

느티만가닥 버섯의 원형질체 분리와 재생에 관한 연구

최혜진¹ · 김병각¹ · 현진원^{2*}

¹서울대학교 약학대학

²제주대학교 의과대학

Studies on Protoplast Isolation and Regeneration of *Lyophyllum ulmarium*

Hye Jin Choi¹, Byung Kak Kim¹ and Jin Won Hyun^{2*}

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Department of Biochemistry, Cheju National University College of Medicine, 1 Ara-1 dong, Jeju 690-756, Korea

Abstract

This experiment was undertaken to investigate proper conditions for protoplast isolation and regeneration from the mycelia of *Lyophyllum ulmarium*. Protoplast isolation and regeneration are influenced by a variety of factors such as enzyme, osmotic stabilizer, reaction time and age of mycelia. A combination of Novozyme 234 (10 mg/ml) and cellulase Onozuka R-10 (10 mg/ml) with 0.6 M MgSO₄ was most effective for isolation of the protoplasts. The optimum reaction time of the mycelia with the lytic enzymes was 3.5~4 hours at 28°C in shaking condition at 120 strokes per min. High yield of the protoplasts were obtained from its 4~5 days old mycelia on complete agar media. Its protoplasts were regenerated to normal hyphae. Regeneration media with 0.6 M sucrose were proper for regeneration of the protoplasts. Their regeneration frequency on complete agar media was 2.3~2.7%.

Key words – Basidiomycetes, *Lyophyllum ulmarium*, Protoplast isolation, Protoplast regeneration, Osmotic stabilizer

서 론

주름버섯목 (Agaricales), 느타리과 (Pleurotaceae), 느티만가닥버섯속 (*Lyophyllum*)에 속하는 느티만가닥 버섯 *Lyophyllum ulmarium* (Bull: Fr) Kuhn.의 균모는 지름 4.5~15 cm로 원형 또는 한쪽으로 기울어져 있고 표면은 편평하고 다갈식을 띤다. 이 버섯은 활엽수의 마른나무에서 단상 또는 균생하며 독특한 향기와 맛을 지니고 있어 오랫동안 식품으로 애용되어 왔고 최근에는 이 버섯의 균사 및

자실체의 단백다당체 성분이 항암효과 및 항산화작용을 가진 것으로 발표되었다 [1].

한편 고등 균류는 자연 상태에서 균사 접합에 의해 재배되어 왔으나 환경의 악화 및 병충해의 발생 등으로 안전 재배가 어려워 생산력이 급격히 떨어지게 되었고 이에 따라 재배기술의 개발과 함께 불량한 환경 조건에서도 안정 재배가 가능한 새로운 품종의 육종방법의 개발이 필요하게 되었다. 우수 균주의 개발을 위하여 종래에 사용한 방법들(연변이)에 의한 특정 산물의 생산능이 증대된 균주를 얻거나 교배가 가능한 균주 간에는 유성생식을 통한 우량종의 선발을 피하는 것이었다. 그러나 이러한 방법은 상대적으로 그 효율이 낮으며 특정 산물의 생산을 증대시키는 한

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 064-754-3838, Fax : 064-726-4152

E-mail : jinwonh@cheju.ac.kr

계가 있어서 어떤 균주에 대한 체계적이고 과학적인 육종을 위해서는 그 종의 전체적인 생활 환경에 걸친 유전적 기전이 충분히 밝혀져야 쉽게 응용될 수 있다. 그러나 진균류의 경우 실험실내에서 조작이 간편한 몇 종에만 연구가 국한되어 있고, 특히 담자균류의 경우, 같은 종내의 계통간에도 불화합성이 존재하여 균사의 융합이 어렵고 복잡한 유전 양식을 가지므로 분자 수준에서의 유전학적인 기초 연구가 지극히 부족한 실정이다. 담자균류의 생리활성 성분의 대부분은 세포벽을 구성하는 단백질 다당체로 돌연변이나 유전자 클로닝에 의해 그 함량 및 성분을 변화시키기는 어려우며 이를 시행하기 위한 담자균류의 유전학적인 기초 연구가 아직 미약하므로 접근하기 어렵다.

