

핵전이에 의한 *Aspergillus oryzae* var. *oryzae*와 *Penicillium chrysogenum*의 잡종형성 및 Alkaline Protease 생성

양영기* · 강희경 · 임채영 · 문명님
조선대학교 자연과학대학 생물과학부

The Hybrid Formation between *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* and *Penicillium chrysogenum* by Nuclear Transfer and the Production of Alkaline Protease. Yang, Young-Ki*, Hee-Kyoung Kang, Chae-Young Lim, and Myeng-Nim Moon. Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea - Interspecific hybrids between *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* and *Penicillium chrysogenum* (Tyr), high alkaline protease producing fungi, were obtained by nuclear transfer technique. Nuclei isolated from the wild type *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* strain were transferred into auxotrophic *Penicillium chrysogenum* mutants and selected the new strains showing an increased protein degrading capability. Maximum production of protoplasts were obtained by 1% Novozym 234 at 30°C for 3 hours and the most effective osmotic stabilizers for the isolation of protoplasts were 0.6M KCl. Frequencies of hybrid formation by nuclear transfer were $1.3 \times 10^{-3} \sim 2.8 \times 10^{-3}$. They could be suggested as an aneuploid by the observation of genetic stability, conidial size, DNA content, and nuclear strain. The hybrids showed 1.1~2.2 fold higher alkaline protease activities than parental strains.

Key words: *Aspergillus oryzae* var. *oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, nuclear transfer, alkaline protease

Protease(EC 3.4.21.14)는 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로서 Hartly[7] 분류법에 의하면 활성과 기능적 면에서 serine protease, thiol protease, metallo protease, aspartic protease, 그리고 최적 pH에 따라 acid, neutral, alkaline protease로 분류된다. 이러한 protease는 cheese 제조, 식육의 연화, 주류의 혼탁방지, 피혁가공, 제빵공업 등 여러 목적에 이용되고 있으며, 특히 alkaline protease는 주로 세제 및 피혁공업에 널리 이용되고 있다. 특히 최근에 와서 alkaline protease가 첨가된 효소세제의 개발과 더불어 소요량이 증가하여 현재 단일 효소로써는 최대의 생산량을 나타내고 있고 앞으로도 수요가 증가될 것으로 생각되는 산업적인 이용성이 매우 높은 효소이다. 이러한 protease는 대다수의 미생물에서 세포외 효소로써 생산되고 있으며 그러한 미생물 중에서 alkaline protease를 생산하는 것으로 알려진 세균류로는 *Bacillus*속[9], *Pseudomonas*속[15], *Streptomyces*속[18] 등이 있고, 효모류로는 *Candida*속, *Saccharomyces*속 등이 있으며, 균류에 있어서는 *Aspergillus*속 일부 중(*A. sojae*, *A. oryzae*, *A. flavus* 등)에서 생산이 보고되어 있다[4]. 한편, 미생물의 우수균주 개발 방법은 종래에는

돌연변이 유발이나 교잡을 통하여 이루어져 왔으나 상대적으로 효율이 낮고 특정산물의 생산증대에 한계가 있음이 인식되어[18] 보다 분자적인 차원에서의 접근 방법이 필요하게 됨에 따라 원형질체 융합과 핵전이 및 유전자 재조합기술이 이용되고 있다. 원형질체 융합기술은 Kao와 Michayuk[11]에 의하여 polyethylene glycol(PEG) 사용에 의하여 식물의 원형질체 융합이 높은 빈도로 이루어짐을 보고된 후 몇몇 사상균류들의 종내, 종간의 원형질체 융합이 이루어졌다[20]. 이를 통하여 원형질체 융합기술이 유전물질 전달을 위한 유용한 방법임이 밝혀졌고 또한 균류에 있어서 생활사가 밝혀지지 않은 종의 유전학적 분석이 가능하고 산업적으로 유용한 우수균주의 육종법으로 이용될 수 있음이 인정되었다[4, 10, 22]. 그럼에도 불구하고 원형질체 융합기술은 잡종 선발에 있어 융합에 사용된 모균주가 서로 상이한 유전자 marker를 가진 변이주를 이용해야 하는데 야생형 균주는 특정 유전자표지를 갖고 있지 않아 융합에 이용하는 방법이 없고 이종간에는 융합이 어렵거나 설사 융합이 이뤄졌다 할지라도 생육기간이 지극히 한정되는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 이용되고 있는 핵전이는 Ferenczy와 Pesti[5]에 의하여 최초로 시도되었는데, 이 방법은 핵공여체 균주에 영양요구성 돌연변이와 같은 유전자 표지를 도입하는 번거로움과 유용한 형질이 돌연변이에 의해 저해되는 위험성을 극복할 수 있는 기술이다.

