

## 버섯류의 원형질체 나출을 위한 고효율 효소 선발

김종군<sup>1,3</sup> · 김진희<sup>1</sup> · 공원식<sup>2</sup> · 강희완<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>한경대학교 생물환경·정보통신 전문대학원, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, <sup>3</sup>한경대학교 유전공학연구소

## Selection of High Efficient Enzyme for Protoplasts Isolation from Mushrooms

Jong-Kun Kim<sup>1,3</sup>, Jin-Hee Kim<sup>1</sup>, Won-Sik Kong<sup>2</sup> and Hee-Wan Kang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Bio.&Information Technology, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

<sup>2</sup>Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>3</sup>Institute of Genetic engineering, Hankyong National University, Ansong 456-749, Republic of Korea

(Received June 22, 2010. Accepted June 23, 2010)

**ABSTRACT:** This study was carried out to select cell wall degrading enzymes for maximizing protoplast yield from Basidiomycetes. The protoplasts were released from spore suspension, mycelia cultured on cellophane membrane, and homogenized mycelia of *Flammulina velutipes* using commercial cell wall degrading enzymes. The highest yield of protoplasts was obtained from the homogenized mycelia treated with the enzyme combination of Glucanex<sup>R</sup> 200G and cellulase onozuka R-10. The protocol was also available for *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, and *Hypsizygus marmoreus*.

**KEYWORDS :** Basidiomycetes, Cell wall degradation enzymes, Protoplast

분자유전학이나 분자유종학, 기능유전체학 등의 연구에 있어서 형질전환과 유전자 tagging 기술은 필수적이다(Cho *et al.*, 2006). 자낭균류에 비하여 담자균류, 특히 버섯은 무성포자의 형성이 저조하기 때문에 원형질체를 나출시켜 형질전환을 수행하는 것이 일반적이다(Kim *et al.*, 2004). 원형질체를 이용한 연구에 있어서 가장 중요한 요인은 다량의 원형질체를 얻어내는 것이다. 원형질체의 나출 효율에 영향을 주는 주된 요인으로는 시험 균주의 생리적 조건과(고 등, 1985), 세포벽 분해 효소의 종류 및 농도, 효소액의 pH, 효소와의 반응시간, 삼투조절제의 종류와 농도, 그리고 균사체의 배양시간, 배양에 사용한 배지의 종류 등 몇 가지 환경적 요인들이 원형질체 나출에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다(Peberdy, 1976).

일반적으로 버섯류의 원형질체 나출을 위한 세포벽 분해 효소로는 Novozyme 234(Novo Industry, Denmark)와 2% lywallzyme(Guangdon Institute of microbiology, China)이 주로 사용되어 왔다(Yi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2001). 한편, *Pleurotus ostreatus*의 경우, 1.5%  $\beta$ -glucuronidase와 0.5% cellulase onozuka 혹은  $\beta$ -D-glucanase와 Novozyme 234, 그리고 snail enzyme 등을 혼합 사용하여 고효율의 원형질체를 분리하였다고 보고된 바 있다(Yoo *et al.*, 1985).

버섯의 연구에 있어서 효율적인 형질전환 시스템 개발은 유전자 조작에 있어서 궁극적으로 필요한 방법이며, 이에 앞서 형질전환 효율의 극대화에는 다량의 원형질체 확보가 필수

적이다. 그러나 원형질체 나출 효율이 우수한 세포벽 분해 효소로 사용되어 오던 Novozyme 234가 생산 중단되어 원형질체 나출 관련 연구 수행에 어려운 점이 있다.

따라서 본 연구에서는 현재 시판되고 있는 세포벽 분해 효소 중 일부를 조합하여 *Flammulina velutipes*를 대상으로 가장 효율적인 방법을 선발하고, 선발된 방법을 *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *Hypsizygus marmoreus*에 적용하여 고효율 저비용의 원형질체 분리에 성공하였으며, 분리한 원형질체의 안정한 재생을 확인하여 이에 대해 보고하고자 한다.

시험균주인 *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *H. marmoreus* 균주는 국립농업과학원 및 경기도 버섯연구소에서 분양받아 실험에 사용하였다. 원형질체 나출의 최적 조건을 확립하기 위하여 *F. velutipes*의 포자, 셀로판지에 배양한 균사체 및 homogenizer로 마쇄한 균사체를 대상으로 효소를 처리하였다. 마쇄 균사체는 MCM (mushroom complete medium) 배지와 PDA(potato dextrose agar) 배지에 시험균주를 4-5회 계대 배양하여 균사 생육을 빠르게 한 후, 200 ml의 MCM 액체배지에 접종하여 준비하였다. 균사의 오염을 방지하기 위해 streptomycin과 penicillin을 각각 100  $\mu$ g/ml씩 배지에 첨가하였다. 접종 후, 25°C에서 100 rpm으로 7-10일 동안 배양하여 균사를 충분히 생육시킨 후, homogenizer를 이용하여 10,000 rpm으로 30초 동안 마쇄하였다. 이 마쇄된 균사를 다시 회수하여 25°C에서 100 rpm으로 하루 동안 더 배양한 다음 원형질체 나출을 위하여 사용하였다. 마쇄된 균사체를 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 상층액을

\*Corresponding author <E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr>

제거한 후 40  $\mu$ l의 1M  $MgSO_4$ 를 첨가하여 다시 5,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다.

