

## 맛느타리버섯(*Pleurotus sapidus* Kalchbr)의 원형질체 분리 및 환원에 관한 연구

柳昌鉉·劉英福·朴淵姬\*

農村振興庁 農業技術研究所 菌相科 \*亞州大學校 生物工學科

### Studies on Protoplast Formation and Reversion of *Pleurotus sapidus* Kalchbr

Chang-Hyun You, Young-Bok Yoo and Yun-Hee Park\*

Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute, R.D.A. Suweon 440-707 and \*Department of Bioengineering, Ajou University, Suweon 440-749, Korea

**ABSTRACT:** Factors affecting protoplast formation and reversion were investigated in *Pleurotus sapidus* kalchbr. For release of protoplast, enzyme mixture of Novozyme 234,  $\beta$ -D-glucanase and  $\beta$ -glucuronidase was most effective, when mycelium of 0.6 M sucrose solution as osmotic stabilizer without addition of buffer solution. The yield of protoplast was highest with mycelium cultured for 4 days on mushroom complete agar medium at 30°C.

Protoplasts of *Pleurotus sapidus* were reverted to normal hyphal growth with maximum reversion frequency of 2% on Mushroom complete agar medium stabilized with 0.6 M sucrose solution and covered by 0.75% agar layer.

**KEYWORDS:** *Pleurotus sapidus*, Protoplast formation, Reversion.

우리나라에서 가장 많이 재배하고 있는 느타리버섯류는 세계적으로 48종이 보고되었으며, 주요 재배종은 *pleurotus ostreatus*를 비롯해서 *P. florida*, *P. sajor-caju* 등 몇종에 불과하여 농가소득을 증대시키기 위해서는 수량과 품질이 우수한 우량품종의 육성이 필요하다. 그러나 느타리버섯류는 4극성으로 종내는 물론 종간의 불화합성 때문에 군사융합에 의한 품종개량은 한계성이 있으며(Anderson 등, 1973; Terakawa, 1960), 이러한 문제점을 해결하기 위하여 원형질체의 융합이나 핵을 전이시키는 방법을 이용하기에 이르렀다.

버섯류의 원형질체는 Strunk(1965)가 *Polystictus versicolor*에서 가장 먼저 분리한 이래 *Schizophyllum commune*(De vries 등, 1972), *Lentinus edodes*(Ushiyama 등, 1977), *P. ostreatus*(下 등, 1984), *P. florida*(劉 등, 1985), *P. cornucopiae*(李 등, 1986a) 등에서 분리되었으며, 종에 따라 원형질체 분리와 환원에 영향을 미치는 효소의 종류,

농도, 삼투압 조절제, pH 등에 차이가 있음을 보고하였다.

본 연구는 품질이 우수한 *P. sapidus*의 원형질체 분리 및 환원에 적합한 제조조건을 구명하여 느타리버섯류의 유전 및 육종연구에 필요한 기초자료로 제공하고자 하였다.

#### 材料 및 方法

##### 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 농업기술연구소에 보존 중인 맛느타리버섯(*Pleurotus sapidus*) ASI 2057의 dikaryon 균주(ATCC 36568)이다. 온도별 배양시험 및 균주보존용 배지는 감자한천배지를 사용하였으며, 원형질체 분리 및 환원용 배지는 Raper(1972)의 버섯환원배지로 조성은 Dextrose 20g, Peptone 2g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g, 증류수 1,000 ml였다. 맛느타리

버섯균의 배양 최적온도 시험은 15°C에서 30°C까지 5°간격으로 실시하였다.

#### 세포벽 분해효소

원형질체 분리용 균사체는 투석용 Cellophane membrane(Fisher Sci. Co)을 버섯완전배지 위에 놓고 28°C에서 4일간 배양하였으며, 직경 5cm의 petri dish당 4개 균총씩 넣고 삼투압 조절제에 녹인 효소액을 처리하였다. 세포벽 분해효소는 Novozym 234(Novo Industri, Denmark),  $\beta$ -D-Glucanase(BDH Chem. U.K),  $\beta$ -Glucuronidase(Sigma Chem. U.S.A.) Chitinase(Sigma Chem. U.S.A.), Cellulase onozuka R-10(Yakult Hon Sha, Japan)을 삼투압 조절제 1ml당 5-20 mg 농도로 단독 또는 혼합하여 녹인 다음 membrane filter(Gelman Sci. 0.2  $\mu$ m)에 여과한 후 사용하였다.

