임산에너지 23(2) : 21-28. 2004
J. Kor. For. En. 23(2) : 21-28. 2004

표고 균주의 배양 기간과 자실체 발생 기간에 따른 에르고스테롤 변화와 효소적 특성[1]

김명길[2] · 윤갑희[2] · 박원철[2] · 박현[2] · 최준원[2] · 이재원[2] · 이봉훈[2]

Ergosterol Contents and Enzymatic Characteristics of *Lentinula edodes* During Culture and Fruiting Periods[1]

Myungkil Kim[2], Kabhee Yoon[2], Wonchull Bak[2], Hyun Park[2], Joonweon Choi[2], Jaewon Lee[2] and Bonghun Lee[2]

요 약

표고버섯 톱밥재배시 배양에 의한 중량감소율과 생장기간에 따른 에르고스테롤 정량으로 균사 생장량을 조사하였고, 배양기간과 자실체 발생기간에 따른 균체 외와 균체 내의 효소 특성을 조사하였다. 배양기간에 따른 중량 감소는 산림5호가 농기3호와 산림6호에 비해 낮은 중량감소율을 나타냈다. 에르고스테롤 정량에 의한 균사 생장량 조사 결과, 암배양기간 동안 3균주 모두 균사 생장량이 증가하였으며, 농기3호가 상대적으로 높은 증가율을 보인 반면, 산림5호는 낮은 증가율을 보였다. 농기3호와 산림6호는 명배양기간 동안에 균사 생장량이 최고치에 이르렀으며, 산림5호는 자실체 발생기간 전까지 계속 증가하였다. 배양기간과 발생기간에 따른 균체 외와 균체 내 효소 역가를 측정한 결과, 배양 초기(10일)에는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 분해에 관여하는 CMCase, avicelase, xylanase, glucanase의 역가가 높았고, 배양 10일 후 리그닌 분해에 관여하는 laccase와 Mn-peroxidase의 역가가 높아지는 경향을 나타내었다.

ABSTRACT

Three different strains of ***Lentinula edodes***, Sanlim 5-Ho, Sanlim 6-Ho and Nongki 3-Ho, were cultured in the sawdust media of Mongolian oak(*Quercus mongolica* Fisch) for 90 days under dark and light conditions(each 30 days) and fruiting period(30 days). Weight loss of sawdust media was determined after fungal cultures and the contents of ergosterol in fungal mycelia were quantified by HPLC analysis followed by solvent extraction. Compared with the two other fungal strains(8%), weight loss of Sanlim 5-Ho was slightly lowered to 7%. The level of ergosterol content, a parameter for fungal growth, was continuously enhanced in Sanlim 5-Ho for dark and light incubation periods. However,

1. 접수 2004년 12월 10일 Received on Dec. 10, 2004.
2. 국립산림과학원 임산공학부 화학미생물과 Dev. of Wood Chemistry & Microbiology, Dept. of Forest Products at Korea Forest Research Institute

Sanlim 6-Ho and Nongki 3-Ho recorded the maximized fungal growth under light condition. In fruiting periods the ergosterol contents were lowered in the three strains. Intra- and extracellular enzymes during cultural and fruiting periods were also characterized. The activity of Mn-peroxidase and laccase, which are characteristics enzymes for white rot fungi as lignin degrading enzymes, were determined as a high level overall the periods. As cellulose degrading indicators, the activity of CMCase, avicelase, xylanase and glucanase were detectable in initial incubation period.

