

느타리버섯 菌絲의 原形質體 裸出에 관한 研究

卞明玉 · 高昇柱 · 朴容煥 · 申寬澈*

農村振興廳 農業技術研究所 · 忠南大學校 農科大學 農生物學科*

Some Factors Affecting the Protoplast Release from *Pleurotus ostreatus*

Myung-Ok Byun, Seung-Joo Go, Yong-Hwan Park and Gwan-Chull Shin*

Institute of Agricultural Sciences, Office of Rural Development, Suweon 170, and

**Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Chung*

Nam National University, Daejeon 300-31, Korea*

Abstract: Some factors affecting the protoplast release from mycelia of *Pleurotus ostreatus* using commercial lytic enzymes were investigated. The highest yields of the protoplast were obtained from four days old mycelia grown in mushroom complete medium. The solution of 0.8M MgSO₄ or KCl showed good results as the osmotic stabilizer for releasing the protoplast. Novozym 234 was the most effective among commercials tested. The concentration of the enzyme and pH of the enzyme solution were optimal at 15mg/ml and 5.5~6.0 for the protoplast release, respectively. Mycelial digestion was optimal at about 28°C and was better in the reciprocal shaking bath (75 oscillations/min) than the stationary culture.

Keywords: Basidionycete, *Pleurotus ostreatus*, Protoplast.

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 맛과 香氣가 좋아 옛부터 食用으로 널리 利用되어 왔으며 各種 아미노산이 豊富(Karberer 1974)하고 抗癌 및 抗菌力 效果가 있는 糖類를 含有하고 있어(Kim 1979) 保健食品으로 차츰 認識이 높아지고 있다.

느타리 버섯의 遺傳的 特性에 대하여 Vandendries (1933), Terakawa(1960), 및 Raper(1966)는 4極性的 交配 形態임을 報告하였고 Eugengo(1968)와 Anderson (1973)은 이 버섯이 多數의 因子를 가진 4極性임을 밝히고 菌株間 交配로 子實體 生産力이 높은 菌株를 얻을수 있다고 報告하였다. 따라서 지금까지 느타리 버섯의 育種은 菌株間交配에 除限되어 왔으며(Go 1981) 優秀한 特性을 가진 種間 혹은 屬間 交配는 不可能하였다.(Eger 1976) 이와같은 問題點을 解決하고자 最近에 原形質體 融合(Ferenczy 1974)과 遺傳子 再組合(Jackson 1972)이 試圖되고 있으며 이를 爲해서 우선적으로 原形質體裸出이 이루어져야 한다, 原形質體 裸出은 Bachmann(1959)이 달팽이(*Helix pomatia*)의 胃

消化 酵素液을 利用하여 *Neurospora crassa*에서 成功한 以後 Laborda(1974)는 *Streptomyces*가 分泌하는 酵素를 利用하여 *Fusarium culmorum*의 分生孢子에서 原形質體를 얻었고, Santiago(1983)는 *Trichoderma*의 酵素로 풀버섯(*Volvariella*)의 原形質體를 裸出시켰다. 以上과 같이 菌類의 原形質體 裸出은 菌體에 細胞壁分解酵素를 處理하므로써 얻을수 있으며 最近에는 이들 酵素가 精製되어 市販되고 있다.(Hamlyn 1981)

本 研究은 市販用 酵素를 利用하여 느타리 버섯의 菌絲로부터 原形質體를 裸出시키는데 必要한 몇가지 要因을 究明하여 多量의 原形質體를 生産하고자 修行하였으며 그 結果를 報告하고자 한다.

材 料 및 方 法

느타리 버섯의 原形質體 裸出에 關한 研究을 爲하여 農業技術研究所 保存菌인 ASI 2018을 液體 培養한 後 菌絲體를 Waring Blender를 利用하여 7,500 rpm으

로 1분 30초간 磨碎한 것을 1ml씩 試驗培類基(50ml/250ml 후라스크)에 接種하여 25°C에서 4日間 培養한 後 圓心分離(700g/10分)하여 集菌하였다. 集菌된 菌絲體를 滲透壓 調節劑로 2回 洗滌한 다음 酵素液(50mg/ml 酵素液)을 處理하여 28°C 恒溫 震盪培養機에서 75rpm 으로 震盪하며 1時間 後부터 光學顯微鏡에서 hemacytometer로 裸出된 原形質體의 數를 調査하였다.

