

*Trichoderma koningii*의 conidiospore로 부터의 原形質體 分離에 관하여

朴 喜 門 · 洪 淳 佑 · 河 永 七

(서울대학교 自然科學大學 微生物學科)

Isolation of Protoplast from Conidiospore of *Trichoderma koningii*

Park, H.M., S.W. Hong and Y.C. Hah

(Dept. Microbiol. Seoul National University)

ABSTRACT

Conditions for isolation of protoplasts from conidiospores of *Trichoderma koningii* ATCC 26113 were tested.

Maximum production of conidial protoplasts was obtained by preincubation of conidiospores on liquid minimal medium for 8 1/2 hrs. and by reaction with cell wall lytic enzyme for 3 hrs. Among effective cell wall lytic enzymes (Driselase, β -Glucuronidase, Novozyme and Zymolyase), Driselase was the most effective one on the production of conidial protoplasts. The production of conidial protoplasts was also enhanced by addition of 2-Deoxy-D-Glucose (25 μ g/ml) into liquid minimal medium.

Over 70% of the initial swollen conidia, preincubated in liquid minimal medium supplemented with 2-Deoxy-D-Glucose (25 μ g/ml), were converted to protoplasts by incubation with 2% (w/v) commercial lytic enzyme Driselase at 28°C for 3 hrs.

The reversion frequency of the conidial protoplasts was about 30 times (25~50%) higher than that of mycelial protoplasts (0.6~1.3%).

緒 論

Kao와 Michayluk이 1974년 Polyethylene-Glycol(PEG)에 의하여 植物體의 原形質體 融合(Protoplast Fusion)이 효과적으로 이루어짐을 보고한 이래, 여러 種類의 微生物들에 대한 原形質體의 生成 및 그 融合에 관한 많은 研究가 행하여져왔다(Ferenczy et al. 1975; Fordor and Alföldi 1976; Schaeffer et al. 1976; Sipiczky and Ferenczy 1977). 이러한 연구의 결과 원형질체 융합기술이 遺傳物質 전달을 위한 유용한 방법임이 밝혀졌으며 실제 이 기술을 이용하여 細菌類 및 菌類에 있어 새로운 재조합체와 산업적으로 유용한 우량균주의 개발에 성공한 바 있다(Hopwood 1981; Wesseling 1980; Hamlyn et al. 1979; Seki et al. 1983). 특히 菌類에 있어

원형질체 융합기술 적용시의 장점들은 첫째 그 준비과정이 비교적 용이하며, 둘째 일단 생성된 원형질체는 正常細胞로 還元되어질 수 있고, 셋째 生活史(life cycle)가 밝혀지지 아니한 種의 遺傳學的 分析(genetic analysis)이 가능할 뿐 아니라, 넷째 산업적으로 유용한 균주들의 육종 방법으로 이용되어질 수 있다는 것이다(Peberdy 1980).

이상의 사실들로 미루어 볼 때, 섬유소 분해능이 높기는 하나 不完全 菌類(Fungi Imperfecti)에 속하여 유전학적 연구 등이 이루어져 있지 아니한 *Trichoderma koningii*의 우량균주 개발 및 유전학적 연구 등을 위하여 원형질체 융합기술을 이용하는 것이 유망한 것으로 판단된다. 본인 등(Cho et al. 1981a, b; Lim et al. 1983)은 이미 *T. koningii*의 菌絲體로부터 원형질체를 생성, 추출하기에 성공한 바 있으며, 이에 따른

원형질체의 생성 및 정상균사체로의 환원 등에 대하여 보고한 바 있다. 그러나, 菌絲體로부터 유도된 원형질체는 그 生成時期와 生成部位에 따라 함유하고 있는 核이나 細胞內 小器官 등의 분포가 불균일하여, 正常菌絲體로의 還元率 이 낮으므로 融合率 및 再組合體의 수득률이 낮은 단점이 있다. 이러한 단점의 解決 方案으로는 單一 細胞 상태로 존재하는 conidiospore (conidia)로부터 原形質體를 분리하는 것이 매우 바람직하다고 생각된다(Bos et al. 1981).

