

한국산 구름버섯의 菌株間 生理的 特性 比較

朴榮道·黃完均·許才斗·金聖桓*·朴元穆*

廣東製藥(株) 中央研究所, *高麗大學校 農科大學 植物保護學科

Comparisons of Physiological Characteristics in *Coriolus versicolor* Intraspecific Strains

Young-Do Park, Wan-Kyunn Whang, Jae-Doo Huh,
Seong-Hwan Kim* and Won-Mok Park*

Institute of Central, Kwang-Dong pharmaceutical Co. LTD, Seoul 150-053 and

*Department of plant protection, College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea

ABSTRACT: This study was executed to investigate characterization of physiological genetic in *Coriolus versicolor*, basidiomycetes. The optimal media for mycelia culture were PDA, CVT-I and MES as solid media, 927 and CVT-III were good as liquid media, respectively. The optimal condition for mycelial culture was pH 5.6 and 25-30°C. Electrophoretic isozymes and protein patterns from mycelia identified very similar in 16001 and KD88001 strain, but the other species were very different in band patterns. Especially, pattern of esterase seemed to be valuable tool as taxonomic techniques for indentifying species of *Coriolus versicolor*. Fruiting body was cultivated with artificial logs cultivation method; 16001 and KD88001 were very similar to fruiting body shapes and colours but 16001 and CVT-80 were different in their shapes, colours and making primordia. Therefore, 16001 and KD88001 were assumed to the same strain, but 16001, 16002 and CVT-80 had the different genetic background.

KEYWORDS: Physiological Characterization, Protein Isozyme patterns, Fruiting body, *Coriolus versicolor*, Basidiomycetes.

高等菌類中 버섯은 古代로부터 人類生活과 밀접한 관계를 가져 食用과 藥用 및 産業用 등으로 널리 利用되어 오고 있어 이에 따른 여러가지 生理的 特性 (Hayes, 1978)이나 有効成分(Bose, 1955; Gregory 등, 1966) 및 毒性(Sugiura와 Ito, 1977) 등에 대한 研究가 활발하게 進行되어 왔다.

구름버섯 *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. 은 擔子菌類(Basidiomycotina)中 多孔菌科(Polyporaceae)에 속하는 木材腐朽菌으로서 自然狀態에서 쉽게 발견할 수 있는데, 韓國에서도 약 10여種이 自生하고 있는 것으로 알려져 있다(金 등, 1978). 특히, 구름버섯에 있어서는 여러가지 藥理作用이 있는 것으로 알려진 이래로 研究가 활발하게 이루어져 Tsukagoshi(1974) 등은 Protein bound-polysac-

charide 라는 蛋白多糖體를 熱水抽出하여 이것이 sarcoma-180에 대하여 抗癌作用이 있음을 밝힌 이래로 이를 産業的으로 活用하고자 하는 노력들이 傾注되어 (吉汲親雄 등, 1980; 1985) 最近에 이르러서는 菌絲體를 大量으로 液內培養하여 培養產物로부터 얻은 polysaccharide-k 를 商品化하기에 이르렀다.

그러나 이런 研究의 발전속에서 菌株가 잘못 混用되고 있는 例가 많을 뿐 아니라, 특히 同一 種의 菌株間에도 採集場所나 採集時期에 따라 단순한 子實體의 形態의인 차이만으로는 系統的인 分類가 대단히 어려운 것으로 되어 있다.

本 研究는 韓國에서 收集된 3系統의 구름버섯 菌株와 日本에서 收集된 1系統의 菌株間에 있어 各 菌株의 培養條件 및 電氣泳動法에 의한 蛋白質과 同位

試料은 100 μ l(μ l/ μ g protein)을 注入하였으며, 電氣泳動은 continuous buffer system으로, gel buffer와 tray buffer는 0.025M Tris-glycine electrode buffer(pH8.3)을 사용하여 10 $^{\circ}$ C에서 15V로 18時間 실시하였다.

