

황갈색시루뽕버섯(*Inonotus mikadoi*)의 균사체 배양 최적 조건 및 생리학적 특성

최수정¹ · 김성준¹ · 한영환*

¹동국대학교 대학원 생물학과, 동국대학교 생명과학과

Inonotus mikadoi IMSNU 32058의 최적 균사생장을 위한 배양학적 특성 및 세포효소 활성의 최적 조건을 조사하였다. 균사생장을 위한 최적온도는 27°C였고, 실험한 pH 범위중 pH 4.5에서 최적균사생장을 나타내었다. 사용된 복합배지 중 malt extract media (MEM)와 *Phellinus igniarius media* (PIM)에서 가장 좋은 균사생장을 나타내었다. 최소배지로써 Czapek-Dox 한천배지를 사용하여 탄소원으로 당당류, 이당류 및 다당류를 첨가하였을 때 xylose, raffinose 및 carboxymethyl cellulose (CMC)에서 가장 좋은 생장을 나타내었다. 일반적으로 유기질소원이 무기질소원보다 생장을 더 촉진하였다. 유기질소원으로는 yeast extract, soytone, proteose peptone 및 bacto peptone을 사용하였을 때 균사생육이 우수하였다. 무기질소원으로는 ammonium sulfate를 사용했을 때 균사생육이 촉진되었으며, 가장 우수한 비타민원은 *p*-aminobenzoic acid (PABA)이었다. MEM 액체(pH 4.5) 배지를 이용하여 27°C에서 5일간 배양하였을 때, *I. mikadoi*의 균사의 분비효소 및 균사내 효소의 활성도를 측정하였다. 균사내 분비 효소 중 laccase의 활성도가 다른 효소에 비해 상대적으로 높았다. 균사의 분비 효소도 균사내 분비효소와 마찬가지로 laccase의 활성도가 다른 효소에 비해 상대적으로 높았으며 protease, chitinase 그리고 lipase의 활성도는 낮거나 없었다.

Key words □ exomycelial enzymes, *Inonotus mikadoi*, laccase, mycelial growth

Inonotus mikadoi IMSNU 32058은 담자균류의 소나무비늘버섯과에 속하는 버섯으로 여름에 활엽수, 특히 벗나무의 생목, 고목, 그루터기에 여러 개가 겹치면서 군생하는 목재 백색 공부후성 1년생 버섯이다. *I. mikadoi*는 *Polyporus mikadoi* 혹은 *Inonotus cuticularis* 라는 학명으로 불리기도 한다(5).

Inonotus 속에 속하는 *Inonotus hispidus*(6)는 목재를 분해하며, *Inonotus tomentosus*(3)의 경우에는 tomentosus root disease를 일으킨다는 보고가 있다. 산업폐수로부터 크롬의 처리와 우라늄 축적에 *Inonotus mikadoi*를 사용한다는 보고도 있다(4). 생물학적 공정을 주요한 염색폐수 처리기술 개발을 위한 기초적 연구로서 백색부후균을 이용하기도 하였다(7).

지금까지 다른 백색 부후균을 포함해 *Inonotus* 속은 목재 분해 및 폐수 분해에 대한 연구 등이 일부 이루어져 왔으며, *Inonotus mikadoi*의 경우에는 생리학적 특성에 대한 연구가 이루어지지 않았으며 기초적 연구가 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 *Inonotus mikadoi*를 좀 더 다양하게 이용하고자 균사체 배양을 위한 최적 조건 및 생리학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 재료

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 054-770-2213, Fax: 054-770-2515
E-mail: yhhan@dongguk.ac.kr

본 실험에 사용된 *Inonotus mikadoi* IMSNU 32058은 서울대학교 자연과학대학 미생물연구소(Institute of Microbiology at Seoul National University, IMSNU)로부터 분양 받아 사용하였으며, yeast extract-malt extract-glucose (YMG)배지에서 계대 배양하여 사용하였다. 실험에 사용한 배지용 시약은 Difco사에서, 효소활성 측정에 사용한 기질과 탄소원, 질소원, 비타민원 등의 시약은 Sigma사의 특급 및 일반시약을 구입하여 사용하였다.

