

*Penicillium verruculosum*으로부터 분생자 원형질체의 생성과 재생

김정호 · 허정원 · 정희종 · 이용규 · 정기철*

전남 대학교 생물공학연구소

섬유소 분해능이 우수한 *P. verruculosum*의 분생포자로부터 원형질체의 생성 및 재생에 대하여 조사하였다. 균의 원형질체 생성을 위하여 2-deoxy-D-glucose(2-DG)가 첨가된 최소배지에서 분생 포자를 10-12시간 전배양 시킨후 시판 세포벽분해효소들을 작용시켜 본 결과 그중 Novozyme 234 (1%, w/v)에서 50% 이상의 가장 좋은 원형질체 생성 수율을 보였다. 전배양 되지 않은 포자로부터는 원형질체 생성이 이루어지지 않았으며 원형질체 생성율을 향상 시키기 위한 첨가제로서 2-DG의 효과가 무첨가에 비해 2배 이상의 수율을 증가 시켰다. 포자 원형질체의 재생율은 49.2%로 동 균주의 균사체 원형질체의 재생율 4.6-27.8%(삼투압 조절제로서 0.6 M magnesium sulfate)보다 높았다. 원형질체 생성 및 재생을 위한 삼투합 안정제로서는 0.6 M ammonium sulfate와 0.6 M magnesium sulfate가 가장 적절하였다. 광학 현미경을 통하여 부풀린 포자로부터 원형질체의 생성과정과 두 가지 각기 다른 양상의 재생 과정이 관찰 되었다.

KEY WORDS □ *Penicillium verruculosum*, Conidiospore, Protoplast, Regeneration

미생물의 육종방법으로 종래에는 돌연변이의 유발이나 교잡을 통해서 목적에 적합한 우량형질을 선택하는 방법이 이용되어 왔으나, 이들 방법은 상대적으로 그 효율이 낮으며 특정 산물의 생산성 증대를 꾀 하는데 한계가 있는 것으로 인식 되었다. 따라서 보다 분자적 차원에서의 접근 방법이 필요하게 됨에 따라 최근 유전자 재조합기술과 더불어 원형질체 융합기술을 통한 우수 균주 개발이 활발히 이루어지고 있다(11, 13, 20, 24).

미생물에 의한 cellulase 생산에 관한 연구의 일환으로 Chung등(5)에 의해 자연계로부터 새로이 분리된 *Penicillium verruculosum*은 cotton등 천연 섬유소 분해능이 우수할 뿐만 아니라 cellulase 유도 기율도 지금까지 널리 연구되고 있는 *Trichoderma*속과 더불어 이 균주의 유전학적 연구 및 산업적 응용 연구에 적합한 미생물로 개대되는 바 크다.

이미 이 균주의 균사 원형질체 융합에 대하여 보고 하였으나(6,7), 균사체로부터 생성된 원형질체는 그 생성된 시기 및 부위에 따라 크기나 핵의수, 그리고 세포내 기관의 불균일성으로 말미암아 재생률 및 융합율이 낮은 단점이 있어 사상균의 포자로부터 원형질체를 추출하여 융합 재료로 삼고 있다(16). 포자 원형질체의 경우 *Aspergillus nidulans*(4), *Trichoderma koningii*(12) 로 부터 20-50%의 재생율을 보여 균사

체에서 유도시보다 무려 30배 이상 높은 수득율을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 *P. verruculosum*의 분생 포자로부터 원형질체의 형성과 재생의 최적 조건등을 검토하고 그 과정등을 관찰 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

토양에서 분리된 *Penicillium verruculosum* F-3 (IFO 31136)과 PVA23(arg) 및 PVP33(phe) 영양 요구성 변이주 들을 사용하였다. 야생형과 영양 요구성 변이주에 대하여 PDA 배지(potato, 200 g, dextrose 20 g, agar 20 g/l)를 완전배지(6, 7)로 하였고, 다소 변형 시킨 Mandel's 배지(dextrose, 10 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.4 g; KH_2PO_4 , 1.4 g; $CaCl_2$, 0.3 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.4 mg; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 3.7 mg and agar, 20 g/l)를 최소배지(6, 7)로 하여 각각의 아미노산을 첨가하여 사용하였다. 영양 요구성 변이주들의 포자 전배양을 위한 배지로서는 상기 최소배지에서 한천을 뺀 액체 배지를 사용 하였으며, 원형질체 재생을 위한 재생 완전배지와 재생 최소배지는 상기 완전 및 최소배지에 삼투압 안정제를 첨가한 배지를 사용하였고, 목적에 따라 한천을 뺀 액체 재생배지를 사용하였다.