원형질체 나출을 위한 세포벽 분해 효소로 cellulase onozuka R-10(Yakult Honsha, Japan), yatalase(Takara), Glucanex<sup>R</sup> 200G(Novo Industry, Denmark)를 단독 혹은 조합하여 사용하였다(Table 1). 각각의 효소는 0.5 M  $MgSO_4$ 에 녹이고, 1 M  $MgSO_4$ 를 첨가하여 최종농도를 조절하였으며, 25°C에서 약 100 rpm으로 6시간 동안 배양하면서 1시간 단위로 원형질체 나출정도를 조사하였다. 6시간 후, 10ml의  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 를 넣고 10분간 실온에 방치한 후, sintered glass filter P-1로 여과하여 남아 있는 균사찌꺼기를 제거하였다. 여기에 1 M의 sorbitol을 첨가하고 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하고, 다시 동량의 1 M sorbitol을 넣고 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 여기에 40 ml의 1 M

sorbitol을 넣고 5,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 남아있는 세포벽 분해효소를 제거하고, 나출된 원형질체를 현미경으로 관찰하였다. 또한 나출된 원형질체의 재생률을 조사하기 위하여 Yoo 등(1985)이 보고한 바와 같이 원형질체를 0.6 M sorbitol에 2회 세척한 후 약  $2 \times 10^7$  protoplasts/ml로 조절하고, 1% agar를 사용하여 만든 MCM 배지와 혼합하여 미리 준비해 놓은 0.6 M sorbitol이 첨가된 MCM 배지 위에 5 ml씩 분주하였다. 25°C에서 7~10일간 배양한 후, 재생률을 조사하였다.

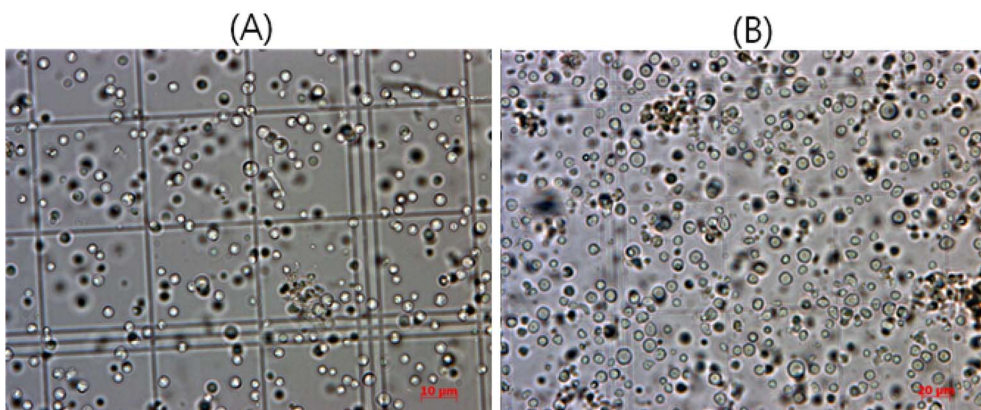
가장 효율적인 원형질체 나출 방법을 확립하기 위하여 포자, 셀로판지에 배양한 균사, homogenizer로 마쇄한 균사체를 대상으로 공시한 세포벽 분해효소를 단독 혹은 조합하여 처리하였다. 그 결과, 포자현탁액이나 셀로판지에 배양한 균사를 사용하는 것에 비해 homogenizer로 마쇄한 균사체를 사용하는 것이 높은 수율로 원형질체를 분리할 수 있었다(Table 1). 원형질체의 나출 정도에는 균주의 생리적 상태가 큰 영향을 주고, 균사체의 배양시간이나 배양 조건 등 환경조건도 그 효율에 영향을 준다고 보고된 바 있다(Peberdy, 1976). 따라서 본 연구에서 homogenizer로 마쇄한 균사체에서 높은 수율로 원형질체가 분리된 것은 균주의 생리적, 배양적 차이 때문으로 생각된다.

