

표고버섯 자실체 형성에 미치는 티아민의 영향

신갑균 · 이상원* · 김사익**

경상대학교 임산공학과, 진주산업대학교 미생물공학과*, 진주산업대학교 임산공학과**

The Effects of Thiamin on the Fruiting of *Lentinula edodes*

Gab-Gyun Shin, Sang-Won Lee* and Sa-ick Kim**

Department of Forest Products Engineering, Gyeongsang National University

*Department of Microbiological Engineering, Chinju National University

**Department of Forest Products Engineering, Chinju National University

Abstract

The investigation was carried out to identify the active constituent in yeast extract for fruit body formation of *Lentinula edodes*. The result suggests that free thiamin which is known as the active substance for the fruiting of *L. edodes*, was detected but thiamin mono, di, three phosphates were not detected in the yeast extract produced by Difco Co.. Therefore, the thiamin content of the yeast extract was determined, the yeast extract was fractionated to five portion by the post-column fluorescence method. The content of thiamin in yeast extract(1g) was 0.436mg as thiamin hydrochloride. It was found that 76% of the total thiamin(0.332mg) was contained in fraction II. About 20% of the total thiamin(0.087mg) was present in fraction I, but not in fractions III, IV and V. In accordance with the contents of thiamin in the fractions, the fruit body formation was the highest by the treatment of fraction II(100%) and followed by fraction I (60%), V(50%), III(30%). Thiamin did not influence for the vegetative mycelial growth of *L. edodes*, but be used for fruit body formation.

Key words : yeast extract, thiamin, *Lentinula edodes*, fractionation,

서론

표고버섯(*Lentinula edodes*(Berk) Pegler.)은 담자균류에 속하는 식용버섯으로서 양송이버섯에 이어 세계에서 두 번째로 많이 생산하고 있는 버섯이다(1-4). 이러한 표고버섯은 식용적인 가치 뿐만 아니라 항종양성, 항콜레스테롤성, 면역증강 등의 효과로 인해 현재에는 기능성식품, 건강식품 및 다이어트식품 등으로 더욱 주목을 받고 있다(5,6).

표고버섯 재배에 관한 우리 나라의 정확한 기록은

알 수가 없으나, 일본의 경우는 17C경부터 시작한 것으로 보고되고 있으며, 초기에는 자연계에서 버섯이 발생한 나무의 조직을 채취하여 접종원으로 사용하였으나 오늘날에는 버섯 조직을 순수 분리·배양하여 종균으로 사용하게 됨으로서 그 생산량은 비약적으로 증가하게 되었다.

표고버섯 생산은 주로 참나무류를 이용한 원목재 배법을 행하고 있는데, 이 방법은 많은 자원과 노동력을 요구하고 있으며, 특히 최근에는 골목용인 참나무의 부족과 산촌지역 노동인구의 노령화 등으로 인하여 재료구입 뿐만 아니라 버섯의 생산에도 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다. 이러한 문제점의 해결을 위해서 1990년대에 톱밥에 영양물질을 첨가한 목

Corresponding author : Sang-Won Lee, Department of Microbiological Engineering, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

분배지를 사용한 균상 재배법이 일본에서 실용화됨으로서 표고버섯의 생산이 더욱 활기를 찾게되었으며, 우리 나라에서도 이러한 기술이 도입되어 균상재배 방법의 한 표고버섯의 생산이 점차 증가하고 있다. 그러나 톱밥에 영양물질을 첨가한 균상재배법은 버섯배양 환경의 완전 제어 등으로 표고버섯의 배양기간이 대폭 단축되고, 또 버섯배지중량 당 버섯의 생산량은 비약적으로 증가하였으나, 잡균오염 대책을 포함하여 버섯의 안정적인 생산을 유지하기 위해서는 아직도 지속적이고 많은 연구가 필요한 것으로 보고되고 있다(7).

