한국생물공학회지 제5권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 5. No. 3. 229-234(1990)

*Agrocybe cylindracea*의 원형질체 분리 및 환원

박 신 · *이 재 성
대구대학교 농화학과
*영남대학교 식품가공학과

Protoplast Isolation and Reversion from *Agrocybe cylindracea*

Shin Park and Jae Sung Lee*
Dept. of Agrochemistry, Taegu University
**Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University*

ABSTRACT

The isolation and regeneration of protoplasts are necessary for protoplast fusion of edible mushrooms. In this study, over 5×10^7 ml^{-1} protoplasts of *Agrocybe cylindracea* were isolated using the method described by Yanagi. Enzyme mixture of cellulase Onozuka R10(2%), chitinase (0.2%) and Novozym 234(0.1%) was most effective for the isolation of protoplasts and the yield of protoplasts was 4.85×10^7 ml^{-1}. 0.6M sucrose was the most effective osmotic stabilizer. The maximum amount of mycelia and yield of protoplasts were obtained from 5~7 days cultured mycelia. In the case of 5~7% days cultured mycelia, the digestion time with lytic enzyme was 4~6 hours. ACM and MCM medium were most effective for the regeneration and reversion of protoplasts, and reversion frequency was 6.9~7.0%. 0.6M sucrose was most stable osmotic stabilizer.

서 론

원형질체는 Weibull (1953)(1)이 lysozyme 처리에 의해 *Bacillus megaterium*으로 부터 처음으로 분리한 이래 Eddy와 Williamson(1957)(2)은 달팽이 소화관에서 추출한 소화액을 사용, 효모의 원형질을 분리하였다. Emerson등 (1958)(3)은 *Neurospora crassa*에서 사상균으로는 처음으로 원형질체 분리에 성공하였다.

고등균류인 *Basidiomycetes*에서는 Strunk(1965)(4)가 *Polystictus versicolor*에서 처음 원형질체를 분리한 이후 *Schizophyllum commune* (Devries and Wessels, 1972)(5) *Coprinus cinereus*(Moore, 1975)(6) *Lentinus edodes* (Ushiyama and Nakai, 1977)(7) *Tricholoma matsutake*(Abe 등, 1982)(8) *Phanerochaete chrysosporium* (Gold 등, 1983)(9) *Flammulina velutipes*(Yamada 등, 1983)(10) *Coprinus macrorhizus*(Yanagi and Takebe, 1985)(10, 12, 13, 14) *Pleurotus sajor-caju*(Go, 1985)(14) *Pleurotus cornucopiae*(Lee, 1986)(15)등에서 보고되었다.

원형질체를 이용한 연구에 있어서의 과제는 많은 양의 원형질체를 얻는 것으로 여기에 관계하는 요인으로써 효소의 종류와 농도, 효소액의 pH, 삼투압조절제의 종류와 농도, 균사체의 배양시간, 효소액과의 반응시간 등이 있다(Peberdy, 1976)(16).

원형질체는 포자로 부터, mycelia로 부터, 그리고 체조직으로 부터 분리될 수 있다. 분리된 원형질체는 원형질

융합(Kevei등, 1977;Peberdy, 1980; Yoo등, 1984)(17, 19) 세포내 소기관 및 DNA의 분리(Morris, 1978; Peberdy, 1979)(20, 21) 형질전환(Case 등, 1979; Tilburn 등, 1983; Ballance등, 1983)(22, 24)에 유용하게 사용되고 있고 분류학적 연구에도 이용되고 있다(Sipiczki 등, 1982)(25).

분리된 원형질체는 완전한 균사체로 재생, 환원되어야 실제 응용이 가능한데 새로운 세포벽의 합성(regeneration) 과 정상적인 균사체로의 환원(reversion)이 있다.

환원율은 환원율(%)=생존 균체수/접종한 원형질체수×100으로 나타나는데 환원율에 관계하는 요인으로는 환원용 배지의 조성, 삼투압 조절제의 종류 및 농도, overlay하는 배지에 첨가되는 top agar의 농도 등이 있다.

