

## 食用버섯의 原形質體 分離에 관한 研究

劉英福 · 존 페버디\* · 柳昌鉉

農村振興廳 農業技術研究所 · 英國 노팅엄대학 식물학과\*

## Studies on Protoplast Isolation from Edible Fungi

Young-Bok Yoo, John F. Peberdy\* and Chang-Hyun You

Institute of Agricultural Sciences, Office of Rural Development, Suweon 170, Korea  
and Department of Botany, University of Nottingham\*, Nottingham NG7 2RD, England

**Abstract:** This experiment was undertaken to investigate proper conditions for protoplast isolation from strains of *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* and *Volvariella volvacea*. Combination of  $\beta$ -D-glucanase, novozym 234 and snail enzyme with 0.6M  $MgSO_4$  in 0.05M Na-maleate buffer, pH 5.8 was the most effective for isolation of protoplasts. High yields of protoplasts were obtained from 4~5 days old mycelia of *P. florida* and *P. ostreatus* on mushroom complete agar medium. Protoplasts were also obtained in good yield from other fungi but *A. bisporus* and *V. volvacea*. In the latter two cases protoplast release was observed; however, the yield was much lower than those of the other fungi.

**Keywords:** Protoplast isolation, *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Volvariella volvacea*, Basidiomycetes.

高等 菌類는 버섯이라 부르는 子實體를 가지며 다수의 食用버섯이 인공재배에 성공하여 최근에는 이들 食用버섯의 생산과 소비가 급속한 속도로 증가하여 1981년에는 1,357,000%을 기록하였다. 이 중에서 양송이가 70%, 표고가 14%, 풀버섯이 4% 그리고 느타리버섯류가 2.8%로서 이들 버섯 생산량이 세계 총생산의 90%를 넘어서고 있으며 그 외에 불로초, 팽이, 목이 등이 재배되고 있다(Delcaire, 1983). 버섯은 食用뿐만 아니라 藥用으로도 이용되고 있는데 특히 抗癌效果에 관한 연구가 활발히 보고 되고 있다(Lucas등, 1957; Shibata등, 1968; Vogel등, 1975; Kim등, 1984).

고등 균류는 복잡한 遺傳 樣式과 菌叢 形態로 인하여 遺傳 및 育種이 高等植物에 비하여 발전하지 못하였으며(Raper, 1966; Chang and Hayes, 1978), 이러한 연구에 있어서 가장 어려움중의 하나는 種 및 屬간은 물론이거니와 동일한 系統간에도 菌絲 融合이 이루어지지 않는 것이었다. 이와같은 문제점을 해결하기 위하여 최근에 제안된 原形質體 操作 기술이 고등균류의 유전

및 육종연구에 매우 유용한 방법이 될 것으로 본다 (Peberdy, 1980; Ferenczy, 1981).

Weibull (1953)은 처음으로 *Bacillus megaterium*에서 원형질체를 분리하였으며, Eddy와 Williamson (1957)은 달팽이(*Helix pomatia*)의 소화관에서 추출한 소화액으로 yeast에서 원형질체를 분리하였다. 絲狀菌類에 있어서는 *Neurospora crassa*에서 처음으로 원형질체를 얻었으며(Emerson and Emerson, 1958; Bechmann and Bonner, 1959) 高等 菌類에 있어서는 1965년 Strunk가 *Polystictus versicolor*에서 처음으로 원형질체를 분리한 이후 지금까지 많은 균류에서 얻어오고 있다(De Vries and Wessels, 1973; Moore, 1975; Yamada, 1983; Gold등, 1983; Byun, 1984, 秦, 1984). 원형질체는 원형질체 융합 (Kevei등 1977; Peberdy등 1977; Bradshaw, 1983; Yoo등, 1984), 細胞內의 小器管 및 核의 轉移(Ferenczy and Pesti, 1982; Becher등, 1982), DNA抽出, 遺傳子 運搬體의 形質轉換(Case등 1979; Ballance등, 1983)에 이용 되어져 매

우 홍미로와 졌다.

본 연구는 고등 균류의 원형질체 조작을 위한 기초 연구로서 주요 재배 버섯인 양송이, 표고, 풀버섯, 느타리버섯, 사철느타리버섯, 여름느타리버섯 및 팽이버섯의 원형질체 분리에 미치는 몇가지 요인을 조사하여 보고 하고자 한다.

## 材料 및 方法

### 菌 株

본 실험에서는 양송이 (*Agaricus bisporus* ASI 1056), 표고 (*Lentinus edodes* ASI 3007; dikaryon), 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus* ASI 106-6; monokaryon), 사철느타리버섯 (*Pleurotus florida* ASI 124-30; monokaryon), 풀버섯 (*Volvariella volvacea* ASI 2080) 으로서 한국 농촌진흥청 농업기술 연구소의 보존균주이고, 여름느타리버섯 (*Pleurotus sajor-caju* p1-27; dikaryon) 은 홍콩 中文大學의 S.T. Chang 교수로부터 제공받았으며, 이에 앞서 Chang 교수는 인도의 Central Food Technological Research Institute의 Dr. Zakia Bano로부터 이 균주를 제공받은 것이다.

