

장수버섯(*Fomitella fraxinea*)의 원형질체 분리 및 재생

김경수* · 유창현 · 공원식 · 김영호 · 차동열

농업과학기술원 응용미생물과

Protoplasts Isolation and Reversion of *Fomitella fraxinea*

Kyung-Soo Kim*, Chang-Hyun You, Won-Sik Kong,
Young-Ho Kim and Dong-Yeul Cha

Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science
and Technology, RDA Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT: Factors affecting protoplasts isolation and regeneration of *Fomitella fraxinea* were investigated. Lytic enzyme mixture of Novozym 234, Cellulase onozuka R-10 and β -Glucuronidase was found to be the best for the protoplasts isolation. Osmotic stabilizer of 0.6 M sucrose was observed as the best for protoplasts isolation. The highest number of protoplasts was obtained from the *F. fraxinea* mycelium with lytic enzyme mixture and osmotic stabilizer that had been cultured for 3 hours. The highest regeneration rate of 0.02% was achieved when the 0.6 M sorbitol was employed as osmotic stabilizer.

KEYWORDS: *Fomitella fraxinea*, Lytic enzyme, Osmotic stabilizer, Protoplasts

장수버섯은 담자균아강(Holobasidiomycetidae), 민주름버섯목(Aphyllphorales), 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 버섯으로 아카시아 등에서 많이 발생된다. 최근에는 항암, 성인병, 혈압저하 작용 등(水野, 1992; 유 등, 1996)에 효과가 높아 관심심이 높아지고 있는 버섯이다. 버섯은 종류에 따라 기능성이 각기 다르므로 종간 원형질체 융합 등에 의한 다기능성 버섯의 개발이 바람직하다.

버섯류의 원형질체에 관한 연구는 1965년 Strunk가 *Polystictus versicolor*에서 처음으로 원형질체를 분리한 이후 많은 균류에서 이루어졌다(Moore, 1975; Yamada, 1983; Gold 등, 1983; Park 등, 1987; Choi 등, 1987; 김, 1993). Peberdy(1989)는 원형질체 분리에 미치는 요인은 세포의 생리적 상태, 세포벽 분해에 사용되는 효소, 삼투압 조절제 등이라고 하였다. 분리된 원형질체는 새로운 세포벽이 생성되어 재생(regeneration)되어야 한다. 고등균류의 경우 Strunk(1965)가 *Polystictus versicolor*에서 재생형태를 보고한 이후 *T.*

matsutake(Abe 등, 1982), *F. velutipes*(Yamada 등; 1983), *C. versicolor*(박, 1991), *G. lucidum*(Park 등, 1987), *L. edodes*(김; 1993) 등에서 보고되었으나 장수버섯에서는 아직 원형질체 분리 및 재생이 보고된 것이 없다. 이 시험에서는 장수버섯의 원형질체 분리와 재생에 영향을 미치는 세포벽 분해효소의 종류, 삼투압 조절제 등 몇 가지 요인에 대해서 구명하고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 시험에 사용한 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에 보존중인 장수버섯(*F. fraxinea*) ASI 17001을 사용하였다. 균사체의 계대배양 및 원형질체 분리를 위한 균사체 배양은 Fig. 1과 같이 5종류의 배양기에서 균사체 배양 시험을 실시하고 그 중에서 균사생장이 양호하고 공중균사량이 많은 감자한천배지(PDA)를 사용하였다. 원형질체 재생을 조사하기 위한 배지는 버섯완전배지(MCM; 20 g dextrose, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.46 g KH_2PO_4 , 1