원형질체 생성

최소액체배지에 *P. verruculosum*의 포자현탁액(1.0×10^7 spores/ml)을 접종한후 30°C에서 전배양 시

*To whom correspondence should be addressed.

이 연구는 교육부 유전공학연구지원비(1986년)의 일부에 의하여 수행되었음.

키면서 시간별로 시료를 채취하여 포자의 부풀림 및 발아관형성 정도를 조사하였다. 포자의 부풀림 여부는 Ekunday와 Carlile(10)의 방법에 의거하여 lactophenol cotton blue로 염색되는 것을 부풀림이 일어난 것으로 간주하였고, 발아관형성 여부는 포자 단축길이의 1/2 이상 발아관이 형성된 경우를 발아관형성으로 간주하였다. 전 배양 시간별 원형질체 생성은 포자를 상기와 동일하게 배양하면서 시간별로 수확하여 Novozyme 234(1%, w/v) 용액을 처리하고 30°C에서 반응 시킨후 생성된 원형질체의 수를 hemacytometer로 산정함으로써 적정전배양시간, 효소 처리시간 및 효소농도 등을 결정하였다. 원형질체 추출에 사용된 각종 세포벽분해효소로는 Chitinase (Sigma, USA), Laminarinase(Sigma, USA), β -glucuronidase(Sigma, USA), Novozyme 234(Novo industry, Denmark), Driselase(Kyowa Hakko Kogyo, Japan), Zymolase 20-T(Seikagaku Kogyo, Japan), Macerozyme R-10(Yakult Honsha, Japan), Cellulase Onozuka RS(Yakult Honsa, Japan) 그리고 Meicelase(Meijiseika Kaisha Ltd. Japan) 등을 사용 하였다. 2-deoxy-D-glucose(2-DG)의 효과는 최소 액체배지에 2-DG를 농도별로 첨가하고 상기와 같이 포자를 집중한 후 배양(10-12 시간) 시키면서 Novozyme 234(1%, w/v)를 가하여 30°C에서 3시간 반응시키고 생성된 원형질체 수를 산정함으로써 조사하였다.

원형질체 재생

분생포자로부터 생성된 원형질체를 순수분리하기 위하여 5% Ficoll 400(MW: 400,000) 용액을 원심분리 매체로 하여 원심분리시키고(400×g, 30분), 상층부분만을 덜어내 새 원심분리관에 모은후 농축시키고 삼투압안정제로 두번 세척하였다(12). 순수 분리한 원형질체는 삼투압안정제로 적절히 희석한 후 재생완전배지에 접종하였고, 대조구로서 평균증류수로 삼투압충격을 준 원형질체는 삼투압안정제가 첨가되지 않은 완전배지에 접종하여 30°C에서 배양하였다. 재생율은 다음 식과 같이 Lee(15)의 방법에 의하여 산출하였다.

$$\text{재생율} = \frac{B-C}{A} \times 100(\%)$$

- A: 접종한 총 원형질체 수
- B: 재생된 집락 수
- C: 삼투압 충격에 의하여 파괴 되지않은 원형질체 수

삼투압 안정제

원형질체 생성 및 재생중에 사용된 삼투압 안정제로서 KCl, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NaCl, MgSO₄, sorbitol, mannitol 등을 0.5 M citrate buffer (pH 5.6)에 농도별로 용해시키고 membrane filter(porosity: 0.45 μ m)에 여과하여 사용하였다.