*Corresponding author
Tel. 82-62-230-6663, Fax. 82-62-230-6619
E-mail: YGYang@mail.chosun.ac.kr

따라서, 본 연구에서는 핵전이를 이용하여 alkaline protease의 활성을 갖는 *A. oryzae* var. *oryzae*와 *P. chrysogenum* 사이에서 잡종을 유도한 후, 원형질체 형성과 재생조건 및 재생양상을 관찰하고, 잡종의 분석과 alkaline protease 활성을 측정하여 alkaline protease 고생산 균주 선발을 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 실험에 사용된 균주인 *A. oryzae* var. *oryzae*, *P. 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. 최소배지로는 dextrose 10 g, minimal salt stock solution 20 ml/l, 균주에 따른 영양 요구물, 그리고 colony의 크기를 제한하는 sodium desoxycholate(SDC) 0.08%를 혼합하여 제조하였다. 환원용배지로는 완전배지와 최소배지에 삼투안정제 KCl을 0.6M 되게 첨가하여 사용하였다.

원형질체의 형성 및 재생

완전 액체 배지에 분생포자 현탁액(5.0×10^5 spores/ml)을 접종하고, 30°C에서 18시간 배양하여 집균한 다음, 1%의 Novozym 234 용액과 2-deoxy-D-glucose(25 µg/ml)로 처리하여 30°C에서 3시간 반응 시키면서 hemocytometer로 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 등의 방법[13]에 따라 재생율을 산출하였다.

핵의 순수분리 및 핵전이에 의한 형질전환

야생형 균주로부터 핵을 추출하기 위한 방법으로서, Ferenczy와 Pesti[5]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 과쇄액을 원심분리 하였다. 분리된 pellet에 0.6 M sucrose가 첨가된 SMC II(0.6 M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) 2 ml을 가하여 재현탁시킨 후, sucrose discontinuous gradient에 시료 0.36 ml을 가하고 초원심분리(Beckman, 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 야생형인 *A. oryzae* var. *oryzae*의 핵과 영양요구성 변이주인 *P. chrysogenum*의 원형질체를 각각 1 ml씩 혼합하여 원심분리하였다. 이와 같은 방법으로 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 반응 시킨 후, 0.6 M KCl로 세척하여 환원용 완전배지와 환원용 최소배지 및 완전, 최소배지에 각각 도말하여 30°C에서 5~10일간 배양하였다.

유전적 안정성

환원용 최소배지에서 얻어진 이형접합체의 균사체를 완전배지에 옮겨 분생포자를 형성시킨 후, 이들 분생포자를 수확하여 완전배지(CM)에 도말하고 생성된 colony를 다시 완전배지와 최소배지(MM)에 replica하여 완전배지에 나타나면서 최소배지에 나타나지 않는 colony를 분리하고 독립영양형의 비를 구하여 colony의 유전적 안정성을 검토하였다.

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 Myers의 diphenylamine test법 [6]에 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 0.2%, casein 0.8%를 사용한 최소 액체 배지에 포자를 1.0×10^7 conidia/ml 되게 접종하여 30°C에서 48시간 배양하고, 이 배양액을 4°C에서 원심분리하여 얻은 상층액을 세포외 조효소 용액으로 사용하였다. Alkaline protease의 효소 활성도 측정은 Nakamura 방법 [17]을 일부 변형한 방법으로 측정하였다. 기질용액은 50 mM NaOH-Borate buffer(pH 9.0)에 기질인 0.6% (w/v) casein을 녹여 사용하였다. 2.5 ml의 기질용액에 조효소액을 0.5 ml 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 2.5 ml의 TCA 용액(0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33M acetic acid)을 가하여 반응을 정지시켰다. 미분해 casein 침전 생성을 위해 30°C에서 20분간 방치한 후 Whatmann filter paper(No.2)로 여과하여 여과액 1 ml을 취하고 0.55 M Na₂CO₃ 1 ml와 3배로 희석한 foline reagent를 가해 30°C에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활

성도는 1분 동안에 1 µg tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하여 분석하였다.