지금까지 많은 絲狀菌類의 菌絲體로부터 원형질체를 분리하기에 성공한 예는 있으나(Anné et al. 1976; Croft et al. 1979; Ferenczy et al. 1975; Kevei et al. 1977), conidiospore로부터 본격적인 원형질체의 분리에 성공한 경우는 Bos 등 (1981)에 의하여 연구된 *Aspergillus nidulans*의 경우와 *Trichoderma reesei* QM 9414 (Toyama et al. 1983)의 경우 외에는 전무한 실정이다.

따라서, 本人 등은 *T. koningii* ATCC 26113의 conidiospore로부터 原形質體를 生成 分離시킬 수 있는 方法 및 그 條件들을 추구한 바 소기의 結果를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌株 및 培地

菌株로는 *T. koningii* ATCC 26113을 使用하였으며, Malt Extract배지(malt extract 20gr., peptone 1gr., glucose 10gr./l)를 완전배지로 사용하였고 최소배지로는 Mandel salt에 glucose를 탄소원으로 하여(glucose 10gr., urea 0.3gr., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3gr., KH_2PO_4 0.4gr., CaCl_2 0.06gr., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06gr., $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mgr., $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.456mgr., $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.28mgr., $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.85mg/l) 28°C에서 培養하였다.

2. 前 培養時間別 conidia의 發芽度 측정

최소 액체 배지에 conidia 현탁액을 접종한 후 (1.0×10^6 conidia/ml) 28°C에서 진탕배양하면서, 매 시간 시료를 채취하여 conidia의 swelling 정도 및 發芽管 形成 정도를 조사하였다.

conidia의 swelling 여부는 Ekundayo 등(1964년)의 方法에 의거하여, lacto-phenol cotton blue로 염색되는 것을 swelling된 것으로 간주하

였다. 즉, 1ml의 試料를 원심분리(750×g, 5분)하여 conidia를 가라앉히고, 0.1% cotton blue를 0.5ml 가하여 5분간 염색하고, 여기에 9.5ml의 증류수를 가하여 세척한 후 다시 10ml 증류수로 세척하여 염색된 conidia의 수를 hemacytometer로 측정하였다.

發芽管의 형성여부는, conidia 단축 길이의 1/2이상 發芽管이 形成된 경우를 發芽管이 形成된 것으로 간주하였으며, 이의 보완실험으로 이들 시료를 완전 평판 배지에 접종하여 형성되는 colony의 숫자를 측정하였다.

3. 前 培養時間別 原形質體 生成度 측정

최소 액체 배지에 conidia현탁액을 접종한 후 (1.0×10^6 conidia/ml) 진탕 배양하면서, 時間別로 conidia를 수확하여, 1% (w/v) Driselase 용액을 처리하고, 28°C에서 진탕배양하면서 原形質體의 生成量을 측정함으로써 적절한 前 培養時間 및 酵素 처리시간을 결정하였다.

4. 各種 細胞壁 分解 酵素의 효과 측정

各種 酵素에 의한 原形質體의 生成정도를 조사하기 위하여 다음과 같은 酵素들을 0.6M MgSO_4 용액에 녹여 millipore filtration (pore size $0.45\mu\text{m}$)하여 사용하였다.

Cellulase "Onozuka ss" (10mg/ml, Yakult Co. Ltd.), Chitinase(8 units/ml, Sigma), Driselase (10mg/ml, Kyowa Hakko Co. Ltd.), β -Glucuronidase(4, 200units/ml, Sigma), Macerozyme R-10 (10mg/ml, Yakult Co. Ltd.), Novozyme TM 234 (10mg/ml, Novo Ind.), Zymolyase 5,000 (2.5units/ml, Seikagaku Kogyo Co. Ltd.) 즉, 최소 액체 배지에서 8~9시간 진탕배양하여 conidia를 충분히 swelling시킨 후 osmotic stabilizer로 두 번 세척하고 各種 酵素를, 酵素溶液 1ml 당 1.0×10^7 conidia가 존재하는 농도로 가하여 28°C에서 3시간 반응시켜 생성된 原形質體의 숫자를 측정하였다.

5. 2-Deoxy-D-Glucose의 效果측정

최소 액체배지에 2-Deoxy-D-Glucose(2-DG)를 농도별로 첨가한 후, 28°C에서 conidia를 진탕배양시켜 8~9시간 지난 후에 90% 이상의 conidia가 swelling되었을 때 1% Driselase를 가하여 3시간 반응시켜 생성되는 原形質體의 수를 hemacytometer로 측정하였다.

