

영지 원형질체 분리를 위한 대체 세포벽 분해 효소 탐색과 최적 조건 설정

김민식 · 오민지 · 임지훈 · 이은지 · 오연이*

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Exploration of alternative cell wall lysing enzymes and optimization of conditions for *Ganoderma lucidum* protoplast isolation

Minseok Kim, Min Ji Oh, Ji-Hoon Im, Eun-Ji Lee, and Youn-Lee Oh*

Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Korea

ABSTRACT: Recently, active research in Korea and worldwide has begun to focus on gene function and cultivar development using gene editing tools. This research, in addition to studies on edible mushroom, aims to enhance the physical and biochemical characteristics of mushrooms for applications in materials and substance production. For these studies, efficient isolation of protoplasts from the target mushroom is critical. However, several commercial cell wall-lysing enzyme cocktails, including Novozyme234, Glucanex, and Lysing enzymes, have recently been discontinued. In this study, we aimed to identify alternative enzyme systems to replace the discontinued cell wall-lysing enzymes for stable isolation of protoplasts from *Ganoderma lucidum*. To select an optimal osmotic buffer, enzyme function in 0.6 and 1.2 M Sorbitol, Sucrose, Mannitol, and KCl was assessed. The effect of reaction time was also evaluated. Protoplast isolation efficiency of each alternative enzyme was tested using lysing enzymes from *Trichoderma harzianum*, Chimax-N, and Yatalase, either individually or in combination. This matrix of studies identified enzymes and optimal conditions that could replace the discontinued lysing enzymes.

KEYWORDS: Cell wall, *Ganoderma lucidum*, Lysing enzyme, Protoplast

서론

버섯은 인간의 역사에서 식생활은 물론 건강, 제례에 있어서도 빼놓을 수 없는 중요한 요소이다. 버섯의 재배는 6세기

경에 중국에서 흑목이를 재배한 것이 최초의 버섯 인공 재배로 알려져 있고, 한국에서도 18세기 조선시대에 표고의 인공 재배법이 수록되는 등 현재 전세계적으로 약 200여종의 버섯이 재배되고 있다(Royse et al., 2017). 현재 2023년 기준으로 세계 버섯 시장 규모는 1,725만 달러에 도달했으며, 전세계적인 팬데믹 이후 사람들의 건강에 대한 관심이 늘어남에 따라 버섯 산업의 규모 또한 커질 것으로 보고 있다. 이러한 버섯의 중요성에도 불구하고, 버섯의 품종 육성과 유전자 연구에 대한 진척은 동식물과 비교했을 때 상대적으로 부족한 편이다. 분자마커의 개발, 양적형질 위치(Quantitative trait loci, QTL)의 발견과 연관성 매핑과 같은 연구들은 활발히 진행되고 있으나 근본적인 유전자 기능에 관한 연구와 분자유전학적인 기법을 활용한 품종 개발에서 약세를 보이고 있는데, 이는 버섯이 속한 곰팡이가 가지는 특유의 세포구조에서 기인한 문제이다(Sonnenberg et al., 2017). 하나의 핵에 염색체 쌍이 존재하는 동식물에 비하여 버섯이 속한 곰팡이는 각 염색체 쌍이 서로 다른 핵에 각각 존재하는데, 이로 인해

J. Mushrooms 2024 September, 22(3):87-91
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2024.22.3.87>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853

© The Korean Society of Mushroom Science
 Minseok Kim(Post doctoral researcher), Min Ji Oh(Researcher), Ji-Hoon Im(Researcher), Eun-Ji Lee(Researcher), Youn-Lee Oh(Senior researcher)

*Corresponding author
 E-mail : kmstaur@korea.kr
 Tel : +82-43-873-5703, Fax : +82-43-873-5702

Received September 2, 2024
 Revised September 10, 2024
 Accepted September 13, 2024