培地

培地 조성은 버섯 完全培地(Mushroom Complete Medium: MCM)는 20g dextrose, 2g peptone, 2g yeast extract, 0.5g MgSO₄·7H₂O, 0.46g KH₂PO₄, 1.0g K₂HPO₄, 증류수 1,000ml였으며 버섯 最少培地(Mushroom Minimal Medium: MMM)는 20g dextrose, 2g DL-asparagine, 0.5g MgSO₄·7H₂O, 0.46g KH₂PO₄, 1.0g K₂HPO₄, 120μg thiamine. HCl, 증류수 1,000ml였다.

滲透壓 調節劑

磷酸 緩衝 溶液(pH5.8)에 KCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄를 各各 0.6M 濃도가 되도록 調節하여 殺菌한 後 使用하였다.

細胞壁 分解 酵素

市販用 酵素로서 cellulase RS (Onozuka), Macerzyme R10(Onozuka)은 日本 Yakurt 會社 製品을 Dri-elase, Chitinase는 Sigma製品을, Novozym 234는 Denmark의 Novo Industries의 製品을 使用하였으며 酵素液은 滲透壓 調節劑에 5~20mg/ml의 酵素를 녹여 8,000rpm으로 30分間 圓心 分離한 後 membrane filter (porosity 0.2μm)로 濾過하여 調製하였다.

結果 및 考察

菌絲體 培養 條件

느타리 버섯菌의 培地 種類에 따른 原形質體의 裸出 程度를 調査한 바 試驗된 두 培地에서 모두 原形質體를 얻을 수 있었으나(Table I) 原形質體 裸出數는 培養基의 種類에 따라 差異가 있어 버섯 最少 培地에서 培養된 菌絲보다 버섯 完全 培地에서 培養된 菌絲에서 原形質體 裸出이 많았다. 또한 Fig. 1에서 보는 바와같

Table I. Effect of culture media on the yields of protoplast in *P. ostreatus*.

Medium	No. of protoplasts/ml
Mushroom minimal medium	9.7 × 10 ⁶
Mushroom complete Medium	5.7 × 10 ⁷

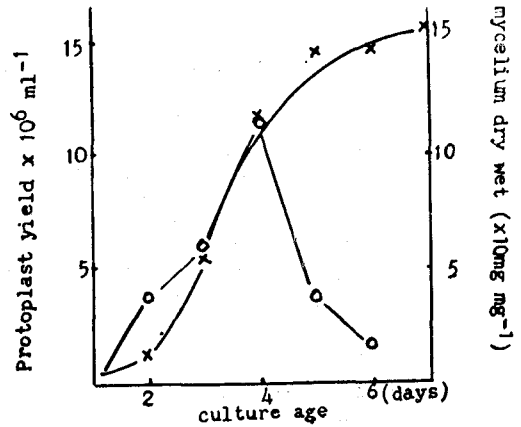


Fig. 1. Effect of growing periods on the protoplast releasing in *P. ostreatus*.

×—× : mycelium dry weight,
○—○ : protoplast yield.

이 菌의 培養期間에 따라서도 原形質體 裸出數에 差異를 보였으며 버섯 完全 培地에 4日間 培養한 菌絲體로부터 가장 많은 原形質體를 얻을 수 있었는데 이 時期는 느타리버섯菌絲의 生育 段階別로 볼때는 代數期에 該當되었다 느타리 버섯의 原形質體 裸出數가 培養基 種類 및 培養期間에 따라 差異를 보인 것은 菌絲의 生育 條件과 生育段階에 따라 菌絲 細胞壁의 成分이 變化한데 起因하는 것으로 보인다.