Keywords : *Intracellular enzyme activity, extracellular enzyme activity, weight loss of sawdust medium, ergosterol, Lentinula edodes*

서 론

표고버섯은 목재의 성분인 리그닌을 주로 분해하는 백색 부후균 중의 하나로 보통 참나무 류에 접종하여 자실체를 발생시켜 주요한 산림의 고부가가치 소득원으로 사용해 오던 식용 버섯이다. 그러나 원목재배는 원목 공급과 인력 소요 때문에 사용이 제한되어 있고, 작업이 상대적으로 용이하고 톱밥을 이용할 수 있다는 장점을 가진 표고버섯 톱밥 배지의 사용 추세가 급속히 확산되고 있는 실정이다. 톱밥 배지 재배는 무엇보다도 우수한 종균을 확보하는 것이 시급하지만 종균 개발과 더불어 이미 확보해 놓은 톱밥용 종균의 형태학적 특성[6]이나 영양원별 특성 외에 생리적 특성[13,14] 중의 하나인 효소적 특성을 살펴보는 것도 중요하다.

표고 균주는 생장하는 과정 중에 외부의 자극에 의해 세포 외로 효소를 분비하여 배지 내의 성분을 분해하는 것으로 보이나, 때로는 세포 내에서도 미생물 대사 중의 하나로 효소를 분비하여 1차 대사 과정을 거치는 것으로 널리 알려져 있다[7].

표고버섯의 배양 기간동안의 효소 변화에 대한 결과에 따르면 배양 기간에는 셀룰로오스와 리그닌을 분해하는 효소에 의한 영향이 크고, 발생 기간 중 초기에는 역시 배지 내의 탄수화물 성분을 분해하는 효소의 역할이 크다가 점차로 배지 내의 질소 성분을 이용하여 자실체 형성에 관여하는 단백질 분해 효소가 주요한 역할을 한다[1,12].

한편, 표고 균주의 생장량을 확인하는 일반적인 지표로서 중량 감소율을 측정하였으나 상대 습도의 변화와 배양 시 발생되는 분해수로 인해 톱밥 재배 시 정확한 지표로 사용할 수 없는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 보완할 수 있는 대체 방법 중의 하나인 에르고스테롤 정량법[3,8,9,10]은 에르고스테롤을 측정함으로써 균사 생장을 가장 정확하게 알려 주는 지표라 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 국립산림과학원에서 보유하고 있는 대표적인 톱밥 배지 종균으로 이용되고 있는 균주들의 배양과 자실체 발생 기간에 따른 표고 톱밥 배지 내에서의 균사 생장량과 효소적 특성을 고찰하였다.

재료 및 방법

1. 배양과 발생

공시균주는 국립산림과학원에서 보유하고 있는 톱밥배지용 표고 균주인 산림5호(KFRI 208), 산림6호(KFRI 406), 농기3호(KFRI 192)를 사용하였으며, 1000ml의 종균병에 500g의 신갈나무(*Quercus mongolica Fisch*) 톱밥배지(톱밥:미강:면자각:설탕:석고=68:20:10:1:1, 함수율, 60%)를 넣고 살균 후 접종하여 시료로 사용하였으며, 표고균주의 배양기간은 암배양기간(30

일)과 명배양기간(30일)으로 발생기간은 30일로 하였다.

2. 균사 중량 감소율과 에르고스테롤 정량

중량 감소율은 배양기간에는 10일 간격으로 측정하였고, 발생기간에는 수분 첨가로 인하여 측정하지 않았다.

에르고스테롤을 정량하기 위해 톱밥배지(10g)에 메탄올 50ml를 가해 10분 동안 sonicate하여 상등액을 취하고 나머지 잔사에 새로 메탄올 50ml를 다시 첨가하여 10분간 sonicate를 반복하였다. 메탄올 추출액은 에탄올 20ml와 수산화칼륨 10g을 넣어 80℃에서 1시간동안 진탕하면서 검화 시켰다. 검화된 용액에 증류수 50ml를 첨가한 후 헥산 (50ml × 2)으로 추출하였다. 추출액은 농축한 후 메탄올(2ml)에 녹여 HPLC 분석 전까지 -20℃에서 보관하였다. HPLC 분석은 Waters symmetry C18 reverse phase column(4.6mm × 250mm)이 장착된 Hewlett Packerd 1100 Series 기종을 사용하였다. 이동상 용매는 98% 메탄올을 상온에서 1ml/min의 유속을 균일하게 사용하였으며 280nm상에서 ergosterol의 분석을 실시하였다. 정량분석을 위한 검량선은 ergosterol 표준품(sigma, E6510)을 사용하여 위의 조건 하에서 작성하였다.