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

염색체 쌍을 주형으로 필요로 하는 상동재조합(Homologous recombination, HR)이 일어나기 매우 어려워 비상동말단연결(Non-homologous end joining, NHEJ)이 유전자 복구 매커니즘에서 매우 우세하게 발현하게 된다(Liu K et al., 2020). 따라서 최근까지 보편적인 유전자 연구 및 형질전환 툴이었던 상동 재조합을 이용한 유전자 편집을 활용하는 것이 매우 비효율적이었다(Morio F et al., 2020). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation(ATMT)를 활용한 연구가 어느정도 진행되긴 했지만, 유전자의 삽입이 무작위 위치에 이루어지고 이로 인해 육종형질을 변형하기 힘들고, 유전자의 삽입만이 가능할 뿐 결실이나 대체를 유도하는 것이 어려운 단점이 있다(Chen et al., 2000). 하지만 2020년에 노벨 화학상을 수상한 CRISPR/Cas 유전자 가위가 개발됨에 따라 버섯에서도 유전자 교정을 시도하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 기존의 HR을 이용하는 유전자 편집과 불특정 위치에 삽입되는 ATMT와 달리 CRISPR/Cas 시스템은 gRNA를 통해 매우 정확한 위치에서 지속적인 유전자 절단을 일으키고, 이를 통해 유전자 복구 매커니즘의 오류로 인한 유전자 결손을 유도한다(Ding Y et al., 2019). 또한 기존의 외래 유전자 삽입이 필수적이던 방식에서 벗어나 단백질과 RNA 결합체(Ribonucleoprotein, RNP)를 이용할 수 있기 때문에 세포 내부로 외래 유전자의 삽입을 방지할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 다만 유전자 가위를 활용한 유전자 교정 연구는 고효율의 원형질체 분리가 가장 기본적이고 필수적인 요소이기 때문에 교정 대상 버섯의 원형질체 분리 효율을 높이는 기술개발이 선행되어야 한다. 버섯 원형질체 분리에 사용되었던 세포벽분해효소 제품이(Novozyme234, Glucanex, Lysing enzyme from *Trichoderma harzianum*) 단종되어 원형질체 분리가 어려운 실정으로, 영지의 유전자 교정 처리를 위한 원형질체 분리에 적합한 효소 조성을 선발하는 것이 본 연구의 목적이다. 여러 효소들 중에서 버섯 세포벽의 Chitin을 효율적으로 분해할 수 있는 Chitinase, Lysing enzyme, Yatalase에 대하여 효율적인 구성을 선발하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

원형질체 분리 실험을 위한 균주는 농촌진흥청 버섯과에서 보유하고 있는 '영지2호'를 사용하였고, PDA(Potato dextrose agar, 40 g/L)배지에 접종하여 24 °C에서 14일간 배양하였다. 배양된 균주는 다시 PDB(Potato dextrose broth, 24 g/L) 200 mL에 접종하여 24 °C, 암조건에서 10일간 정치 배양하였다. 그 후 균질기를 이용하여 배양된 균사를 한번 갈아 준 후, 새로운 PDB 배지 200 mL에 옮겨 24 °C, 암조건에서 10일간 정치 배양한 후 실험에 사용하였다.

삼투완충액 선발

배양된 균사를 Miracloth(Merk, Germany)로 배지를 제거하고 8종의 다양한 삼투완충액을 사용하여 세척하였다(Table 1). 얻어진

Table 1. Protoplast isolation efficiency depending on the type and concentration of osmotic buffer

Osmotic buffer	Conc.	Number of Protoplast($\times 10^7$ /mL)
Sorbitol	0.6 M	26.7 \pm 3.3
	1.2 M	6.7 \pm 0.9
Sucrose	0.6 M	17.3 \pm 1.1
	1.2 M	1.9 \pm 0.1
Mannitol	0.6 M	0.07 \pm 0.01
	1.2 M	0.01 \pm 0.01
KCl	0.6 M	0
	1.2 M	0