本 實驗에서 原形質體 裸出 最適 培養 期間이 4日인 것은 *Aspergillus*의 20時間(Peberdy 1976), *Trichoderma*의 18時間(Banites 1972, Cho 1982)과 많은 差異가 있었으나 生育 段階別로 볼때 이들 菌株의 代數期에 가장 많은 原形質體를 얻을 수 있었다는 報告와는 一致되었다.

滲透壓 調節劑

裸出된 原形質體의 安定性을 維持시켜 주기 위하여 必要한 滲透壓調節劑로는 無機鹽類, 糖, 糖알코올 등이 있으나 絲狀菌의 경우 無機鹽類가 더욱 效果의이라는 報告가 있었으므로(Peberdy 1979) 本 實驗에서는 無機

Table II. Effect of osmotic stabilizers on the protoplast release from *P. ostreatus*.

Osmotic stabilizer	Protoplasts release*
0.6M KCl	‡
0.6M MgSO ₄	‡
0.6M (NH ₄) ₂ SO ₄	+

*Protoplasts release: + a few, ‡ abundant

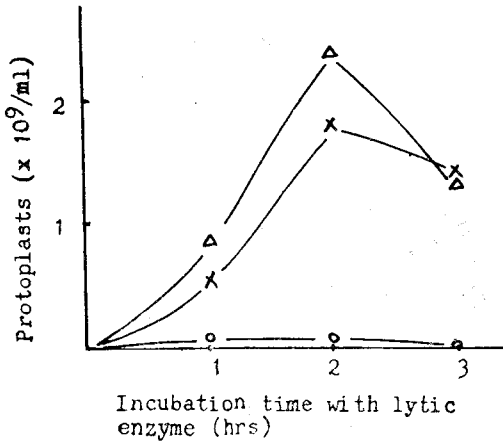


Fig. 2. Effect of osmotic stabilizer concentration on the protoplast release.

○—○: 0.4M MgSO₄, ×—×: 0.6M MgSO₄, △—△: 0.8M MgSO₄

鹽類를 供試하여 實驗한 結果 滲透庄 調節劑의 種類에 따라 裸出된 原形質體의 量에 差異가 있었다. (Table II) Table II에서 보는 바와 같이 KCl과 MgSO₄는 裸出된 原形質體 量이 많았으나 (NH₄)₂SO₄ 處理時는 매우 低調하였다.

滲透庄 調節劑중 原形質 裸出이 良好하였던 MgSO₄의 濃度를 달리하여 實驗한 結果 0.6M 및 0.8M濃度에서 原形質體 裸出量이 가장 많았고 0.4M濃度에서는 적은 傾向이었다. (Fig. 2) 酵素의 處理 時間은 2時間 程度에서 가장 많은 原形質體 裸出을 보였고 이보다 時間이 짧거나 길때는 裸出量이 減少되었다.

菌類의 原形質體 裸出에 미치는 滲透庄 調節劑의 種類와 濃度에 對한 實驗을 보면 *Trichoderma koningii*는 0.6M MgSO₄와 0.6M(NH₄)₂SO₄가 (Cho 1982), *Aspergillus nidulans*는 0.4M NH₄Cl, *Penicillium chrysogenum*은 0.6M KCl, *Fusarium culmorum*은 0.6M MgSO₄, *Neurospora crassa*는 0.6M NH₄Cl(Peberdy 1976)이 效果의이라는 結果와 같이 菌株에 따라 差異가 있었다. 擔子菌인 *Volvariella*는 0.6M KCl과 MgSO₄(Santiago 1983), *Phanerochaete chrysosporium*에서는 0.6M MgSO₄ (Gold 1983)가 良好하다는 報告와 比較해 볼때 滲透壓 調節劑 濃度는 本 實驗과 多少 差異가 있으나 그 種類는 一致하였다.

酵素 種類 및 分解條件

細胞壁 分解 酵素의 種類別로 느타리 버섯의 原形質體 裸出 程度를 比較하면 Table III과 같이 Macerozyme處理區에서는 전혀 裸出되지 않았고, cellulase,

Table III. Comparison of different commercial enzyme preparations for release of protoplasts in *Pleurotus ostreatus*.