세포외 수용성 단백질의 양상분석

모균주와 형질전환체의 세포외 수용성 단백질의 양상을 알아보기 위해 Laemmli 방법[12]에 의하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 즉, 전기영동 gel로는 10% polyacrylamide gel을 사용하였고, stacking gel에서 100 V, separating gel에서는 150 V로 전개하고 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 탈색시켜 band를 확인하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질로는 carbonic anhydrase(M.W. 31,000), aldolase(M.W. 40,000), ovalbumin(M.W. 42,700), glutamate dehydrogenase(M.W. 55,000), bovine plasma albumin(M.W. 66,000), phosphorylase B(M.W. 97,000)를 사용하였다.

결과 및 고찰

원형질체 형성

균류 원형질체 형성에 있어서 가장 많이 이용되고 있는 세포벽 분해효소인 Novozym 234를 사용하여 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 1%의 Novozym 234에서 *A. oryzae* var. *oryzae*와 *P. chrysogenum*에서 각각 13.8×10^7 protoplasts/ml, 1.21×10^7 protoplasts/ml로 가장 높게 나타났다. Novozym 234는 *Trichoderma harzianum*에서 분리한 복합효소로 α -1,3-glucanase와

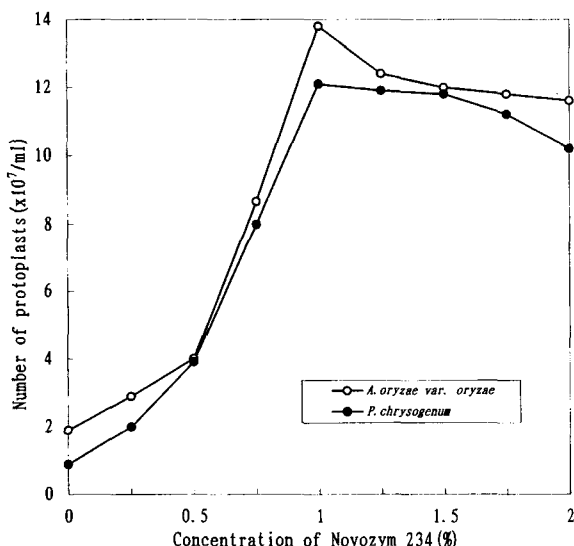


Fig. 1. Effect of Novozym 234 concentrations on the formation of protoplasts from *A. oryzae* var. *oryzae* (○) and *P. chrysogenum* (●). The reaction was performed for 2 hours at 30°C with gentle shaking.

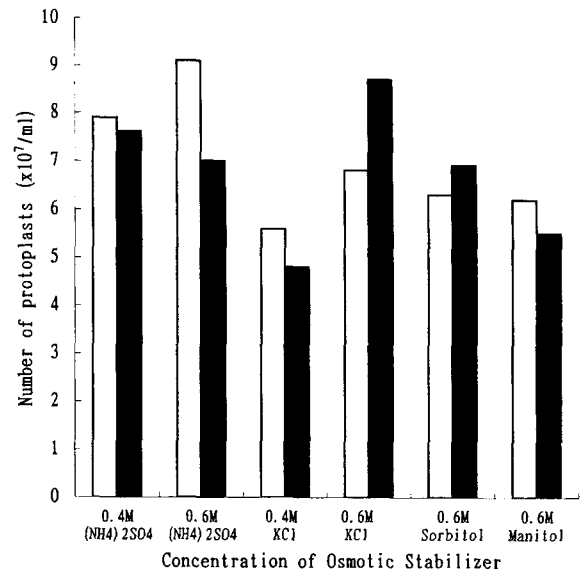


Fig. 2. Effect of concentrations of different osmotic stabilizers on the formation of protoplasts of *A. oryzae* var. *oryzae* (□) and *P. chrysogenum* (■). The reaction was performed with 1% Novozym 234 for 2 hours at 30°C with gentle shaking.