#### 삼투압 조절제

삼투압 조절제로는 Sucrose, Mannitol, Sorbitol, KCl, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O를 각각 0.6 M로 조절하였으며, Sucrose의 농도시험은 0.4-1.2 M을 사용하였다.

#### 세포벽 분해효소의 반응온도 및 pH

세포벽 분해효소는 Novozym 234,  $\beta$ -D-Glucanase와  $\beta$ -Glucuronidase를 각각 15 mg/ml씩 혼합하여 사용하였으며, 반응온도는 20, 25, 30, 35°C에서 처리하여 원형질체를 분리시켰다. 세포벽 분해효소를 용해시키는 0.6 M Sucrose 삼투압 조절제의 pH는 200 mM phosphate buffer로 4, 5, 6, 7, 8, 9가 되도록 조절하였다.

또한 Buffer Solution이 원형질체 분리량에 미치는 영향조사는 phosphate buffer 외에 100 mM Clerk and Lubs buffer(100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaOH), 100 mM McIlvaine buffer(100 mM Citric acid, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 200 mM Succinic acid-NaOH buffer(200 mM Succinic acid, 200 mM NaOH), 50 mM Sodium maleate buffer(20 mM Maleic acid, 20 mM NaOH)의 pH를 6.0으로 조절하였다.

#### 균사의 배양기간

균사의 배양기간에 따른 원형질체 분리량 조사를 위한 균주배양은 28°C에서 3, 4, 5, 6일간 하였다. 원형질체의 분리는 처리별로 효소액을 petri 접시당 2 ml씩 처리한 후 28-30°C의 왕복진탕기(120 rpm)에서 120분간 분리하였으며, 원형질체 수는 광학현미경하에서 혈구측정기를 이용하였다.

#### 원형질체의 환원

분리한 원형질체는 Sintered glass filter(Pore size 100-120  $\mu$ m)에 여과하여 균사체를 제거한 후 800×g에서 5분간 원심분리하였다. 침전된 원형질체는 삼투압 조절제로 2회 세척하고 원형질체 수를 ml당 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>으로 희석하여 버섯 완전배지에 0.5 ml씩 분주하였다. 이때의 삼투압 조절제 농도시험은 Sucrose를 0.4-1.2 M로 하였으며, 종류는 Sucrose, Mannitol, Sorbitol, KCl을 각각 0.6 M 농도로 하였다.

원형질체를 넣은 후 피복하는 한천의 농도는 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2%로 하였으며, 28°C에서 7-10일간 배양하여 환원된 균총수를 조사하였다.

## 結果 및 考察

#### 균사의 최적 배양온도

맛느타리버섯균의 배양 최적온도를 구명하고자 온도별로 균사생장 길이를 측정한 결과 30°C가 가장 양호하고, 다음이 25°C였으며, 35°C에서는 생장속도가 급격히 지연되고 균총의 형태도 비정상적이었다(Fig. 1). 이와같은 결과는 좋은 다르나 Zadrazil(1974)이 *P. ostreatus*와 *P. florida*에서 보고한 최적온도와 같았으며, 高(1984)의 *P. sajor-caju*, Zadrazil(1974)의 *P. cornucopiae*에서 25°C가 양호한 결과와는 달라 중간에 균사생장 최적온도가 다를 수 있었다.