따라서 원형질체의 융합은 버섯에 있어서 훌륭한 육종 방법의 하나로 이용되고 있다. 원형질체는 세포벽이 없는 상태인데다 융합이 쉽게 이루어지게 하는 융합 보조제를 사용함으로써 원연간에도 체세포 잠종화가 이루어 질 수 있다. 원형질체 융합을 위해서는 먼저 많은 원형질체를 나출할 수 있어야 하며 나출된 원형질체는 다시 세포벽이 재생되어 원래의 균사상태로 환원될 수 있어야 한다. 버섯에서는 1965년 Stunk[2]가 처음으로 구름버섯 *Coriolus versicolor*에서 원형질체를 분리한 이후 1973년 De Vries & Wessels는 치마버섯 *Schizophyllum commune*에 대하여 원형질체를 분리하였다[3].

초기의 원형질체 융합은 Ferenczy 등 (1972)이 *Geotrichum*에서 동종간 원심력으로 융합을 하여 융합주를 획득하였으나 그 효율이 매우 낮았으며 원연간에는 이루어지지 않았다[4]. 그 후 원형질체 융합에 의한 유전적 교배의 방법으로 가능성은 polyethylene glycol (PEG)이 고등 식물의 융합 보조제로 발견되면서 (Anne, 1975) 크게 진보하게 되었다[5]. 이 PEG를 이용한 원형질체 융합기법은 세균, 곰팡이, 식물 및 동물세포에 걸쳐 광범위하게 이용되어 왔는데 (Ferenczy, 1977)[6], PEG에 의한 원형질막 융합의 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 PEG를 처리한 적혈구 세포를 이용한 실험에서 두 막이 접한 부분의 단백질 입자들은 이동하여 liquid-rich region이 만들어지며 여기에 Ca^{+2} 이 작용하므로 원형질체가 융합되는 것으로 추정하고 있다 (Knutton, 1979)[7]. 원형질체의 융합과정, 특히 세포막 융합과정은 생체 내에서 각종 물질을 흡수 또는 분비기전을

규명하는데 중요한 실험 방법으로 인식되고 있다. 또한 유전자 조작의 대상으로서 형질전환 실험이나 원형질체 융합에 의한 유전자 재조합체의 수득률이나 유전적 변환을 피하고자 하는 경우에 주로 이용된다. 실제로 유전적 배경이 잘 알려져 있지 않은 균류에 있어 새로운 재조합체와 산업적으로 유용한 우량 균주의 개발에 성공한 바 있다 [8]. 특히 담자균류에 있어 원형질체 융합 방법의 장점은 준비과정이 용이하고 일단 생성된 원형질체가 다시 정상으로 환원될 수 있고 생활사가 밝혀지지 않은 종의 유전학적인 분석이 가능할 뿐만 아니라, 교배가 불가능한 종간의 재조합체를 얻을 수 있어 산업적으로 유용한 균주들의 육종범위로 이용될 수 있다는 것이다.

원형질체의 생성에 영향을 미치는 요인들로는 세포벽을 효과적으로 분해시킬 수 있는 분해효소의 종류와 농도, 반응시간 및 온도, 원형질막을 둘러싸서 삼투압 충격에 약한 원형질체의 삼투압 안정성을 유지시키는 삼투압 안정제의 농도, 균사 배양시간 및 pH 등이 있다. 초기 실험에는 실험 균주의 세포벽을 특이적으로 분해하는 미생물로부터 세포벽 분해효소를 직접 추출하여 사용하였으므로 원형질체의 분리가 효과적으로 이루어지지 못하였으나 최근에는 대부분 시약급의 상품으로 시판되고 있다.

세포벽이 제거된 원형질체는 보호구조 없이 원형질막으로만 둘러싸여져 있기 때문에 원형질체의 유리 및 그 이후의 단계에 적절한 삼투압이 유지되지 못하면 안정성을 상실하여 수축 또는 파열된다. 따라서 원형질체에 영향을 주지 않으면서 적절한 삼투압을 유지시킬 수 있는 삼투압 안정제가 필요하다. 담자균류의 경우 $MgSO_4$, KCl , NH_4Cl , $NaCl$ 등의 무기염류와 Sucrose, Mannitol 등의 당류가 주로 쓰이고 있다[9-13]. 재생의 단계는 골격을 이루는 섬유성 세포벽이 형성됨과 동시에 다른 성분도 합성되면서 재생이 시작된다. 원형질체 재생의 빈도는 균주마다 매우 다양하며 담자균류의 경우는 재생율이 낮은 편이며 이는 균사 성장속도와 원형질체의 잠재력과 연관이 있는 것으로 본다.