본 연구는 원형질융합, 핵치환 등을 이용한 버섯의 품종개량을 위한 기초 연구로서 원형질분리, 환원의 제조건을 최적화하였기에 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 일본에서 야생하는 균주 중 우수한 균주를 분리, 사용하였으며 Agrocybe complete medium(이하 ACM)을 보존용 배지로 하였다. ACM배지의 조성은 starch 2.0%, bacto-soytone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH_2PO_4 0.046%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_47H_2O$ 0.05%, agar 1.5%이다. 또한 재생용 배지로 사용한 malt yeast glucose(이하 MYG)의 조성은 malt extract 1.0%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%이며, mushroom complete medium(이하 MCM)의 조성은 glucose 2.0%, peptone 0.2%, yeast extract 0.2%, KH_2PO_4 0.046%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_47H_2O$ 0.05%, agar 1.5%이고, mushroom minimal medium(이하 MMM)의 조성은 glucose 2.0%, $KH_2PO_4$0.046%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_47H_2O$ 0.05%, agar 1.5%이다.

균사체의 배양

A. cylindracea 균사체의 배양은 사면 배양된 균사에 ACM액체배지 10ml를 무균 상태로 부어 균사를 백금이로 가볍게 긁은 다음 살균된 ACM 액체배지 100ml에 접종, 28℃에서 5~7일 정체배양하였다.

효소

Novozym 234 (Novo Ind., Denmark), Cellulase Onozuka R10(Yakult Honsha, Japan), Chitinase(Sigma Chem. Co., U.S.A), Zymolyase 60000 (Seikagaku Kogyo, Japan), β-Glucuronidase (Sigma Chem. Co., U.S.A)를 단독 혹은 혼합 사용하였으며, 삼투압조절제 0.6M이 포함된 maleate buffer 0.05M(pH 5.5) 용액에 효소를 완전히 녹인 후 membrane filter(German Sc. 0.2μm)로 제균후 냉장보관 사용하였다.

원형질체 분리

Yanagi(1984) 등(11)에 의한 방법을 사용하였는데 200~400mg의 어린 균사체와 효소액 1ml를 shaking incubator에서 30℃, 80strokes/min로 4~6시간 반응시켰다. 60μm nylon mesh로 여과 후haemacytometer로 원형질체수를 측정하였다. 효소액과 반응시 30분마다 심하게 흔들어 주었다.

원형질체 재생 및 환원

Yanagi(1984)등(11)에의한방법을사용하였는데분리된 원형질체를 0.6M sucrose가 포함된 ACM 액체배지로 단계적 희석을 하여 원형질체수가 10^2~10^3/ml가 되게 하였다. 삼투압조절제 0.6M이 포함된 재생용 배지에 원형질체를 0.2ml씩 분주한 다음, 40~45℃로 유지시켜 놓은 agar 0.6%인 동일한 배지를 5ml씩 원형질체위에 overlay 하여 고르게 분포시켜, 28℃ 항온기에서 배양하였다.

결과 및 고찰

원형질체 분리에 미치는 효소의 영향

효소의 농도에 따른 원형질체 생성량을 조사하기 위해 Novozym 234를 사용하였다. Novozym 234를 5~20mgml^{-1} 사용하여 조사한 결과, 10mgml^{-1} 사용시 원형질체 생성량이 가장 많았으며 효소의 농도가 높을수록 단기내에 원형질체를 분리하는 경향을 보였다(Fig. 1). 각종 효소를 단독 혹은 혼합 사용시 원형질체 생성량은 Table 1에 나타난 바와 같이 단독 사용시는 Novozym 234가 가장 효과적이었으며 혼합 사용시는 Cellulase Onozuka R10(2%)+Chitinase(0.2%)+Novozym 234(0.1%)가 가장 효과적이었다.

삼투압조절제의 영향

원형질체 분리시 효소 용액에 첨가되는 삼투압조절제로는 mannitol, sucrose, sorbitol, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 등이 있는데, 이들이 원형질 분리에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2에 나타난 바, sucrose 0.6M이 가장 효과적이었으며 KCl이 삼투압조절제로 가장 부적당하였다.

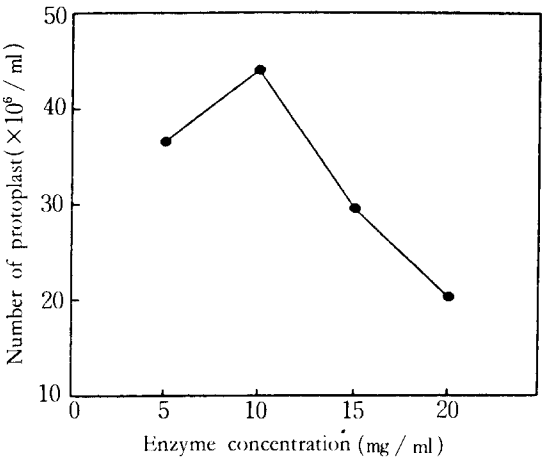

Fig. 1. Effect of enzyme concentration on the protoplast release from mycelia of *A. cylindracea*.
Novozym 234 was used as the lytic enzyme. The enzymatic treatment of *A. cylindracea* was done at 30℃ in the shaking incubator.