그 중에서 담자균의 자실체 형성에 관한 연구는 대부분이 합성배지에서 균사생장이 왕성하고, 자실체 형성도 용이하며, 세대간이 1~2주간으로 비교적 짧은 *Favolus arcularius*(8~9), *Coprinus atramentarius* (10~12) 및 *Schizophyllum commune*(13~15) 등의 버섯을 이용하여 행하여져 오고 있다. 그러나 식용버섯 중에서도 비교적 배양기간이 긴 표고버섯은 합성배지 상에서 자실체 형성에 관한 검토가 적으며, 특히 액체 배지를 이용한 자실체 형성에 관한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. Leatham 등(16~17)은 탄소원으로 D-글루코스, 질소원으로 L-글루타민산을 함유한 합성 액체 배지를 이용하여 표고버섯 자실체 형성에 관해서 검토한 결과, Sn과 Ni이 효과가 있는 것으로 보고하였으나, Manuso 등(18)은 peptone과 glucose가 함유된 PG액체배지에 여러 가지 자실체 형성 촉진물질 즉, Sn, Ni, 바나린 및 리그닌 전구물질 등을 첨가하여 광조사하에서 70일 이상 배양하여도 표고버섯의 자실체는 전혀 발생되지 않았다는 상반된 보고를 하였다. 그러나 그는 이 PG배지에 효모추출물을 첨가하면 저온처리를 하지 않아도 배양 35~40일경에 배지 전체에서 자실체가 형성되었다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 버섯균주에 따라서도 다르게 나타날 수 있지만, 배지조성 및 자실체 형성 촉진물질에 따른 영향으로 추측된다.

그렇기 때문에 본 연구에서는 효모추출물 중에 함유되어있는 여러 가지 성분 중에서 표고버섯의 자실체 형성 촉진물질을 분리하여 규명하고, 균사생장과 자실체 발생에 미치는 영향에 관해서 검토하였다.

재료 및 방법

공시균

본 실험에 사용한 표고버섯 균주는 일본 Miyazaki 대학 산림화학 연구실에서 potato dextrose agar(PDA)

배지에 보존 중인 Mori 465(森産業株式會社製)균을 분양 받아 15일 간격으로 계대배양 하면서 사용하였다.

배지 및 배양방법

기본배지의 성분은 Table I에 나타낸 바와 같이 peptone과 glucose를 함유한 PG 액체배지를 사용하였으며, 기본 PG배지에 효모추출물 2.5g/l을 첨가한 PGY배지 및 염산티아민을 1.45mg/l을 첨가한 PGT배지를 본 실험에서 사용하였다. 모든 배지의 초기 pH는 5.7로 조정하였으며, 티아민은 membrane filter (0.20 μ m, Adevantech製)로 여과시켜 배지에 무균적으로 첨가하였다.

Table I. Composition of the basal medium(per liter)

Glucose	50 g
Poly Peptone	2.5 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.5 g
FeCl ₂ · 6H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7.2 mg
ZnCl ₂	4 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 mg

버섯균주의 액체배양 시에는 500ml용 삼각플라스크에 티아민을 제외한 각 배지성분을 100ml씩 분주한 후 121°C, 30분간 고압 멸균 한 다음, 미리 PDA 배지에 배양해둔 표고버섯 균사체를 직경 5mm의 코르크 보우러로 떼어내어 액체배지상에 접종하여 25°C, 상대습도 60%의 항온실 내에서 광조사(200Lux, 12시간 조사, 12시간 암흑의 반복)하면서 일정기간 정치배양 하였다.

효모추출물의 분획

Sephadex G-25 fine(Pharmacia Biotech製)을 충전한 유리컬럼(1.6×100cm, Pharmacia Biotech製)에 효모추출물(Difco社製) 수용액(0.25g/ml) 2ml을 첨가한 후, 유속 0.8 ml/min으로 용리하고, 용리된 각 시험관의 용액은 1/30농도로 희석시켜, 島津分光光度計 UV-240을 사용하여 260nm에서 흡광도를 측정하였다.