β -1,3-glucanase 주성분으로 cellulase, xylanase, neutral protease, laminarinase, chitinase 활성을 가지며, 몇몇 효모와 사상균 균사체의 경우 원형질체 형성에 특히 유용한 세포벽 분해효소로 알려져 있다[4, 21]. 이러한 세포벽 분해효소 Novozym 234의 농도에 따른 원형질체 형성율은 *Candida pseudotropicalis*에서는 0.1~0.3%의 효소를 처리하여 60 분간 반응시켰을때 97.6%로 가장 높은 형성율을 보였으며, 0.3% 이상의 농도에서는 약간 감소한다는 보고[28]와 유사하였으며, 최적 형성율을 보인 1% 이상의 농도에서는 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 원형질체 형성에 영향을 미치는 삼투안정제의 종류와 농도별 효과는 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 1% Novozym 234로 2시간 동안 반응시켰을때, *A. oryzae* var. *oryzae*의 경우 0.6 M(NH₄)₂SO₄, *P. chrysogenum*의 경우에는 0.6 M KCl에서 가장 좋은 효과를 나타내었다. 일반적으로 사상균류의 경우 삼투안정제는 무기염류, 효모의 경우에는 당 및 당알콜류가 효과적인 것[23]으로 알려져 있으나, 이러한 결과는 *Aspergillus* 속, *Geotrichum* 속, *Penicillium* 속 등의 경우에 0.6 M~1.2 M KCl이 가장 효과적이라는 보고[3, 24, 25]와 *Trichoderma harzianum*의 경우에 0.6 M sorbitol에서 가장 효과적이라는 보고[16]와는 차이가 있다. 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 원형질

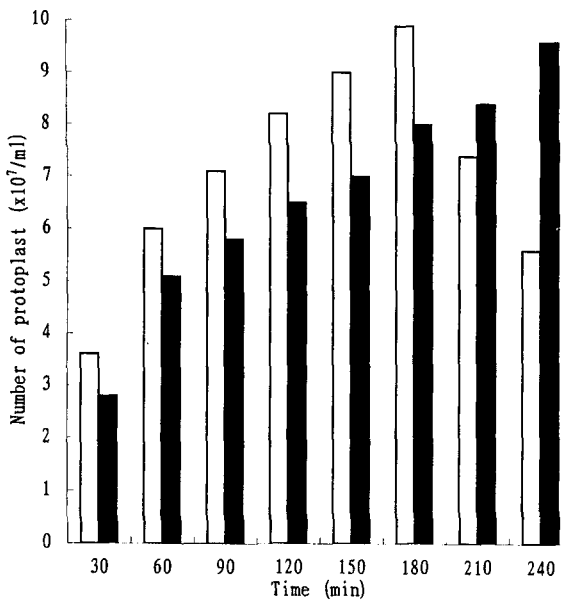


Fig. 3. Effect of digestion times on the formation of protoplasts from *A. oryzae* var. *oryzae* (□) and *P. chrysogenum* (■). The reaction was performed with 1% Novozym 234 for 2 hours at 30°C with gentle shaking.