Lytic enzyme (5mg/ml)	Released protoplasts*
Cellulase	+
Chitinase	+
Drieslase	+
Macerozyme	-
Novozym 234	≡

*released protoplasts: - none, + a few, ≡ abundant

chitinase, Drieslase에서는 原形質體가 약간 裸出되었으며 Novozym 234에서는 많은 原形質體가 裸出되었다. 各 酵素別로 裸出程度가 다른 것은 酵素의 種類에 따라 主成分이 다르기 때문이며 Novozym 234에서 原形質體가 많이 裸出되었던 것은 擔子菌의 細胞壁이 대체로 Chitin과 glucan으로 構成되어 있으며 Novozym 234의 主成分이 cellulase, chitinase 및 glucanase이기 때문으로 생각된다.

細胞壁 分解 酵素를 Novozym 234로 供試하여 濃度를 달리實驗한 結果 Fig. 3에서 보는 바와 같이 酵素 濃度가 15~20mg/ml일때 酵素 處理 2時間 後에 原形質體 裸出量이 가장 많았으며 時間이 경과함에 따라 原形質體 數는 減少하는 傾向이었다. 한편 酵素 濃度가 5~10mg/ml로 낮은 경우에는 3時間後에 裸出된 原形質體 數가 많아 處理 酵素의 量에 따라 細胞壁 分解

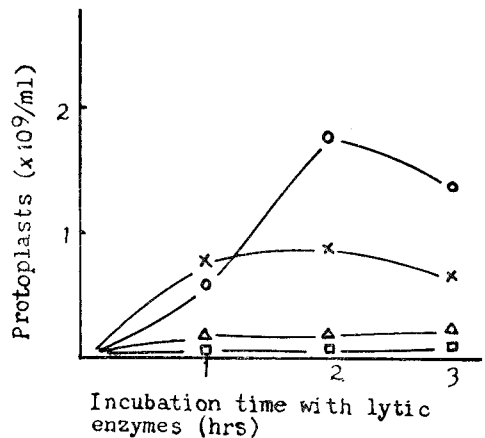


Fig. 3. Effect of enzyme concentration on the protoplast release from *P. ostreatus* mycelia using 0.6M MgSO₄ as the osmotic stabilizer. ×—×: 20mg/ml, ○—○: 15mg/ml, △—△: 10mg/ml, □—□: 5mg/ml.

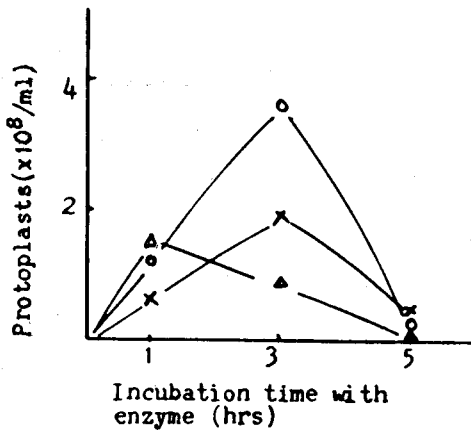


Fig. 4. Effect of digestion temperature on the formation of protoplasts of *P. ostreatus*.

x-x: 24°C, o-o: 28°C,
△-△: 32°C.

速度에 差異가 있었다. 本 實驗에서 느타리 菌絲의 原形質體는 15mg/ml까지는 酵素 濃도가 增加할수록 裸出量도 增加하나 20mg/ml에서는 오히려 減少하는 傾向을 보였으므로 分解酵素를 15mg/ml로 2時間 處理하는 것이 가장 效果의이었다.

細胞壁 分解酵素의 pH를 磷酸 緩衝 溶液을 利用하여 5에서 7까지 0.5간격으로 處理한 結果 最適 pH는 5.5~6.0이었으며 (Table IV) 原形質體의 크기도 가장 컸다. 分解 酵素의 酸도에 따라 原形質體의 크기가 다른것은 裸出된 原形質體가 初期에는 작으나 時間이 經過함에 따라 原形質體內的 液胞의 크기가 커져 原形質體크기도 增加하기 때문이었다.