Table 1. Effect of various commercial enzymes on the protoplast release.

Enzyme	Number of protoplast($\times 10^6 ml^{-1}$)
Novozym 234(1%)	45.3
Cellulase Onozuka R 10(2%)	15.3
Cellulase Onozuka R 10(2%) +Chitinase (0.2%)	32.5
Cellulase Onozuka R 10(2%) +Chitinase (0.2%) +Zymolyase 60000 (0.1%)	38.0
Cellulase Onozuka R 10 (2%) + Chitinase (0.2%) + β-glucuronidase (0.2%)	25.5
Cellulase Onozuka R 10 (2%) +Chitinase (0.2%) + Novozym 234 (0.1%)	48.5
Chitinase (0.2%)	7.0

The enzymatic treatment of *A. cylindracea* was done at 30℃ in the shaking incubator.

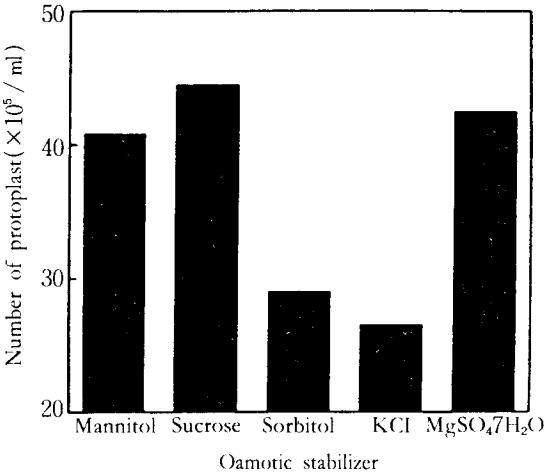

Fig. 2. Effect of osmotic stabilizer on the protoplast release.
Novozym 234 was used as the lytic enzyme. The enzymatic treatment of *A. cylindracea* was done at 30℃ in the shaking incubator.
The concentration of each osmotic stabilizer was 0.6M.

균사체의 배양일수

균사체의 배양일수에 따른 원형질체 분리 효과는 3일 정도 자란 어린 균사체는 원형질체 생성이 빨랐으나 균사체의 생성량과 원형질체 생성량이 적었으며 10일 정도 오래된 균사체는 균사체 생성량은 많았으나 원형질체 분리 시간이 오래 걸리며 원형질체 생성량도 적었다. 원형질체 분리에 가장 적합한 균사체의 배양일수는 5~7일이었는데 배양일수 5일된 균사체는 원형질체 생성량이 가장 많았으며 배양일수 7일된 균사체는 원형질체 생성량도 많은 편이며, 특히 균사체량이 많아 원형질체 분리에 효과적이었다.

효소액과의 반응시간

균사체와 효소액과의 반응시간에 따른 원형질체 분리는 균사체의 배양일수에 따라 다른 경향을 나타내었다. 배양일수가 짧은 어린 균사체는 단시간내 원형질체가 분리되었으나 10일정도된 늙은 균사체는 원형질체를 최대로 분리하는데 8시간이 소요되었다. 배양일수가 5~7일 정도된 균사체의 경우 최대 원형질체 분리에 도달하는데 약4~6시간이 소요되었다. 어린 균사체의

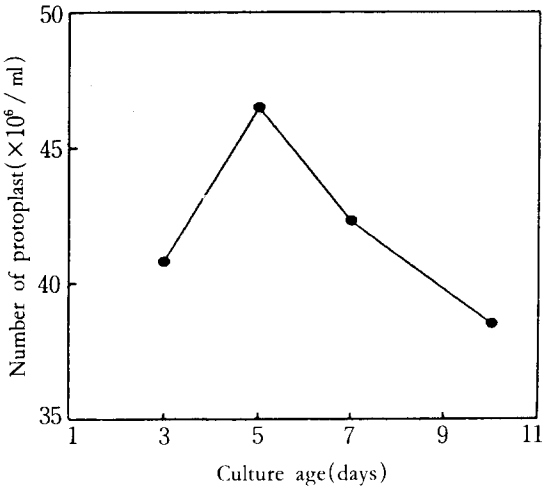

Fig. 3. Effect of culture age of mycelia on the protoplast release.
Novozym 1% was used as the lytic enzyme. The enzymatic treatment of *A. cylindracea* was done at 30℃ in the shaking incubator.