티아민의 정량법

효모추출물과 각 분획물에 0.1N 염산 50ml를 가하고 100°C의 수조에서 산 가수분해 시킨 후, pH를 4.5로 조정하였다. pH를 조정한 가수분해 액에 1%(w/v)

Takadiastase B(三共製藥製)용액 2ml을 첨가하여 혼합한 다음, 37~40℃에서 12시간 효소 반응시켜 티아민에 결합된 인산기를 절단하였다. 효소 반응액은 다시 100℃의 수조에서 15분간 가열하여 효소반응을 완전히 정지시킨 후, Permid를 충전한 컬럼에 넣어 1ml/min의 속도로 흘려 내리면서 티아민을 흡착시켰다. 흡착된 티아민은 0.1N HCl용액을 이용하여 25% KCl용액이 되도록 조제한 후, 4ml/min의 유속으로 흘려보내면서 티아민을 탈착시켰다. 탈착된 티아민용액은 Fig. 1에 나타낸 고속액체 크로마토 그래피(HPLC)로 티아민을 분리한 후, 15% NaOH용액에 $K_3Fe(CN)_6$ 을 녹여 0.01%로 조제한 반응액에 의해 이동상중의 티아민을 Thiochrom화시켜 형광검출기로 검출하였다.

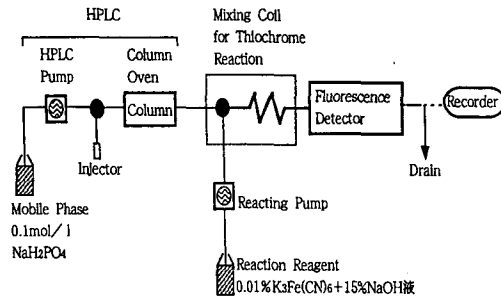


Fig. 1. Flow scheme of the thiamin analyzing system.

HPLC의 분석조건은 HPLC; LC-6A(島津製作所製), 컬럼; ODS-II(4.6×150mm, 島津製作所製), 유속; 0.5ml/분(이동상, 반응액), 검출기; 형광검출기 RF-550, 島津製作所製, 여기파장; 375nm, 형광파장; 450nm에서 실시하였다(19).

결과 및 고찰

효모추출물 중의 티아민 함유량

효모추출물 중에 함유되어 있는 티아민의 효과를 검토하기 위하여 먼저 효모추출물을 Sephadex G-25 fine을 충전한 컬럼으로 분획한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 용출 용액 50ml~100ml까지를 Fraction I, 100~156ml까지를 Fraction II, 156~208ml까지를 Fraction III, 208ml~260ml까지를 Fraction IV, 260ml이 후 용액을 Fraction V로 구분하여 분획하였다. Fraction I, II, III, IV 및 V의 순서로 저분자량의 물질이 용출되었다.

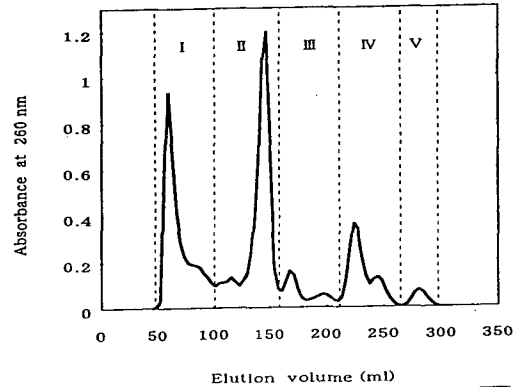


Fig. 2. Gel chromatography of yeast extract through Sephadex G-25 fine column.