### 培 地

버섯完全培地(Mushroom Complete Medium; MCM), 버섯最少培地(Mushroom Minimal Medium; MMM) 및 감자배지(Potato Dextrose Agar; PDA)를 121°C에 20분 멸균후 사용하였으며 그 組成은 다음과 같다 (g/l). 즉, 버섯완전배지(Raper 등, 1972)는 Bactoyeast extract(Difco) 2.0, Bacto-Peptone (Difco) 2.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, glucose 20.0, Bacto-agar (Difco) 20.0, 버섯최소배지는 (Raper 등, 1972)는 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.46, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, DL-asparagine 2.0, thiamine-HCl 120μg, glucose 20.0, Bacto-agar(Difco) 20.0, 그리고 감자배지(Booth, 1971)는 potato (without skins, diced and cooked for 10 min in 700ml distilled H<sub>2</sub>O and strained through porous cloth) 200.0, dextrose 15.0, agar 20.0이다.

### 分解 酵素

Cellulase CP(John and Sturge Ltd U.K), Cellulase onozuka R-10 (Yakult Honsha, Japan), Driselase, β-D-Glucanase (BDH Chemicals Ltd U.K), Marcerozyme, Novozym 234 (Novo Industri, Denmark), Rhozyme HP 150, snail enzyme을 5mg/ml로 삼투압 조절체에 혼합하여 1~12시간 정도 4°C의 냉장고에 보관해 두면서 부드럽게 흔들어서 완전히 녹은 후에 원심

분리(27,000g×30min)로 무균화하여 -20°C의 냉각고에 보관하면서 필요할때에 상온의 물에 녹여서 사용하였다.

### 滲透壓 調節劑

眞菌類에 많이 사용되고 있는 KCl, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, mannitol, sorbitol 및 sucrose를 0.4~1.2M 농도로 50mM Na-Maleate 또는 20mM phosphate buffer pH 5.8에 녹여 121°C에서 20분 멸균하여 사용하였다.

### 菌絲體의 前處理

5mM 및 50mM의 2-mercaptoethanol을 0.2M phosphate에 녹여 균사체에 30분 처리한 후 삼투압 조절제 또는 증류수에 5~10회 세척한 후 원형질체 분리 방법에 따라 하였다.

### 原形質體 生成

여름느타리버섯은 28°C, 풀버섯은 35°C, 그 외의 균주는 25°C에서 MCM, MMM 및 PD의 agar배지에서 배양하였다. 먼저 멸균된 cellophan을 각 배지위에 고루 편다음 5~7일 이전에 접종 배양한 균주의 가장자리 부근의 균사를 둥근모양으로 직경이 약 5mm되게 cork borer로 절단하여 1개의 Petri dish에 2군데 접종하여 2~6일간 배양하였다. 원형질체 분리를 위하여 cellophan 위에 균사가 알맞게 자랐을 때 균사체와 cellophan을 가위 또는 칼로 절단하여 직경이 약 5cm 되는 멸균된 petri dish에 옮겨서 효소액 2ml와 혼합하여 28°C에서 9시간 동안 천천히 흔들었다(120 strokes min<sup>-1</sup>).

분리된 원형질체는 광학현미경으로 관찰하면서 haemocytometer로 수를 셈하였다.

## 結 果 및 考 察

### 酵素의 影響

원형질체 생성량은 균류와 효소의 종류에 의존함은 명백하다. 몇가지의 상용화된 효소의 단용 및 혼합사용으로 느타리버섯에서 가장 좋은 효소를 선발한 것은 Table I 과 같다. 여기에서 β-D-glucanase만을 사용하였을 때는 원형질체가 분리되지 않았으며, 단용으로는 Novozym 234가 균사체 분해력이 높아 가장 많은 원형질체를 얻었지만, 일반적으로 혼합사용이 더욱 효과적이었다. Cellulase CP+Snail enzyme, Novozym 234+snail enzyme이 좋았으며, 특히 β-D-Glucanase+Novozym 234+Snail enzyme이 가장 효과적이었다. 또 풀버섯에서는 Cellulase CP+Cellulase onozuka R-

**Table I.** Comparison of commercial enzymes for their ability to induce protoplast release from *Pleurotus ostreatus*.

Enzyme	Degree of protoplast production	Protoplast yield ( $\times 10^8$ /ml)
Cellulase CP (sturge)	+	1.32
$\beta$ -D-Glucanase (BDH)	-	0
Novozym 234 (Novo)	+	3.65
Snail enzyme	+	0.57
Cellulase CP + $\beta$ -D-Glucanase	+	—
Cellulase CP + Novozym 234	+	—
Cellulase CP + Snail enzyme	++	—
$\beta$ -D-Glucanase + Novozym 234	+	—
$\beta$ -D-Glucanase + Snail enzyme	+	—
Novozym 234 + Snail enzyme	++	—
Cellulase CP + $\beta$ -D-Glucanase + Novozym 234	++	—
Cellulase CP + $\beta$ -D-Glucanase + Snail enzyme	+++	—
Cellulase CP + Novozym 234 + Snail enzyme	++	—
$\beta$ -D-Glucanase + Novozym 234 + Snail enzyme	+++	36.20

+++ : indicates best protoplast yield.