3. 균체 외와 균체 내 효소 특성

표고균주의 균체 외 조효소액을 얻기 위하여 0.1M McIlvaine 완충액(pH 6.0)을 가하여 3시간동안 4℃에서 추출, 여과 후 원심 분리하여 상등액을 취하고, 균체 내 조효소액은 같은 조건 하에서 5분 동안 호모게나이저로 분쇄하여 여과 후 원심분리하여 상등액을 취하여 역가측정을 하였다.

CMCellulase는 carboxyl methyl cellulose (CMC-Na)를 0.1M sodium acetate(pH 5.0) 완충액에 넣어 환원당 정량법으로 계산하여 측정하였고, Avicelase는 avicel-PH 101를 같은 완충액에 넣고 환원당 정량으로 계산하였다. β-1, 3-glucanase, amylase, xylanase는 0.1M McIlvaine 완충액(pH 5.0)에 기질로 2mg/ml의 laminarin, soluble starch를 넣고 37℃에서 60분간 반응시키고, xylan은 증류수(pH 6.2)에 녹여 환원당 정량법으로 측정하였다. β-N-acetylglucosaminidase는 조효소액(0.2ml)에 4mM p-nitrophenyl-β-d-N-acetylglucosamine(0.2ml)을 0.1M McIlvaine 완충액(pH 4.5)에 넣어 37℃에서 10분간 반응 후 0.2M Na_2CO_3(2.0ml)를 가해 반응을 정지한 다음 측정하였다. Laccase는 조효소액(0.3ml), ABTS (0.15ml)를 0.2M lactate buffer(pH 3.0)에 첨가해 420nm에서 흡광도를 측정하였고, Mn-peroxidase는 조효소액(0.3ml)에 veratryl alcohol(0.3ml) 용액, H2O2(0.05ml)의 용액을 0.1M tartrate buffer(pH 3.5)에 첨가해 310nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 정량은 Bradford법(1976년)에 의거하여 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 균사 중량 감소율과 에르고스테롤 정량

세 균주 모두 중량 감소율 변화의 양상은 비슷하였고, 특히, 암배양기간 동안에 급격한 변화가 있었다. 그 중 산림5호의 중량 감소 변화율이 농기3호와 산림6호에 비해 적음을 알 수 있어(Figure 1) 산림5호의 균사 생장이 다른 두 균주에 비해 느림을 알 수 있었다.

고체 배지 내 균사 생장량을 측정하는 여러 방법 중 육안으로 판단하는 가장 간단한 중량 감소율 변화와 에르고스테롤 양 변화와의 관계가 있는지의 여부를 알기 위해 에르고스테롤 정량을 실시하였다. 살아있는 균사 세포막에서만 발견되어지는 에르고스테롤에 의한 정량분석으로 균사 생장량을 측정한 결과 중량 감소율 변화와 비교되었다. 암배양기간에는 공시 균주 모두 균사 생장량이 증가하기는 하였으나 산림 5호는 낮은 균사 생장 증가율을 보