6. 各種 化學物質의 效果 측정

최소 액체 배지에서 충분히 swelling시킨 conidia를 수확하여, 2-Mercaptoethanol(0.2%), Triton X-100(0.1%), EDTA(60mM) 등을 처리한 후 (30°C, 30분) osmotic stabilizer로 세척하고 2% Driselase 용액을 3시간 처리하여, 이들 化學物質이 原形質體 生成에 미치는 영향을 조사하였다.

7. 顯微鏡의 觀察

최소 액체 배지에서 swelling시킨 conidia를 원심분리시켜 osmotic stabilizer로 두번 세척한 후 細胞壁 分解酵素를 세 시간 처리하고, osmotic stabilizer로 세척하여, 최종 농도가 3%되게 만든 glutaraldehyde로 고정시켜 顯微鏡으로 觀察하였다.

8. conidial protoplast의 正常 菌絲體로의 還元

덜균된 원심분리관에 30% Sucrose용액을 5ml 넣고, 그 위에 酵素를 처리한 conidia 반응액을 1~2ml 가한다. 이를 swing-bucket 원심분리하여 (400×g, 20분) 상층부분을 pasteur-pipette로 덜어내어 새로운 원심분리관에 모은다. 이렇게 순수분리한 原形質體를 osmotic stabilizer로 세척한다.

순수 분리한 原形質體를 osmotic stabilizer로 적절히 희석한 후 0.6M MgSO₄를 첨가한 환원용 완전 평판배지에 접종하여 이들 conidial protoplast의 환원률(reversion frequency)을 측정하였다.

結果 및 考察

지금까지 많은 絲狀菌의 菌絲體로부터 原形質體를 추출하기에 성공한 바 있으나, conidiospore로부터 原形質體를 多量 추출한 경우는 1981년 Bos 등이 2-DG를 첨가한 배지에서 *Aspergillus nidulans*의 conidia를 swelling시킨 후 *Orskovia xantineolytica*로부터 얻은 酵素를 처리하여 原形質體를 추출한 경우와 1983년 Toyama 등이 *T. reesei* QM 9414의 immature conidia에 *T. viride* BIA로 얻은 酵素를 처리하여 原形質體를 추출한 경우 외에는 전무한 실정이다.

1. 前 培養 時間의 效果

本人 등은 *T. koningii* ATCC 26113의 菌絲體로부터 原形質體 추출에 效果의으로 사용된 바

Table 1. Effect of Preincubation

| Incubation time | 0 | 3 | 6 | 7 | 9 |
|----------------------|-------|---|---|-----------------------|-----------------------|
| Number of Protoplast | · · · | | | 1.1 × 10 ⁶ | 2.3 × 10 ⁶ |

* Conidia were incubated in TMB at 28°C

* Conidia were treated with Driselase (1%, w/v) for 3hrs

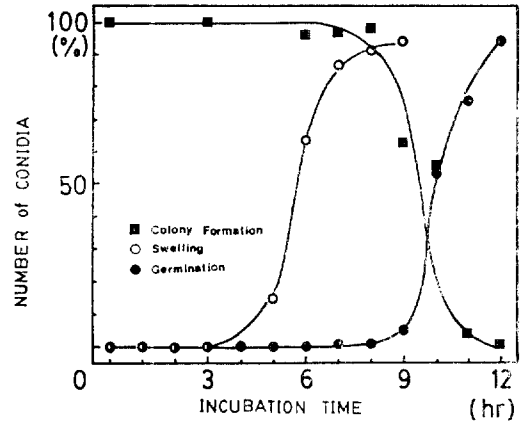


Fig. 1. Time Course of Swelling and Germination *Conidia were preincubated in TMB

있는 Driselase를 여러 상태의 conidia에 처리하여 原形質體의 생성여부 및 정도를 살펴보았다.