체 생성율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 삼투안정제 0.6M(NH₄)₂SO₄에 1% Novozym 234를 녹여 각 균사체에 처리한 후 반응시간을 30분 간격으로 30분에서 240분까지 반응시키면서 원형질체 형성양상을 비교하여 본 결과 *A. oryzae* var. *oryzae*와 *P. chrysogenum*에서 각각 180, 240분에서 최대의 형성율을 보였으나, 세포벽 분해효소의 처리시간을 오래 할수록 원형질체 재생율이 낮아진다는 보고[1]를 고려하여 효소처리 시간을 180분으로 정하였다. 이러한 결과는, *A. nidulans*의 균사체에 Oerskovia 효소를 3시간 동안 처리하였을 때[1] 최대의 생성율을 보였으며, *A. niger*와 *T. reesei*에서 효소를 처리한 후 각각 30°C와 28°C에서 3시간 반응시켰을 때 최대의 원형질체 형성율을 보였다는 결과[19]와 유사한 경향을 보였으며, *Candida pseudotropicalis*에서 Novozym 234를 처리하였을 때 30°C에서 1시간, 효모에 zymolyase를 처리하였을 경우 30°C에서 90분간 반응시켰을 때 최대의 원형질체 형성율을 보였다는 결과[23]보다는 길었다. 이러한 효소처리의 온도 및 처리 시간의 차이는 사용 균주의 세포벽 조성분, 세포벽 분해효소의 특성과 처리 온도 등에 기인한 것으로 보인다. 삼투안정제의 종류 및 농도와 함께 원형질체 형성에 중요한 인자의 하나인 pH는 *Aspergillus*속의 경우 pH 5.5~6.0 사이의 범위가 적합한 것으로 알려졌는데 그 중에서도 pH 5.8이 최적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 세포벽 분해에 관여하는 효소 성분의 최적 반응 pH와 원형질체 내부의 pH와 유사하므로서 원형질체 형성 및

Table 1. Effect of osmotic stabilizers on protoplast regeneration of *A. oryzae* var. *oryzae* and *P. chrysogenum*

Osmotic stabilizer	Regeneration frequency (%)	
	<i>A. oryzae</i> var.	<i>P. chrysogenum</i>
0.4M (NH ₄) ₂ SO ₄	13.4	14.2
0.6M (NH ₄) ₂ SO ₄	10.0	12.2
0.4M KCl	12.1	20.6
0.6M KCl	18.0	30.8
0.4M Mannitol	1.1	13.0
0.6M Mannitol	1.3	12.1
0.4M Sorbitol	1.4	0.9
0.6M Sorbitol	1.4	0.8

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. 본 실험에서는 원형질체 형성에 적합했던 0.6 M KCl에서 높은 재생율을 보였으며, 그 재생율은 *A. oryzae* var. *oryzae*에서 18.0%, *P. chrysogenum*에서 30.8%를 나타내었다(Table 1). 이러한 재생율은 Lorz와 Potrycus [14]이 0.6 M sorbitol을 사용하였을 경우 *A. niger*는 15.3%, 0.6 M KCl을 사용하였을 경우 *A. oryzae*에서 1.46~13%라는 결과보다 높은 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 균주에 따른 재생율이 삼투안정제의 종류에 따라 각기 다를 수 있음을 알 수 있었다.

핵전이에 의한 집종의 형성

핵전이에 의한 형질전환은 Sandwich method를 변형시킨 방법으로 *Saccharomyces* 속과 *Trichoderma* 속 및 *Aspergillus* 속에서 사용한 방법[19]을 적용하여 *A. oryzae* var. *oryzae*의 야생형 균주로 부터 핵을 순수분리하고 형질전환시키고자하는 *P. chrysogenum*의 원형질체를 형성시킨 후 형질전환을 행하고, 다음식에 의하여 형질전환율을 산출하였다.

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

따라서 본 실험의 형질전환체율은 Table 2와 같이 약 1.3×10⁻⁴~3.8×10⁻⁴를 나타내었는데, 이는 *A. nidulans* 514와 야생형 균주간의 형질전환율 4.8%라는 보고[25]와 *T. koningii* 야생주와 변이주 CUT 121 사이에서의

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

Crosses	Frequencies ($\times 10^4$)
<i>A. oryzae</i> var. <i>oryzae</i> (wild) ^a × <i>P. chrysogenum</i> (Tyr) ^b	1.3
	1.5
	3.8
	1.6
	1.9

a: donor nuclei, b: recipient protoplast.