였다. 농기3호와 산림6호는 명배양 초기에 균사 생장율이 최고치에 이르렀으나 그 이후 감소하였으며, 산림5호는 발생기간 전까지 계속 증가함을 보였다. 이것은 통상 알려진 표고 균주의 암배양기간에 주로 균사의 활력을 보이는 생장기(lag phase)에 도달한 후, 명배양기간에 균사 생장의 안정과 동시에 균막을 형성하는 안정기(stationary phase)에 접어드는 것으로 알고 있으나, 산림5호는 명배양기간에도 계속 살아 있는 균사 생장을 한다는 것에 주목할 수 있었다. 즉, 위의 중량 감소율 변화에서 보는 바와 같이 암배양기간 이후 명배양기간에 보이는 변화율의 양상이 별 차이가 없어 보이나, 에르고스테롤 정량에 의해 균주간의 차이가 뚜렷이 구분되어 토양이나 뿌리 내 형성된 균근의 양을 정량한 다른 연구자들[4,5,11,10]의 결과에서와 같이 균사 생장량의 측정 지표로써 매우 중요한 인자임을 알 수 있었다. 또한, 톱밥 배지를 이용한 표고 균주를 재배할 시 산림5호가 상대적으로 느린 균사 생장을 보이므로 저온시기에 크기가 작은 톱밥 배지 형태에 접종하여 배양하는 것이 효과적이라고 사료되었다(Figure 2).

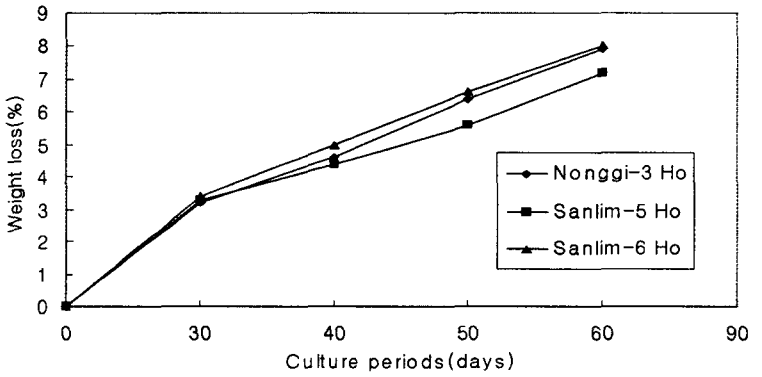

Figure 1. Weight loss of sawdust medium by Lentinula edodes during culture periods.

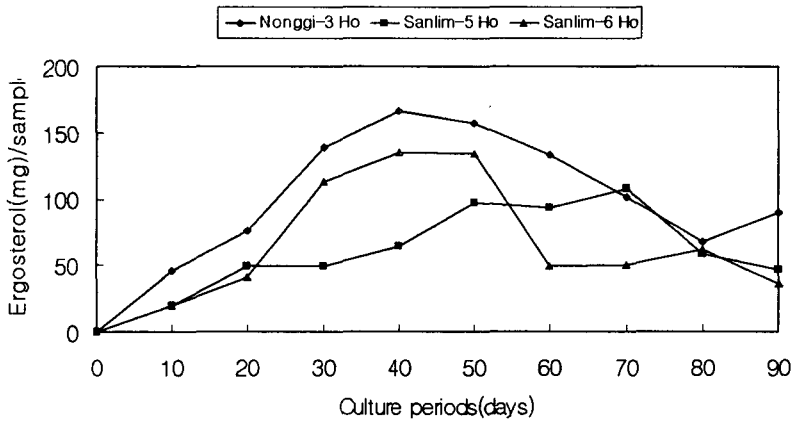

Figure 2. Ergosterol content as fungal biomass of Lentinula edodes during culture periods.