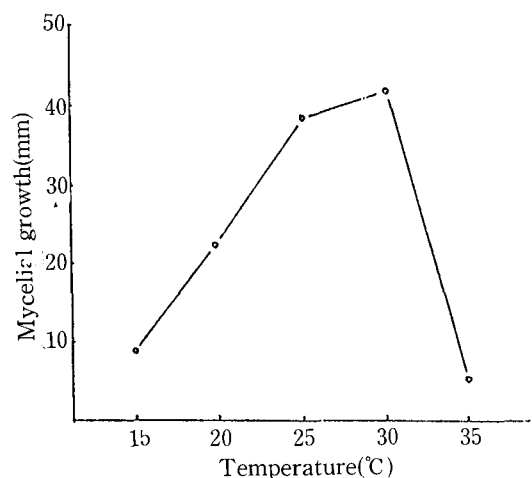


Fig.1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Pleurotus sapidus* during 8 days culture.

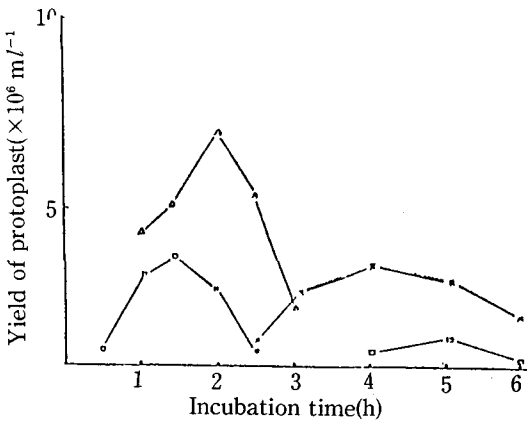


Fig.2. Effect of enzyme concentration on the release of protoplasts from mycelia of *P. sapidus*. Novozym 234 was used at the concentration of 5 mg (□-□), 10 mg (×-×), 15 mg (△-△) and 20 mg/ml (○-○) at 28°C.

#### 세포벽 분해효소의 영향

세포벽 분해효소의 최적 농도를 구명하고자 버섯류에서 많이 사용되는 Novozym 234를 삼투압 조절제 m/당 5, 10, 15, 20 mg씩 넣고 원형질체 수를 조사한 결과 Fig.2와 같이 15 mg일 때 가장 많았으며 농도가 높거나 낮아지면 적어졌다. 원형질체의 나출 속도는 농도가 높을수록 빨라 20 mg에서는 1.5시간, 15 mg에서는 2시간, 10 mg은 4시간경에 최대분리량에 도달하였다.

느타리버섯류의 원형질체 분리량에 대해서 Novozym 사용시 李 등(1986)은 *P. cornucopiae*, 高 등

(1985)은 *P. sajor-caju*에서 5 mg, 卞 등(1984)은 *P. ostreatus*에서 10 mg/ml이 효과적이라고 하여 본 결과와는 최적 농도에 차이가 있었다. 이와같이 버섯의 종류에 따라 효소의 농도와 반응시간이 다른것은 세포벽의 구성성분이나 공시균주의 배양조건 등에 차이가 있기 때문으로 생각된다.

원형질체의 분리 효율을 향상시키고자 몇가지 효소를 혼합사용한 결과 Novozym 234, m-D-Glucanase와  $\beta$ -Glucuronidase를 각각 15 mg/ml 혼합시 뚜렷한 증진효과를 나타내었다(Table I). 효소의 혼합사용에 대한 연구로 Abe 등(1982)은 Cellulase, Zymolase와  $\beta$ -Glucuronidase를 *Trichoderma matsutake*, Yanagi 등(1983)은 chitinase와 cellulase를 *Coprinus macrophizus*에 사용시 효과가 높아 본 결과와는 달랐으나 李 등(1986)의 *P. cornucopiae*, 劉 등(1987)의 *Lyophyllum ulmarium*에서 보고한 결과와는 같았다.

#### 삼투압 조절제

삼투압 조절제의 적정 농도를 알기 위하여 균류에서 많이 사용되는 Sucrose를 0.4-1.2 M까지 처리한 결과 0.6 M에서 원형질체 분리량이 가장 많았고 다음이 0.4 M 이었으며, 1.0 M 이상에서는 분리량이 급격히 감소되었다(Table II).