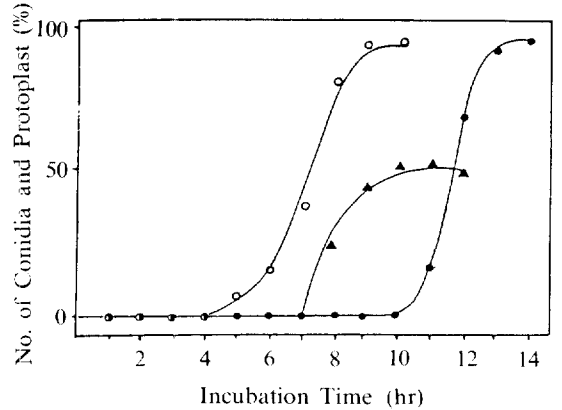


Fig. 1. Time course of swelling, germination and protoplast formation from conidiospore of *P. verruculosum* during incubation in liquid minimal medium containing 2-deoxy-D-glucose (25 μ g/ml). —○—: swelling conidia. —●—: germination conidia. —▲—: protoplast yield

결과 및 고찰

원형질체 생성

전 배양시간의 효과

최소액체배지에 *P. verruculosum*의 포자현탁액을 집중한후 시간별로 시료를 채취하여 여러 상태의 포자에 Novozyme 234(1%, w/v)를 처리하고 원형질체 생성 여부를 살펴 보았다(Fig. 1). 전 배양 4시간째부터 포자는 부풀기 시작하여 10시간 후에는 거의 부풀었으며 본격적인 발아는 11시간째 부터 시작하여 12-14시간째에 95% 이상 발아 하였다. *A. nidulans*(4), *Cunninghamella elegans*(9)와 같이 부풀지 않은 포자로부터는 원형질체 생성을 볼 수 없었으며 전배양 7시간 이후의 포자부터 원형질체 생성이 시작되어 10-12시간 전배양시킨 포자에서 가장 높은 원형질체 생성율이 관찰되었다. 따라서 포자상태를 유지하면서 발아관 형성이 시작되기 전인 전 배양후 10-12 시간 정도가 효소처리 적정시간임을 시사 하였다.

세포벽 분해효소의 선택

각종 세포벽분해효소는 작용 양식을 달리하는 여러가지 효소로 구성되어있어 균의 세포벽 구조를 이해하는데 도움이되며, 따라서 적정 효소의 선택이 원형질체 생성율을 최대화시킬 수 있다. 상기 포자현탁액을 2-DG(25 μ g/ml)가 첨가된 최소배지에서 10 시간 전배양시킨후 각종 시판 세포벽분해효소들을 1% (w/v) 농도로하여 원형질체 생성 정도를 조사하였다 (Table 1). 시험된 효소중 Novozyme 234는 50% 이상의 높은 생성율을 나타내었으며 그 다음으로 Driselase, β -glucuronidase, Zymolase 20T, Chitinase순 이었고 Chitinase와 laminarianse 그리고

Table 1. Comparison of commercial enzymes for their ability to induce protoplast formation from *P. verruculosum*.

Lytic enzyme	Protoplast formation	
	Intact conidia (%)	Swollen conidia (%)
Chitinase	—	10
Laminarinase	—	—
β -Glucuronidase	—	16.7
Chitinase + Laminarinase + β -Glucuronidase	—	21
Novozyme 234	—	51.3
Driselase	—	20.5
Zymolase 20T	—	13.7
Macerozyme R-10	—	—
Cellulase Onozuka RS	—	—
Meicelase	—	—

Conidia were preincubated in liquid minimal medium for 10 h and treated with each enzyme (1%, w/v) at 30°C for 3 h.

β -glucuronidase의 혼합 효소의 경우도 21%의 생성율을 보였으나 Novozyme 234 단독 사용시 보다는 생성율이 저조하였다. 상기 효소들의 작용정도 중 α -1,3-glucanase가 주성분이며, 소량의 laminarinase 및 chitinase 활성을 가지는 효소인 Novozyme 234에 의해서 가장 효과적인 것을 볼때 *P. verruculosum*의 세포벽 구조는 chitin과 chitin의 glucosamine에 β -1,6/ β -1,3 glucan이 연결되어 있으며 α -1,3 glucan이 다수 존재하는 것으로 추측되었다.