2. 균체 외와 균체 내 효소 특성

농기3호, 산림5호 및 산림6호 균체 외 효소의 배양일수에 따른 역가변화경향은 다음과 같다(Figure 3, 4, 5). 대체적으로 배양 초기에는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 분해하는 CMCase, avicelase, xylanase, glucanase 역가가 나타났으며, 배양 10일 후부터 대표적인 리그닌 분해 효소인 laccase와 Mn-peroxidase의 역가가 점점 높아짐을 알 수 있었다. 특히, Mn-P의 역가는 발생기간 중에도 높은 수치를 나타내었다. Terasita 등(1998)에 따르면 표고 균주는 보통 초기 생장기(lag phase)에 cellulase와 xylanase 역가가 빠르게 증가하다가 자실체 발생 기간까지 그 역가를 유지한다고 하였다. 그러나, 본 연구 결과에서는 농기3호와 산림6호는 명배양기간 중간에 역가를 회복한 듯이 보였으나 다시 낮은 역가를 보인 반면, 산림5호는 초기 생장 이후 계속 낮은 역가를 보였다. 이는 톱밥 재배 시 초기에는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 분해에 관여하다가 자실체 발생 전까지는 백색 부후균의 큰 특징 중의 하나인 리그닌 분해에 주력한다는 것을 알 수 있었다. 이는 백색 부후균 중에서도 표고 균이 다른 균주에 비해 Mn-P의 활성이 매우 높다는 배 등[2]의 연구 결과와 같았으며, 표고 배양 기간 중에 이 효소의 역할과 메카니즘을 조사하는 것이 필요하다고 생각되었다. 그리고, 발생기간에는 효소 역가가 매우 낮아졌는데 이것은 배지 내의 균사 자체의 활력은 떨어지고 생식생장을 하는 상태이므로 효소의 활력이 자실체 형성에 관여하는 부분으로 전이되었을 것으로 생각되어 자실체 발생 기간의 효소 역가 변화 경향을 알아보기 위해 실험이 진행 중에 있다.

또한, 농기3호, 산림5호 및 산림6호 균체 내 효소의 배양일수에 따른 역가변화경향을 균체 내 효소와 비교한 것은 그림 6과 같다. 균체 외 효소와 마찬가지로 배양 초기에 높은 역가를 가지다가 그 이후에는 낮아지며 균체 외 효소에 비해 낮은 역가를 나타내었다.

결론적으로 표고 균주의 톱밥 배지 재배와 관련하여 배양과 자실체 발생 기간동안의 효소적 특성을 살펴 보면, 톱밥 배지 내의 무기 및 유기 영양원 조절이나 배지 크기 조절 및 접종과 배양 시기 조절을 통하여, 초기 배양 시기에는 셀룰로오스 분해 효소의 활성을 높여 주는 조건과 그 이후에는 리그닌 분해력을 높이는 조건 구명이 필요할 것이다.

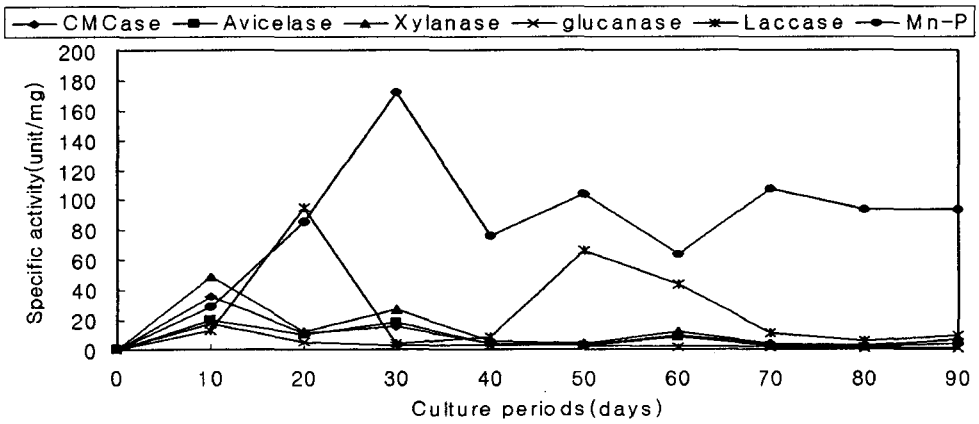

Figure 3. Enzymatic activities of Sanlim 5-Ho in culture medium.