그 結果 Table 1에서와 같이 swelling시키지 아니한 conidia로부터 6시간까지 前 培養시킨 conidia의 경우 Driselase(1%, w/v)에 의하여 原形質體가 生成되지 아니하였으나, 前 培養 7시간 이후의 conidia로부터는 原形質體가 生成되기 시작하여 시간의 경과에 따라 계속 그 생성이 증대되었다. 또한 최소배지에서 前 培養한 conidia의 swelling여부 및 發芽管 形成도를 前 培養時間에 따라 조사한 結果, Fig. 1에서 보듯이 前 培養 세 시간 경과 후부터 swelling되기 시작하여 약 9시간 경과 후에는 95% 이상이 swelling되고, 發芽管의 生成은 8시간 이후부터 시작되어 9시간 이후부터 본격적으로 이루어졌다. 이러한 結果를 뒷받침하는 또 다른 사실로 前 培養 8시간 이후부터 완전 평판배지에 접종한 conidia에 의하여 生成되는 colony의 숫자가 급격히 감소함이 드러났다(Fig. 1). 일반적으로 絲狀菌類의 conidia는 swelling되기 시작하면서 각각의 conidia가 상호 뭉쳐지는 현상을 나타내며, 發芽管의 形成과 함께 보다 많은 conidia가 급격히 뭉쳐져 發芽管이 形成될 경우 실제의

viable cell 숫자보다 적은 숫자의 colony를 형성하게 되는 현상을 나타낸다.

따라서, Fig. 1에서 나타난 결과로부터 前培養 8시간 이후부터 9시간에 걸쳐 發芽管이 形成되기 시작하고, conidia상태를 유지하면서 최대의 原形質體 生成을 유도할 수 있는 前培養時間은 8½시간 가량임을 알 수 있다.

2. 酵素 처리시간의 效果

최소 액체배지에서 95% 이상의 conidia를 swelling시킨 후, 1% Driselase 용액을 처리하여 (conidia의 농도; 酵素溶液 1ml당 1.0×10^7 conidia) 28°C에서 진탕반응시키면서, 반응시간에 따른 原形質體의 生成량을 조사하여본 結果, Fig. 2에서 볼 수 있듯이 반응 두 시간 이후부터 原形質體의 生成이 급격히 증가하기 시작하여 세 시간 이후에 거의 최대 수준의 生成을 보여주었다. 이때 생성되는 原形質體의 수는 $2.0 \sim 2.7 \times 10^6$ 수준으로 하나의 conidia로부터 한 개의 原形質體가 生成된다고 가정할 때, 반응에 참여한 conidia의 20% 가량이 原形質體로 轉換되었음을 알 수 있다. 세 시간 이후부터 생성된 原形質體는 그 내부의 液胞가 본격적으로 커지기 시작하는 경향을 나타내었는데, 이러한 경향성은 菌絲體로부터 유도되는 原形質體의 경우와 유사한 것이었다(Cho et al. 1981a). 일반적으로 液胞가 커지는 原形質體는 그 내부의 新陳代謝率

(metabolic activity)이 높을 것이라는 보고가 있으나, 원심분리를 이용한 原形質體의 수확등 이후의 실험과정에 불리한 점이 많아 적정 반응시간을 세 시간으로 결정하였다.

3. 各種 細胞壁 分解酵素의 영향

이미 *T. koningii*의 菌絲體로부터 原形質體를 추출하기에 효과적인 것으로 밝혀진 Driselase의 예(Cho et al. 1981a., Lim et al. 1983) 지금까지의 菌類의 원형질체 분리에 널리 사용되어지고 있는 各種 細胞壁 分解酵素의 效能을 조사하여본 바, Table 2에서와 같이 사용된 모든 酵素들이 intact conidia에 대하여서는 效果를 나타내지 못하였으며 9시간 가량 swelling시킨 conidia의 경우에만 Driselase(2.7×10^6), β -Glucuronidase(2.3×10^6), Novozyme 234(1.1×10^6), Zymolyase 5,000(3.3×10^5)의 순으로 原形質體 生成이 가능하였다.