본 연구에서는 원형질체의 분리와 재생에 관여하는 분해효소의 종류와 농도, 반응시간 및 온도, 삼투압 안정제의 농도, 균사 배양시간 및 pH에 대하여 실험을 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

본 실험에 사용한 느티만가닥 버섯 *Lyophyllum ulmarium* (Bull: Fr) Kuhn.의 균사체 및 원형질체를 얻기 위한 최적의 배양조건을 얻기 위해 배지의 조성을 바꾸어 실험하였다. 실험에 사용한 배지의 종류 및 각 성분은 Table 1 이 요약하였다. 또한 모든 배지는 121°C, 1 kg/cm², 15 min 동안 고압증기멸균하였다. 원형질체 재생용 배지로는 완전 배지에 각종 삼투압 안정제를 0.6 M 되게 첨가하였다. 그리고 한천은 기층의 경우 2%, 위층은 0.75% 농도로 첨가하여 사용하였다.

원형질체의 생성 방법

완전 평판배지에 셀로판을 깔고 그 위에 cork borer를 사용하여 직경이 약 0.5 cm 되게 일정 크기로 떼어낸 균사체를 접종시켜 28°C에서 4~5 일간 배양시켰다. 성장한 균사체를 따로 수득하여 삼투압 안정제가 첨가된 세포벽 분해 효소 용액 (5~15 mg/ml)을 가한 뒤 부드럽게 진탕시키면서 (120 strokes) 28°C에서 일정시간 반응시켰다. 균사 잔여물을 sintered glass filter (porosity No. 1)를 사용하여 원형질체만을 순수 분리하였다. 분리한 원형질체에 삼투압 안

정제를 가하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 효소 액을 제거한 후 한번 더 삼투압 안정제로 세척하고 삼투압 안정제로 현탁시켜 원형질체 수가 10⁶~10⁷로 되게 하였다. 그리고 생성된 원형질체를 hemacytometer를 이용하여 광학현미경으로 (400배) 확인하였다.

세포벽 분해 효소의 영향 비교

세포벽 분해 효소에 의한 원형질체 생성 농도를 조사하기 위하여 다음의 효소 Novozym 234 (Sigma Chem. Co., USA), cellulase-Onozuka R-10 (Yakurt Honsha, Japan), β-glucuronidase (Sigma Chem. Co., USA)를 0.6 M MgSO₄ 용액에 녹여 여과시킨 후 사용하였다.

삼투압 안정제의 영향 비교

삼투압 안정제에 의한 원형질체의 생성율을 조사하기 위하여 MgSO₄, KCl, NaCl, sucrose, mannitol, sorbitol을 각각 0.6 M 농도로 만든 용액에 세포벽 분해 효소를 용해시켜 균사체와 반응시킨 뒤 생성되는 원형질체 수를 비교하였다.

pH의 영향 비교

원형질체를 얻기 위한 최적의 pH 조건을 찾기 위하여

Table 1. Media Composition

Composition (g/l)	Medium								
	MMM	MCM	CCM	MCM	A	B	C	D	PDA
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Peptone	20	2.0	5.0	2.0	5.0	5.0	2.0	2.0	5
Yeast Extract	20	2.0	5.0	2.0	5.0	2.0	5.0	2.0	39
Glucose		20	20	20	50	20	20	50	
Agar		20	20	20	20	20	20	20	
PDA				10	10	10	10	10	
Mineral Soln* (ml/l)									

MMM: Mineral minimum media.

MCM: Mineral carbon media.

CCM: Complete carbon media.

MCM: Mineral carbon media.

PDA: Potato dextrose media.

*Mineral solution (mg/l) : ZnSO₄ · 7H₂O, CuSO₄ · 5H₂O, MnCl₂ · 4H₂O, FeSO₄ · 7H₂O.

pH 4, 5, 6, 7에서 형성된 원형질체의 수를 조사하였다.