**Table II.** Comparison of commercial enzymes for their ability to induce protoplast release from *Volvariella volvacea*.

Enzyme	Degree of protoplast production
Cellulase CP + Cellulase onozuka R-10 + Driselase	++
Cellulase CP + Cellulase onozuka R-10 + Snail enzyme	+
Cellulase CP + Driselase + $\beta$ -D-Glucanase	-
Cellulase CP + Driselase + Macerozyme	+
Cellulase CP + Driselase + Rhozyme HP 150	—
Cellulase CP + $\beta$ -D-Glucanase + Rhozyme HP 150	—
Cellulase CP + $\beta$ -D-Glucanase + Novozym 234	—
Cellulase CP + $\beta$ -D-Glucanase + Snail enzyme	—
Cellulase CP + Novozym 234 + Rhozyme HP 150	—
Cellulase CP + Rhozyme HP 150 + Snail enzyme	—
Novozym 234 + Cellulase onozuka R-10 + Driselase	++
Novozym 234 + Cellulase onozuka R-10 + Rhozyme HP 150	+
Novozym 234 + Cellulase onozuka R-10 + Snail enzyme	—
Novozym 234 + Driselase + Rhozyme HP 150	+
Novozym 234 + $\beta$ -D-Glucanase + Macerozyme	—
Novozym 234 + $\beta$ -D-Glucanase + Rhozyme HP 150	—
Novozyme 234 + $\beta$ -D-Glucanase + Snail enzyme	+++
Novozyme 234 + Macerozyme + Snail enzyme	—
Novozyme 234 + Rhozyme HP 150 + Snail enzyme	—

Snail enzyme+Cellulase onozuka R-10+Driselase	-
Snail enzyme+Cellulase onozuka R-10+β-D-Glucanase	-
Snail enzyme+Cellulase onozuka R-10+Rhozyme HP 150	-
Snail enzyme+Driselase+Rhozyme HP 150	+
Snail enzyme+β-D-Glucanase+Rhozyme HP 150	-
Snail enzyme+Macerozyme+Rhozyme HP 150	+
Driselase+Cellulase onozuka R-10+β-D-Glucanase	-
Driselase+Cellulase onozuka R-10+Macerozyme	+
Driselase+Cellulase onozuka R-10+Rhozyme HP 150	++

##: indicates best protoplast yield.  
-: no protoplast

10+Driselase, Novozym 234+Cellulase onozuka R10 +Driselase, Driselase+Cellulase onozuka R10+Rhozyme HP150에서 효과가 좋았으며, 가장 효과적인 효소는 느타리버섯에서와 동일한 β-D-Glucanase+Novozym 234+Snail enzyme이었다(Table II). 대체로 단 용보다는 혼합사용이 효과적이지만 β-D-Glucanase+Novozym 234, β-D-Glucanase+Snail enzyme, Cellulase CP+Snail enzyme의 혼합은 단일 효소 사용과 비슷하였다. 여기서의 Novozym 234의 높은 효소능력과 효소의 혼합조합에 따라 그 분해능력이 크게 차이가 나타났는데 이러한 결과는 Hamlyn등(1981)의 결과와 일치하였다.

滲透壓 調節劑의 影響

삼투압 조절제는 원형질체가 나출될 때 안정성을 잃지 않고 안전하게 유지해주는 역할을 하며, 그 성분과 함량은 원형질체 생성에 크게 영향을 미친다. 농도별로 느타리버섯의 군사체에 비교한 결과는 Fig. 1과 같

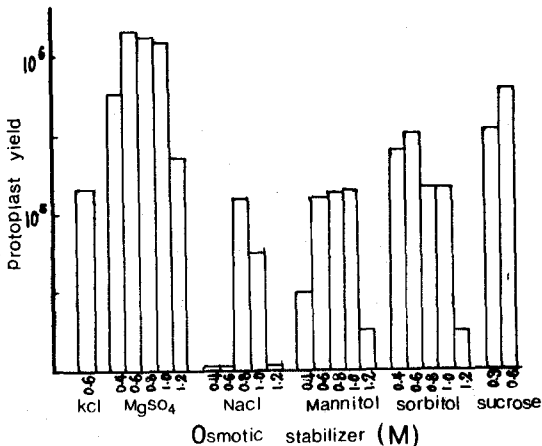


Fig. 1. Comparison of the osmotic stabilizers on the release of protoplast from *Pleurotus ostreatus*.