이전에 버섯류의 원형질체 나출에는 효율이 높은 Novozyme 234가 주로 사용되어 왔으나, 최근 Novozyme의 생산이 중단되면서 yatalase나 lywallzyme이 주로 사용되고 있다. 그러나 yatalase는 상당히 고가의 효소이고, lywallzyme은 Novozyme에 비해 효율이 떨어지는 단점이 있다. 따라서 현재 시판중인 분해효소 중 가격이 저렴하면서도 원형질체 나출 효율이 높은 효소를 선발하고자 Glucanex<sup>R</sup> 200G와 cellulase onozuka R-10을 이용하였다. 그 결과, 효소를 각각 단독으로 처리한 경우 Glucanex<sup>R</sup> 200G가 cellulase onozuka R-10이나 yatalase에 비해 높은 수율의 원형질체를 얻을 수 있었다(Table 1). 또한 cellulase onozuka R-10와 혼합 처리한 경우에도 yatalase에 비해 Glucanex<sup>R</sup> 200G가 원형질체 나출에 더 효과적인 것으로 조사되었다(Fig. 1). 선발된 Glucanex<sup>R</sup> 200G와 cellulase

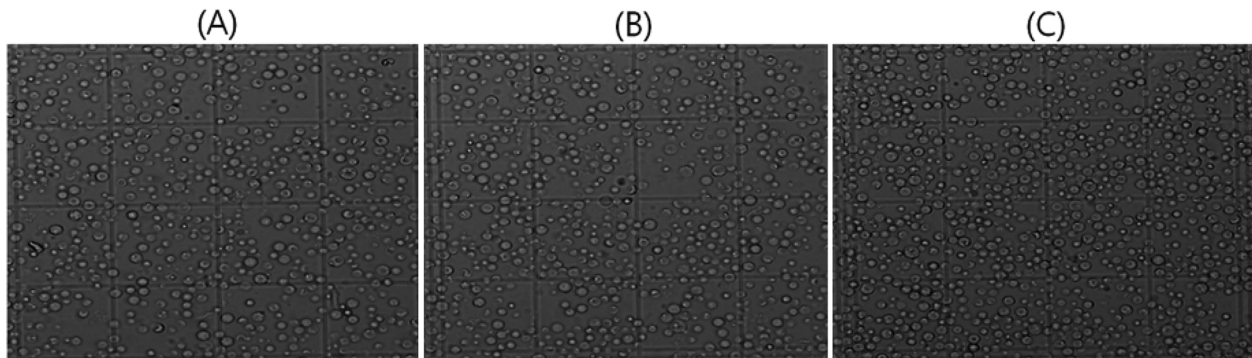
**Table 1.** Effect of commercial enzymes on the protoplast release from various methods using spore and mycelia of *Flammulina velutipes*

Enzyme preparation <sup>a</sup>	Protoplast yields( $\times 10^5$ protoplasts/ml)		
	Spore suspension	Mycelia cultured on cellophane membrane	Homogenized mycelia
Cellulase	0.003	1.2	23
Yatalase	0.005	2	60
Glucanex <sup>R</sup>	0.01	3.9	80
Cellulase + Yatalase	0.17	9	200
Cellulase + Glucanex <sup>R</sup>	0.29	21	400
Cellulase + Yatalase + Glucanex <sup>R</sup>	0.3	32	410

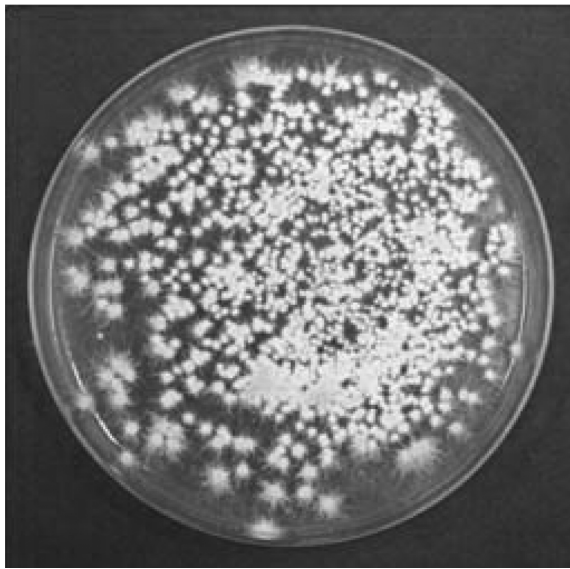
<sup>a</sup>Concentration of lytic enzyme was 10 mg/ml, and osmotic stabilizer was used 0.6 M sorbitol buffer. Cellulase, Cellulase onozuka R-10; Glucanex<sup>R</sup>, Glucanex<sup>R</sup> 200G.