분획된 효모추출물의 5개 Fraction을 각각 PG배지에 첨가하여 70일 동안 표고버섯 자실체 발생시험을 실시한 결과를 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 알 수 있는 바와 같이 효모추출물의 Fraction을 첨가하지 않은 대조구에서는 70일 동안 배양해도 전혀 표고버섯이 발생되지 않았으나, 5개 Fraction을 첨가한 모든 배지에서는 표고버섯의 자실체가 발생되었다. 특히 Fraction II를 첨가한 시험구는 효모추출물 자체를 PG배지에 첨가한 시험구와 같이 100%의 자실체가 발생되었으며, Fraction I을 첨가한 시험구는 60%, Fraction III는 30%, Fraction IV는 40%, Fraction V는 50%의 자실체 발생을 보였다.

이상의 결과로부터 효모추출물 중에 함유되어 있는 표고버섯 자실체 발생 촉진 물질의 주체는 Fraction II에 함유되어 있으며, 그 외의 Fraction에는 분자량이 다른 자실체 발생 촉진물질이 약간 함유되어 있는 것으로 추측되었다.

Table 2. Inducing effect of yeast extract and fraction of it on the fruit body formation of *Lentinula edodes*

Additive	% of culture with fruiting
None(Control)	0
Yeast extract	100
Fraction I	60
II	100
III	30
IV	40
V	50

1992년에 Matsuo 등(18)은 버섯류의 자실체 발생 촉진 물질로 알려져 있는 아미노산류, 비타민류 및

무기염류 등을 PG 액체배지에 첨가하여 표고버섯 자실체 발생시험을 실시한 결과, 비타민의 한 종류인 티아민(B1)이 가장 효과적이었다고 보고하였다. Komai 등(21)의 연구에 의하면 효모추출물 중에는 티아민이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 있기 때문에 본 연구에서 표고버섯의 자실체 형성에 효과를 나타낸 물질도 효모추출물 중에 함유된 티아민일 가능성이 높은 것으로 추측된다.

그렇기 때문에 먼저 효모추출물 중에 함유되어 있는 티아민과 그 에스테르류를 분리·정량하여 Fig. 3에 나타내었다.

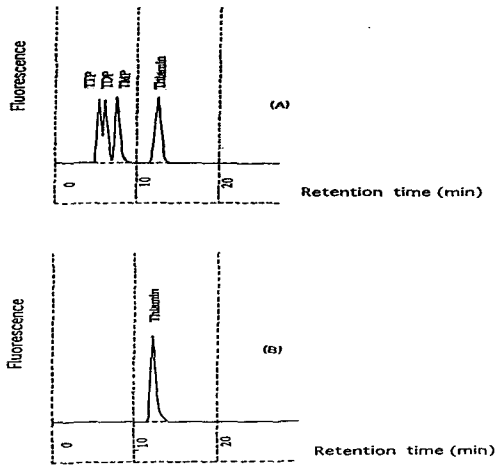


Fig. 3. Chromatograms for standard samples Thiamin, TMP, TDP, TTP(A) and Thiamin(B) in the yeast extract.

Fig. 3 (A)는 티아민 표준물질(Sigma Co. USA)의 크로마토 그래프이고, Fig. 3 (B)는 효모추출물로부터 추출한 티아민의 크로마토 그래프이다. 이 결과에서 알 수 있는 바와 같이 티아민의 표준물질에서는 티아민-인산, 디인산, 트리인산 및 유리 티아민이 관찰되었으나 효모추출물 중에는 유리 티아민만이 검출되었다. 티아민은 수용성 비타민으로 생물의 당질대사에 불가결한 인자로서, pyruvic acid의 산화에 이용되며, 티아민 디인산 에스테르는 pyruvic acid dicarboxylase의 보조소로 밝혀져 있다(19,20). 그러나 본 연구에 사용한 효모추출물 중에는 효모의 생체내에 풍부하게 존재하고 있는 각종 인산 에스테르류는 전혀 함유되어 있지 않고, 유리형만이 존재하고 있다는 것을 알 수 있었다.