다. 조절제의 종류에 따라 많은 차이를 보였는데 0.6M MgSO<sub>4</sub>와 0.6M Sucrose에서 효과가 좋았으며, NaCl 및 Mannitol에서는 분리량이 극히 적었고, 원형질체의 크기도 MgSO<sub>4</sub>나 Sucrose에 비하여 작았다. 풀버섯에서의 삼투압 조절제 종류를 비교해 본 결과는 느타리버섯에서와 비슷한 경향을 나타내었는데 0.6M MgSO<sub>4</sub>에서 가장 효과가 좋았다(Fig. 2). 이러한 원형질체 분리에 있어서 삼투압 조절제의 종류와 농도에 따라 많은 차이를 나타낸 Villanueva and Garcia Acha (1971)의 결과와 동일한 경향이었으며, Flint (1982)의 *P. ostreatus*에서의 20% Sucrose와 0.6M MgSO<sub>4</sub>에서 원형질체 생성량이 높았다는 결과와도 일치하였다. 그러나 Byun(1984)은 느타리버섯에서, Santiago(1981)는 풀버섯에서 0.6M MgSO<sub>4</sub>와 0.6M KCl의 원형질체 분리에 대한 효과가 거의 동일하다고 하였으며, 秦(1984)은 MgSO<sub>4</sub>보다 오히려 1.0M Mannitol에서 가장 높은 원형질체를 생성했다고 보고한 결과와는 다른 경향을 나타내었다.

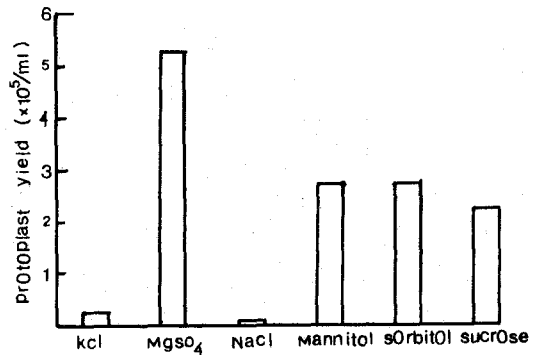


Fig. 2. Influence of the osmotic stabilizers on the release of protoplast from *Volvariella volvacea*.

**pH의 影響**

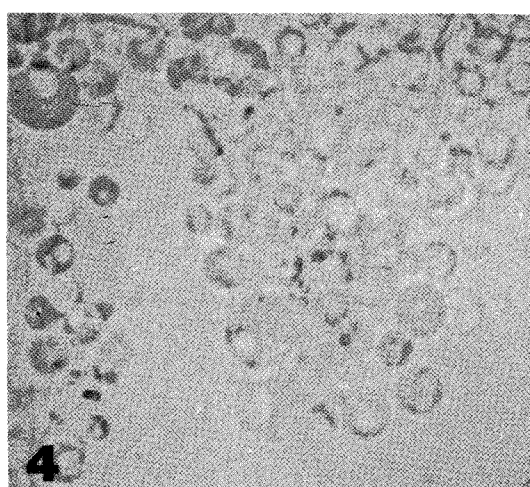
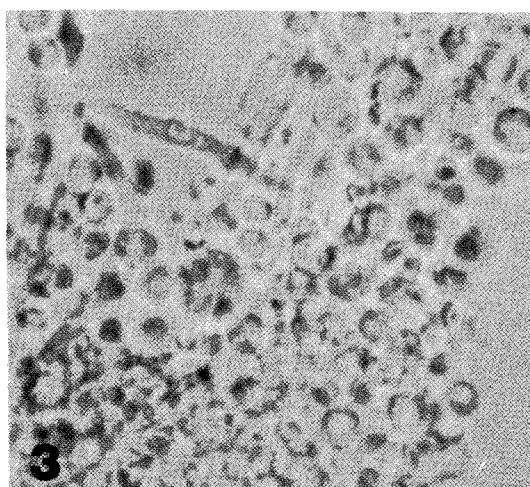
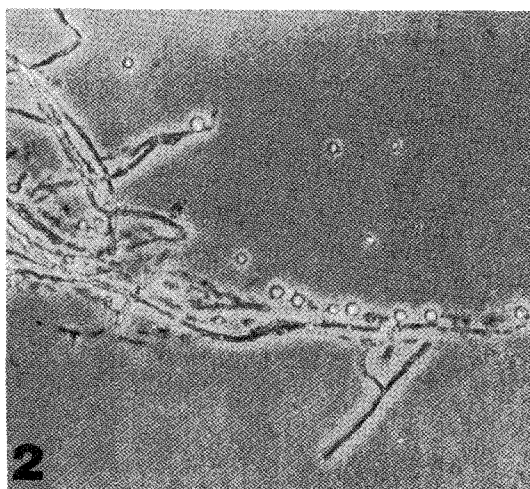
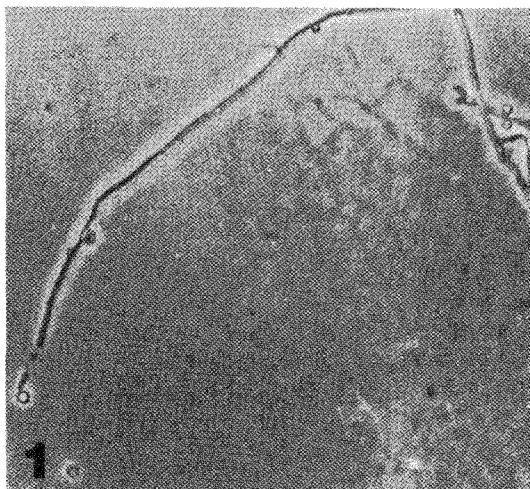
원형질체 분리에 있어서 느타리버섯에서의 pH의 영향을 보면 Table III과 같다. 많은 효소들이 pH 5.8에서 높은 분해력을 나타내었는데(Santiago, 1981, Hamlyn, 1982); Novozym 234와  $\beta$ -D-Glucanase+Novozym 234+Snail enzyme에서도 pH5.8에서 효과가 좋았다. 그러나 Cellulase CP는 오히려 pH5.8보다 pH를 조정하지 않은 상태(pH4.0)가 높은 효과를 나타내었다. 이러한 결과도 *Cephalosporium acremonium*(Hamlyn,