Table 3. Genetic stability of transformants

Strains	No. of mean colony		Segregant (%)
	CM ^b	MM ^c	
HAP ^a -A36	997	262	0.26
HAP-A31	903	681	0.75
HAP-A39	936	655	0.70
HAP-B5	962	222	0.23
HAP-B6	723	245	0.34
HAP-C2	664	752	1.13
HAP-A34	927	226	0.24
HAP-A2	1,000	746	0.75
HAP-A23	303	828	2.73
HAP-A17	981	755	0.77

a: hybrid between *A. oryzae* var. *oryzae* and *P. chrysogenum* (Tyr), b: complete media, c: minimal media.

Table 4. Conidial size and DNA content of transformants

Strains	Conidial size (μm) (mean \pm SD)	DNA content/ 10^7 conidia (μg)
<i>A. oryzae</i> var. <i>oryzae</i> (wild)	7.1 \pm 0.5	1.49
<i>P. chrysogenum</i> (Tyr)	3.9 \pm 0.3	0.84
HAP-A36	4.4 \pm 0.2	1.13
HAP-A31	4.8 \pm 0.3	1.52
HAP-A39	5.2 \pm 0.2	1.04
HAP-B5	4.4 \pm 0.2	0.99
HAP-B6	4.4 \pm 0.3	1.87
HAP-C2	4.2 \pm 0.3	0.97
HAP-A34	4.9 \pm 0.3	0.84
HAP-A2	4.6 \pm 0.2	2.18
HAP-A23	4.4 \pm 0.3	1.52
HAP-A17	4.5 \pm 0.2	0.85

31%[8]보다는 낮았으나, *A. usamii*와 *A. oryzae*사이의 형질전환율 0.17%[19] 보다는 높은 편이었다. 이와 같이 낮은 형질전환율은 중간 형질전환으로 인한 불안정성과 균주의 유연관계에 의한 것으로 생각된다.

잡종의 분석

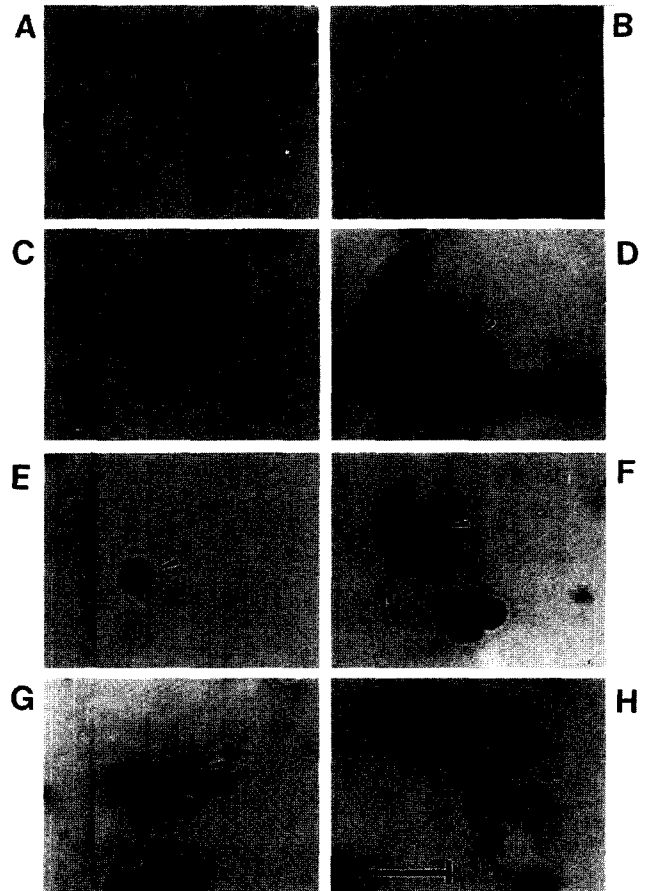


Fig. 4. Photographs of nuclei form of parental strains and their transformants. A, *A. oryzae* var. *oryzae*; B, *P. chrysogenum*; C, HAP-A36; D, HAP-A39; E, HAP-C2; F, HAP-A34; G, HAP-A2; H, HAP-A23. Bar is 10 μm and arrows indicate nuclei.

핵전이에 의하여 얻어진 잡종의 유전성 안정성을 검토한 결과를 Table 3에 나타내었는데 인위적 분리비에 의한 유전적 안정성이 1% 미만인 형질전환체 8 균주 즉, HAP-A36, HAP-A31, HAP-A39, HAP-B5, HAP-B6, HAP-A34, HAP-A2 및 HAP-A17를 획득하였다.