發色法

蛋白質 : 電氣泳動 後 gel은 發色液(800ml H₂O, 200ml methanol, 70ml acetic acid, 60g Trichloro acetic acid, 25ml 1% Coomassie brilliant blue R250)에 1時間 동안 浸漬한 후 脫色液(H₂O : methanol : acetic acid=14 : 6 : 1v/v/v)에 12時間 浸漬하였다(Glynn 등, 1969).

Esterase : Gel을 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 30分間 浸漬하는 동안 10分 간격으로 buffer을 3회 갈아주어 gel의 酸度를 調整하였다. 35 $^{\circ}$ C의 發色液(60mg α -naphthyl acetate 70mg fast blue RR salt, 120mg 0.1M Tris-HCl buffer (pH7.2)에 浸漬하여 band가 명확해질 때까지 發色하였다(Kahler 등, 1970).

Leucine amino peptidase(LAP) ; Gel을 發色液(120ml Tris-malate buffer(pH5.4), 50ml distilled water, 15mg fast black K salt, 20mg L-leucyl- β -naphthylamide HCl)에 30分間 浸漬하여 暗狀態에서 發色하였다(Green 등, 1981).

Acid phosphatase ; Gel을 0.1M acetate buffer (pH5.2)에 30分間 浸漬하여 gel내의 酸度를 調整한 후 發色液(100ml acetate buffer pH4.5, 60ml 10% MgCl₂ solution, 70mg Fast Garnet GBC salt, 80ml α -naphthyl acid phosphate)에서 37 $^{\circ}$ C에 30分間 浸漬하여 發色하였다.

Peroxidase : Gel을 水洗한 후 發色液(0.03% H₂O₂ : Benzidin solution : H₂O=1 : 1 : 4)에 1~2分間 暗狀態에서 발색한 다음 5% acetic acid로 세척하고 5% acetic acid에 浸漬하였다.

子實體 形成

툽밥배지(참나무툽밥 : 米糠=8 : 2, 水分 65%)에 培養한 種菌을 참나무 原木에 接種하여 25~30 $^{\circ}$ C에서 60日間 活着시킨 후 1日 1回 給水하였다.

結果 및 考察

固體培地上的 菌絲成長度 比較

일반적으로 버섯의 菌絲培養에 널리 사용되어진 PDA外 11種의 供試培地에서 菌絲의 成長度를 측정

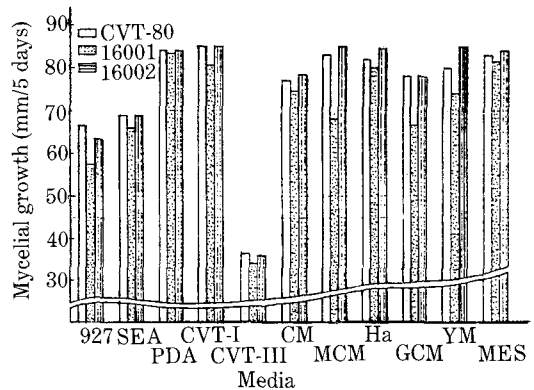


Fig.1. Comparison of the mycelial growth on various media in *Coriolus versicolor*.

한 結果는 Fig. 1과 같다.

16001과 16002 및 CVT-80의 3菌株의 培地 선택성은 아주 유사하였으며, 培地別 成長度에는 큰 차이를 보였는데 CVT-I, MCM, Hamada, GCM, YM 그리고 MES가 양호하였으며 菌絲의 密度와 氣菌絲量을 고려했을 때 PDA와 CVT-I 및 GCM이 가장 양호한 것으로 나타났다.

液體培地에서의 成長度 比較

固體培地上에서 成長이 양호했던 CVT-I外 7種과 成長이 不良했던 CVT-III를 선발하여 500ml Elenmyer-flask에 培地를 100ml씩 分注하고 CVT-80 菌株을 接種하여 27 $^{\circ}$ C에서 7日間 培養한 후 菌絲體의 乾燥重量과 輕視의인 菌絲體量을 比較한 結果 Table II에서와 같이 CVT-III와 927이 양호한 것으로 나타났다. 특히, 固體培地上에서 成長이

Table II. Comparison of mycelial growth and density in several liquid media from *Coriolus versicolor* CVT-80

Media	Dry weight of mycelium (g)	Mycelial density*
927	1.26	++++
PDA	0.65	+++ -
CVT-I	0.36*	+ -
CVT-III	1.38*	++++
MCM	0.53	+++++
Hamada	0.26	+++++
YM	0.21	++
MES	0.31	+ -

* +++++: indicates good cultured mycelial in liquid media.