*Corresponding author

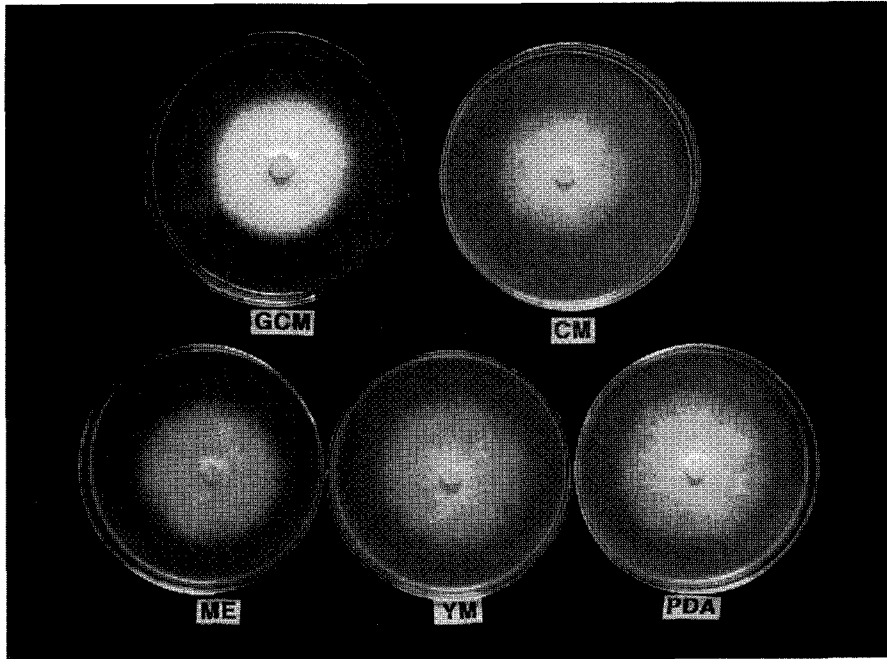


Fig. 1. Mycelial morphology of *F. fraxinea* on various media.

*GCM; Ganoderma complete medium, CM; Mushroom complete medium, ME; Malt extract, PDA; Potato dextrose agar, YM; Yeast malt extract

g K_2HPO_4 , 2 g yeast ex., 2 g peptone, 20 g agar/1,000 ml)이며 여기에 0.6 M 삼투압조절제를 첨가하여 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하였다.

분해 효소

세포벽 분해효소는 Cellulase onozuka R-10(Yakult Honsha, Japan), β -Glucuronidase (Sigma Chemical Co., USA), Novozym 234(Novo Biolabs, Denmark)를 단용 또는 혼용 시 5 mg/ml로 pH 조절없이 멸균된 0.6 M 삼투압 조절제에 혼합하여 2시간 정도 4°C에서 완전히 녹인 후 0.5 μ m membrane filter로 무균화하여 사용하였다.

삼투압 조절제

원형질체 분리시 삼투압 조절제로 sucrose, sorbitol, mannitol, dextrose, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.6 M로 조절하여 사용하였으며, 원형질체 재생시 험에서는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 제외한 나머지 5종을 사용하였다

원형질체 분리

감자한천배지에 반투석 cellophane을 깔고 그 위에 미리 배양한 접종원 균총의 가장자리 부근의 균사를 직경이 약 5 mm 정도 되는 cork borer로 절단하여 1개의 petri-dish당 4개의 균총을 접종하여 30°C에서 4일간 배양하였다. 배양된 균사체는 cellophane과 함께 직경 5 cm의 멸균된 petri-dish에 옮기고 효소액을 5 ml씩 처리하여 28°C의 진탕기에서 120 rpm으로 배양하면서 광학현미경으로 관찰하고, haemocytometer로 분리된 원형질체 수를 조사하였다.

원형질체 재생

균사체에 효소액을 처리하여 3~4시간 배양한 후 sintered glass filter(Porosity 1)에 여과하여 균사체를 제거하고 2,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 버리고 0.6 M 삼투압조절제로 세척하여 분해효소를 제거하였다. 이러한 세척 과정을 2번 반복하고 원형질체 갯수를 조사한 후 희석하여 삼투압 조절제가 처리된 버섯완전배지에 농도별로 분

Table 1. Comparison of lytic enzymes for the release of protoplasts of *F. fraxinea*

Lytic enzymes	No. of protoplasts ($\times 10^4/ml$)
Novozym 234	2.5
Cellulase onozuka R-10	0
β -Glucuronidase	0
Novozym 234+Cellulase onozuka R-10	8.8
Novozym 234+Cellulase onozuka+ β -Glucuronidase	8.9

*Osmotic stabilizer: 0.6 M sucrose.