균사 성장 일수에 따른 영향 비교

균사의 성장정도에 따른 원형질체의 생성율을 조사하기 위하여 3~7일간 각각 성장시킨 균사의 원형질체의 수를 비교하여 최적 성장일수를 결정하였다.

균사체 염색

Slide glass를 올려 놓은 완전 평판배지에 균사를 접종한 후 균사체가 자란 slide glass를 평판배지로 부터 옮긴 다음 DAPI (46-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride ; 50 μg/ml)로 30 분간 염색하였다. 염색한 후 fluorescence microscope로 검경하였다.

원형질체의 재생 방법

분리한 원형질체를 0.6 M 농도의 삼투압 안정제로 현탁시켜 10⁶~10⁷ protoplast/ml 되게 희석한 다음 삼투압 안정제가 첨가된 완전 평판배지에 0.5 ml씩 분주하고 45℃로 식힌 0.75% top agar 배지 5 ml를 넣고 잘 흔들어 혼합한 후 균혀서 28℃에서 배양하였다. 원형질체의 재생율은 배양하여 생성된 균사체 수를 접종한 원형질체의 수와 비교하였다.

$$\text{원형질체의 재생율 (\%)} = \frac{\text{생성된 균사의 수}}{\text{접종한 원형질체의 수}} \times 100$$

실험 결과 및 고찰

균사 성장 조건

각종 성분이 첨가된 고체배지에서 자란 *Lyophyllum ulmarium*의 성장 결과를 Table 2에 정리하였다. MCM보다 MCM의 경우 균사성장이 저지된 것으로 보아 MCM에 포함된 미량원소의 영향으로 사료 되며, C 배지에서 가장 높은 성장율을 보였으며 균사체의 모양은 Fig. 1과 같았다.

원형질체의 생성 조건

(1) 세포벽 분해 효소의 효과

시판되는 효소 제품 중 담자균류에서 효과가 인정된

Table 2. Influence of different media on the mycelial growth

Media	Colony radius (cm)				Degree of aerial mycelium growth
	2 days	4 days	6 days	8 days	
MMM	0.77	1.10	1.40	1.70**	++
MCM	0.90	1.50	2.00	2.60	+++
CCM	0.92	1.40	2.00	2.63	++
MCM	0.90	1.37	2.03	2.50	+
A	0.90	1.20	1.80	2.20	+++
B	0.85	1.37	1.90	2.50	++
C	0.90	1.53	2.05	2.60	+++
D	0.70	1.20	1.65	2.30	+
PDA	0.80	1.27	1.55	2.17	++

*Indicate degree of aerial mycelium.

**Mean values of three petri dishes.

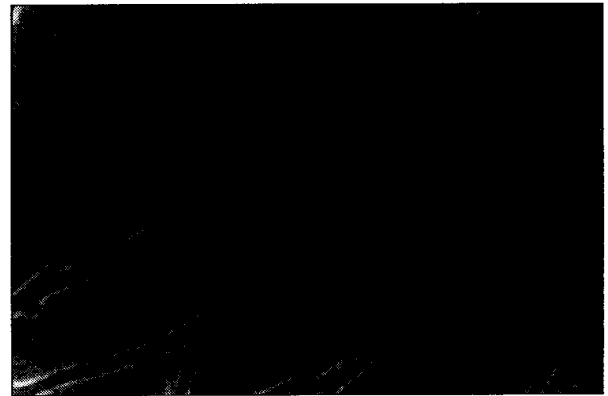
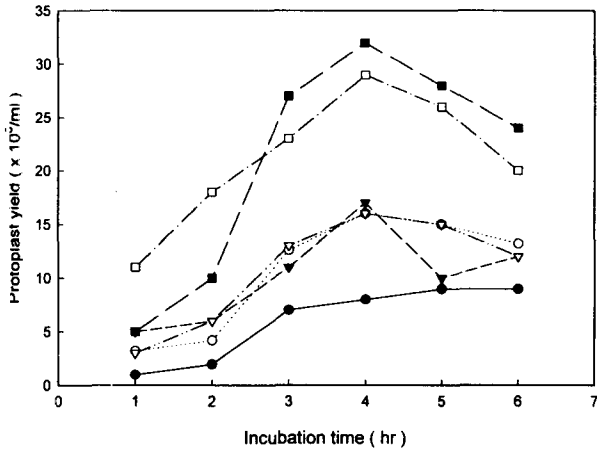


Fig. 1. The mycelia of *Lyophyllum ulmarium* (×400).