1982)에서의 결과와 일치하였다.

**菌絲體의 前處理 效果**

일부의 絲狀菌類에서 높은 농도의 삼투압 조절제 또는 알맞는 농도의 화학물질 처리로 원형질체 분리량을 증가했다고 보고하였는데(Dooijewaard-Kloosterziel등 1973; Russell등, 1973; Santiago, 1981), 풀버섯에 2-mercaptoethanol을 5mM과 50mM 농도로 처리한 결과 효과가 없었다(Table IV).

**酵素 處理 時間과 완충액의 影響**



**Fig. 3.** Morphology of protoplasts emerging and liberated from *Pleurotus ostreatus* mycelium during incubation in 0.6M MgSO<sub>4</sub> stabilized lytic mixtures at 28°C.

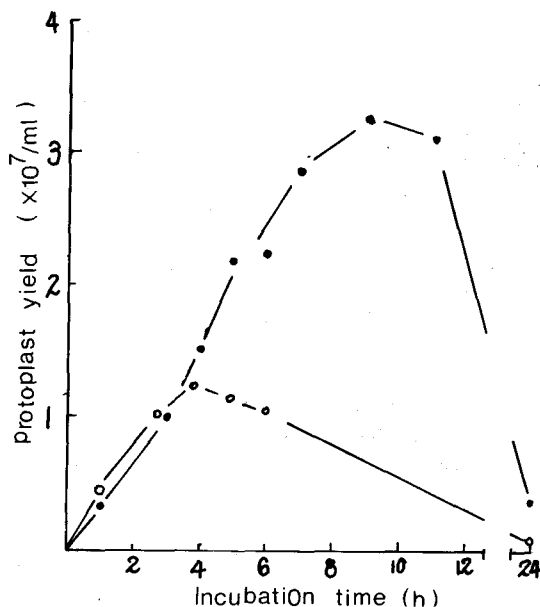
- (1) Emergence of protoplast at the hyphal tip in 0.6M MgSO<sub>4</sub> after one hour digestion.
- (2)(3) Protoplast emerging from subapical hyphae in 0.6M MgSO<sub>4</sub> after 2~3 h digestion. The protoplasts are small and non-vacuolate.
- (4) Highly vacuolate protoplasts liberated from the subapical zone in 0.6M MgSO<sub>4</sub> after 5 h digestion.

**Table III.** Effect of pH on protoplast formation from *Pleurotus ostreatus*. The digestion was carried out 4 h with 0.6M sulfate magnesium stabilizer.

Enzyme	Protoplast yield ( $\times 10^5$ )	
	Control (without buffer)	pH 5.8
Cellulase CP	17.7 (pH 4.0)	4.0
Novozym 234	33.0 (pH 4.97)	36.5
$\beta$ -D-Glucanase+Novozym 234+Snail enzyme	115.0	362.0

**Table IV.** Effect of mycelial pretreatment with 2-mercaptoethanol on protoplast formation from *Volvariella volvacea*.

Concentration	Protoplast yield ( $\times 10^6$ )
50mM	4.25
5mM	2.50
0	4.75



**Fig. 4.** Effect of incubation time on protoplast release. Enzymes were dissolved in 20mM phosphate buffer (o-) or in 50mM sodium-maleate buffer (●-).