이상의 結果로부터 *T. koningii*의 菌絲體에 效果의 作用하였던 Driselase는 conidia에도 역시 效果의 作用함을 알 수 있으며, 菌類에 있어 가장 널리 사용되어지고 있는 β -Glucuronidase와 최근 몇 가지 絲狀菌類 및 酵母菌類에 效果가 좋은 것으로 알려지고 있는 Novozyme 등은 *T. koningii*의 경우에 있어서는 Driselase보다 그 效能이 낮은 것으로 판명되었다. 또한 酵母의 原形質體 추출에 가장 널리 쓰이고 있는

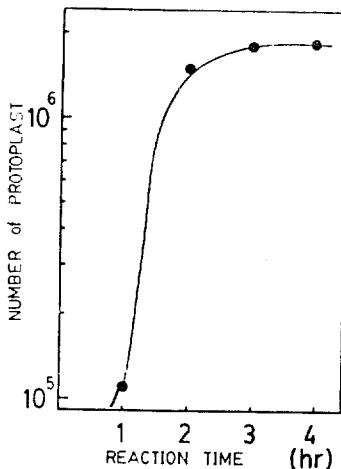


Fig. 2. Yield of Protoplasts During Enzyme Treatment

* Conidia were incubated in TMB for 9hrs. Driselase (1%) soln. were used and reacted at 28°C

Table 2. Protoplast Formation with Various Enzymes

| Lytic Enzyme | Number of Protoplast | |
|------------------------|----------------------|-------------------|
| | intact conidia | swollen conidia |
| Cellulase Onozuka SS | — | — |
| Chitinase | — | — |
| Driselase | — | 2.7×10^6 |
| β -Glucuronidase | — | 2.3×10^6 |
| Macerozyme R-10 | — | — |
| Novozyme TM 234 | — | 1.1×10^6 |
| Zymolyase 5000 | — | 3.3×10^5 |

* Conc. of enz.; Cellulase, 10mg/ml; Chitinase, 8 units/ml; Driselase, 10mg/ml; β -Glucuronidase, 4,200units/ml; Macerozyme, 10mg/ml; Novozyme, 10mg/ml; Zymolyase, 2.5units/ml

* Conidia were preincubated in TMB for 9 hrs and reacted for 3 hrs.

* The number of conidiospores in reaction mixture was adjusted about 1.0×10^7 conidia/ml.

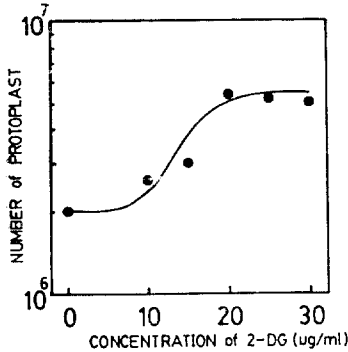


Fig. 3. Effect of 2-deoxy-D-glucose
* Conidia were incubated for 9 hrs.

Zymolyase의 경우 *T. koningii*에 있어서는 그 效能이 아주 낮은 것으로 밝혀졌다. 그의 단독으로 사용할 경우 효과가 없는 Cellulase, Chitinase, Macerozyme 등을 다른 酵素와 함께 사용하였을 경우 그 結果를 표시하지 아니하였으나 별 다른 증대효과가 나타나지 아니하였다.

4. 2-Deoxy-D-Glucose의 效果

이미 酵母의 細胞壁 合成 저해제 등으로 많이 사용되어 왔으며, *Aspergillus nidulans*의 conidiospore로부터 原形質體를 추출하는데 이용되었던 2-Deoxy-D-Glucose(2-DG) (Bos et al. 1981)의 效果를 살펴보기 위하여, 최소 액체배지와 2-DG를 각기 달리 첨가한 최소 액체배지들에서 conidia를 前 培養하여 swelling시킨 후 1% Driselase 용액을 처리한 結果 Fig.-3에서와 같이 2-DG를 첨가하지 아니한 경우 약 20% 가량의 conidia가 原形質體로 轉換되었던데 반하여, 2-DG를 20µg/ml 이상 가하여준 경우 50% 이상의 conidia가 原形質體로 轉換되었다. 따라서, 최소 액체배지에 20µg/ml 이상의 2-DG를 첨가한 후(여기서는 25µg/ml을 적정농도로 결정하였다.) conidia를 swelling시키고 1% Driselase를 처리하여 주면 반응 세 시간 이후에 50% 이상의 conidia가 原形質體로 轉換됨을 알 수 있었다.