경우 효소에 의해 원형질체가 빨리 분리되는 원인은 어린 균사체는 세포벽이 얇고 세포벽의 구성성분이 완전하지 않기 때문이라고 판단된다.

Table 2. Effect of incubation time with enzyme solution on the protoplast release from *A. cylindracea*.

Incubation time (hours)	Number of protoplast($\times 10^6 ml^{-1}$)	
	Culture age(days)	
	5	7
1	12.5	10.0
2	28.5	26.3
3	35.3	30.3
4	44.3	36.5
6	43.0	42.0
8	40.5	41.5
10	35.0	38.0

Novozym 1% was used as the lytic enzyme.
The enzymatic treatment of *A. cylindracea* was done at 30℃ in the shaking incubator.

원형질체 재생에 미치는 재생 배지의 영향

재생 배지로는 ACM, MCM 배지가 환원율이 6.9~7.0%로 가장 양호 하였으며 5~6일 배양시 육안으로 관찰할 수 있었다. MMM 배지에서는 8~10일 경과시 육안으로 관찰할 수 있었으며 환원율이 2.0%로 저조했다(Fig .4)

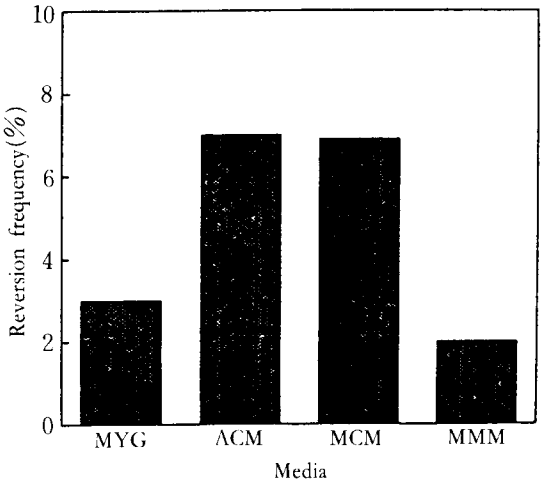

Fig. 4. Effect of media on the reversion of protoplast.

Sucrose(0.6M) was used as the osmotic stabilizer.
MYG: malt extract 1.0%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%
ACM: starch 2.0%, bacto-soytone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH_2PO_4 0.046%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 7H_2O$ 0.05%, agar 1.5%
MCM: glucose 2.0%, peptone 0.2%, yeast extract 0.2%, KH_2PO_4 0.046% K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 7H_2O$ 0.05%, agar 1.5%
MMM: glucose 2.0%, KH_2PO_4 0.046%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 7H_2O$ 0.05%, agar 1.5%

원형질체 재생에 미치는 삼투압조절제의 영향

삼투압조절제로는 sucrose 0.6M을 사용했을 경우 환원율이 6.9%로 가장 좋았는데 이는 원형질체 분리를 위한 삼투압조절제로 sucrose 0.6M이 가장 좋았던 전술한 결과와 일치한다. 삼투압조절제를 첨가하지 않은 경우 환원율이 0.1%로 원형질체 분리, 재생을 위한 삼투압조

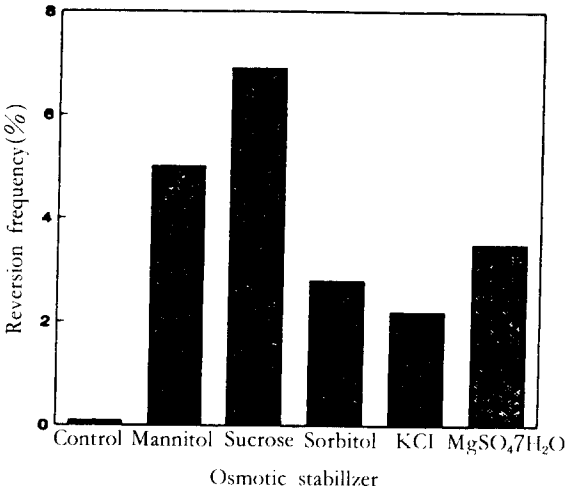

Fig. 5. Effect of osmotic stabilizer on the reversion of protoplast.

ACM medium was used for the reversion of protoplast and 0.6% agar ACM medium was overlayed on the protoplast.

The concentration of each osmotic stabilizer was 0.6 M.