2-deoxy-D-glucose의 효과

포도당 이성질체로서 다당류의 세포벽저해제로 알려진 2-deoxy-D-glucose의 효과는 무처리 경우도 약 25%의 원형질체 생성율을 나타내었으나, 25 μ g/ml 처리시 2배 이상(51%)의 원형질체 생성효과를 나타내었다. 2-DG 이외에도 첨가제로서 thiol 화합물이나 Triton X-100등을 사용하여 세포벽 단백질의 disulfide 결합이나 지질이중층을 제거함으로써 원형질체 생성율을 향상시킨 예도 있다(8, 22).

효소처리의 농도, 시간, 및 온도 영향

최소액배지에 25 μ g/ml의 2-DG를 첨가하고 전배양 10시간 후 각기 다른 농도의 Novozyme 234를 처리하여 본 결과 1%(w/v) 농도로 3시간 반응시 50% 이상의 원형질체 생성율을 보였으며, 2%에서는 65% 이상의 높은 생성율을 보여 고농도에서 짧은 시간내에 보다 높은 원형질체를 생성시킴을 알 수 있었다. 또한 효소반응의 적정온도 조건을 검토한 결과 30°C에서 3시간 작용했을 경우가 최적이었으며, 25°C에서는 반응이 훨씬 느리게 이루어져 차차 증가하나 28, 30 그리고 33°C에서는 3시간 이상의 작용을 받게되면 원형질체 수가 감소하는 경향을 보였다(data not

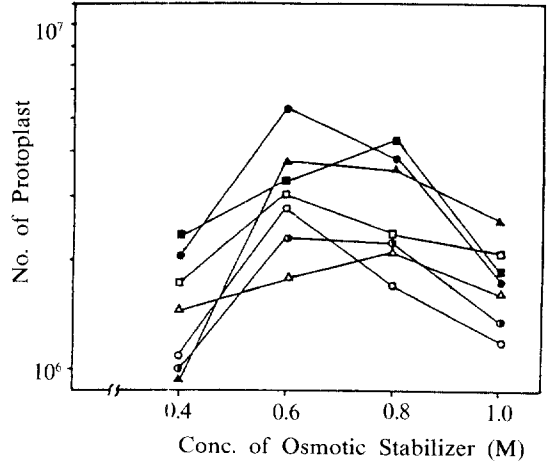


Fig. 2. Effect of osmotic stabilizer on the formation of protoplast from conidiospore of *P. verruculosum*. After conidiospores were preincubated for 10 h, reaction was performed with 1% Novozyme 234 dissolved in the 0.05 M citrate buffer containing various osmotic stabilizers at 30°C for 3 h. (NH₄)₂SO₄(●), KCl (■), NH₄Cl(▲), MgSO₄(○), NaCl(□), Sorbitol(△), Mannitol(◊).

shown). 일반적으로 원형질체로부터 정상세포로의 재생에 있어 세포벽분해효소와의 반응시간이 길수록 감소하는 것은 세포벽분해효소에 함유된 소량의 단백질분해효소가 단백질이나 당단백질에 작용하기 때문이며(21), 따라서 효소반응의 최적조건을 Novozyme 234 용액을 1%(w/v)로 첨가하고 30°C에서 1시간 반응시키는 조건으로하였다.