Sucrose 등 5종의 삼투압 조절제를 0.6 M로 조절하여 시험한 결과 Table III과 같이 Sucrose에서 가장 많이 분리되었고 다음이 Mannitol이었다. 이러한 결과는 高 등(1985)의 *P. ostreatus*와 *P.*

Table I. Effect of commercial enzymes for the release of protoplasts from mycelia of *Pleurotus sapidus*.

Enzyme	No. of Protoplast ( $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ )
Cellulase onozuka R-10	0
Chitinase	0
$\beta$ -D-Glucanase	0.1
$\beta$ -Glucuronidase	0.2
Novozym 234	6.9
Novozym 234+Cellulase onozuka R-10	15.6
Novozym 234+ $\beta$ -D-Glucanase	14.3
Novozym 234+ $\beta$ -Glucuronidase	27.8
Novozym 234+Cellulase onozuka R-10+ $\beta$ -Glucuronidase	25.6
Novozym 234+Chitinase+ $\beta$ -Glucuronidase	7.9
Novozym 234+ $\beta$ -D-Glucanase+ $\beta$ -Glucuronidase	31.7

**Table II.** Effect of osmotic stabilizer concentration on protoplast release from *Pleurotus sapidus*.

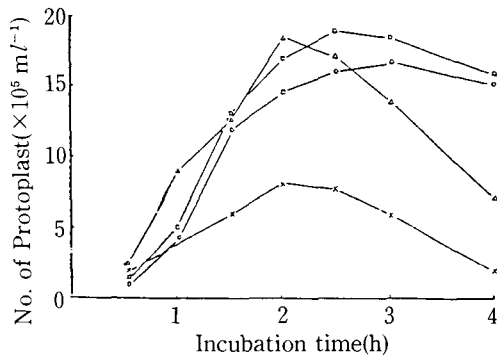
Sucrose (M)	No. of Protoplast ( $\times 10^5 \text{ml}^{-1}$ )
0.4	19.50
0.6	20.00
0.8	15.50
1.0	0.75
1.2	0.75

**Table III.** Influence of osmotic stabilizers on the release of protoplast from *P. sapidus*.

Osmotic stabilizer	No. of Protoplast ( $\times 10^6/\text{ml}$ )
Sucrose	26.5
Mannitol	10.0
Sorbitol	4.8
Potassium chloride	2.3
Magnesium sulfate	0.8

*sajor-caju*, 李 등(1986)의 *P. cornucopiae*에서와 같았으나 劉 등(1985)의 *P. ostreatus*, Ushiyama 등(1977)의 *Lentinus edodes*에서 Magnesium sulfate가 우수하다는 것과는 달라 버섯의 종류에 따라 각기 다른 경향을 나타내었다.

세포벽 분해효소의 반응온도 및 pH 효소액의 반응온도에 따른 원형질체 분리량은 25-30°C에서 많았으며, 35°C에서는 현저히 감소되었다(Fig. 3).



**Fig.3.** Effect of temperature on the release of protoplasts from *P. sapidus* in Mixture of Novozym 234,  $\beta$ -D-Glucanase and  $\beta$ -Glucuronidase was used at 20°C (○-○), 25°C (□-□), 30°C (△-△) and 35°C (×-×).

**Table IV.** Effect of pH on protoplast release. Novozym 234,  $\beta$ -D-Glucanase and  $\beta$ -Glucuronidase were dissolved in 20 mM phosphate buffer.

H	No. of Protoplast ( $\times 10^5 \text{ml}^{-1}$ )
4.0	8.25
5.0	15.00
6.0	18.50
7.0	11.50
8.0	1.00
9.0	0.50
without buffer (pH 6.0)	29.00

**Table V.** Comparison of different buffer solution on the release of protoplasts in *P. sapidus*.

Buffer (pH 6.0)	No. of Protoplast ( $\times 10^5 \text{ml}^{-1}$ )
100mM Clark and Lubs	1.00
100mM McIlvaine	0.02
200mM Phosphate	1.25
50mM Na-Maleate	1.00
200mM Succinic acid-NaOH	0.02
Control (without buffer pH 6.0)	22.50

원형질체의 최대 분리량에 도달하는 시간은 온도가 높을수록 빨라 30 및 35°C에서는 2시간이었으나 20°C에서는 3시간대로 길었다.