영지 균사로부터 원형질체 분리를 위해 Lysing enzyme(Sigma-Aldrich, USA) 10 g/L, Chimax-N(Amicogen, Korea) 5 g/L, Yatalase(Takara, Japan) 5 g/L, Cellulase(Sigma-Aldrich, USA) 2 g/L를 각 조성의 삼투완충액 20 mL에 녹인 후 0.2 μ m 필터(Merck, Germany)로 걸러서 준비하였다. 분리된 균사와 각 삼투완충액에 녹인 효소 카테일을 혼합 후 암조건 하에 24 °C에서 4시간 동안 반응하였다. 그 후 다시 Miracloth로 균사를 거르고 각 삼투완충액 20 mL로 세척한 후, 걸러진 용액을 $\times 1000$ g, 4 °C에서 15분간 원심분리하고 상층액을 조심스럽게 제거했다. 다시 각 삼투완충액 50 mL을 첨가하여 현탁한 후에 동일 조건으로 다시 원심분리하고 상층액을 제거한 후 각 삼투완충액을 1 mL 첨가하여 현탁하였다. 현탁액은 Hemocytometer(Marienfeld Superior, Germany)를 이용하여 현미경으로 원형질체 수를 확인하였다.

반응 시간 선발

삼투완충액은 0.6M Sorbitol을 사용하였고, 효소 조성은 Lysing enzyme 10 g/L, Chimax-N 5 g/L, Yatalase 5 g/L, Cellulase 2 g/L를 사용하여 위와 같은 방법으로 진행하였다. 균사와 배양액을 각각 2, 3, 4, 5, 6 시간 반응한 후 Hemocytometer를 이용하여 현미경으로 원형질체 수를 확인하였다.

효소 조성 선발

삼투완충액은 0.6M Sorbitol을 사용하였고, 효소 조성은 Table 3와 같이 구성 후 위와 같은 방법으로 진행하였다. 각 조성별 원형질체의 수는 Hemocytometer를 이용하여 현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

최적 삼투완충액과 시간

영지2호의 최적 삼투완충액과 반응 시간을 선발하기 위하여 다양한 조건을 선정 후 각 조건별로 분리된 원형질체 수를 확인하였다(Table 1, 2). 일반적으로 삼투완충액으로 많

Table 2. Protoplast isolation efficiency depending on incubation time

Incubation time (hr)	Number of Protoplast($\times 10^7$ /mL)
2	0.8 ± 0.1
3	7.9 ± 1.2
4	26.7 ± 3.3
5	20.2 ± 1.8
6	3.9 ± 0.8

Table 3. Protoplast isolation efficiency depending on enzyme composition

Lysing enzyme	Enzyme composition(mg/mL)			Number of Protoplast ($\times 10^7$ /mL)
	Chimax-N	Yatalase	Cellulase	
10			2	17.1 ± 2.1
5			2	12.8 ± 1.6
2			2	6.3 ± 1.1
	10		2	23.3 ± 2.7
	5		2	22.9 ± 3.4
	2		2	13.3 ± 3.1
		10	2	6.7 ± 2.9
		5	2	4.2 ± 1.5
		2	2	0.7 ± 0.2
10	5	5	2	26.7 ± 3.3
10	5		2	23.7 ± 3.1
10		5	2	18.4 ± 3.3
	5	5	2	23.7 ± 3.7

이 사용되는 Sorbitol, Sucrose, Mannitol, KCl을 각각 0.6M, 1.2M의 농도로 준비 후 실험을 진행한 결과, 0.6M Sorbitol, Sucrose에서 높은 원형질체 수를 확보하였고 Mannitol과 KCl을 사용한 결과에서는 매우 낮은 수의 원형질체만이 관찰되었다. 1.2M Sorbitol과 Sucrose에서도 유의미한 숫자의 원형