삼투압 안정제의 종류와 농도 및 pH의 영향

일반적으로 삼투압 안정제로는 사상균의 경우 무기염류가, 효모에 있어서는 당 및 당알코올류가 효과적인 것으로 알려져 있으나(19), *P. verruculosum*의 분생포자로부터 원형질체를 생성해 내는데는 0.6 M (NH₄)₂SO₄가 가장 효율이 좋은것으로 나타났으며, 0.7 M sorbitol이 가장 낮은 효율을 보였다(Fig. 2). 이는 동 균주의 균사체로부터 원형질체 생성을 시도하여 조사되었던 삼투압 안정제인 0.7 M sorbitol과는 다른 현상을 보여 동일 균주라 할지라도 포자나 균사체로부터 원형질체 생성시 각기 다른 삼투압 안정제가 적합할 수 있음을 나타내었다. 또한 *Trichoderma*속에 있어 *T. reesei*(23)와 *T. koningii*(17)의 포자 원형질체 형성시 0.6 M NH₄Cl와 0.6 M sucrose가 최적 삼투압 안정제임을 보고한 것을 볼때 삼투압안정제는 균주와 세포벽 분해 효소등에 따라 각기 차이가 있음을 시사 하였다. 삼투압안정제의 pH를 0.05 M citrate buffer로서 pH 5.1-6.0 까지 조정하여 원형질체생성에 대한 pH의 영향을 조사한 결과 pH 5.7이 최적이었으며 pH 5.5-5.9에서 비교적 안정된 상태를 유지

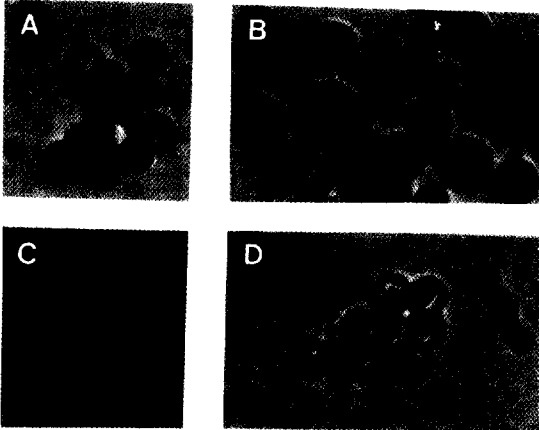


Fig. 3. Protoplasting process from conidiospore of *P. verrucosum*.

A: Dormant conidiospore, B: Swollen conidiospore, C: Release of protoplast from the conidia, D: Isolated protoplast. Bar equals 10 μ m.

Table 2. Regeneration frequency of the protoplast at different osmotic stabilizers.

Osmotic stabilizer ^{a)}	Regeneration frequency (%) _{b)}
(NH ₄) ₂ SO ₄	23.2
MgSO ₄	49.2
NH ₄ Cl	12.3
KCl	35.0
NaCl	30.4
Sorbitol	17.8
Mannitol	19.0

^{a)} Each stabilizer was added into regeneration complete media to give a final concentration of 0.6 M.

^{b)} Regeneration frequency of auxotrophic mutant, PVA 23(arg)

하였다(data not shown).

포자로부터 원형질체 생성 과정의 관찰

*P. verrucosum*의 포자로부터 원형질체가 나뉘어 나오는 과정을 관찰하기 위하여 2-DG가 포함된 최소배지에서 10시간 전배양시키고 삼투압 안정제로 2회 세척후 Novozyme 234(1%, w/v)를 30°C에서 작용시키면서 시간별로 원형질체 생성 과정을 관찰하였다. 전배양 전 휴지기 포자 장축의 길이는 약 4.0-4.5 μ m였으며, 포자상태를 유지하면서 발아직전 최대로 부풀었을때의 장축의 길이는 약 6.0 μ m였다. Fig. 3-C에 나타난 바와 같이 원형질체가 히깨비 세포(ghost)을 남기고 한쪽으로 나뉘어 나오는 과정을 볼 수 있었으며 이 원형질체 장축의 길이는 5.0-5.5

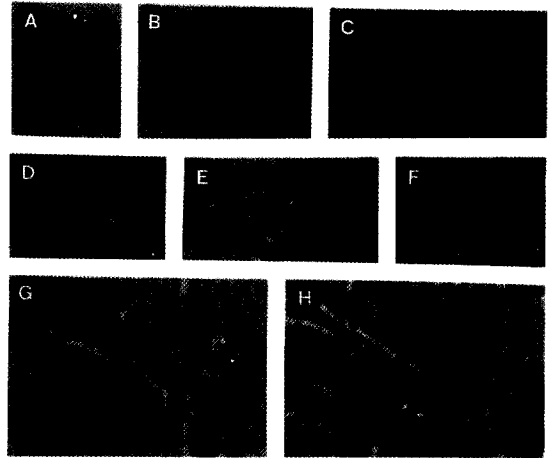


Fig. 4. Regeneration process of protoplast of *P. verrucosum* in regeneration medium(RCM).