**Fig. 1.** Effect of cellulase enzymes to release protoplast from *Flammulina velutipes*. (A), yatalase+cellulase onozuka R-10; (B), Glucanex<sup>R</sup> 200G + cellulase onozuka R-10. The concentration of protoplasts was calculated  $2 \times 10^7$  ml<sup>-1</sup> and  $4 \times 10^7$  ml<sup>-1</sup> using haemocytometer, respectively.



**Fig. 2.** Released protoplasts from homogenized mycelia of *Pleurotus ostreatus* (A), *P. eryngii* (B), and *Hypsizygus marmoreus* (C) using Glucanex<sup>R</sup> 200G+cellulase onozuka R-10.



**Fig. 3.** The regeneration colonies from the protoplast of *F. velutipes*. Protoplasts were incubated at 25°C for 7 days on 0.6 M sorbitol stabilized MCM.

onozuka R-10 효소의 혼합 처리를 *F. velutipes* 이외의 다른 버섯균주에 적용하여 원형질체 나출 효율을 조사한 결과, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *H. marmoreus* 등의 균에 대해서도 고효율로 원형질체가 분리되었다(Fig. 2). 또한 분리한 원형질체의 재생률을 조사한 결과, *F. velutipes*의 원형질체에서  $9.3 \times 10^4$  protoplasts/ml가 재생되어 0.47%의 재생률을 나타내었다(Fig. 3). *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *H. marmoreus*의 원형질체 재생률은 각각 0.45%, 0.39%, 0.51%로 나타났다(데이터 미제시).

이와 같이 새롭게 선발된 세포벽 분해효소인 Glucanex<sup>R</sup> 200G는 yatalase에 비해 가격이 저렴하고, 고효율의 원형질체 나출율을 보이는 것으로 조사되었다. 따라서 버섯류의 원형질 나출 연구에 이러한 방법을 이용하면 비용을 1/50 이하로 절감시킬 수 있으며, 원형질체의 나출 효율 또한 2배 이상 증가하는 것으로 확인되었다.

## 적요

현재 시판되고 있는 세포벽 분해 효소 중 cellulase onozuka R-10(Yakult Honsha, Japan), yatalase(Takara), Glucanex<sup>R</sup> 200G(Novo Industry, Denmark)를 조합하여 *Flammulina velutipes*를 대상으로 가장 효율적인 방법을 선발하고, 선발된 방법을 *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *Hypsizygus marmoreus*에 적용하였다. *F. velutipes*의 포자, 셀로판지에 배양한 균사, homogenizer로 마쇄한 균사체를 대상으로 공시한 세포벽 분해효소를 단독 혹은 조합하여 처리하였다. 그 결과, 포자현탁액이나 셀로판지에 배양한 균사를 사용하는 것에 비해 homogenizer로 마쇄한 균사체를 사용하는 것이 높은 수율로 원형질체를 분리할 수 있었다. 또한 시험에 사용한 효소 중 선발된 Glucanex<sup>R</sup> 200G와 cellulase onozuka R-10 효소의 혼합 처리에서 고효율의 원형질체가 분리되었다. 분리된 원형질체를 대상으로 재생률을 조사한 결과, 0.39-0.51% 범위의 재생률을 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 BioGreen 21 program (code# 20070401-034-021)에 의하여 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 고승주, 신관철, 유영복. 1985. 느타리버섯과 여름느타리버섯의 원형질체 나출과 재생. 한국균학회지 13: 169-177.
- Cho, Y., Davis, J. W., Kim, K. H., Wang, J., Sun, K. H., Robert, A., Cramer, J. and Christopher, B. L. 2006. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using Linear Minimal Element(LME) constructs. MPMI 19:7-15.
- Kim, S., Song, J. and Choi, H. T. 2004. Genetic transformation and mutant isolation in *Ganoderma lucidum* by restriction enzyme mediated integration. FEMS Microbiol. Lett. 233:201-204.

- Li, G., Li, R., Liu, Q., Wang, Q., Chen, M. and Li, B. 2006. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms. *FEMS Microbiol. Lett.* 256:203-208.
- Peberdy, J. F. 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67:23-26.
- Sun, L., Cai, H., Xu, W., Hu, Y., Gao, Y. and Lin, Z. 2001. Efficient transformation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:383a-383j.
- Yi, R., Tachikawa, T., Mukaiyama, H., Mochida, Y., Ishikawa, M. and Aimi, T. 2009. DNA-mediated transformation system in a bipolar basidiomycete, *Pholiota microspora*(*P. nameko*). *Mycoscience* 50:123-129.
- Yoo, Y. B., Peberdy, J. F. and You, C. H. 1985. Studies on protoplast isolation from edible fungi. *Kor. J. Mycol.* 13:1-10.