**Table V.** Production of protoplasts from mycelia of edible fungi on different media.

Species	Growth medium	Protoplast yield ( $\times 10^6$ /ml)				
		Culture age (days)				
		2	3	4	5	6
<i>A. bisporus</i>	MCM	—	—	0.025	—	—
<i>F. velutipes</i>	MCM	1.35	1.85	4.52	2.90	2.80
	MMM	0.87	0.30	15.20	19.20	2.80
	PDA	1.75	4.40	12.70	52.70	36.80
<i>L. edodes</i>	MCM	0.10	1.12	1.27	2.22	1.60
	MMM	0.15	0.42	0.92	0.85	0.75
	PDA	1.45	4.30	8.40	10.00	8.25
<i>P. florida</i>	MCM	2.42	8.00	23.20	116.00	20.80
	MMM	0.95	2.50	15.40	7.50	7.45
	PDA	1.45	2.85	7.95	9.95	7.15
<i>P. ostreatus</i>	MCM	3.87	5.70	36.20	25.80	25.00
	MMM	3.00	13.60	21.40	18.50	16.70
	PDA	2.90	7.10	12.95	7.75	4.55
<i>P. sajor-caju</i>	MCM	5.77	18.30	11.20	22.80	9.37
	MMM	1.60	0.40	6.90	10.40	8.75
	PDA	3.00	6.25	8.40	11.80	12.00
<i>V. volvacea</i>	MCM	0.075	—	—	—	—

pH를 조절하기 위하여 사용되는 buffer의 종류는 효소의 분해력과 원형질체 생성에 크게 영향을 미칠 수 있다. 원형질체는 효소처리후 1시간부터 분리되기 시작하면서 점점 증가하여 4시간 이후부터는 원형질체의 液胞化가 되면서 크기가 커졌다(Fig. 3). 0.6M MgSO<sub>4</sub>+20mM phosphate buffer pH5.8과 0.6M MgSO<sub>4</sub>+50mM Na-maleate buffer pH5.8을 비교해보면 효소처리후 4시간까지는 비슷한 분해력을 나타내다가 Na-maleate buffer인 경우는 점점 증가하여 처리후 9시간에 가장 많은 원형질체를 분리하여 phosphate buffer에 비하여 거의 3배이상을 분리하였다(Fig. 4). 여기서 느타리버섯, 사철느타리버섯, 여름느타리버섯, 표고 및 팽이버섯 모두 Na-maleate buffer 사용이 효과적이었다. 원형질체 크기를 비교해 보면 풀버섯이 가장 크고, 사철느타리버섯, 느타리버섯 순으로 크게 나타났고, 양송이의 원형질체는 아주 작고 쉽게 파열되는 것 같았다. 이러한 Na-maleate buffer의 원형질체 생성 증가현상은 De Vries and Wessels (1972)이 0.4M, 0.6M MgSO<sub>4</sub>-50mM Na-maleate buffer pH5.8을 사용하였을 때 균사체에 효소처리후 4시간보다 8시간 이상에서 점차 원형질체의 분리가 증가했다는 보고와 동일한 경향이였다. 그리고 phosphate buffer는 0.6M MgSO<sub>4</sub>와 혼합하였을때 침전이 됨을 발견하였다.

菌絲體의 培養 日數와 培地의 影響

菌絲의 성장과 원형질체의 생성량은 깊은 관계가 있는데 균사의 성장을 빠르게하는 배지에서 원형질체의 생성량이 많게 나타났다(Table 5). 느타리버섯, 사철느타리버섯, 여름느타리버섯, 양송이, 풀버섯은 MCM에서, 표고와 팽이버섯은 PDA에서 균사의 성장이 빠르고, 원형질체 분리량이 많았다. 즉, 느타리버섯은 4일, 사철느타리버섯은 5일 그리고 여름느타리버섯은 3일간 MCM에서 배양했을때 가장 효과적이었으며, 표

Table VI. Production of protoplasts from mycelium of *Pleurotus ostreatus* in a liquid MCM.

Culture age(h)	Protoplast yield( $\times 10^6$ /ml)
24	0
30	0
36	0.72
42	1.92
48	4.12
54	0.80
72	0.10