5. Driselase의 濃度 效果

Driselase의 濃度에 따른 protoplast의 生成率을 비교하기 위하여 최소 액체배지에 25µg/ml의 2-DG를 첨가한 배지에서 前 培養한(8½시간) conidia에 각기 다른 濃度の Driselase를 처리하여본 結果 Fig. 4에서 보듯이 원형질체의 生

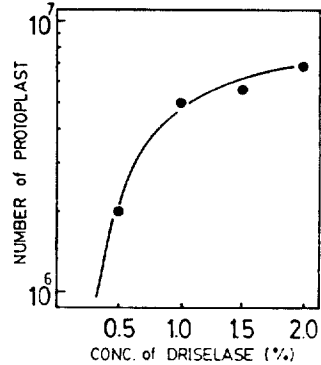


Fig. 4. Effect of Driselase with Various Concentration
* Conidia were incubated in TMB+2-DG (25µg/ml)

成이 1.0%부터 급격히 증가하기 시작하여(약 5.0×10⁶ protoplasts/ml) 2.0% 酵素 처리시 약 70% 이상의 (7.0×10⁶ protoplasts/ml) conidia가 원형질체로 轉換되었다. 이러한 結果는 2.1×10⁷ protoplasts/ml(약 80%) 수준의 원형질체가 生成된 *Aspergillus nidulans*보다는 다소 낮은 수준이기는 하나(Bos et al. 1981), *T. reesei* QM 9414의 immature conidia로부터 2.0~2.5×10⁶ protoplasts/ml 수준의 원형질체가 얻어진 Toyama 등(1983)의 結果보다는 3배 이상 높은 수준의 것으로 이들 conidial protoplast를 이용하면, 높은 빈도의 원형질체 융합 및 환원이 가능하리라 판단된다.

6. 各種 化學物質의 영향

絲狀菌의 菌絲體나 酵母로부터 原形質體를 分離할 때 2-Mercaptoethanol 등의 환원제나 계면활성제 등에 의하여 그 生成이 증대됨이 보고된 바 있다(Fournier et al. 1977). 따라서 *T. koningii*의 conidiospore로부터 原形質體를 추출하는데 있어 이들 化學物質의 影響을 살펴보았다. 그 결과 Table 3과 같이 化學物質을 처리하지 아니한 경우보다 낮은 수준의 原形質體가 生成되어 이들 化學物質들의 전처리에 의하여 오히려 conidia의 생존도가 손상됨을 유추할 수 있

Table 3. Effect of Chemical Treatment

| Chemical | 2-ME ^a | Triton X-100 ^b | EDTA ^c |
|----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| Number of Protoplast | 1.8 × 10 ⁶ | — | 1.2 × 10 ⁶ |

* a ; 0.2%. b ; 0.1%, c ; 60mM

었다.

7. 顯微鏡의 觀察

swollen conidia에 酵素를 처리한 후 conidia로부터 원형질체가 생성되는 과정을 位相差 顯微鏡으로 觀察하였다. plate 1A가 원형질체가 빠져나오고 있는 상태이며, 이것이 좀더 進行된 상태(plate 1B), 이미 빠져나온 原形質體와 細胞壁만 남은 ghost(plate 1C)를 볼 수 있었다. 이상의 結果로 볼 때, 電子 顯微鏡을 통한 微細構造의 觀察이 이루어져야 확실한 것이 되겠으나, 일단 形成된 原形質體의 대부분은 細胞壁 成分이 완전히 없는 形態의 原形質體인 것으로 추정된다.

8. 原形質體의 正常菌絲體로의 還元

Sucrose(30%) 용액을 이용하여 일단 生成된 原形質體를 잔유 細胞壁 成分 또는 미처 分解되지 아니한 conidia로부터 분리할 수 있었으며, 이들 순수분리된 原形質體를 0.6M MgSO₄가 첨가된 완전 培養배지에 접종하여 正常菌絲體로의 還元率을 살펴보았다. 그 結果 Table 4와 같이

Table-4. Regeneration Frequency of Protoplast

| Mycelial Origin | Conidial Origin |
|-----------------|-----------------|
| 0.6~1.3% | 25~50% |

Regeneration frequency was determined by calculating the number of colonies formed on regeneration complete medium.

conidia에서 分離된 原形質體의 還元率(25~50%)은 菌絲體에서 유도된 것(0.6~1.3%)보다 약 30배 이상 높은 수준을 나타내었다. 또한 Toyama 등(1983)이 *T. reesei* QM 9414의 immature conidia에서 얻어낸 原形質體의 還元率이 1% 내외인 것에 비해볼 때 본 實驗의 結果는 상당히 높은 수준의 것임을 알 수 있다.