효모추출물 및 분획한 각 Fraction에 함유되어 있는 유리티아민 량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 1g의 효모추출물 중에는 436 μ g의 티아민이 존재하였으며,

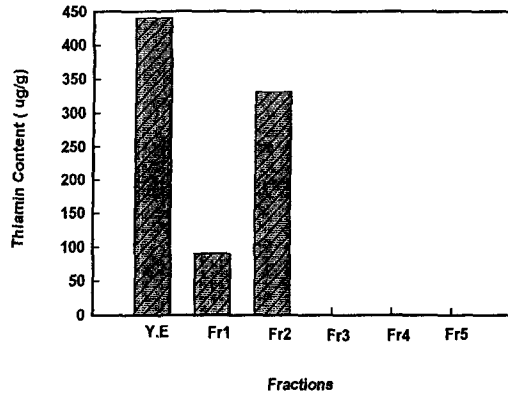


Fig. 4. Concentration of thiamin in yeast extract and each fractions

Fraction I에는 전체 량의 20%에 상당하는 87 μ g, Fraction II에는 전체량의 76%에 상당하는 332 μ g의 티아민이 함유되어 있었다. 그러나 Fraction III, IV, V에서는 티아민이 전혀 검출되지 않았다. 이상으로 Table 2와 Fig. 4의 결과를 종합하면 표고버섯의 자실체 형성에 가장 효과적인 Fraction II(Table 2의 결과)는 티아민 함량이 효모추출물 전체 티아민의 76%가 집중(Fig. 4의 결과)되어 있는 것으로 보아 효모추출물이 버섯 자실체의 발생을 촉진한 결과는 효모추출물 중에 함유되어 있는 티아민의 효과인 것으로 사료된다.

티아민이 Fraction II에 집중되어 있음에도 불구하고 Fraction II보다 고분자 영역인 Fraction I에 티아민이 함유되어 있는 것은 생체대사 중에서 티아민은 단백질과 결합된 상태(21)로 이송되기 때문에 Fraction I에 존재하는 티아민은 thiamin binding protein(TBP)의 상태인 것으로 사료된다.

티아민이 자실체 형성에 미치는 영향

지금까지 각종 버섯의 균사성장을 위하여 여러 가지 촉진물질에 관한 많은 연구가 이루어져 왔으나, 실용적으로 사용되지 못한 경우가 많다. 그 이유로는 버섯생장의 경우 균사성장과 자실체 형성의 과정에 있어 촉진물질이 서로 상의한 경우가 많기 때문에 균사성장 촉진물질이 버섯의 균사성장은 촉진시키나 자실체 형성에는 전혀 영향을 주지 않는 경우가 많다. 그러므로 표고버섯의 균사성장 및 자실체 발생에 미치는 티아민의 영향을 조사할 목적으로 시판중인 염산티아민(Sigma Co. USA)을 구입하여 효모추출물 중에 함유되어 있는 티아민량과 동등한 농도가 되도록 염산티아민(1.45mg/l)을 PG배지에 첨가하여(PGT배

지) 70일 동안 정치배양 한 결과를 Table 3에 나타내었다. 대조구로서는 PG배지 및 PG배지에 효모추출물을 2.5g/l 첨가한 PGY배지를 사용하였다. PG배지에서는 표고버섯 자실체가 전혀 형성되지 않았지만, PGT배지에서는 80%, PGY배지에서는 100% 자실체가 형성되었다. 이상의 결과로부터 티아민은 표고버섯의 자실체 형성에 직접적인 영향을 주는 촉진물질이라는 것이 판명되었다. PGY배지가 PGT배지 보다 자실체 발생율이 약간 높게 나타난 것은 효모추출물 중에 티아민 외에 버섯의 생육에 유익한 여러 가지 물질이 존재하기 때문으로 사료된다.

Table 3. The effects of thiamin and yeast extract on the fruit body formation of *L. edodes*.

