

*Ganoderma lucidum*의 원형질체 형성과 재생

박영도 · 박경숙 · 이재성

영남대학교 식품가공학과
(1985년 8월 30일 수리)

Protoplast Formation and Regeneration of *Ganoderma lucidum*

Young-Do Park Gyung-Sook Park and Jae-Sung Lee

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

(Received August 30, 1985)

Ganoderma lucidum protoplasts were formed by the treatment of Novozym 234. The osmotic stabilizers such as mannitol were effective enough to produce protoplasts up to 10^6 /ml. For regeneration, however, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ was suitable. When inositol and sucrose were employed as osmotic stabilizers, the regeneration ratio reached to 0.26%. Overlay of Streptomycin sulfate added agar was required to prevent bacterial contamination.

지난 1978년 이래 원형질체 융합은 미생물의 유전물질 교환의 도구로써 크게 관심을 모아왔다^{1,2,3)}. 특수한 물질의 생산성이 높거나 기타 우량적 성질을 갖는 박테리아 균주의 개량을 위해서 뿐만 아니라^{4,5)} 곰팡이에 대한 원형질체 융합도 많이 발표되었다^{6,7)}.

*Ganoderma lucidum*은 담자균의 일종으로 근년에 한국의 버섯재배업자들에게 큰 기대를 주고 있다. 한약재의 일종으로 알려진 영지버섯은 그 항암 효과가 뛰어난 것으로 보고되었고⁸⁾, 혈압강하제로서의 효과도 알려졌다⁹⁾. 이외에 신 등¹⁰⁾은 이 균주의 미네랄 함량도 보고한 바 있으나 *G. lucidum*에 대한 다른 연구는 별로 발표된 것이 없다.

본 연구에서는 Novozym 234를 이용하여 *G. lucidum* 원형질체의 형성을 유도한 후에 재생시킨 결과를 보고한다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst로서 본 실험실에서 보관해 오고 있는

균주이다.

배지

균주배양에는 Potato Dextrose Yeastextract Medium (PDY), Mushroom Complete Medium (M-CM), Mushroom Minimal Medium (MMM), Potato Dextrose Agar (PDA)를 사용하였으며 그 조성은 Table 1과 같다.

재생용 배지는 각 배지에 삼투압 조절제를 가한 2%한천 고형배지를 사용했으며 0.75%한천 overlay용 배지에는 Bacteria의 성장을 억제하기 위하여 streptomycin sulfate (250 μ g)를 첨가하였다.

분해효소

Novozym 234 (Novo Ind. Denmark)을 0.6M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 5.8) 용액에 혼합하여 부드럽게 흔들어서 완전히 녹인 후 여과 (HA 0.45 μ m) 시켜 사용하였다.

삼투압 조절제

Protoplast 형성을 위한 효소 완충액으로는 각각 0.6M의 Sorbitol, Mannitol, Inositol, Sucrose, KCl, NaCl 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를, 재생용 배지로는 0.6M Sucrose와 0.6M Inositol (sigma) 용액을 사용했다.

Table 1. Component of Media for Mycelium Culture and Regeneration.

Medium	Ingredient	Content (g/l)
PDY	Potato	200.0
	Peptone	5.0
	Dextrose	50.0
	Yeast extract	5.0
	KH_2PO_4	1.0
	MnSO_4	0.5
	Agar	20.0
MCM (Raper et al., 1972)	Yeast extract	2.0
	Peptone	2.0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
	KH_2PO_4	0.46
	K_2HPO_4	1.0
	Glucose	20.0
	Agar (Difco)	20.0
MMM (Raper et al., 1972)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
	KH_2PO_4	0.46
	K_2HPO_4	1.0
	DL-Asparagine	2.0
	Thiamin-HCl	1.20 μg
	Glucose	20.0
	Agar (Difco)	20.0
PDA (Booth, 1971)	Potato	200.0
	Dextrose	15.0
	Agar	20.0

*Sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

원형질체 형성

균주는 25°C에서 PDY배지에서 배양하였다. 멸균된 셀로판지를 각 배지위에 고무 편 다음 3~4일 이전에 접종배양한 균주의 가장자리 부근의 균사를 둥근 모양(직경 5 mm)으로 절단했다. 이것을 1개의 페트리접시에 3개씩 접종하여 2~4일간(72~77시간) 배양하였다. 균사가 알맞게 자랐을 때 균사체와 셀로판지를 멸균된 페트리접시에 옮겨서 효소액 10ml를 첨가하여 24~26°C에서 2~4시간 동안 진탕배양하였다. 배양액을 일정 시간마다 채취하여 광학현미경하에서 혈구계산기를 사용하여 생성된 원형질체가 최대치에 도달하였을 때 배양액을 Sintered glass filter (Porosity 1)를 사용하여 여과하여 원형질체를 회수하였다. 분해효소를 씻어

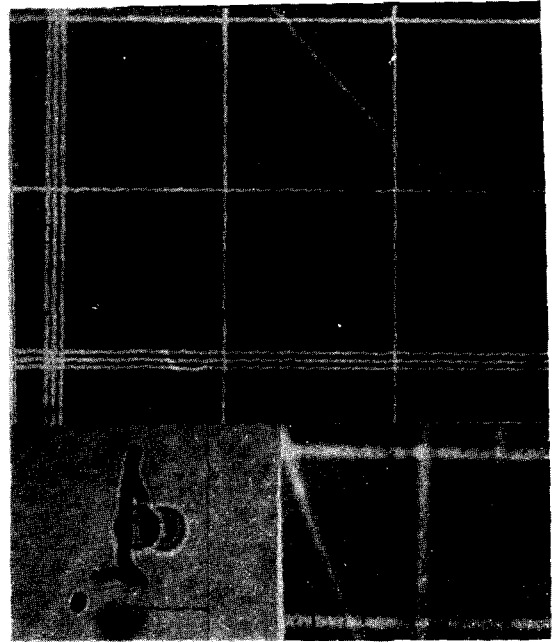


Fig. 1. Isolated protoplast of *G. lucidum* after 3 hours shaking.
(scale line = 10 μm)

내기 위하여 0.6M Sucrose를 첨가한 다음 원심분리(700g, 10분)하였다. 이와 같이 2회 세척한 다음 0.6M Sucrose에 현탁시켰다.

원형질체를 알맞는 농도로 희석하여 0.6M Inositol과 Sucrose가 각각 첨가된 배지에 0.5ml씩 분주시키고 배지표면에 고무 편지게 한 다음 0.75% 한천배지를 5ml씩 overlay 한 후 완전히 굳은 후에 25°C에서 6~10일간 배양하여 환원된 균종을 조사하였다.

결과 및 고찰

*Ganoderma lucidum*의 protoplast 형태는 Fig. 1에서 볼 수 있고, 각종 삼투압 조절제의 원형질체 형성에 대한 영향은 Table 2와 같다.

Mannitol이 삼투압 안정제로 가장 우수하였으며, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 가장 낮은 나출율을 보였다.

효소와의 반응시간별로 원형질체 나출수를 세었을 때 반응시간 2시간을 정점으로 하여 원형질체가 감소하기 시작하였다(Table 3).

이렇게 볼 때 가장 적합한 반응시간은 3시간 이하 약 2시간 정도로 하여 원형질체를 회수하는 등

Table 2. Formation and Regeneration of protoplast of *G. lucidum*

Osmotic Stabilizer	No. of Protoplasts released	Regeneration ratio (%)
Inositol	1.8×10^6	0.093-0.263
Sorbitol	4.5×10^6	
Sucrose	3.2×10^6	0.084-0.257
Mannitol	8.6×10^6	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8.5×10^5	None
KCl	4.9×10^6	
NaCl	3.3×10^6	

* Enzyme; Novozym 234 (5mg/ml)
 * Reaction Tem.; 25°C
 * Reaction Time; 2-3hr.

Table 3. Effect of incubation time on protoplast release.

Time (hr)	Released Protoplasts (ml)
1	9.0×10^5
2	3.3×10^6
3	1.7×10^6
4	1.6×10^6
5	4.3×10^5
6	3.3×10^5

안 파괴율을 최소로 줄이는 것이 대단히 중요할 것으로 본다.

각 배지별로 균사의 성장속도 및 재생율을 검토하였는 바 PDY배지에서 *G. lucidum*의 균사 생장이 가장 왕성하였으며 원형질체의 재생율도 PDY배지에서 가장 양호하였다 (Table 4).