또한 모균주와 형질전환체의 conidia의 크기와 DNA 함량을 측정하여 Table 4에 나타내었는데 모균주에 비하여 형질전환체들은 conidia의 크기가 1.08~1.33배 정도 컸으며, 핵염색을 하여 비교하여 본 결과를 Fig. 4에 나타내었는데, 1.01~1.46 배 정도 증가하여 형질전환체의 핵이 모균주에 비하여 유사하거나 약간 큰 경향을 보였다. 이상의 결과로부터 형질전환체의 핵형은 aneuploid로 추정할 수 있었다. 이러한 것은 *A. niger*와 *A. ficuum* 및 그 융합체에서 1.6~2.2 배 증가되어 aneuploid이었던 보고[16]와는 차이가 있다. 또한 모균주와 형질전환체 사이의 세포외 수용성 단백질의 SDS-PAGE를 행한 결과를 Fig. 5에 나타내었는데, 모균주와 형질전환체 사

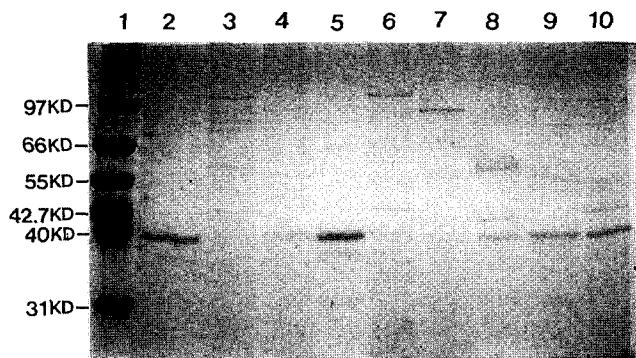


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of total soluble protein in extracellular extracts of parental strains and their hybrids. Lanes, 1: molecular weight marker, 2: *A. oryzae* var. *oryzae*, 3: *P. chrysogenum*, 4: HAP-A36, 5: HAP-A31, 6: HAP-A39, 7: HAP-B5, 8: HAP-B6, 9: HAP-C2, 10: HAP-A34.

Table 5. Alkaline protease activities of transformants

Strains	Alkaline protease units ^a	Activities units/mg protein	Protein content µg/ml
<i>A. oryzae</i> var. <i>oryzae</i>	0.17	1.47	365
<i>P. chrysogenum</i>	0.07	1.27	263
HAP-A36	0.56	2.97	1662
HAP-A31	0.53	2.11	1481
HAP-A39	0.50	1.37	1457
HAP-B5	0.50	1.89	1456
HAP-B6	0.50	2.01	1406
HAP-C2	0.42	1.29	1207
HAP-A34	0.41	1.55	1172
HAP-A2	0.40	1.67	1136
HAP-A23	0.38	1.48	1053
HAP-A17	0.37	1.78	996

a: unit was expressed as the amount of enzyme which give OD 660 nm equivalent to 1.0 µg of tyrosin in one minute.

이의 세포의 수용성 단백질의 양상은 다르게 나타났다. 이는 각 균주의 단백질 생성 및 분비기작에 따른 차이인 것으로 보인다.

형질전환체의 alkaline protease 활성

모균주와 형질전환체의 alkaline protease 활성을 측정 한 결과를 Table 5와 Fig. 6에 나타내었다. 형질전환체들의 효소활성은 2.97 units/mg으로 가장 높게 나타났으며, 나머지 균들에서도 1.78~2.11 units/mg로 모균주에 비하여 1.1~2.2배로 증진된 경향을 볼 수 있다.