Medium	% of cultures with fruiting
PGY	100
PGT	80
PG	0

PGY; Yeast Extract was added to basal peptone-glucose liquid media at 2.5g/l. PGT; Thiamin was added to basal peptone-glucose liquid media at 1.45mg/l. PG; peptone-glucose liquid media.

티아민이 균사성장에 미치는 영향

다음으로는 PG, PGY, PGT의 3종류 액체 배지를 사용하여 티아민이 표고버섯의 균사성장에 미치는 영향을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다.

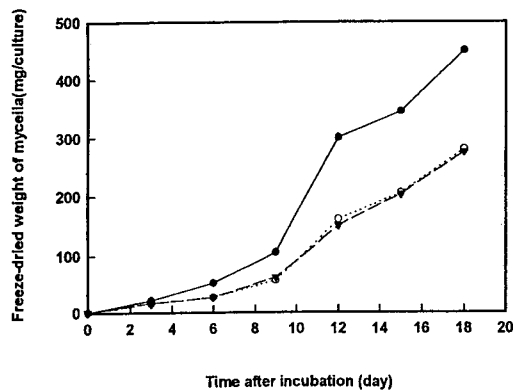


Fig. 5. Effects of thiamin and yeast extract on mycelial growth in peptone-glucose media.
●PGY media, ○PGT media, ▼PG media

PGY배지에서는 균사성장이 왕성하였으나 PGT배지와 PG배지와는 큰 차이는 없었다. 티아민을 첨가한 PGT배지와 첨가하지 않은 PG배지 상에서는 균사성장이 저조하였다. PGT배지와 PG배지에서 균사성장의

차이가 나타나지 않는 것으로 보아 티아민은 표고버섯 균사 성장에는 그 직접적인 영향이 없는 것으로 생각된다. 또한 PGY배지가 다른 두 배지보다 균사 성장이 왕성한 것은 효모추출물 중에 함유되어 있는 티아민 외의 각종 유용 물질들로 인한 상승효과라고 생각된다(22). 효모로부터 분리한 추출물 중에는 티아민 이외에도 SP-I가 표고버섯의 균사성장을 촉진한다는 보고(22-25)도 있으며, 또한 파로부터 추출된 핵산 관련물질인 3'-AMP, Adenosin, Adenin등이 표고버섯의 균사성장을 촉진한다는 보고도 많이 있다(26).

이상의 검토 결과, 티아민은 표고버섯의 영양생장기에 해당하는 균사 성장에는 영향을 주지 않으나, 생식생장기에 해당되는 자실체 형성을 촉진하는 것으로 밝혀졌다.

요 약

효모추출물 중에 함유되어 있는 표고버섯 자실체 형성 촉진 물질을 검토한 결과, 그 자실체 형성 촉진 물질은 티아민이었으며, 티아민은 우리의 형태로만 존재하고, 티아민 일인산, 이인산 및 삼인산 에스테르는 존재하지 않았다. 한편, 효모추출물 1g중에 함유된 티아민의 양은 436 μ g이고, 그 전체량의 약 76%에 상당하는 332 μ g의 티아민이 Fraction II에, 약 20%에 해당하는 87 μ g이 Fraction I에 존재하였으며, 이러한 티아민은 표고버섯의 영양생장에는 영향을 주지 않고, 생식생장에 관여하여 자실체의 형성을 촉진한다는 것을 밝혔다.

참고문헌

1. 水野 卓, 川合正編. (1992) "キノコの科學·生化學", 學會出版センター, 229-235
2. 川合正充, (1988) "きのこの利用", 築地書館, 10-15
3. 古川久彦, (1992)きのこ學, 共立出版株式會社, 27-53
4. 中村克載, (1982)キノコの辭典, 朝倉書店, 26~45, 205-211
5. 荒井綜一, (1995) 機能性食品の研究, 學會出版センター, 37-43
6. Kabir Y., Yamaguchi M. and Kimura S. (1987) Effect of Shiitake(*Lentinus edodes*) and Maitake (*Grifola frondosa*) Mushrooms on Blood Pressure and Plasma Lipids of Spontaneously Hypertensive Rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **33**, 341-346
7. Diehle D. A. and Royes D. J., (1986) Shiitake