이상으로, conidiospore에서 유도한 原形質體를 이용하여 原形質體 融合을 시도할 경우 보다 높은 빈도의 融合率과 再組合體의 수득률을 기대할 수 있을 것이며, 이를 이용한 形質轉換 實驗 또한 비교적 용이하게 이루어질 수 있을 것으로 기대된다.

摘 要

Trichoderma koningii ATCC 26113의 conidiospore로부터 原形質體 生成을 유도할 수 있는 最適 條件들을 조사하였다.

최소 액체배지에서 약 8시간 前 培養시킨 conidia로부터 最大限의 conidial protoplast 生成을 유도할 수 있었으며, 酵素처리 3시간 이후에 原形質體 生成이 최대치에 도달하였다. 各種 細胞壁 分解 酵素 중 Driselase, β -Glucuronidase, Novozyme, Zymolyase 등이 效果의이었으나, Driselase가 가장 우수한 것으로 판명되었다. 최소 액체배지에 2-Deoxy-D-Glucose(2DG; 25 μ g/ml)를 첨가한 경우 原形質體 生成이 진작되었으며, 最適 條件下 즉, 2-DG(25 μ g/ml)가 첨가된 최소 액체배지에서 conidia를 8시간 前 培養하여 Driselase(2%) 용액과 함께 28°C에서 3시간 동안 진탕배양 시키면, 반응에 가해진 conidia의 70% 이상이 原形質體로 轉換되었다.

또한 conidial protoplast의 正常菌絲體로의 還元率은 mycelial protoplast의 경우보다 30배 가량 높은 것으로 판명되었다.

REFERENCES

- Anne, J. and J.F. Peberdy, 1976, Induced fusion of fungal protoplast following treatment with polyethylene-glycol., J. Gen. Microbiol., 92:413-417.
- Bos, C.J. and S.M. Slakhorst, 1981, Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores, Can. J. Microbiol., 27:400-407.
- Cho, N.J., Y.H. Rhee and S.W. Hong, 1981a, Formation of protoplast form *Trichoderma koningii*, Kor. J. Microbiol., 19(4):186-191.
- Cho, N.J., H.M. Park and Y.H. Rhee, 1981b, Protoplast reversion of *Trichoderma koningii*, Kor. J. Microbiol., 19(4):192-198.
- Croft, J.H. and R.B.G. Pales, 1979, Protoplast fusion and vegetative incompatibility in *Aspergillus nidulans*, In Protoplast-Applications in Microbial Genetics, ed. J.F. Peberdy, pp.27-34, Univ. Nottingham, England.
- Ekundayo, J.A. and M.J. Carlile, 1964, The germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*; spore swelling and germ-tube emergence,

- J. Gen. Microbiol., 35:261-269.
7. Ferenczy, L., F. Kevei and M. Szegedi, 1975, High frequency fusion of fungal protoplasts, *Experientia*, **31**:1028-1029.
 8. Fordor, K. and L. Alföldi, 1976, Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*, P.N.A.S., Wash., **37**:2147-2150.
 9. Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignin and H. Helalot, 1977, Recombination after protoplast fusion in yeast *Candida tropicalis*, *Arch. Microbiol.*, **115**:143-149.
 10. Hamlyn, P.F. and C. Ball, 1979, Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*, In *Genetics of Industrial Microorganism*, pp. 185-191, ed. O.K. Sebeck and A.I. Laskin, A.S.M., Washington.
 11. Hopwood, D.A., 1981, Genetic studies with bacterial protoplast, *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**: 237-272.
 12. Kevei, F. and J.F. Peberdy, 1977, Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts, *J. Gen. Microbiol.*, **102**:255-262.
 13. Lim, H.M., H.M. Park, Y.C. Hah and S.W. Hong, 1983, Electron Microscopic study of protoplasts released from mycelium of *Trichoderma koningii*, *Kor. J. Electron Microscopy*, **13**(1):49-61.
 14. Peberdy, J.F., 1980, Protoplast Fusion-a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms, *Enzyme Microbiol. Tech.*, **2**:23-29.
 15. Schaeffer, P., B. Cami and R.D. Hotchkiss, 1976, Fusion of bacterial protoplast, P.N.A.S., **73**:2151-2155.
 16. Seki, T.S., S. Limtong, S. Myo, S. Uedono, J. Kumnuata and H. Taguchi, 1983, Genetic recombination of yeast strains for high ethanol production, In *Unesco Regional Workshop on Protoplast Fusion in Microorganism.*, Final Report, pp. 66-73, Seoul, Korea.
 17. Sipiczky, M. and L. Ferenczy, 1977, Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe*: auxotrophic mutants of identical mating type, *Mol. Gen. Genet.*, **151**:77-81.
 18. Toyama, H., A. Shinmyo and H. Okada, 1983, Protoplast formation from conidia of *Trichoderma reesei* by cell wall-lytic enzymes of a strain of *Trichoderma viride*, *J. Ferment. Technol.*, **61**(4): 409-411.
 19. Wesseling, A.C. and D.L. Barbara, 1980, Strain improvement by genetic recombination of Cephamycin producers, *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces griseus*, *Dev. Ind. Microbiol.*, **22**: 641-651.