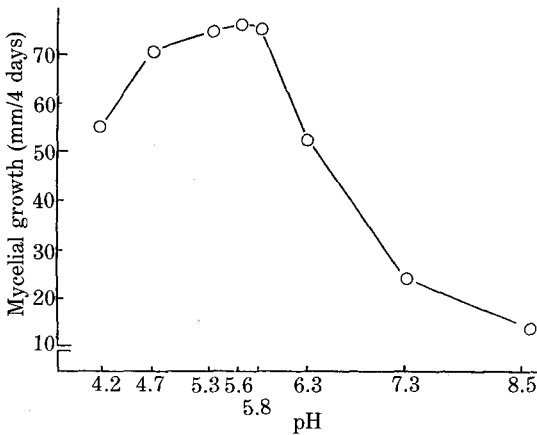


Fig. 2. Effect of pH on the mycelial growth in *Coriolus versicolor* CVT-80.

不良했던 CVT-III가 液體培地上에서는 가장 양호하게 나타났는데 이는 培地成分中 炭素原의 含量이 높기 때문에 菌絲의 初期生長이 느린 것으로 사료되며, 또 다른 모든 培地에서는 菌絲體 形態가 pellet를 形成한데 비해 Hamada 培地에서는 pulp 形態를 이루었는데, Hyponex를 제외한 培地에서는 pellet를 形成하는 것으로 보아 이는 培地成分中 fertilizer인 Hyponex에 의한 影響인 것으로 사료된다.

pH에 의한 影響

CVT-80 菌株를 CVT-I 固體培地上에서 pH에 따른 影響을 조사한 結果(Fig. 2) pH 5.6을 最適으로 하여 5.0~5.8에서 양호한 것으로 나타났다.

溫度에 따른 影響

菌絲 成長이 溫度에 따른 影響을 조사하기 위하여

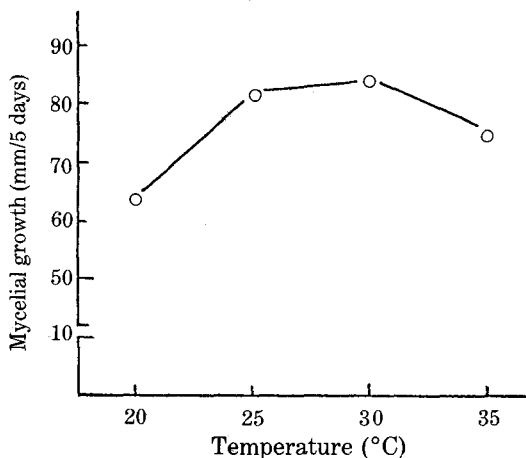


Fig. 3. Effect of temperatures on the mycelial growth *Coriolus versicolor* CVT-80.

固體培地上에서 20, 25, 30 및 35°C로 培養한 結果(Fig. 3) 25~30°C가 양호한 것으로 나타났다.

菌絲間 體細胞融合

各 菌株間에 있어 生理遺傳的 類緣關係를 檢定하기 위하여 固體培地上에서 菌絲融合을 실시한 結果(Plate 1) 各 菌絲間에는 不化合線(antagonistic line)을 形成하여 菌絲間 融合은 일어나지 않았다. 따라서 系統間에 있어 生理遺傳的으로 차이가 있음을 확인하였다.