Type I: A. Pyriformed conidial protoplast in 8 h; B. Formation of yeast-like form and aberrant tube in 14 h; C. Normal hypha development from the ontrary side of aberrant tube. Type II: D. E and F. Normal hypha are developed from regenerating protoplast in one side directly or radically. G. Lengthened and branched hypha in 20 h; H. Well-developed hypha in 24 h.

μ m 정도였다.

원형질체 재생

원형질체 재생 조건

포자원형질체를 순수분리하기 위하여 Ficoll 400(5%, w/v)을 원심분리 매체로하여 원심분리시키고 정제후, 적정 삼투압 안정제로 세척 후 재생완전평판배지에서 정상 균사로의 재생을 피하였으며, 재생양상을 살펴보기 위하여는 재생완전액체배지에서 배양하여 시간별로 관찰하였다. 원형질체 생성시에 사용하였던 무기염류 및 당알칼등을 0.6 M 농도로하여 조사한바(Table 2), 0.6 M MgSO₄에서 거의 50%의 높은 재생율을 나타내어 군사 원형질체로부터 얻은 재생율(4.6-27.8%, 0.6 M MgSO₄) 보다 훨씬 높은 것을 알 수 있었다(6). 또한 원형질체 생성시 최적 삼투압 안정제로 사용되었던 (NH₄)₂SO₄는 이에 크게 미치지 못하여 *Coprinus cinereus*(1), *T. koningii*(12), *Geotrichum candidum*(14)등 에서와 같이 원형질체 생성과 최적 삼투압 안정제가 각기 다름을 보고한 것과 유사하였다.

원형질체 재생 과정의 관찰

원형질체로부터 정상 균사체로 재생 되어지는 과정을 광학 현미경으로 관찰하였다. *P. verrucosum*의 군사 원형질체 재생 양상에서는 크게 팽창한 원형질체의 한쪽면에 돌출부(pyriform)가 형성되고 몇시간 뒤 효모 모양의 구조체가 cell chain을 형성하며 그

후 cell chain의 끝에서 불규칙한 관(aberrant tube)이 형성되었다가 20시간째에 aberrant tube가 소실되어 가면서 그 반대편에서 균사가 형성되고 24시간째에는 전형적인 균사체의 모양을 볼 수 있었다고 하였다(6). 그러나 포자 원형질체의 재생 과정에서는 현저히 다른 형태의 재생 양상을 보였는데, 상기와 같은 형태의 재생 과정(Fig. 4, A.B.C)과 Villanueva와 Garcia(25)의 보고와 같이 원형질체로 부터 직접 정상 균사체로의 발달이 이루어져 일방향, 양방향, 그리고 방사상으로 신장되어 나가는 형태(Fig. 4, D.E.F)의 두가지 양상으로 이루어짐을 알 수 있었다. 이와 비슷한 형태의 재생 양상은 *A. nidulans*(18) *P. chrysogenum*(2)등 에서도 유사 하였다. 이상의 결과를 살펴볼때 포자 원형질체는 균사체 원형질체 보다는 핵 및 세포내 소기관의 균일성으로 말미암아 보다 변체관 등 비정상적인 세포 구조체 없이도 직접 원형질체로 부터 정상적인 균사를 발달시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 추정된다(3, 6).