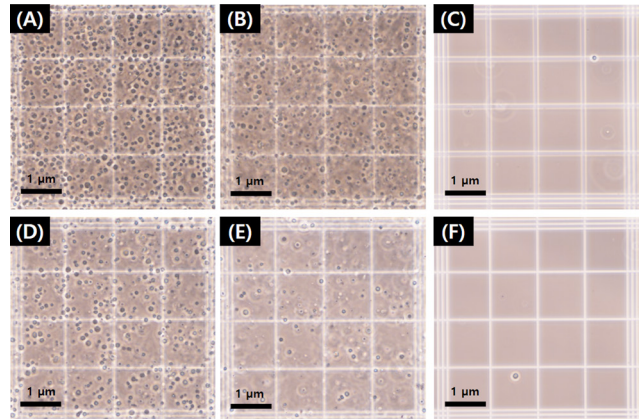


Fig. 1. Protoplast yield based on osmotic buffers. (A) 0.6M Sorbitol($26.7 \pm 3.3 \times 10^7$ /mL); (B) 0.6M Sucrose($26.7 \pm 3.3 \times 10^7$ /mL); (C) 0.6M Mannitol($0.07 \pm 0.01 \times 10^7$ /mL); (D) 1.2M Sorbitol($6.7 \pm 0.9 \times 10^7$ /mL); (E) 1.2M Sucrose($1.9 \pm 0.1 \times 10^7$ /mL); (F) 1.2M Mannitol($0.01 \pm 0.01 \times 10^7$ /mL).

질체가 분리되었으나, 0.6M에 비해 1.2M에서 각각 약 4배, 9배 낮은 수의 원형질체가 관찰되어 최종적으로 가장 높은 수치를 보인 0.6M Sorbitol을 최적 삼투원충액으로 선발하였다 (Table 1, Fig. 1).

효소 카테일과 영지 균사의 반응시간 별 원형질체 분리 효율을 확인한 결과에서는 4시간 동안 반응했을 때 가장 높은 분리 효율을 보였고, 5시간 반응까지도 약 20.2×10^7 개/mL 수준의 원형질체 분리 효율을 보였지만 그 외의 시간에서는 급격히 낮아지는 모습을 보여 4시간 반응을 선발하였다.(Table 2, Fig. 2)

최적 대체 효소 조성

앞서 선발한 최적 삼투원충액 0.6M Sorbitol과 최적 반응시간 4시간을 적용하여 총 13개의 효소 조성을 구성하였다(Table 3). 현재 쉽게 구매가 가능한 세포벽 분해 효소인 Yatalase와 endo-, exo-chitinase 카테일인 Chimax-N을 기준에 가장 많이 사용되고 있는 Lysing enzyme from *Trichoderma harzianum*과 비교 하였다. Cellulase의 경우 표고, 양송이에서 실험했을 때 세포벽 분해에 큰 영향을 주지는 않지만 잔여물 감소에 영향을 미치는 것을 확인하여 모든 조성에 2 mg/L의 농도로 처리하였다(Kim et al., 2021, 2023). 그 결과, Lysing enzyme, Chimax-N, Yatalase를 각각 처리했을 경우 Chimax-N, Lysing enzyme,