원형질체를 재생배지에 옮긴 지 6일 후에 육안으로 균총이 관찰되었으며 10일까지 새로운 균총의 생장이 계속되었다.

원형질체 재생율은 Inositol 및 Sucrose 첨가배지에서 낮은 재생율이나마 (0.08~0.26%) 재생이 가능하였으나 MgSO₄·7H₂O는 재생용 배지의 삼투압 조절제로서는 부적합하였다.

*Pleurotus ostreatus*의 원형질체 재생에 관한 보고는 재생율 2%^(11,12)부근으로부터 0.01%⁽¹³⁾까지 그 재생조건에 따라 대단히 변이가 심한 것을 볼 수 있다. *G. lucidum*의 경우에도 배지, 삼투압 조절제 등 가장 적합한 조건을 찾음으로써 재생율을

Table 4. Growth and Protoplast Regeneration of *G. lucidum*.

Culture media	Growth degree	Regeneration frequency
PDY	****	**
PDA	**	-
MCM	***	*
MMM	*	-

-; none *; a few ****; abundant

항상시킬 수 있으리라 사료된다.

항생제를 첨가하지 않고 재생시킬 경우 배양 2~3일 후면 Bacteria가 페트리 접시의 全面에 번식하여 재생된 균총을 관찰하기가 어려웠다. Sietsma 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 overlay용 배지에 Streptomycin sulfate를 무균적으로 첨가하여 이 분체를 극복하였으며 재생된 균총을 관찰할 수 있었다. 그러나 많은 다른 보고서는 항생제 사용없이 재생시킬 수 있었던 것으로 보아 원형질체의 회수, 농축 및 배양과정을 개선하여 오염을 방지하는 방법을 확립하는 것이 필요하다고 생각된다.

적 요

Novozym 234를 사용하여 *Ganoderma lucidum*의 원형질체 형성 및 재생 실험을 실시하였다.

원형질체 형성에는 Mannitol을 위시한 여러가지 삼투압 조절제를 사용하여 10⁶/ml의 원형질체 형성이 가능하였다. 재생 실험에서는 Inositol과 Sucrose를 삼투압 조절제로 하여 0.26%까지의 재생율을 얻을 수 있었으나 MgSO₄·7H₂O는 재생용 배지의 삼투압 조절제로서는 부적합하였다. 재생 실험에서는 Bacteria등의 오염을 억제하기 위하여 Streptomycin sulfate를 첨가한 배지를 overlay하였다.

참고문헌

1. Abe, M., H. Umetsu, T. Nakai and D. Sasage: *Agr. Bio. Chem.* **46**(7), 1955.
2. Magae, Y., Y. Kakimoto, Y. Kashiwagi and T. Sasaki: *Appl. and Env. Micr.* **49**, 441 (1985)
3. 유영복, J. Peberdy, 유창현: *한국균학회지* **13** (1), 1 (1985)

4. 김종수, 이세영 : 한국미생물학회지 Vol. 1, 22, 35 (1984)
5. Nouna, Bakhiet and P. Donald, Stahly : *Appl. and Env. Micr.* 49(3), 577 (1985)
6. Ferenczy, L., F. Kevei and M. Szegedi : Attila Jozsef University (1974)
7. 유영복, 변영옥, 고승주, 유창현, 박용환, J. Feberdy : 한국균학회지 12(4), 164 (1984)
8. 강창윤, 심미자, 최응철, 이영남, 김병각 : 한국생화학학회지 14(2), 101 (1981)
9. 久保道德, 松田秀秋, 田中基晴, 木村善行, 藤忠人, 有地滋, 奥田拓道, 桐ヶ谷記昌 : 基礎と臨床 Vol. 14, 1 (1980)
10. 신혜원, 김하원, 최응철, 김병각 : 한국균학회지 13(1), 53 (1985)
11. 변영옥 : 충남대학교 대학원 석사학위논문 (1984)
12. 유영복 J., Peberdy, 차동렬 : 한국균학회지 13(2), 79 (1985)
13. 진경희 : 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문 (1984)
14. Adriana, M. P., Dooijewaard-Kloosterziel, J. H. Sietsma, J. T. M. Wouters : *J. of General. Micr.* 74, 205 (1973)