한편 인산 완충용액의 pH별 원형질체 분리량을 본 결과 pH6에서 양호하였으나 무처리보다는 적었다(Table IV). 따라서 pH 조절용 완충용액이 원형질체 분리에 미치는 영향을 본 결과 Table V에서와 같이 완충용액의 사용은 오히려 원형질체 분리량이 적어 상당한 영향이 있음을 알 수 있었다.

**균사의 배양기간**

버섯완전배지에서 균사의 배양기간에 따른 원형질체 분리량은 4일간 배양하였을 때 총 분리량과 단위면적당 분리량이 가장 많았다(Table VI). 이와 같은 결과는 高 등(1985), 李 등(1986)과 같은 경향이였으며, 呂 등(1988)의 *Flammulina velutipes*에서 5일이 양호한 것과는 1일의 차이가 있었다. 균사체 배양기간이 4일경에 효과적인 원인은 균사생장이 가장 왕성한 시기로 세포막의 조직이 다른 시기보다 치밀하지 않는데 기인된 것으로 보인다.

**Table VI.** Production of protoplasts from mycelial colonies of different ages in *Pleurotus sapidus*.

Culture age (day)	Colony area (cm <sup>2</sup> )	No. of Protoplast ( $\times 10^6 \text{ml}^{-1}$ )	Protoplast yield per unit area ( $\times 10^5 \text{ml}^{-1}$ )
3	16.96	0.70	0.41
4	23.77	4.90	2.06
5	30.90	2.23	0.72
6	37.31	1.60	0.43

**원형질체의 환원**

분리된 원형질체의 환원에 적당한 삼투압 조절제인 Sucrose의 농도는 0.6 M에서 가장 양호하여 원형질체 분리시와 같은 경향이였다(Table VII). 또한 최적 삼투압 조절제로는 Table VIII에서와 같이 Sucrose가 2.02%로 환원율이 가장 높고 KCl은 매우 낮았다. 그러나 Sucrose는 환원율이 높은 반면 균사의 성장속도는 Mannitol이나 Sorbitol에 비하여 지연되는 것이 관찰되었다. 원형질체 환원에 Sucrose가 양호함은 여러 연구자들에 의해 보고되었으나 환원율은 劉 등(1987)이 *L. ulmarium*에서 0.23%, Abe 등(1982)은 *T. matsutake*에서 10%나 되어 종에 따라 차이가 심하였다.

원형질체의 환원을 위하여 원형질체와 함께 피복

**Table VII.** Effect of the concentration of osmotic stabilizers on the reversion of protoplasts.

Sucrose (M)	Reversion frequency (%)
0	0.003
0.4	0.696
0.6	0.704
0.8	0.610
1.0	0.116
1.2	0

**Table VIII.** Effect of different osmotic stabilizer on the reversion of protoplasts.

Osmotic stabilizers	Reversion frequency (%)
0.6M Sucrose	2.02
0.6M Mannitol	1.06
0.6M Sorbitol	0.40
0.6M KCl	0.18

**Table IX.** Influence of top agar concentration on the reversion of protoplasts in *Pleurotus sapidus*.

Agar conc. (%)	Protoplast reversion (%) on MCM
Control	1.00
0.25	0.67
0.50	0.82
0.75	1.79
1.0	0.77
2.0	0.70

되는 한천의 최적 농도는 0.75%에서 가장 양호하였으며, 무피복구에서도 높은 환원율을 보였다(Table IX). 본 시험결과는 高 등(1986)이 *P. ostreatus*에서 보고한 것과 비슷한 경향이였으나 李 등(1986)의 *P. cornucopiae*에서 한천이 첨가되지 않은 배지에서 가장 양호한 결과와는 달라 종에 따른 차이가 있는 것으로 생각된다.