몇 가지 효소를 병용하여 최적 농도를 결정하였다 (Fig. 2, Table 3). 분리된 원형질체가 파괴되지 않도록 짧은 시간에 많이 얻는 것이 필요하기 때문에 적절한 효소의 농도와 처리시간의 선택이 매우 중요하다. *Lyophyllum ulmarium*에서는 Novozym 234 (10 mg/ml)와 cellulase Onozuka R-10 (10 mg/ml)를 혼합하여 사용하였을 때 원형질체 형성율이 가장 높았다. 또한 Novozym의 농도가 증가할수록 형성율이 증가하였으나 cellulase의 경우 10 mg/ml에서 포화상태를 보였다. 반응 시작 후 1 시간까지는 각 농도에서 유사한 원형질체의 형성율을 나타내었으나 2시간 이후부터는 농도에 따라 형성율의 차이를 보였으며 4시간에서 각각 최고



Novozym 234 (mg/ml) + cellulase Onozuka R-10 (mg/ml)

●	5	0
○	10	0
▼	15	0
▽	10	5
■	10	10
□	10	15

Fig. 2. Effect of enzyme concentrations on the protoplast release.

Table 3. Comparison of different commercial enzyme preparations for the release of protoplast

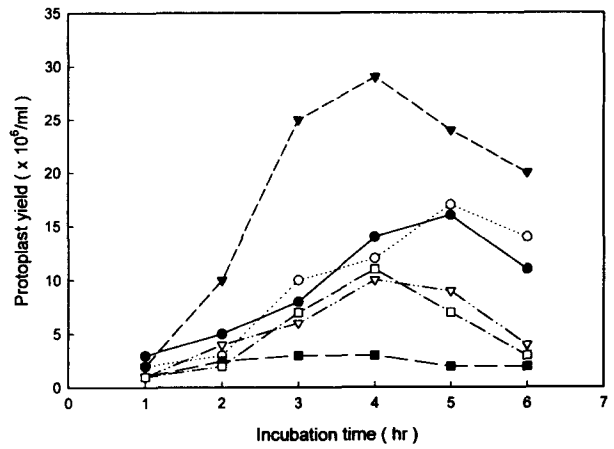
Enzyme	Protoplast yield (x 10 ⁶ /ml)
Novozyme ^a	7.0
Novozyme ^b	12.6
Cellulase ^a	0.4
Cellulase ^b	10.9
Novozyme ^b +Cellulase ^b	27.1
Novozyme ^b +β-glucuronidase ^a	8.0
Novozyme ^b +β-glucuronidase ^b	9.2

a: 5 mg/ml. b: 10 mg/ml.

치를 나타내었다. 그 후 시간이 경과되면서 원형질체의 수는 점차 감소하였다.

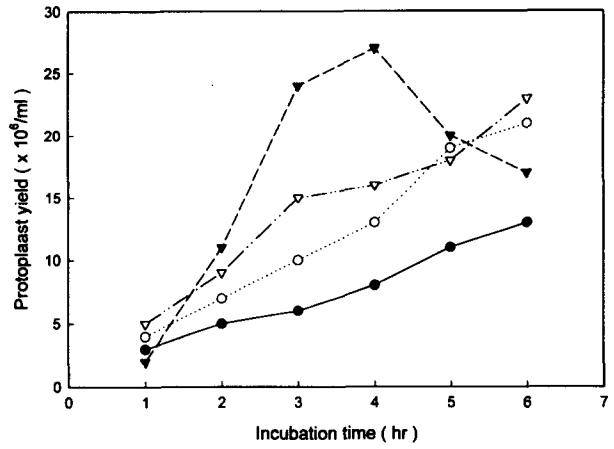
(2) 삼투압 안정제의 효과

원형질체의 안전성을 유지하기 위하여 삼투압 안정제로 sucrose, mannitol, sorbitol, MgSO₄, NaCl, KCl을 실험하였다. 0.6 M MgSO₄가 가장 효과적이었고 유기물에 비해 무기염류에서 더 높은 형성율을 나타내었다 (Fig. 3, Fig. 4).