細胞壁 分解 酵素의 分解 最適 溫度는 時間에 따라 差異가 있었으며 處理 1時間 經過後에는 32°C에서 裸出量이 가장 많았고 28, 24°C순이었으나 3時間後에는

Table IV. Effect of pH on the protoplast formation in *P. ostreatus*.

pH	Released protoplast*	Protoplast size(μm)
5.0	+	2.5~5.0
5.5	≡	5.5~7.5
6.0	≡≡	3.8~7.5
6.5	+	5.0
7.0	+	3.8

*Released protoplasts: + a few, ≡ medium, ≡≡ abundant

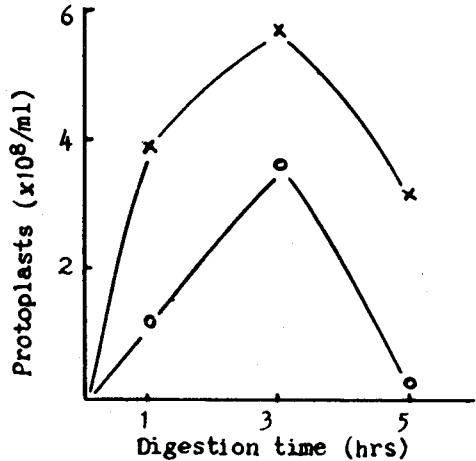


Fig. 5. Effect of shaking during the digestion on the protoplast release from *P. ostreatus*.

x-x: oscillation (75 rpm)
o-o: stationary.

28°C에서 裸出量이 가장 많고 24, 32°C 순이었다. (Fig. 4).

이와 같은 結果는 原形質體 裸出時 處理 溫度가 높을때는 酵素의 作用이 빨리 이루어지나 原形質體가 쉽게 파괴되므로 時間이 經過함에 따라 그 數가 적어졌고 低溫에서는 裸出 所要時間은 길으나 原形質體가 長期間 安定한 狀態를 維持하므로 28°C로 處理하였을때 3時間後 가장 裸出數가 많았던 것으로 보인다. 그러나 處理時間이 4時間以上일 때는 모든 處理에서 裸出數가 減少되었으므로 健全한 原形質體를 얻기 위해서는 分解溫度와 時間을 考慮하여야 할 것으로 보인다.

또한 酵素 處理 時間中 振盪(75 oscillation/min)을 한것이 定置培養한 것에 비해 原形質體의 裸出量이 많았으며 (Fig. 5) 處理 3時間만에 가장 많은 裸出을 보였다. 이러한 結果는 振盪을 하므로서 酵素의 活力이 增大되어 裸出이 容易하였기 때문인 것으로 생각된다.

以上과 같이 原形質體 裸出은 菌絲體에 알맞는 分解 酵素와 滲透壓 調節劑를 混合하여 適當한 培養 條件을 갖춰주면 可能하나 이들의 여러 條件이 裸出量과 密接한 關係에 있으므로 最大限의 原形質 裸出을 爲해서는 一次的으로 使用코자 하는 菌株別로 最適 條件을 究明하는 것이 가장 重要하다고 생각된다.

摘 要

느타리 버섯의 細胞 融合에 依한 新品種을 育成하기 爲한 첫단계로 菌絲의 原形質裸出을 爲한 일련의 實驗

을實施한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

스타리 버섯 菌絲의 原形質體는 菌絲體를 버섯 完全 培地에 4日間 培養하였을 때 裸出數가 가장 많았으며 滲透壓 調節劑는 $MgSO_4$ 와 KCl 이 效果의이었고 濃度는 $MgSO_4$ 를 使用하였을 0.8M 때에서 優秀하였다. 細胞壁 分解 酵素는 Novozym 234를 15mg/ml使用時 가장 效果의이였으며 酵素液의 最適 pH는 5.5~6.0이였다. 菌絲體의 分解適溫은 28°C였으며 75rpm으로 振盪할 때 가장 많은 原形質體를 얻을 수 있었다.