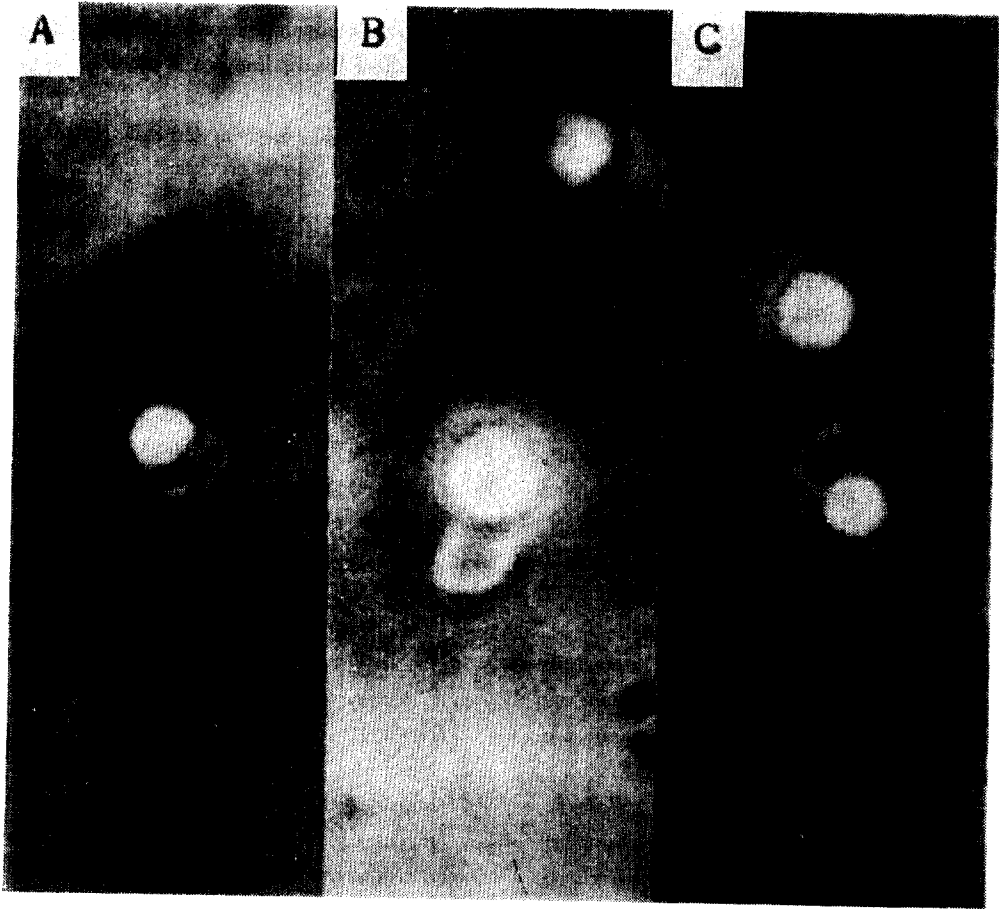


Plate 1. Observation of Protoplasting Process with Phase Contrast Microscopy.