● NaCl
○ KCl
▼ MgSO₄
▽ Sucrose
■ Mannitol
□ Sorbitol

Fig. 3. Effect of different osmotic stabilizers on the protoplast release.



● 0.2 M
○ 0.4 M
▼ 0.6 M
▽ 0.8 M

Fig. 4. Effect of different concentrations of MgSO₄ on the protoplast release.

(3) 반응시간에 따른 영향

원형질체가 형성되는 과정을 hemacytometer를 사용하여 반응시간 동안 계산하였다. 그 결과 4 시간 동안 반응시

켰을 때 가장 높은 형성율을 보였다 (Fig. 2).

(4) pH의 효과

pH 4, 5, 6, 7에서 원형질체의 안정성을 살펴보았더니 pH 7에서 최적이었고 산성이 강해질수록 형성율이 감소하였다 (Table 4).

(5) 균사성장 일수에 따른 효과

세포벽 구성성분은 배양시기에 따라 변화하기 때문에 세포벽 분해효소가 특정시기의 세포벽 구성성분에 효과적으로 작용하는 시기를 결정하기 위하여 완전 고체배지 위의 셀로판지에 접종한 지 3일부터 7일까지의 균사체에서 원형질체의 분리를 시도한 결과 5일간 배양한 균사에서 원형질체의 형성율이 가장 높았는데 이는 성장속도가 느려서 원형질체의 형성에 필요한 균사가 생성되는데 소요되는 시간이 길기 때문이었다. 6일이 지나면서 세포벽이 경화되어 효소가 작용하기 어려워져 형성율이 떨어지기 시작하였다 (Fig. 5).

Table 4. Effect of pH on protoplast release

pH	Protoplast yield ($\times 10^6/ml$)
4	7.8
5	10.0
6	12.8
7	24.0

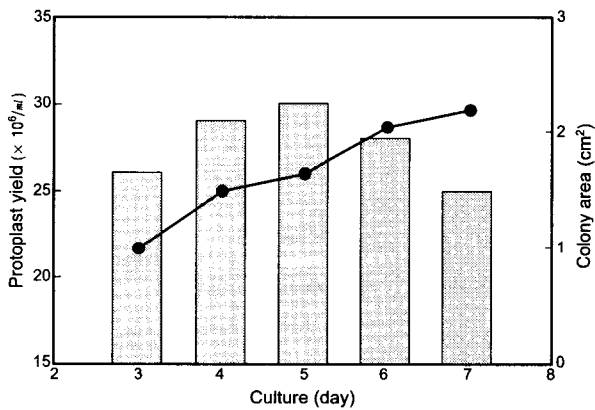


Fig. 5. The yield of protoplasts per unit area of mycelial colony.

Protoplast yield: Vertical bar.
Colony area: Line plot.



Fig. 6. Micrographs of the mycelium of *Lyophyllum ulmarium* prepared by fluorescence microscopy ($\times 400$).

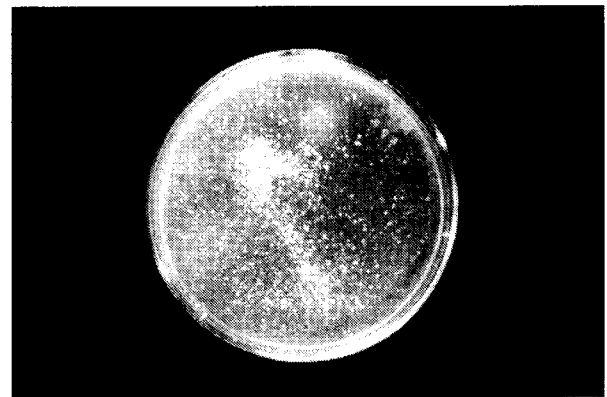


Fig. 7. The regeneration of the cell wall of the protoplast.