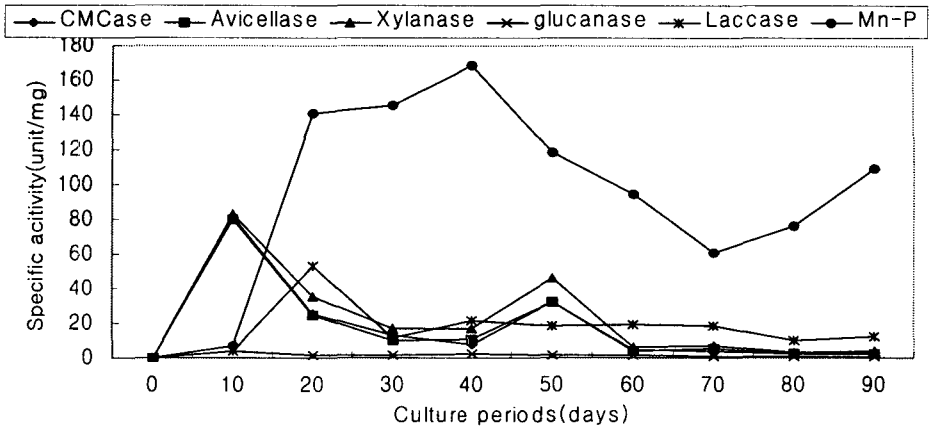

Figure 4. Enzymatic activities of Sanlim 6-Ho in culture medium.

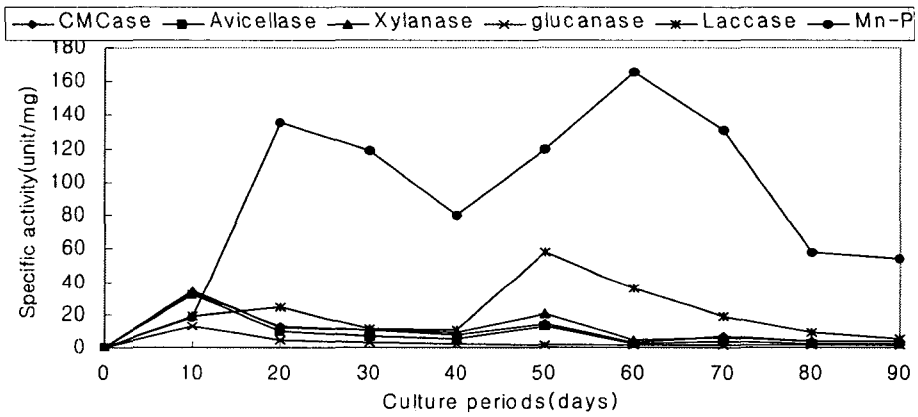

Figure 5. Enzymatic activities of Nonggi 3-Ho in culture medium.

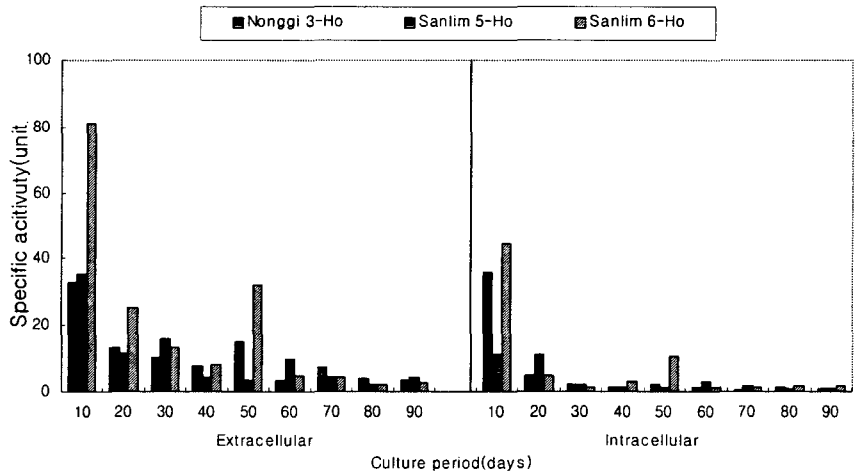

Figure 6. Extra- and intracellular enzymatic activities of CMCase in culture medium