電氣泳動의 band pattern

蛋白質: 各 菌株間에 있어 蛋白質 band pattern에 있어서 major band에서는 거의 同一함을 보였으나, minor band에서는 다소간에 차이를 보임으로써 各 菌株는 同一種이나 系統間에는 차이가 있음

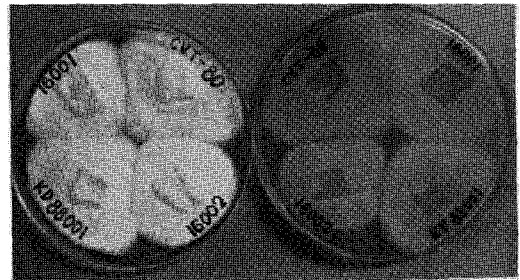


Plate 1. Formation of anastomotal incompatibility among the intraspecies *Coriolus versicolor*.

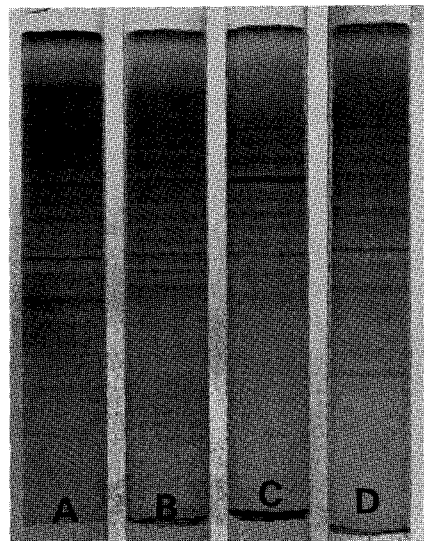


Plate 2. Buffer soluble protein in mycelium of *Coriolus versicolor* on 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel. A; 16001, B; 16002, C; KD88001, D; CVT-80.

을 나타냈다(Plate 2).

Esterase : 16001과 KD88001은 전체적인 band에서 매우 유사한 pattern을 보였으나 극히 부분적인 minor band에서 조금 차이를 보였다. 그러나

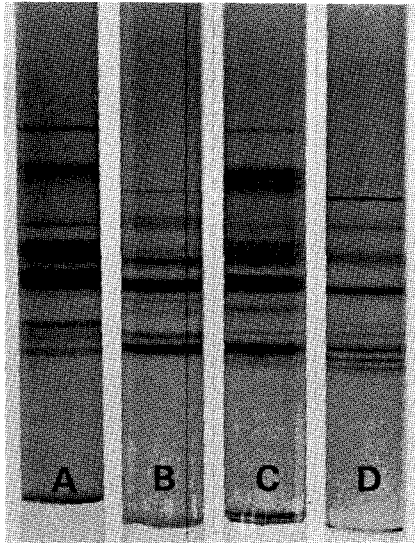


Plate 3. Isozyme patterns of esterase in the mycelium of *Coriolus versicolor* on 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel. A; 16001, B; 16002, C; KD88001, D; CVT-80.

16002와 CVT-80에 있어서는 매우 다른 위치를 나타냄으로써 전체적으로 16001과 KD88001은 類緣關係가 가까운 것으로 사료되나 나머지 菌株間에는 서로 많은 차이가 있음을 나타냈다(Plate 3).

LAP : LAP의 band pattern에 있어서는 각각 1개씩의 major band가 동일한 위치에 나타났으나 minor band는 다소간 위치를 달리하였다(Plate 4).

Acid phosphatase : Acid phosphatase의 pattern 比較에 있어서는 16001과 KD88001 그리고 CVT-80에서는 같은 위치에 1개씩의 major band를 形成했으며 16002에서는 同一位置에 minor band를 形成하였다. 특히, CVT-80에 있어서는 다른 菌株에서 보이지 않던 새로운 major band를 形成하는(1) 特徵을 보였고, 이와 각 菌株들은 다양한 minor band들을 나타냈다(Plate 5).

Peroxidase : Peroxidase의 pattern에서는 각각 2개씩의 major band가 같은 위치에 나타났으며 16002와 CVT-80에서는 또 다른 1개씩의 강한 major band를 각각 다른 부위에 形成하는 特徵을 나타냈다(1, 2). 그러나 minor band는 미약하나마 거의 같은 위치에 依存하였다(Plate 6).