배양 조건

균사 생육에 영향을 미치는 물리화학적 조건을 결정하기 위해 yeast extract-malt extract glucose배지(YMG: 0.4% yeast extract, 1.0% malt extract, 0.4% glucose)를 이용하여 배양 온도 및 초기 pH 조건을 각각 결정하였다. 각 영양원 첨가에 따른 균사 생육의 영향을 알아보기 위해 Czapek-Dox 한천배지(CD: 3.0% glucose, 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% NaCl, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O)중에서 탄소원 및 질소원을 제외한 대신 1.0%의 다양한 탄소원, 20 mM의 무기질소원, 0.3%의 유기질소원을 각각 첨가하여 실험하였고, 비타민의 경우 0.5 mg/L의 농도로 첨가하여 결정하였다. 사용한 모든 배지는 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하였다.

균사 생육의 측정

YMG 한천배지에서 전 배양된 균사를 cork borer(diameter, 7 mm)로 떼어내어 한천배지 상에 위치한 후, 27°C에서 3일간 배

양한 다음 성장한 균사의 직경을 측정하였다. 실험은 3회 이상 반복 수행하여 균사 직경의 평균 및 표준편차를 구하여 균사생육의 최적 성장 조건을 결정하였다.

조효소액의 제조 및 효소 활성의 측정

균사내·외 분비 효소의 특성을 알아보기 위해 yeast extract-malt extract-glucose (YMG)배지에서 전 배양된 균사를 cork borer (diameter, 7 mm)로 떼어내어 복합배지 중에서 MEM 액체 배지 100 ml에 접종하였고, 27°C에서 5일간 현탁 배양하였다 (120 rpm). 배양 후 여과지(Toyo No. 2)를 이용하여 균사와 배양액을 분리한 다음 배양여액을 조효소원으로 균사의 분비 α-amylase, β-glucosidase, CMCase, laccase 및 xylanase등의 효소활성을 측정하였다(1). 균사내 효소 측정을 위해서 homogenizer (MR-500-MCA, Braun Co., Germany)를 사용하여 균사를 20초씩 10회 분쇄하였다. French press(Carver C, Fred S. Carver Inc., USA)를 사용하여 15,000 psi의 압력 하에서 완전히 파쇄시킨 후 원심분리를 시키고 그 상등액을 균사내 효소 활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법을 사용하였고(2), 표준곡선은 bovine serum albumin을 사용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

균사체 최적 배양조건

YMG(pH 5.0) 배지에서 3일간 배양했을 때 최적 배양 온도는 27°C이었다(Fig. 1). 배지의 최적 pH를 규명하기 위해서 YMG 배지(27°C)에서 3일간 초기 pH 4.5~10.0으로 배양한 결과, pH 4.5에서 가장 좋은 균사 성장을 나타내었으며(Fig. 2), pH 5.0~10.0의 범위에서도 어느 정도 성장을 관찰할 수 있었으나 산성의 경우에서 더 우수한 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때, 초기 pH 4.5 이하에서도 실험을 진행하여 최적 균사성장 pH를

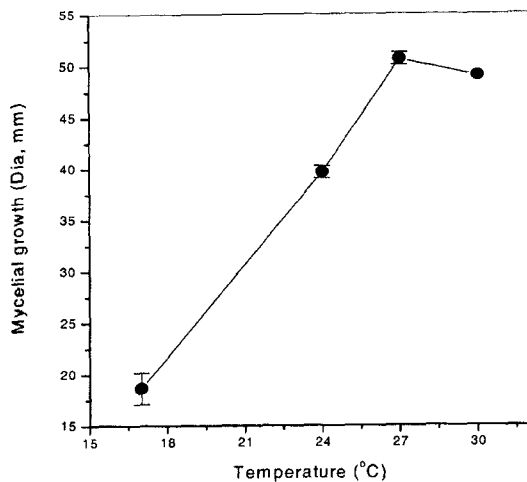


Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *I. mikadoi*. The mycelia were cultivated for 3 days in YMG plate.

