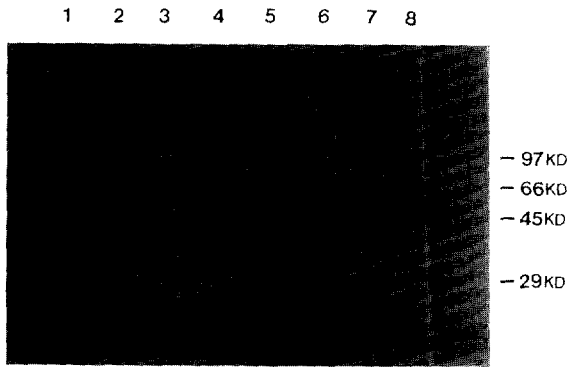


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of total soluble protein in extracellular extracts of parental strains and their hybrids. Lanes, 1, 8: Molecular weight marker, 2: *A. niger*, 3: *P. chrysogenum*, 4: HAPC-43, 5: HAPC-44, 6: HAPC-52, 7: HAPC-38.

Table 5. Lipase activities of transformants

Strains	Lipase activities		Protein content μg/ml
	Units	Units/mg	
<i>A. niger</i>	0.51	1.75	292
<i>P. chrysogenum</i>	0.41	1.26	326
HAPC-36	0.54	1.61	335
HAPC-38	0.43	1.26	340
HAPC-40	0.89	2.81	317
HAPC-43	0.68	2.19	310
HAPC-44	0.67	2.11	336
HAPC-52	0.84	2.75	306

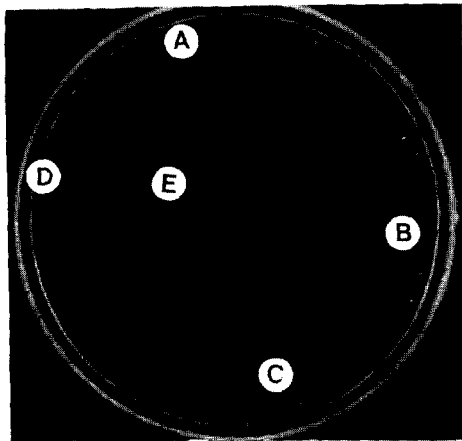


Fig. 8. Determinations of lipase activities from parental strains and their hybrids on the Rhodamin B plate. A, *A. niger*; B, *P. chrysogenum*; C, HAPC-38; D, HAPC-43; E, HAPC-44

모균주와 형질전환체의 Lipase 활성을 측정된 결과를 Table 5와 Fig. 8에 나타내었는데, 형질전환체들의 효소활성이 모균주보다 1.2-2.0배 높은 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1995년도 교육부 유전공학 연구비(1995. 4-1996.

4)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Anne, J. and J.F. Peberdy. 1975. Condition for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solution. *Arch. Microbiol.* **105**, 201-205.
- Anne, J., H. Eysen and P. Desomer. 1976. Somatic hybridization of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature.* **262**, 719-721.
- 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.
- Benitez, T. and I. Garcia-Acha. 1988. Characterization of hydrolase in protoplasts, mycelium, spores, and aberrant tubes of *Trichoderma viride*. In: *Advances in Protoplast Research*. ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, pp. 199-204.
- Bradshaw, R.E., K-U. Lee and J.F. Peberdy. 1983. Aspects of generic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *A. rugulosus* by protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3525-3533.
- Cho, N.T., H.M. Park and Y.H. Rhee. 1982. Protoplast reversion of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **19**(4), 192-198.
- Chung, K.C., K. Kawai, S. Yoshima and Y. Eguchi. 1982. Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verruculosum*. *Hakkokogaku.* **60**, 355-357.
- 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.
- 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.
- Demain, A.L. 1976. Enzymatic conversion of cellulosic materials. In: *Technology and Application*. Symp. No. 6, pp. 79-81. John and Wiley and Sons, New York.
- Ferenczy, L., F. Kevei, M. Franco and I. Rojik. 1976. Factors affecting high frequency fungal protoplast fusion. *Experientia.* **32**, 1156-1158.
- Ferenczy, L. and M. Pesti. 1982. Transfer of nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **7**, 157-160.
- Ferenczy, L. 1983. Current question of gene transfer via protoplast fusion in microorganism. *6th Inter. Protoplast symposium.* 137-142.
- Giles, K.W. and Myers. 1965. An improved diphenylamine method for estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature.* **206**, 93.
- Hamlyn, P.F. and C. Bull. 1979. Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In: *Genetic of Industrial microorganism*. pp. 185-191.
- 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.
- Hopwood, D.A., H.M. Wright, M.J. Bibb and S.M. Cohen. 1977. Genetic recombination through protoplast in *Streptomyces*. *Nature* **268**, 171-174.
- Jonsson, U. and B.G. Snygg. 1974. Lipase production

- and activity as a function of incubation time, pH, and temperature of four lipolytic microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* **37**, 571-581.
19. **Kao, K.N. and M.R. Michayuk.** 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**, 355-367.
 20. **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.
 21. **Lorz, H. and I. Potrycus.** 1978. Investigation on the transfer of isolated nuclei into protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **53**, 251-256.
 22. **Min, K.R.** 1987. Isolation and analysis of intra- and interspecific hybrids in genus *Trichoderma*. In M. S. thesis, Seoul National University.
 23. **Nevalainen, K.M.H. and E.T. Palva.** 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**, 999-1007.
 24. **Park, H.M.** 1985. Intra- and Interspecific protoplast fusion of cellulolytic fungi, *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei*. Ph. D. thesis, Seoul National University.
 25. **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.
 26. **Peberdy, J.F.** 1980. Protoplast fusion: A new approach interspecific genetic manipulation and breeding in fungi. Pergamon Press, 63-71.
 27. **Rho, H.S.** 1991. Study on interspecific hybrid formation by nuclear transfer in *Aspergillus* spp. Department biology, Graduate school, Chungnam Nat'l. Univ.
 28. **Svoboda, A.** 1981. Polyethylene glycol induced membrane fusion in yeast protoplasts. *Acta Histochemica.* **23**, 211-217.
 29. **Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo and H. Okada.** 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 363-368.
 30. **Villanueva, J.R. and I. Garcia-Acta.** 1971. Production and use of fungal protoplasts. In: Method in Microbiol. Vol. 4. ed. by C. Booth. pp. 665-718.
 31. **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 November 13, 1996/Accepted January 11, 1997)

ABSTRACT: Development of Lipase Hyper-producing Strain from Hybrids between *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* by Nuclear Transfer

Young-Ki Yang*, Myeng-Nim Moon, Youn-Hee Lee and Chae-Young Lim(Department of Genetic Engineering, College of Natural Science, Chosun University)

Intergeneric hybrids between *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*(Tyr⁻), hyperlipolytic enzyme-producing fungi, were obtained by nuclear transfer technique. Optimal conditions for formation of intergeneric hybrids were investigated. Maximum production of protoplasts were obtained by 1% Novozym 234 at 30°C for 3 hrs and the most effective osmotic stabilizers for the isolation of protoplasts were 0.6 M KCl. Frequencies of hybrid formation by nuclear transfer were 1.3×10^{-3} - 3.8×10^{-3} . From the observation of genetic stability, conidial size, DNA content, and nuclear stain, it was suggested that their karyotypes are aneuploid. The hybrids showed 1.4-2.2 fold higher lipase activities than parental strains. It was strongly supported by results of this study that nuclear transfer technique is much more efficient in the formation of intergeneric hybrids than protoplast fusion and is very useful for the improvement of strains.