以上에서와 같이 電氣泳動法에 의한 protein 및 同位酵素 pattern中 16001과 KD88001은 거의 유사

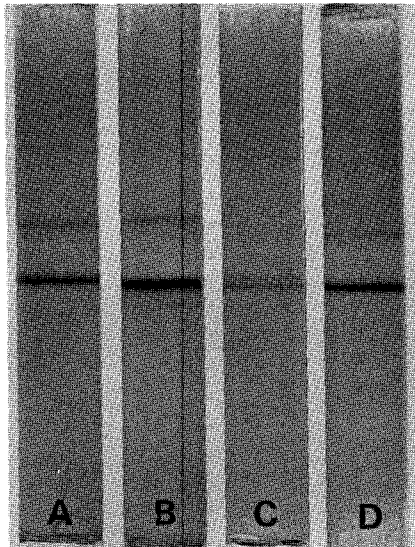


Plate 4. Isozyme patterns of leucine amino peptidase in the mycelium of *Coriolus versicolor* on 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel. A; 16001, B; 16002, C; KD88001, D; CVT-80.

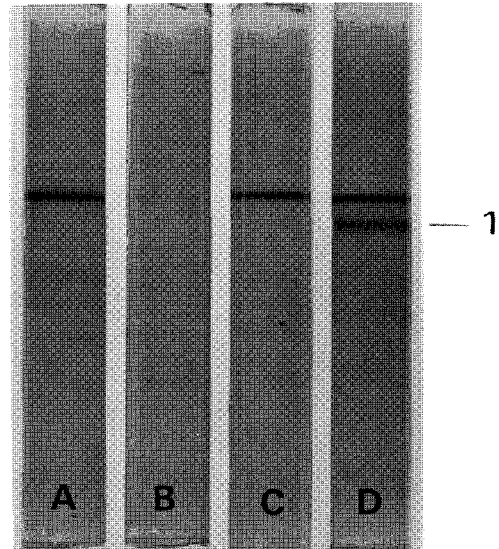


Plate 5. Isozyme patterns of acid phosphatase in the mycelium of *Coriolus versicolor* on 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel. A; 16001, B; 16002, C; KD88001, D; CVT-80.

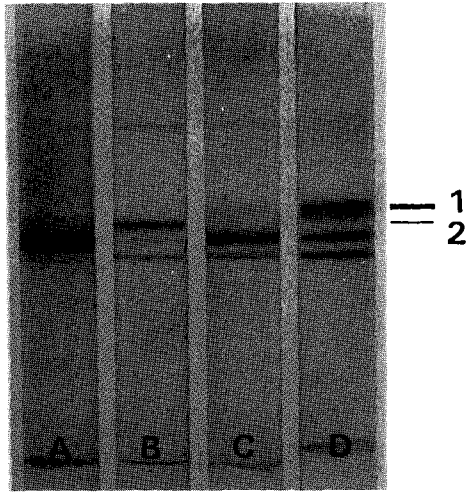


Plate 6. Isozyme patterns of peroxidase in the mycelium of *Coriolus versicolor* on 2-30% polyacryamide porosity gradient tube gel. A; 16001, B; 16002, C; KD88001, D; CVT-80.

한 形態를 나타낸 것으로 보아 遺傳的으로 매우 가까운 系統으로 추측되며 그의 各 菌株間에는 차이가 있는 系統들로 추측되었다.

지금까지 電氣泳動法에 의한 分類方法은 여러 生物體에서 보고되어 왔는데 버섯에 있어서는 Wang 과 Raper(1969)이 *Schizophyllum commune*에서 蛋白質의 pattern을, Roysse 와 May(1982)는 *Agricus bisporus*, *A. campestris* 그리고 *Lentinus edodes* 등에서 遺傳的 類緣關係를 결정짓기 위한 同位酵素 pattern을, Park 등(1986)은 *Ganoderma lucidum*의 菌絲體로부터 얻어진 esterase 同位酵素 pattern에서, Park 등(1988)은 *Pleurotus* spp. 등에서 esterase 나 LAP의 band pattern에서 두드러진 차이가 있음을 보여 電氣泳動法이 種의 分類的, 遺傳的 分化研究에 효과적 方法이 될 수 있음을 보고하였다.