주하고 0.75% top agar 배지와 잘 혼합하여 균현 후 25~28°C에서 배양하였다. 재생율은 재생된 균 총 수를 배양에 사용된 원형질체 수로 나누어 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

세포벽 분해효소의 선발

여러 가지 세포벽 분해효소를 단독 및 혼용으로 처리한 결과는 Table 1과 같다. 세포벽 분해효소의 단독처리로는 Novozym 234가 가장 효과적이었으며, Cellulase onozuka R-10과 β -Glucuronidase는 원형질체가 전혀 분리되지 않았다. 원형질체의 분리량을 높이고자 효소의 혼용시험을 한 결과 Novozym 234 단독보다 Cellulase onozuka R-10을 혼용하거나 Novozym 234+Cellulase onozuka R-10+ β -Glucuronidase를 동량으로 혼용한 것이 좋았다.

원형질체 분리에 영향을 미치는 요인은 여러 가지로 다량의 원형질체를 분리하기 위해서는 적당한 세포벽 분해효소의 선택과 그 적정 조건의 구명이 필요하다. Abe 등(1982)은 여러 가지 효소를 사용하여 *Tricholoma matsutake*의 원형질체를 분리한 결과 단독 사용보다는 두 가지 이상의 효소를 혼용한 것이 양호하다고 하였다. 영지의 원형질체 분리에 대한 국내의 연구에서도 Um 등(1988)은 Novozym 234와 β -Glucuronidase를 혼용한 것이 원형질체 분리율이 가장 높다고 하였으나, Shin 등(1986)은 Novozym 234 단독구가 다른 효소를 혼용한 것보다 원형질체 분리량이 많다고 하여 연구

Table 2. Effects of the osmotic stabilizer on the release of the protoplasts of *F. fraxinea*

Stabilizer (0.6 M)	No. of protoplasts ($\times 10^5/ml$)
Sucrose	2.00
Dextrose	0.50
Sorbitol	0
KCl	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.38
Mannitol	0

*Lytic enzyme: Novozym 234+Cellulase onozuka+ β -Glucuronidase.

시간에 차이가 있었다. 그러나 다른 대부분의 연구에서도 Novozym 234의 단독보다는 다른 효소와의 혼용이 원형질체 분리량이 많다고 하였다(김, 1993; You 등, 1988; Park 등, 1987).

삼투압 조절제

장수버섯(*F. fraxinea*)의 원형질체의 분리에 사용하는 삼투압 조절제는 0.6 M sucrose가 가장 양호하였고 MgSO₄가 다음으로 양호하였으며, sorbitol이나 mannitol의 경우에는 원형질체가 분리되지 않았다(Table 2).

담자균류의 우수한 삼투압 조절제로 *Schizophyllum commune*은 0.3 M KCl(De Vries와 Wessels, 1972), *P. ostreatus*는 0.6 M sucrose와 mannitol(Yoo 등, 1985), *Volvariella volvaceae*는 MgSO₄(Yoo 등, 1985), *G. lucidum*은 0.6 M sucrose(Choi 등, 1986, 박, 1991; Um 등, 1988) *G. applanatum*은 0.6 M KCl(Park 등, 1987), *Lentinus edodes*은 0.6 M mannitol(김, 1993), *Coriolus versicolor*는 0.6 M sucrose(박, 1991)라고 보고하여 무기염류 또는 당류의 삼투압 조절제가 균주에 따라 다양하였다. 따라서 삼투압조절제의 선택은 사용하는 균주와 세포벽 분해효소의 종류에 따라 달리 사용해야 할 것으로 사료된다.

효소액의 처리시간에 대한 원형질체 분리

균사체에 분해 효소액을 처리한 반응시간에 따른 원형질체 생성량을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 효소를 처리한 후 3시간에서 가장 많은 생성량을 보였으며, 4시간에서는 급격한 감소를 보였다. 다른 버섯의 처리시간별 원형질체의 생성량은 *Ganoder-*

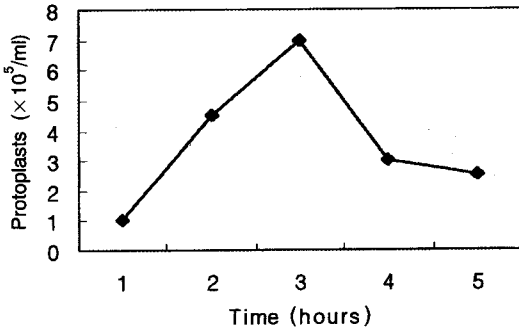


Fig. 2. Influence of incubation time on the release of protoplasts from the mycelium of *F. fraxinea*.