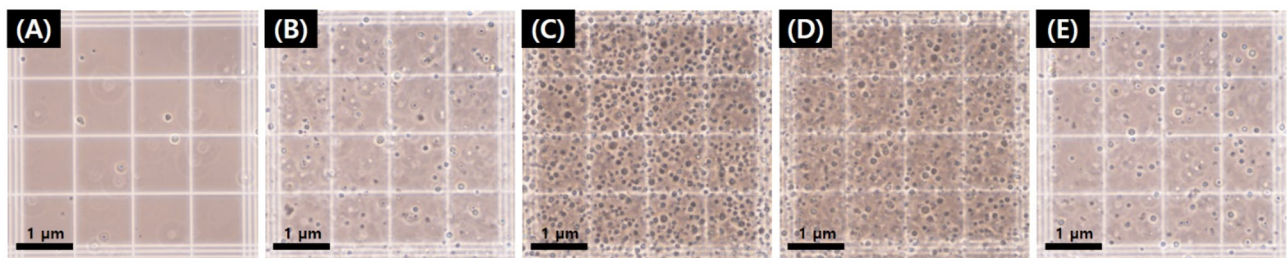


Fig. 2. Protoplast yield based on incubation times. (A) 2 hr($0.8 \pm 0.1 \times 10^7$ /mL); (B) 3 hr($7.9 \pm 1.2 \times 10^7$ /mL); (C) 4 hr($26.7 \pm 3.8 \times 10^7$ /mL); (D) 5 hr($20.2 \pm 1.8 \times 10^7$ /mL); (E) 6 hr($3.9 \pm 0.8 \times 10^7$ /mL).

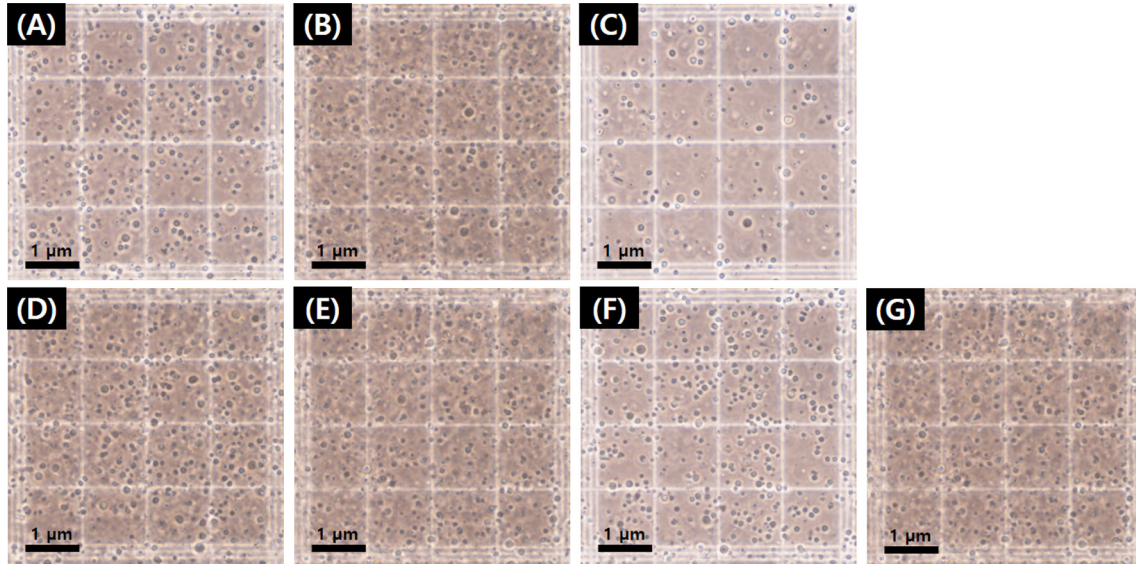


Fig. 3. Protoplast yield based on enzyme compositions. (A) Lysing enzyme 10 mg/L ($17.1 \pm 2.1 \times 10^7$ /mL); (B) Chimax-N 10 mg/L ($23.3 \pm 2.7 \times 10^7$ /mL); (C) Yatalase 10 mg/L ($6.7 \pm 2.9 \times 10^7$ /mL); (D) Lysing enzyme 10 mg/L, Chimax-N 5 mg/L, Yatalase 5 mg/L ($26.7 \pm 3.3 \times 10^7$ /mL); (E) Lysing enzyme 10 mg/L, Chimax-N 5 mg/L ($23.7 \pm 3.1 \times 10^7$ /mL); (F) Lysing enzyme 10 mg/L, yatalase 5 mg/L ($18.4 \pm 3.3 \times 10^7$ /mL); (G) Chimax-N 5 mg/L, Yatalase 5 mg/L ($23.7 \pm 3.7 \times 10^7$ /mL).