결 론

버섯 재배 시 버섯의 균사 생장량은 중량감소율과 더불어 에르고스테롤 정량법에 의해 측정할 수 있었다. 표고 균주는 배양과 발생기간 동안에 목재 내 구성 성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌을 분해하는 여러 가지 효소의 복합적인 작용에 의하여 분해함을 알 수 있었고, 특히, 자실체 발생기간 중에는 전반적으로 균체 외와 균체 내의 효소 역가가 낮아지는 걸로 보아 배지 내에서보다 자실체 형성에 관여하는 생리활동이 왕성해진 것으로 추론되어 앞으로 자실체 발생과 관련하여 원기 생성 시기부터 자실체 내 효소 역가 변화 경향도 진행할 것이다.

인 용 문 헌

1. Amano, Y., K. Nishizawa, R. Tokoo, T. Matsuzawa and T. Kanda. 1992. Extracellular enzymes produced by *Lyophyllum ulmarium (Hypsizigus marmoreus)* in commercial cultivation. Mokusai kakaishi. 38(4) : 411-416
2. Bae, H. J., O. S. Han, H. B. Koh and Y. S. Kim. 1993. Production of Mn-peroxidase and laccase from *Lentinus edodes* and *Coriolus versicolor*. Mokchae Konghak. 21(3) : 87-93
3. Bermingham, S., L. Maltby and R. Cooke. 1995. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. Mycol. Res. 99(4) : 479-484
4. Davis, M., and R. Lamar. 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. Soil. Biol. Biochem. 24(3) : 189-198
5. Gong, P., X. Guan and E. Witter. 2001. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. Applied soil ecology. 17 : 285-289
6. Han, Y. H., W. T. Ueng, L. C. Chen and S. Cheng. 1981. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* Sing. Mushroom Science XI : 623-647
7. Jablonsky, I. 1981. Changes in biochemical and physiological activities of substrates colonized by fungi *P. ostreatus, L. edodes* and *A. aegerita*. Mushroom science XI : 659-673
8. Martin, F., C. Delaruelle and J. L. Hilbert. 1990. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. Mycol. Res. 94(8) : 1059-1064
9. Reyes, R., F. Eguchi, T. Iijima and M. Higaki. 1998. Regeneration of protoplasts from hyphal strands of *Volvariella volvacea*. J. Wood Sci. 44 : 401-407
10. Salmanowicz and J. Nylund. 1988. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as ameasure of ectomycorrhiza infection in scots pine. Eur. J. For. path. 18 : 291-298
11. Seitz, L. M., D. B. Sauer, R. Burroughs, H. E. Mohr and J. D. Hubbard. 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. phytopathology. 69(11) : 1202-1203
12. Terashita, T., R. Murao, K. Yoshikawa and J. Shishiyama. 1998. Changes in carbohydrase activities during vegetative growth and development of fruit-bodies of *Hypsizygus marmoreus* grown in sawdust-based culture. J. Wood Sci. 44 : 234-235
13. Terashita, T., T. Inoue, Y. Nakaie, K. Yoshikawa and J. Shishiyama. 1997. Isolation and characterization of extra- and intra-cellular metal proteinase produced in the spawn-running process of *Hypsizygus marmoreus*. Mycoscience 38 : 243-245
14. Terashita, T., Y. Yamada, K. Yoshikawa and

J. Shishiyama. 1997. Postharvest activity of hydrolytic enzymes produced during sawdust-based bag cultivation of *Grifola frondosa* in culture waste. Mem. Fac. Agr. Kinki Univ. 30 : 33-40

15. Wallander, H., H. Massicotte and J. Nylund. 1997. Seasonal variation in protein, ergosterol and chitin in five morphotypes of *Pinus sylvestris* L. ectomycorrhizae in a mature swedish forest. Soil. Biol. Biochem. 29(1) : 45-53