*ma lucidum*은 4시간(Jeong, 1998), *G. applanatum*은 2시간이 가장 많았다는 보고(Park 등, 1987)와는 유사한 경향을 보였으나 *Schizophyllum commune*은 6시간의 처리에서도 원형질체 생성량이 증가되었다는 보고(Jeong, 1998)와는 다소 차이가 있었다. 따라서 효소 처리시간에 따른 원형질체 생성량의 차이가 있는 것으로 보아 버섯 종류별 효소처리 최적 시간은 다른 것으로 사료되었다.

원형질체 재생

균사로부터 생성된 원형질체는 다시 재생되어 균

Table 3. Effect of different osmotic stabilizer on the reversion of *F. fraxinea* protoplasts

Osmotic stabilizer (0.6 M)	Reversion frequency (%)
Sucrose	0.01
Mannitol	0.01
Sorbitol	0.02
Dextrose	0.01
KCl	0

총을 형성하여야 한다. 재생을 위해서는 일반적으로 삼투압 조절제가 첨가된 고체 배지에 원형질체를 도말하고 삼투압조절제가 첨가된 soft agar(0.5~1.0%)을 중층하여 배양한다. 원형질체의 재생시 사용한 삼투압 조절제별 재생율은 0.01~0.02% 정도로 다른 버섯에 비하여 매우 낮았으며, 삼투압조절제중 sorbitol에서 재생율이 비교적 높고 KCl에서는 재생이 되지 않았다(Table 3, Fig. 3). Peberdy (1979)는 어떠한 균류에서도 재생율이 100%는 결코 되지 않는다고 하였다. 이것은 균사체에서 분리된 원형질체는 매우 다양한 균사체 부위에서 분리되므로 핵이 없는 무핵성 원형질체가 나출되며, 사상 균류의 경우 성장점에서 먼 부위에서 나출된 원형질체는 재생능력이 결핍되어 있기 때문이라고 하



Fig 3. Reverted colonies from protoplasts of *F. fraxinea* on the MCM stabilized with various stabilizers.

였다. 또한 Peberdy(1989)는 담자균류의 재생율이 다른 균주에 비해 낮은 이유는 배양시 균사체의 성장속도가 다른 균주에 비해 느리기 때문이라고 하였다. 담자균의 경우 삼투압조절제의 종류별 재생율이 높은 것으로 *P. cornucopiae*는 sucrose(Lee 등, 1986), *P. ostreatus*는 sucrose, $MgSO_4$ (Yoo 등 1985), *G. lucidum*은 sucrose와 $MgSO_4$ (Choi, 1987; 박, 1991), *C. versicolor*는 sucrose(박, 1993), *G. applanatum*은 sucrose(Park 등, 1987) 등을 보고하였으며, 본 시험보다 재생율이 높았다. 이처럼 원형질체의 재생율이 낮은 이유는 세포내의 핵의 부재(Garcia 등, 1966)라고 보고하였으며, 버섯 종류간의 여러 가지 조건의 차이에서 나타나는 것으로 생각되었다.

적 요

장수버섯(*Fomitella fraxinea*)의 원형질체 분리와 재생에 영향을 미치는 요인을 조사하고자 본 연구를 수행하였다. 세포벽 분해 효소 종류별 원형질체 분리 시험을 수행한 결과 장수버섯 ASI 17001은 Novozym 234+Cellulase onozuka R-10+ β -Glucuronidase를 혼합하여 처리하였을 때 원형질체 분리율이 $8.9 \times 10^4/ml$ 로 가장 높았다. 원형질체 분리시 사용하는 삼투압 조절제로는 0.6 M sucrose가 가장 양호하였으며, 처리시간은 3시간이 가장 양호하였다. 원형질체 재생율은 0.6 M sorbitol에서 0.02%로 다른 조절제에 비하여 양호한 결과를 나타내었으나 KCl에는 전혀 재생이 되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업비의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로 이를 수행할 수 있도록 지원해 주신 것에 감사드립니다.