요 약

Alkaline protease 생산력이 우수한 야생형인 *A. oryzae* var. *oryzae*의 핵을 순수 분리하여 영양요구성 변

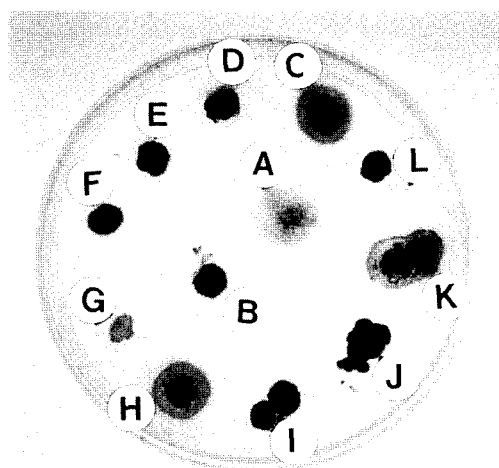


Fig. 6. Determinations of alkaline protease activities from parental strains and their hybrids on the casein plate. A: *A. oryzae* var. *oryzae*, B: *P. chrysogenum*, C: HAP-A36, D: HAP-A31, E: HAP-A39, F: HAP-B5, G: HAP-B6, H: HAP-C2, I: HAP-A34, J: HAP-A2, K: HAP-A23, L: HAP-A17.

이주인 *P. chrysogenum*(Tyr⁻)의 원형질체에 전달하는 핵 전이를 이용하여 중간잡종을 형성시킨 후 이들 형질전환체로부터 alkaline protease 고생산 균주를 획득하였다. 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. 핵전이에 의한 형질전환의 빈도는 $1.3\sim 3.8 \times 10^{-4}$ 으로 비교적 낮은 편이었으며, 유전적 안정성, conidia의 크기, DNA 함량의 측정 그리고 핵염색의 결과 형질전환체의 핵형은 aneuploid로 추정되었다. 형질전환체의 alkaline protease 활성은 모균주와 비교하여 1.1~2.2배 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 조선대학교 학술연구비 지원 및 우수연구센터 기자재 활용에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- 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.
- Chung, K. C., K. Kawai, S. Yoshima, and Y. Eguchi. 1982. Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verruculosum*. *Hakkokogaku* **60**: 355-357.
- Ferenczy, L., F. Kevei, M. Franco, and I. Rojik. 1976.

- Factors affecting high frequency fungal protoplast fusion. *Experimentia* **32**: 1156–1158.
4. Ferenczy, L. 1983. Current question of gene transfer via protoplast fusion in microorganism. *6th Inter. Protoplast Symposium* pp. 137–142.
 5. Ferenczy, L. and M. Pesti. 1982. Transfer of nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **7**: 157–160.
 6. Giles, K. W. and W. Myers. 1965. An improved diphenylamine method for estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**: 93.
 7. Hartly, B. S. 1960. *Ann. Rev. Biochem.* **29**: 459.
 8. 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.
 9. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1401–1414.
 10. 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.
 11. Kao, K. N. and M. R. Michayuk. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**: 355–367.
 12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
 13. 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.
 14. Lorz, H. and I. Potrykus. 1978. Investigation on the transfer of isolated nuclei into protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **53**: 251–256.
 15. Margesin, R. and F. Schinner. 1992. Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychrophilic *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biotech.* **24**: 207–210.
 16. Min, K. R. 1987. Isolation and analysis of intra- and interspecific hybrids in genus *Trichoderma*. *M. S. thesis, Seoul National University*.
 17. Nakamura, M. 1959. *J. Agri. Chem. Sci. Japan* **33**: 586.
 18. Nakanishi, T., Y. Matsumura, N. Minamiura, and T. Yamamoto. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of an *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 37–44.
 19. Nevalainen, K. M. H. and E. T. Palva. 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**: 999–1007.
 20. 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.
 21. Peberdy, J. F. 1980. *Protoplast Fusion: A New Approach Interspecific Genetic Manipulation and Breeding in Fungi*, pp. 63–71. Pergamon Press.
 22. Rho, H. S. 1991. Study on interspecific hybrid formation by nuclear transfer in *Aspergillus* spp. *Department Biology, Graduate School, Chungnam Nat'l. Univ.*
 23. Svoboda, A. 1981. Polyethylene glycol induced membrane fusion in yeast protoplasts. *Acta Histochemica* **23**: 211–217.
 24. Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo, and H. Okada. 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 363–368.
 25. 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 February 26, 1998)