- cultivation on sawdust : Evaluation of selected genotypes for Biological efficiency and mushroom size, *Mycologia*, **78**, 929-933
8. Hayashi H., Tarui N. and Murao S., (1985) Isolation and Identification of Cyclooctasulfur, a Fruiting-body Inducing Substances by *Streptomyces albulus* To 447, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 101-105
 9. Azuma M., hori K., O-hashi Y., Yoshida M., Horinouchi S. and Beppu T., (1990) Basidifferquinone, a New Inducer for Fruiting-body Formation of a Basidiomycetes *Favolus arcularius* from a *Streptomyces Strain* II. Structure of Basidifferquinone, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1447-1452
 10. Ross I. K., (1982) Localization of Carpophore Initiation in *Coprinus congregatus*, *Journal of General Microbiology*, **128**, 2755-2762
 11. Morimoto N. and Oda Y., (1973) Effects of light on fruit-body formation in a basidiomycete, *Coprinus macrorhizus*, *Plant Cell Physiol.*, **14**, 217-225
 12. Uno I. and Ishikawa T., (1973), Purification and Identification of Cyclooctasulfur, a Fruiting-body Inducing Substance, Produced by *Streptomyces albulus* TO 447, *Journal of Bacteriology*, **113**, 1240-1248
 13. Kawai G. and Ikeda Y., (1982) Fruiting-inducing activity of Cerebrosides observed with *Schizophyllum commune*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **719**, 612-618
 14. 川合源四郎, (1986) *Schizophyllum commune* の字實體形成誘導物質に関する研究, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **60**, 1027-1034
 15. Raper J. and Krongelb G. S., (1958), Genetic and Environmental aspects of Fruiting in *Schizophyllum commune* Fr., *Mycologia*, **54**, 131-137
 16. Leatham G. F., (1983), A Chemically defined Medium for the Fruiting of *Lentinus edodes*, *Mycologia*, **75**, 905-908
 17. Leatham G. F. and Stahmann M. A., (1984) Stimulatory effect of Nickel or Tin on Fruiting of *Lentinus edodes*, *Trans. Br. mycol. Soc.*, **83**, 513-517
 18. 松尾尙洋, アブ・バカル・ビン・モハメド, 目黒貞利, 河内進策, (1992) The Effects of Yeast Extract on the Fruiting of *Lentinus edodes* in a Liquid Medium, *Mokuzai Gakkaishi*, **38**, 400-402
 19. 日本 ビタミン學會, (1983) ビタミン實驗法(II), -水溶性ビタミン-, 55-117
 20. 日本 ビタミン學會, "ビタミン學" 東京化學同人, 9-12
 21. Komai T. and Shindo H., (1974) Structural specificities for the active transport system of thiamin in rat small intestine, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **20**, 179-187
 22. 朝井勇直, (1972) 現代生物學大系 ⑧ 微生物, 中山書店, 26-45
 23. Arai M., Tsuchiya E. and Murao S., (1978) Effect of Protease Inhibitor (SP-I) on the Growth of Various Yeasts, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1429-1430
 24. Terashita T., Oda K., Kono M. and Murao S., (1981) Purification and Some Properties of Carboxyl Proteinase in Mycelium of *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1929-1935
 25. Terashita T., Oda K., Kono M. and Murao S., (1984) Purification and Some Properties of Carboxyl Proteinase in Extract from *Lentinus edodes* Fruit-bodies, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2639-2645
 26. Ohga S., (1988) きのご栽培に関する資源學的研究 (第7報), ネギ煎汁のシイタケ菌生 育促進活性と核酸關連物質, *木材學會誌*, **34**, 745-752

(1999년 9월 8일 접수)