참고문헌

김채균. 1993. 표고버섯과 구름버섯 이목간의 원형질체 융합 및 핵 전이에 관한 연구. 박사 학위 논문, 서울대학교.

- 박설희. 1991. 영지와 구름버섯 이속간의 원형질체 융합 및 핵 전이에 관한 연구. 박사 학위 논문, 서울대학교.
- 유창현 등. 1996. 체세포 융합에 의한 약용버섯 우량 품종 육성연구. 과학기술처.
- 水野卓, 川合正允. 1992. きのこの 化學, 生化學, 學會出版センタ-. 東京日本. 315-354.
- Abe, M., M. Umetsu, T. Nakai and D. Sasage. 1982. Regeneration and fusion of mycelial protoplasts of *Tricholoma matsutake*. *Agric. Biol. Chem.* 46(7): 1955-1957.
- Choi, S. H., Kim, B. K., Kim, H. W., Kwak, J. H., Choi, E. C., Kim, Y. C., Yoo, Y. B. and Park, Y. H. 1987. Studies on protoplast formation and regeneration of *Ganoderma lucidum*. *Arch. Pharm. Res.* 10(3): 158-164.
- De Vris, O. M. H. and Wessels, J. G. H. 1972. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *Journal of General Microbiology* 73: 13-22.
- Garcia, A., Lopez-Belmonte, I. F. and Villanueva, J. R. 1966. Regeneration of mycelial protoplast of *Fusarium culmorum*. *J. Gen. Microbiol.* 44: 515-523.
- 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 basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1): 260-263.
- Jeong, H. 1998. Studies on the strain improvement by mycelial fusion and nuclear transfer of *Ganoderma lucidum*, and its pharmacological characteristics. PhD thesis, Konkuk Univ.
- Lee, Y. H., You, C. H., Cha, D. Y., Yoo, Y. B. and Min, K. H. 1986. Protoplast regeneration and reversion in *Pleurotus cornucopiae*. *Kor. J. Mycol.* 14(3): 215-223.
- Moore, D. 1975. Production of *Coprinus* protoplasts by use of chitinase or helicase. *Trans. Br. Mycol. Sec.* 65(1): 134-136.
- Park, Y. D., Yoo, Y. B., Park, Y. H., Chang, M. W. and Lee, J. S. 1987. Protoplast formation and reversion of *Ganoderma applanatum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15(4): 234-240.
- Peberdy, J. F. 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21-29.
- Peberdy, J. F. 1989. Fungi without coats-pro-

- toplasts as tools for mycological research. *Mycol. Res.* **93**: 1-20.
- Shin, G. C., Yeo, U. Y., Yoo, Y. B. and Park, Y. H. 1986. Some factors affecting the protoplast formation and regeneration from the mycelium of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karsten. *Res. Rep. Agri. Sci. Tech. Chungnam Natl. Univ.* **13**(2): 185-192.
- Strunk, C. 1965. Über entstehung und reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polytisticus versicolor*. *Biol. Rundsch*: 242-244.
- Um, S. D., Chae, Y. A., Yoo, Y. B., You, C. H. and Cha, D. Y. 1988. Protoplast isolation and reversion from *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma* sp. *Kor. J. Mycol.* **16**(1): 21-25.
- Yamada, D., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Kakimoto, Y. and Sasagi, T. 1983. Preparation and regeneration of mycelial protoplasts of *Collybia velutipes* and *Pleurotus ostreatus*. *Eup. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **17**: 298-300.
- Yoo, Y. B., Peberdy, J. F. and You, C. H. 1985. Studies on protoplast isolation from edible fungi. *Kor. J. Mycol.* **13**(1): 1-10.
- Yoo, Y. B., Peberdy, J. F. and Cha, D. Y. 1985. Studies on protoplast regeneration and reversion of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* **13**(2): 79-82.
- You, C. H., Yoo, Y. B. and Park, Y. H. 1988. Studies on protoplast formation and reversion of *Pleurotus sapidus* Kalhbr. *Kor. J. Mycol.* **16**(4): 210-213.