Table 5. Effects of osmotic stabilizers on the regeneration of the protoplasts

Osmotic stabilizer (0.6M)	Regeneration frequency (%)
Sucrose	2.70
Mannitol	2.41
MgSO ₄	2.33
NaCl	0.001
KCl	0.001

균사체 염색

균사체의 핵을 관찰하기 위해 DAPI (46-diamidine-2-phenyl indole dihydrochloride)로 염색한 후 형광현미경으

로 관찰한 결과 septum 사이에서 핵이 관찰되었다 (Fig. 6).

원형질체 재생 조건

원형질체 재생에 사용되는 삼투압 안정제는 원형질체의 생성에 사용되었던 것과 동일한 것을 사용하는 경우가 많은데 원형질체의 생성시와는 다르게 0.6 M sucrose를 함유한 배지에서 가장 높은 재생율 (2.3~2.7%)을 나타내었다. 그리고 NaCl과 KCl의 두 무기염류에서는 매우 낮은 재생율을 보였으며 원형질체는 모든 배지에서 10-15일이 지나야 재생되었다 (Fig. 7, Table 5).

결론

*Lyophyllum ulmarium*의 원형질체의 생성과 재생에는 여러 인자가 관여한다. 세포벽 분해 효소, 반응 시간, 삼투압 안정제 및 균사의 성장 일수 등이다. 원형질체의 생성과 재생에 관한 최적 조건을 찾기 위하여 실험한 결과 균사는 3 배지에서 가장 높은 성장율을 보였다. 그리고 Novozym 234 (10 mg/ml)와 cellulase Onozuka R-10 (10 mg/ml)을 혼용하였을 때 효과적이었다. 원형질체의 최적 조건은 4~5일간 배양한 균사를 Novozym 234와 cellulase Onozuka R-10로 처리한 다음 4시간 반응시켰을 때였으며 삼투압 안정제로는 0.5 M MgSO₄이 효과적이었다. 그러나 원형질체의 재생에는 0.6 M sucrose가 가장 높은 재생율을 보였으며 재생 빈도는 2.3~2.7%이었다.

참고 문헌

- Matsuzawa, T., M. Sano, I. Tomita, H. Saitoh and T. Ikekawa. 1997. Studies on antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus*. *Yakugaku zasshi* **117**, 623-628.
- Strunk, C. 1965. Uber Entstehung and reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch.* **3**, 242-245.
- De Vries, O. M. M. and J. G. H. Wassels. 1973. Release of protoplasts from *Shizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viridae*. *J. Gen. Microbiol.* **73**, 13-19.
- Ferency, I. M. M. Szegedi and F. Kevei. 1977. Interspecific protoplast fusion and complementation of *Aspergillus experientia*. *Experientia* **33**, 184-186.
- Anne, J. and J. F. Peberdy. 1975. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Arch. Microbiol.* **105**, 201-205.
- Sipiczki, M. and L. Ferency. 1977. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol. Gen. Genet.* **151**, 77-81.
- Knutton, S. 1979. Studies of membrane fusion. III. Fusion of erythrocytes with polyethylene glycol. *J. Cell Sci.* **36**, 61-72.
- Hamlyn, P. F. and C. Ball. 1979. Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In genetics of industrial microorganism, pp.185-191. eds. Sebeck, O.K., and Laskin, A. I. Am. Soc. Microbiol. Press, Washington.
- Lee, M. H., H. W. Kim, M. J. Shim, S. H. Tho, E. C. Choi and B. K. Kim. 1986. Studies on the constituents of higher fungi of Korea (LIV), general constituents and immuno-potential of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **14**, 149-153.
- Go, S. J. 1985. Studies of the mating characteristics of *Pleurotus sajorcaju* (Fr.) Sing. and its protoplast formation and fusion with *Pleurotus ostreatus*. M.S. Thesis, Chungnam Natl Univ.
- Kim, B. K., E. K. Park and M. J. Shim. 1979. Studies on constituents of higher fungi of Korea (XXIII). *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145-151.
- Yoo, Y. B., C. H. Yoo, Y. K. Park and K. W. Chang. 1987. Protoplast isolation and reversion from *Lyophyllum ulmanium*. *Kor. J. Mycol.* **15**, 14-19.
- Bok, J. W., S. H. Park, E. C. Choi, B. K. Kim and Y. B. Yoo. 1990. Studies on protoplast formation and regeneration of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **18**, 115-121.

(Received November 29, 2002; Accepted April 10, 2003)