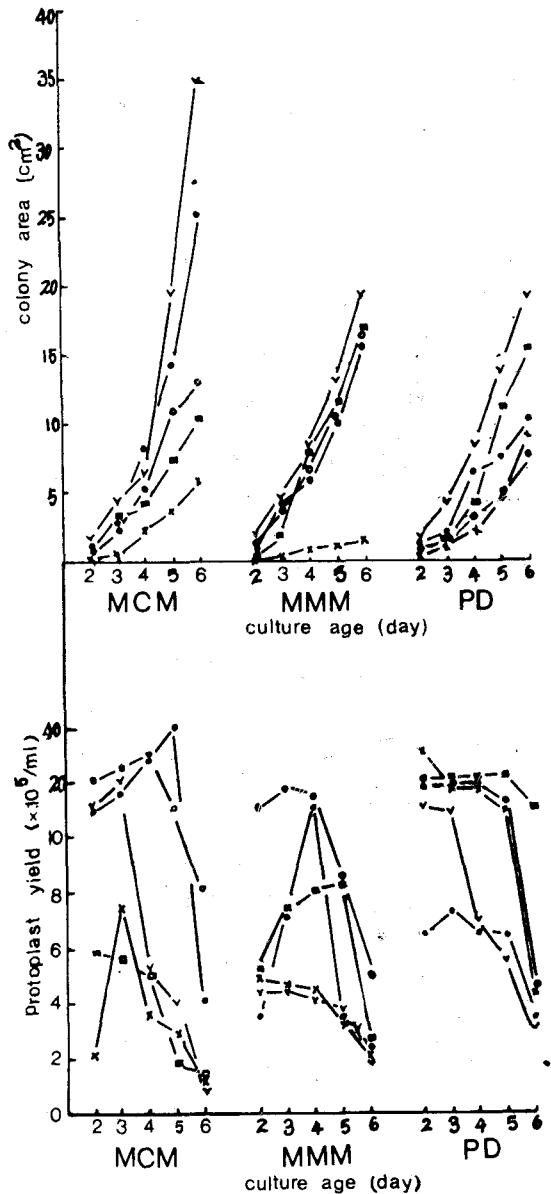


Fig. 5. The yield of protoplast per unit area of mycelial colony on different media:  $\square$ - *F. velutipes*,  $\times$ - *L. edodes*,  $\bullet$ - *P. florida*,  $\circ$ - *P. ostreatus*,  $\nabla$ - *P. sajor-caju*.

고는 2일, 팽이버섯은 5일간 PDA에서 배양했을때 가장 많은 원형질체를 분리하였다(Fig. 5). 생육한 균주의 Colony 면적당 원형질체 형성수를 보면 사철느타리버섯이 가장 많았고, 느타리버섯, 표고, 팽이, 여름느타리버섯의 순이었다. 양송이와 풀버섯은 원형질체

文 獻

분리량이 극히 적어 원형질체操作에 어려움이 크다 할 수 있었다. 원형질체 분리량이 적은 이유는 균사벽이 상당히 다른 구성물질로 이루어져 있어서 여기에 사용한 분해효소로는 완전한 균사벽 분해가 어렵거나, 균사 세포내에 원형질이 없이 비어있는 상태일 수도 있음을 나타낸다고 추정되었다. 양송이의 원형질체 분리수가 적은 결과는 De Vries and Wessels (1973)와 Flint (1982)의 결과와 일치하며, 풀버섯의 결과는 De Vries and Wessels (1973)과 Hamlyn 등 (1981)의 결과와 동일한 경향이였다. 또한 배지의 영향에 있어서 Yamada (1983)의 느타리버섯에서 OS (onion soysauce medium), PD 그리고 GYP 순으로 원형질체 생성이 높았다는 보고와 일치하는 경향이였다.

液體培地와 固體培地에서 배양한 느타리버섯의 원형질체 형성수를 비교해 보면 Cellophan을 이용한 MCM agar배지에서 배양된 것이 액체배양보다 많은 원형질체수를 분리하였으며, 액체배양된 균사체가 보다 민감한 반응을 원형질체 분리에서 나타내었다(Table I, Table V).

摘 要

고등균류의 유전연구와 균주개발을 위한 원형질체 조작의 기초 연구로서 몇가지 주요 버섯류의 원형질체 분리에 관하여 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. *P. ostreatus*와 *V. volvacea*의 원형질체 분리에 알맞는 효소는  $\beta$ -D-Glucanase+Novozym234+Snail enzyme이였으며, 삼투압 조절제로는 0.6M MgSO<sub>4</sub>였고, 이들을 Na-Maleate buffer로 pH 5.8에 조절하여 사용했을때 가장 많은 원형질체를 생성하였다.

2. *P. ostreatus*, *P. florida*, *P. sajor-caju*는 MCM에서 각각 4, 5, 3일간 배양한 균사체에서, *L. edodes*, *F. velutipes*는 PDA 배지에서 각각 2일과 5일간 배양했을때 가장 효과적이였으며, *A. bisporus*와 *V. volvacea*는 분리량이 극히 적었다.

3. *V. volvacea*의 균사체에 2-mercaptoethanol의 전처리하는 효과가 없어 원형질체 분리는 적었으며, 액체배양 보다는 agar 배지상의 cellophan방법이 원형질체 분리에 있어서 효과가 좋았다.

4. 균사체에 효소처리후 1시간 부터 원형질체가 분리되면서 점차 증가하여 9시간경에 가장 많은 원형질체를 얻었으며, 시간이 갈수록 핵포화현상으로 원형질체의 크기가 커졌다.

Bachmann, B.J. and Bonner, D.M.(1959): Protoplasts from *Neurospora crassa*. *J. Bact.* 78: 550-556.

Ballance, D. J., Buxton, F.P. and Turner, G.(1983): Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 284-289.

Becher, D., Conrad, B. and Böttcher, F. (1982): *Current Genet.* 6: 163-165.