절제의 기능을 잘 나타내고 있다(Fig. 5).

요 약

원형질체를 이용한 버섯의 육종 연구에 있어서 원형질체 분리, 재생은 필수적이라 할수 있다. 본 실험에서는 Yanagi 등의 방법을 이용해 *A. cylindracea*의 원형질체를 분리시킨 결과 약 $5\times10^7ml^{-1}$의 다량의 원형질체를 생성시켰다.

원형질체 분리의 최적 조건으로서 Novozym 234의 농도는 $10mgml^{-1}$이었고, 혼합 사용시는 cellulase Onozuka R10(2%)+chitinase(0.2%)+Novozym234(0.1%)의 경우, 원형질체수가 $4.9\times10^7ml^{-1}$으로 가장 양호하였다. 삼투압조절제로서는 sucrose 0.6M이 원형질체 분리에 최적이었으며 균사체의 배양시간은 5~7일간 배양시 균사체의 생성량이 많았으며 원형질체 생성량도 양호하였다. 효소액과의 반응시간은 5~7일된 균사체의 경우 최대 원형질체 분리에 약 4~6시간이 소요되었다.

원형질체 분리, 환원을 위한 최적 배지로는 ACM, MCM배지가 양호하였으며 환원율은 6.9~7.0%였다. 삼투압조절제는 0.6M sucrose가 가장 양호하였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 지원에 의하여 이루어진 것입니다. 이에 대해 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. C. Weibull(1953), *J. Bacteriol.*, **66,** 688.
2. A. A. Eddy and D. H. Willamson(1957), *Nature*, **179,** 1252–1253.
3. S. Emerson and M. R. Emerson(1958), *Proc. Natl. Sci.* U.S.A., **44,** 668–671.
4. C. Strunk(1965), *Biol. Rundsch*, **3,** 242–244.
5. O. M. H. De Vries and J. G. H. Wessel(1972), *J. Gen. Microbiol.*, **35,** 13–22.
6. D. Moore(1975), *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **65,** 134–136.
7. R. Ushiyama and Y. Nakai(1977), *Rep. Tottori. Mycol. Inst.* (Jap.), **15,** 1.
8. M. Abe, H. Umetsu, T. Nakai and D. Sasage(1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46,** 1955–1957.
9. M.H. Gold, T.M. Cheng and M. Alic(1983), *Appl. Env. Microbiol.*, **46(1), 260–263.**
10. O. Yamada, Y. Magae, Y. Kashiwagi, T. Shiratori and T. Sasaki(1983), *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **30,** 495–500.
11. S.O. Yanagi and I. Takebe(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19,** 58–60.
12. K. H. Jin(1984), *M. Sc. Thesis*, Sookmyeng Women's Univ., Seoil.
13. M. O. Byun(1984), *M. Sc. Thesis*, Chungnam National Univ., Daejon.
14. S. J. Go(1985), *M. Sc. Thesis*, Chungnam National Univ. Daejon.
15. Y. H. Lee(1986), *M. Sc. Thesis*, Sookmyeng Women's Univ. Seoul.
16. J. F. Peberdy(1976), *Microbial and plant protoplasts*, (J. F. Peberdy, A. H. Rose, H. J. Rogers and E. C. Cocking, eds), pp 39–50, *Academic Press*, London.
17. F. Kevei and J. F. Peberdy(1977), *J. Gen. Microbiol.*, **102,** 255–262.
18. J. F. Peberdy(1980), *Enzyme Microb. Technol.*, **2,** 23–29.
19. Y. B. Yoo, M. O. Byun, Y. H. Park and J. F. Peberdy (1984), *Kor. J. Mycol.*, **12,** 164–169.

20. N. R. Morris(1979), *J. Gen. Microbiol.*, **106,** 387−389.
21. J. F. Perberdy(1979), *Ann Rev. Microbiol.*, **33,** 21−39.
22. M. E. Case, M. Schweizer, S. R. Kushner and N. H. Giles(1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.a., **76,** 5259−5263.
23. J. Tilburn, C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Z abickyzissman, R. A. Lockington and R. W. Davies (1983), *Gene*, **26,** 205−221.
24. D. J. Ballance, F. P. Boxton, G. Turner(1983), *Biochem, Biophy. Res. Comm.*, **112,** 284−289.
25. M. Sipiczki, J. Kucsera, S. Ulaszewski and J. Zsolt (1982), *J. Gen. Microbiol.*, **128.** 1989−2000.

(Received; August 20, 1990, Accepted; November 14, 1990)