참 고 문 헌

- Akamatsu, K.I., T. Takamura, 1983. Release and regeneration of protoplasts from oidia of *Coprinus cinereus*. *Trans. Myco. Soc. Jap.*, **24**, 173-184.
- Anne, J.H. Eyssen and P. De Somer, 1974. Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. *Arch. Microbiol.*, **98**, 159-166.
- Benitez, T., S. Ramod and I.G. Acha, 1975. Protoplasts of *Trichoderma viride*. *Arch. Microbiol.*, **103**, 199-203.
- Bos, C.J. and S.M. Slakhorst, 1981. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 400-407.
- Chung, K.C., K. Kawai, S. Yashima and Y. Eguchi, 1982. Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verrucosum*. *Hakkokogaku*, **60**, 355-357.
- Chung, K.C. and C.R. Park, 1988. Formation and Regeneration of *Penicillium verrucosum* protoplasts. *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 156-162.
- Chung, K.C., C.R. Park, S. Bai, S.B. Chun and K.C. Kim, 1988. Intraspecific protoplast fusion of cellulolytic fungus, *Penicillium verrucosum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 163-167.
- Dowhanick, T.M., C.J. Panchal and G.G. Stewart, 1984. Effect of pretreatments with sulfhydryls and alkylating agents on spheroplast formation from *Schwanniomyces* species. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 369-374.
- Dlugonski, J., L. Sedlaczek and A. Jawarski, 1983. Protoplast release from fungi capable of steroid transformation. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 57-62.
- Ekunday, J.A. and M.J. Carlile, 1964. The germination of sporangiospore of *Rhizopus arrhizus*. *J. Gen. Microbiol.*, **35**, 261-269.
- Ferenczy, L., F. Kevei and J. Zsolt, 1974. Fusion of fungal protoplasts. *Nature* **248**, 793-794.
- Hong, S.W., Y.C. Hah and H.M. Park, 1984. The conical protoplast fusion of cellulolytic fungus, *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.*, **22**, 207-214.
- Hopwood, D.A., 1981. Genetics studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 237-272.
- Jacobson, T., B. Jensen, J. Olsen and K. Allermann, 1985. Preparation of protoplasts from mycelium and arthroconidia of *Geotrichum candidum*. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 93-96.
- Lee, K.J., 1984. Strain development of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 99-104.
- Moore, P.M. and J.F. Peberdy, 1976. Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **66**, 421-423.
- Park, H.M., S.W. Hong and Y.C. Hah, 1983. Isolation of protoplasts from conidiospore of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.*, **21**, 213-220.
- Peberdy, G.F. and R.K. Gibson, 1971. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.*, **69**, 325-330.
- Peberdy, J.F., 1979. Fungal Protoplast: Isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 21-39.
- Peberdy, J.F., 1980. Protoplast fusion: A tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 23-29.
- Picataggio, S.K., D.H. Schamhart, M.S. Montecourt and D.E. Eveleigh, 1983. Spheroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 121-128.
- Sietsma, J.H. and J.G.H. Wessels, 1981. Solubility of 1,3- β /1,6- β -glucan in fungal walls: Importance of presumed linkage between glucan and chitin. *J. Gen. Microbiol.*, **125**, 209-217.
- 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.*, **52**, 233-246.
- Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo and H. Okada, 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 363-368.
- Villanueva, J.R. and I. Garcia-Acha, 1971. Production and use of fungal protoplasts, p. 665-718. In: *Methods in microbiology*. C. Booth(ed). Vol. 12, Academic Press. New York.

(Received October 24, 1991)

(Accepted January 15, 1992)

ABSTRACT: Formation and Regeneration of Conidial Protoplast from *Penicillium verruculosum***Kim, Jeong-Ho, Jeong-Won Huh, Hee-Jong Chung, Young-Kyu Lee and Ki-Chul Chung*** (Institute of Biotechnology, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea)

Formation and regeneration of conidial protoplast of *Penicillium verruculosum*, hypercellulolytic fungus, were examined. By using Novozyme 234(1% w/v) as a cell wall lytic enzyme, the highest yield of protoplasts exceeding 50% was obtained from the swollen conidiospores preincubated in the minimal medium containing 2-deoxy-D-glucose(2-DG, 25 $\mu\text{g/ml}$) for 10-12 h. No protoplast were obtained from dormant spores. The regeneration frequency of the protoplasts was 49.2%, which was higher than that of mycelium originated protoplast (4.6-27.8%, in 0.6 M MgSO_4 , pH 5.6). The best osmotic stabilizer for the isolation and regeneration of the protoplast was 0.6 M ammonium sulfate and 0.6 M magnesium sulfate, respectively. The process of the protoplast isolation from swollen conidiospore and regeneration having two patterns from protoplast were observed through light microscope.