子實體의 形成

種菌을 接種한 原木을 60日 정도 菌絲를 活着시킨

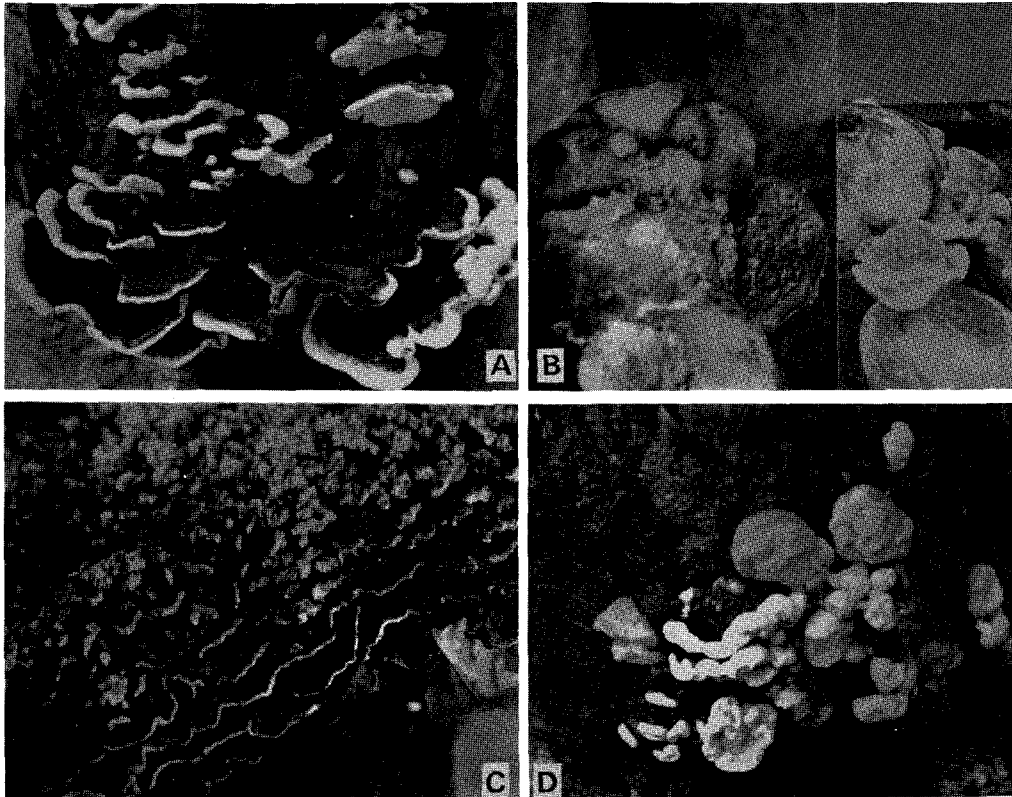


Plate 7. Aphyllocarps of *Coriolus versicolor* from artificial cultivation.

A; 16001, cultivated on oak logs, B; 16002, cultivated on sawdust media, C; KD88001, collected in nature D; CVT-80, cultivated on oak logs.

후 自然狀態에서 1日 1回 給水한 結果 70~80日 경과 후 原氣가 形成되었으며 150日 경과 후 plate 7 과 같이 子實體의 完全한 모양이 形成되었다. 16001 은 野生에서 採集된 KD88001과 形態나 色相에서 매우 유사하였으나, CVT-80은 16001이 黑褐色을 나타내는데 비해 黃褐色을 띄고 있었으며, 16002는 原氣의 形成에서 16001이나 CVT-80에 비해서는 매우 크고 두꺼운 子實層을 形成하여 전체적으로 16001과 KD88001은 같은 系統이나 16002와 CVT-80은 系統的 차이가 있는 것으로 사료되며 이에 대한 구체적인 分類學的 研究로 胞子の 크기나 子實體의 顯微鏡에 의한 微細구조의 차이 등에 대해서는 實驗中에 있다.