Yatalase 순으로 높은 원형질체 분리 효율을 보였고, 특히 Chimax-N의 경우 10 mg/L, 5 mg/L의 농도에서 근소한 차이를 보였다. 또한 Yatalase의 경우 10 mg/L으로 처리했을 때 다른 효소들과 비교하여 최소 1/3 수준의 효율을 보여 상대적으로 약한 활성을 보였다. 각 효소들을 혼합한 결과에서는 모든 효소를 혼합했을 때 가장 높은 효율을 보였지만 각 조성에서 Chimax-N만 빼 조성을 제외하고는 모두 비슷한 효율을 나타냈다. 특히 Chimax-N이 포함된 조성에서는 Chimax-N만을 사용한 조성과 비교했을 때 큰 차이를 보이지 않아 Chimax-N을 단독으로 사용해도 실험에 충분한 양의 원형질체를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.(Table 3, Fig. 3)

이러한 결과는 영지2호 이외에 다른 버섯이나 품종에도 세포벽 분해 효율을 분석하여, 다양한 버섯 유전자 연구에 활용될 수 있을 것이다.

적 요

버섯의 세포벽 분해를 최적화하기 위한 효소 처리에 따른 원형질체 분리 효율을 분석한 결과는 다음과 같다. 최적 삼투완충액 선발을 위해 Sorbitol, Sucrose, Mannitol, KCl을 각각 0.6M, 1.2M의 두가지 농도로 나누어 비교했을 때 0.6M Sorbitol에서 $26.7 \pm 3.3 \times 10^7$ /mL로 가장 높은 원형질체 분리 효율을 확인하였다. 또한 선발된 삼투완충액과 영지 균사의 반응 시간에 따른 영향을 확인한 결과에서는 4시간 동안 반응했을 때 가장 높은 효율을 보였다. 대체 효소의 경우 endo-, exo-Chitinase의 혼합 효소인 Chimax-N을 사용했을 때 기존의 Lysing enzyme과 Yatalase에 비해 더 높은 분리 효율을 보여 원형질체 분리를 위한 대체 효소로서의 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 결과물은 농촌진흥청 신육종기술실용화사업단[과제번호: RS-2024-00322425]과 농촌진흥청 박사 후 연구원 지원사업인 고유연구사업 원예특작시험연구 주관과제(PJ01733101)의 지원을 받아 수행되었습니다.

REFERENCES

- Chen X, Stone M, Schlaghauser C, Romaine CP. 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol* 66: 4510-4513.
- Ding Y, Wang KF, Wang WJ, Ma YR, Shi TQ, Huang H, Ji XJ. 2019. Increasing the homologous recombination efficiency of eukaryotic microorganisms for enhanced genome engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 103: 4313-4324.
- Kim M, Jang K, Lee YS, Oh MJ, Im JH, Oh YL. 2021. Optimization of protoplast isolation and PEG-mediated transformation in *Agaricus bisporus*. *J Mushroom* 19: 256-259.
- Kim M, Ryu H, Oh MJ, Im JH, Lee JW, Oh YL. 2022. Optimization of protoplast isolation and ribonucleoprotein/nanoparticle complex formation in *Lentinula edodes*. *J Mushroom* 20: 178-182.
- Liu K, Sun B, You H, Tu JL, Yu X, Zhao P, Xu JW. 2020. Dual sgRNA-directed gene deletion in basidiomycete *Ganoderma lucidum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Biotechnol* 13: 386-396.
- Morio F, Lombardi L, Butler G. 2020. The CRISPR toolbox in medical mycology: state of the art and perspectives. *PLoS Pathog* 16: e1008201.
- Royse DJ, Baars J, Tan Q. 2017. Current overview of mushroom

production in the world. *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications* 2017: 5-13.
Sonnenberg AS, Baars JJ, Gao W, Visser RG. 2017.

Developments in breeding of *Agaricus bisporus* var. *bisporus*: progress made and technical and legal hurdles to take. *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 1819-1829.