Bradshaw, R.E. (1983): Hybridization of *Aspergillus* species. *Ph. D. Thesis*, University of Nottingham.

Case, M.E., Schweizer, M., Kushner, S.R. and Giles, N.H.(1979): Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5259-5263.

Chang, S.T. and Hayes, W.A. (1978): *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press, New York & London.

Delcaire, J.R. (1983): personal communication.

De Vries, O.M. H. and Wessels, J.G.H. (1972): Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* 73:13-22.

De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. (1973): Effectiveness of a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride* in releasing spheroplasts from fungi, particularly basidiomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 39:397-400.

Dookjewaard-Kloosterziel, A.M.P., Sietsma, J.H. and Woutters, J.T.M. (1973): Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 74:205-209.

Eddy, A.A. and Williamson, D.H. (1957): A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature* 179: 1252-1253.

Emerson, S. and Emerson, M.R. (1958): Production, reproduction and reversion of protoplast like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44: 668-671.

Ferenczy, L. (1981): Microbial protoplast fusion. In *Genetics as a Tool in Microbiology* (eds. S.W.



- Glover and D.A. Hopwood). Cambridge University Press. pp. 1-34.
- Ferenczy, L. and Pesti, M. (1982): *Current Microbiol.* 7: 157-160.
- Flint, J.E. (1982): An appraisal of the problems of strain improvement in *Agaricus bisporus*. *Ph. D. Thesis*, Univ. of Nottingham.
- 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 chrysospor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 260-263.
- Hamlyn, P.F. (1982): Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*, *Ph. D. Thesis*, Univ. of Nottingham.
- 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.
- Kevei, F., and Peberdy, J.F. (1979): Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Molec. Gen. Genet.* 170: 213-218.
- Kim, Y.J., Lee, C.O., Shim, M.J., Kim, S.W., Choi, E.C., and Kim, B.K. (1984): Studies on antitumor components of cultured basidiomycetes. Purification and chemical analysis of antineoplastic constituents of cultured mycelia of *Laccaria laccata*. *Kor. J. Mycol.* 12: 35-43.
- Lucas, E.H., Ringlar, R.L., Byerrum, R.U., Sterens, J. A., Clarke, D.A. and Steck, C.C. (1959): Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibiot. Chemother.* (Washington, D.C.) 7: 1-4.
- Moore, D. (1975): Production of *Coprinus* protoplasts by use of chitinase or helicase. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65: 134-136.
- Peberdy, J.F. (1980): Protoplast fusion—a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* 2:23-29.
- Peberdy, J.F., Eyssen, H. and Anné, J. (1977): Interspecific hybridization between *Penicillium chrylogenum* and *Penicillium cyaneo-fulvum* following protoplast fusion. *Molec. Gen. Genet.* 157: 281-284.
- Raper, J.R. (1966): *Genetics of sexuality in higher fungi*. Ronald Press Company, New York.
- Raper, J.R. and Raper, C.A. (1972): Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 8:1-9.
- Russell, I., Garrison, I.F. and Stewart, G.C. (1973): Studies on the formation of spheroplasts from stationary phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brewing* 79: 48-54.
- Santiago, C.M., Jr. (1981): Studies on the physiology and genetics of *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Singer. *Ph. D. Thesis*, Univ. of Nottingham
- Shibata, S., Nishikawa, Y., Mai, C.F., Fukuoka, F. and Nakanishi, M. (1968): Anti-tumor studies on some extracts of basidiomycetes. *Gann* 59: 159-161.
- Strunk, C. (1965): Über Entstehung und Reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch* 3: 242-244.
- Ushiyama, R. and Nakai, Y. (1977): Protoplasts of shiitake, *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* (Japan) 15: 1-5.
- Villanueva, J.R. and Garcia Acha, I. (1971): Production and use of fungal protoplasts. In *Methods in Microbiology* (ed. C. Booth) 4:665-718. Academic Press, New York.
- Vogel, F.S., Kemper, L.A.K., McGarry, S.J. and Graham, D.G. (1975): Cytostatic, cytotoxic and potential antitumor properties of a class of quinoid compounds, initiator of the dormant state in the spores of *Agaricus bisporus*. *Am. J. Pathol.* 78: 33-48.
- Weibull, C. (1953): The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J. Bacteriol.* 66: 688-696.
- Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Kakimoto, Y. and Sasaki, T. (1983): Preparation and regeneration of mycelial protoplasts of *Collybia velutipes* and *Plurotus ostreatus*. *European J. Appl. Microbiol. Biotec.* 17: 298-300.
- Yoo, Y.B., Byun, M.O., You, C.H., Park, Y.H. and

Peberdy, J.F. (1984): Characteristics of fusion products between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following interspecific protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* 13: 164-169.

秦京熙(1984): *Pleurotus ostreatus*의 protoplast 生成과 還元에 관한 研究. 석사학위논문. 숙명여자대학교 대학원.

〈Received December 6, 1984;

Accepted January 16, 1985〉