**摘 要**

맛느타리버섯(*Pleurotus sapidus*)의 원형질체 분리 및 환원에 영향을 미치는 제 요인의 최적조건을 구명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

원형질체의 분리에 알맞는 균사체의 배양은 30°C의 버섯완전배지에서 4일이며, 세포벽 분해효소는 Novozym 234,  $\beta$ -D-Glucanase,  $\beta$ -Glucuronidase를 각각 15 mg/ml씩 혼합 사용하였을 때 가장 양호하였다. 또한 삼투압 조절제로는 0.6 M Sucrose를 pH 조절없이 사용하고 30°C에서 2시간 동안 반응시키는 것이 가장 효과적이었다.

원형질체의 환원은 삼투압 조절제로 0.6 M Sucrose를 사용하고, 0.75%의 한천을 피복하였을 때 환원율이 2%로 최대였다.

## 參考文獻

- Abe, M., Umetsu, H., Nakai, T. and Sasage, D. (1982): Regeneration and fusion of mycelial protoplast of *Tricholoma matsutake*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1955-1957.
- Anderson, N.A., Wang, S.S. and Schwandt, J.W. (1973): The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycologia* **65**: 28-35.
- De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. (1975): Chemical analysis of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from *Shizophyllum commune*. *Arch. Microbiol.* **102**: 209-218.
- Raper, C.A., Raper, J.R. and Miller, R.E. (1972): Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **64**: 1088-1117.
- Strunk, C.(1965): Uber Entstehung und Reversion enzymatisch enzuegter protoplasten von *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch* **3**: 242-244.
- Terakawa, H.(1960): The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. *Sci. Pap. Coll. Gen. Edu. Univ. Tokyo.* **10**: 65-71.
- Ushiyama, R. and Nakai, Y. (1977): Protoplasts of shiitake, *Lentinus edodes*(Berk.) *Sing. Rept. Tottori Mycol. Inst.* **15**: 1-5.
- Yanagi, S.O. and Takebe, I. (1983): An effecient method for the isolation of mycelial protoplasts from *Coprinus macrophizus* and other basidiomycetes. In protoplasts 1983. Poster proceedings. ed. I. potrykus *et al.*, pp.294-295. Basel: Birhauser Verlag.
- Zadrazil, F.(1974): The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *P. florida*, *P. cornucopiae* and *P. eryngii*. *Mus. Sci.* **9**(1): 621-659.
- 高昇柱, 卞明玉, 柳昌鉉, 朴容煥(1984) : Selection of *Pleurotus sajor-caju* as suitable species for cultivation under summer climatic conditions in Korea. *Kor. J. Mycol.* **12**: 53-58.
- 高昇柱, 申寬澈, 劉英福(1985) : Protoplast Formation, Regeneration and Reversion in *Pleurotus ostreatus* and *P. sajor-caju*. *Kor. J. Mycol.* **13**: 169-178.
- 卞明玉, 高昇柱, 朴容煥, 申寬澈(1984) : Some factors affecting the protoplast releasing from *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **12**: 9-14.
- 李娟姬, 朴容煥, 劉英福, 閔庚喜(1986) : Studies on Protoplast Isolation of *Pleurotus cornucopiae*. *Kor. J. Mycol.* **14**: 141-148.
- 李娟姬, 柳昌鉉, 車東烈, 劉英福, 閔庚喜(1986) : Protoplast Regeneration and Reversion in *Pleurotus cornucopiae*. *Kor. J. Mycol.* **14**: 215-228.
- 呂運炯, 劉英福, 朴容煥, 申寬澈(1988) : Isolation of protoplasts from *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Mycol.* **16**: 70-78.
- 劉英福, Peberdy, J.F. and 車東烈(1985) : Studies on Protoplast Regeneration and Reversion of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* **13**: 79-82.
- 劉英福, 柳昌鉉, 朴容煥, 張權烈(1987) : Protoplast Isolation and Reversion from *Lyophyllum ulmarium*. *Kor. J. Mycol.* **15**: 14-18.

Accepted for Publication 28 September