文 獻

- Anderson, N.A., Wang, S.S. and Schwandt J.W. (1973): The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycologia* 93:28-35.
- Eger, G., Eden, G. and Wissing, E. (1976): *Pleurotus ostreatus* breeding potential of the new cultivation mushroom. *Theoretical and Applied Genetics* 417:155-163.
- Eugenis, G.P. and Anderson N.A. (1968): The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60: 627-634.
- Ferenczy, L., Levei, F. and Zsolt, J. (1974): Fusion of fungal protoplasts. *Nature* 248:793-794.
- Gold M. H., Cheng, T.M. and Alic, M. (1983): Formation, fusion and regeneration of protoplasts from wild type and auxotrophic strains of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied & Environmental Microbiology* 46: 260-263.
- Hamlyn, P.F., Bradshaw, R.E., Mellon, F.M., Santiago, C.M., Wilson, J.M. and Peberdy, J.F. (1981): Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 321-325.
- Isaac, S. and Gokhale, A.V. (1982). Autolysis: a tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79: 389-394.
- Jackson, D.A., Symons, R.H., and Berg, P. (1972): *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69: 2904.
- Kalberer, R. and Künsch, U. (1974): Amino acid composition of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Lebensn U. Techol.* 7: 242-244.
- Kim B.K., Park, E.K. and Shim, M.J. (1979). Studies on the constituents of higher fungi of Korea 23. Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quél., *Pleurotus ostreatus* (F.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* 2: 145-151.
- Laborda, F., Acha, I.G. and Villanueva, J.R.(1974). Studies on a Streptozyme capable of obtaining protoplasts from *Fusarium culmorum* conidia. *Trans. Br. Myco. Soc.* 62:509-518.
- Michalenko, G.O., Hohl, H.R., and Rast, D. (1976): Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. *J. of General Microbiology* 92: 251-262.
- Moore, P.M. and Peberdy, J.F. (1976): Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 421-425.
- Peberdy, J.F. (1976): Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. In *Microbial and plant protoplasts*. Edited by J. F. Peberdy, A.H. Rose, H.J. Rogers, and E. C. Cocking. Academic Press, London, pp.39-50.
- Peberdy, J.F. (1977): Protoplasts and their development, In *the Filamentous Fungi* Vol. 3, edited by J.E. Smith and D.R. Beery, Edward Arnold, pp. 119-131.
- Peberdy, J.F. (1979): Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiobiol.* 33: 21-39.
- Peberdy, J. F., Daltery, D.C., and Moore, P.M. (1976). Factors affecting protoplast in some filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 23-26.
- Raper, J.R. (1966): *Genetics of sexuality in higher fungi*. Ronald Press N.Y.
- Santiago, C.M. (1981): Studies on the physiology and genetics of *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Singer, *Ph.D. thesis. University of Nottingham*.
- Terakawa, H. (1960): The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. *Sci. Pap. Coll Gen. Edu. Univ. Tokyo.* 10: 65-71.
- Vandendries, R. (1933): De la valeur du Darrage Sexuel comme criterium dans l'analyse spore tetrapolaire de Basidiomycete: *Pleurotus ostreatus*, *Genetica* 15: 202-212.

高昇柱, 朴容煥, 車東烈 (1981): 느타리버섯과 사철느
타리버섯의 菌株間 및 種間交配. 韓國菌學會誌 9:
13-18.

朴容煥, 高昇柱, 金東秀(1974): 벗짚을 利用한 느타리
버섯 栽培에 關한 研究(1): 培地材料에 關한 試驗,
農事試驗研究報告 第17輯(土壤肥料, 作物保護, 菌茸

編): 103-107.

조남진, 이영하, 홍순우(1981): *Trichoderma koningii*
의 protoplast 생성에 관하여. Kor. Microbiol. 93:
186-191.

<Received February 10, 1984>