摘 要

구름버섯에 있어 3系統의 韓國產과 1種의 日本產 菌株間 生理遺傳의 類緣關係를 알아보기 위하여 各菌株의 生理的 特徵과 電氣泳動法에 의한 生化學的인 차이 및 人工栽培에 의한 子實體의 形態를 比較한 結果를 要約하면 다음과 같다.

各 菌株의 生育條件中 培地의 선택성에는 대체로 동일한 傾向을 보였는데 固體培地에서는 PDA, CVT-I 그리고 MES 가 양호했으며, 液體培地에서는 927과 CVT-III 가 가장 양호하였다. 또 最適 pH 는 5.6이었으며 溫度는 25~30°C가 적당한 것으로 나타났다.

電氣泳動法에 의한 蛋白質 및 同位酵素들의 pattern 에 있어서는 16001과 KD88001이 대체로 유사하였으나 다른 菌株들 間에는 각각 다르게 나타났다.

各 菌株를 人工栽培하여 子實體의 形態를 조사한 結果 16001과 KD88001은 形態나 色相에서 매우 유사함을 보여 동일 系統으로 나타났다으나 16002와 CVT-80은 현저한 차이를 보여 서로 다른 系統인 것으로 사료된다.

參考文獻

- Bose, S.R. (1955): Campestrin, the antibiotic of *Psalliotia campestris*. *Nature*. **175**: 468.
- Glynn, A.N. and Reid, J. (1969): Electrophoretic pattern of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in genus *Fusarium*. *Can. J. Botany*. **47**: 1823-1831.
- Green, R.L., Dudeck, A.E., Hannash, L.C. and Smith, R.L. (1981): Isozyme polymorphism in *Staugustingress*. *Crop. Sci.* **21**: 778-782.
- Gregory, F.J., Healy, E.M., Agerborg, Jr H.P.K. and Warren, G.H. (1966): Studies on antitumor substances produced by basidiomycetes. *Mycologia* **58**: 80-90.
- Hayes, W.A. (1978): The Biology and Cultivation of Edible mushroom. *Academic Press*, London: 191-237.
- Hwang, B.K., Wolf, G. and Heitefuss, R. (1982): Soluble proteins and multiple forms of esterases in leaf tissue at first and flag leaf stages of spring barley plant in relation to their resistance to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Physiological Plant Pathology* **21**: 367-372.
- Kahler, A.L. and Allard, R.W. (1970): Genetics of isozyme variant in barley. I. Esterase. *Crop. Sci.* **10**: 444-448.
- Park, W.M., Lee, Y.S., Kim, S.H. and Park, Y.H. (1986): Characterization of isolates of *Ganoderma lucidum* by Electrophoretic pattern of Enzymes. *Kor. J. Mycol.* **14**(2): 93-99.
- Park, Y.H., Byun, M.O. and Hiroshi, F. (1988): Comparison of Electrophoretic isozyme and pattern of *Pleurotus* spp. in Korea-I. Homogeneous Gel-. *Kor. J. Mycol.* **16**(2): 87-94.
- Royse, D.J. and May, B. (1982): Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia* **74**(1): 93-102.
- Sugiura, H. and Ito, J. (1977): Toxicological studies on *Ganoderma lucidum* Karst. *Tokoy Yokks Diagaku Kerkyu Nempo* **27**: 722-733.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. (1974): Protein-bound Polysaccharide Preparation, ps-k, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* **65**: 557-558.
- Wang, C.S. and Raper, J.R. (1969): Protein specificity and sexual morphogenesis in *Schizophyllum commune*. *Proc. Natl. Acad.* **66**: 882-889.
- 金三純 等 (1978) : 韓國말 버섯이름 統一案. 韓國菌學會誌, **6**(2) : 43-58.
- 吉汲親雄, 古莊孝雄, 松永謙一, 豊田教之 (1980) : 日本特許公報, 昭55-32355.
- 吉汲親雄, 吉莊孝雄, 大村嘉男, 和田敏彦, 牧田弘充, 安藤降雄, 豊田教之, 松永謙一 (1985) : 日本特許公報, 昭60-41591.