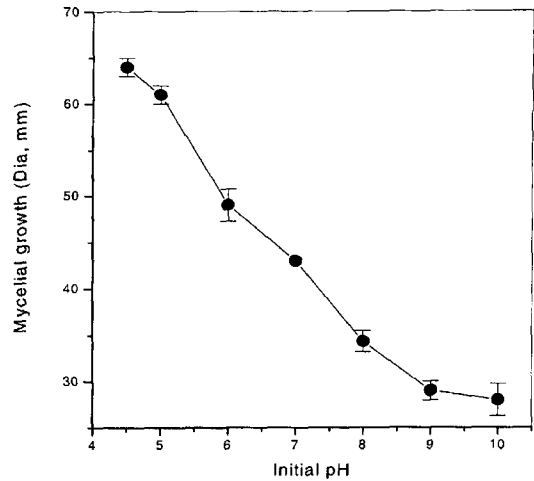


Fig. 2. Effect of initial pH on mycelial growth of *I. mikadoi*. The mycelia were cultivated at 27°C for 3 days in YMG plate.

규명하여야 할 것으로 사료된다. 실험에 사용한 복합배지 중 malt extract media (MEM)와 *Phellinus igniarius media* (PIM)이 가장 좋은 성장을 나타내었으며 YM, PDA, YMG 및 MCM도 비교적 양호한 성장을 나타내었다(Table 1). *Inonotus mikadoi* 생육에 영향을 미치는 탄소원을 결정하기 위해 CD 한천배지에 glucose 대신 각각의 탄소원을 1.0% 첨가하여 실험한 결과 단당류에서는 xylose가 매우 우수한 균사 성장을 나타내었고, glucose도 우수한 성장을 나타내었으며, 이당류에서는 sucrose와 raffinose가 각각 우수하였고 다당류 중에서는 carboxymethyl cellulose (CMC)가 가장 우수하였다(Table 2). CD 한천배지에 20 mM의 무기질소원을 첨가하여 실험한 결과 ammonium sulfate와 ammonium phosphate가 우수한 균사 성장을 보였고(Table 2), 유기 질소원의 영향을 알아보기 위해 0.3%의 다양한 유기 질소원

Table 1. Effect of complex media for enhanced mycelial growth of *I. mikadoi*

Media	Mycelial growth (Dia, mm) ^a	Media	Mycelial growth (Dia, mm) ^a
ACM	52.0 ± 2.0	MMM	53.0 ± 3.5
CDM	49.3 ± 3.2	YMG	68.8 ± 1.2
CDY	40.3 ± 1.5	MMT	51.7 ± 2.1
CVM	62.0 ± 1.0	PDA	67.3 ± 1.5
LEM	61.0 ± 2.0	PIM	67.3 ± 8.1
MCM	65.8 ± 3.8	YM	67.0 ± 2.7
MEM	76.0 ± 1.7		

^aThe values (Dia, mm) are the averages for three replicates. ACM; *Agrocybe cylindracea* medium, CDM; Czapek-Dox medium, CDY; Czapek-Dox yeast extract medium CVM; *Coriolus versicolor* medium, LEM; *Lentinus edodes* medium, MCM; mushroom complex medium, MEM; malt extract medium, MMM; mushroom minimal medium, YMG; yeast extract-malt extract-glucose, MMT; mushroom minimal medium (exception of thiamine HCl), PDA; potato dextrose agar, PIM; *Phellinus igniarius* medium, YM; yeast extract-malt extract medium

Table 2. Effect of carbon, inorganic nitrogen, organic nitrogen and vitamin source on mycelial growth in *I. mikadoi*

Source	Mycelial growth (Dia, mm) ^a	Source	Mycelial growth (Dia, mm) ^a
Carbon source (1.0%)^b			
CD(Control)	35.1 ± 1.2	Maltose	48.7 ± 1.2
Arabinose	49.7 ± 3.8	Mannitol	45.7 ± 3.5
Carboxymethyl cellulose	57.0 ± 1.0	Raffinose	57.0 ± 1.0
Cellulose	49.7 ± 2.1	Starch	46.0 ± 3.5
Erythritol	51.7 ± 0.6	Sucrose	56.3 ± 1.6
Fructose	50.7 ± 4.0	Trehalose	51.3 ± 0.6
Galactose	47.7 ± 2.1	Xylitol	42.7 ± 2.1
Glucose	54.3 ± 0.6	Xylose	60.3 ± 1.5
Lactose	43.3 ± 0.6		
Inorganic nitrogen source (20 mM)			
CD(Control)	33.2 ± 6.3	Calcium nitrate	57.7 ± 7.1
Ammonium chloride	62.0 ± 3.6	Sodium nitrate	61.3 ± 1.5
Ammonium molybdate	10.0 ± 1.2	Sodium nitrite	10.7 ± 1.2
Ammonium phosphate	62.3 ± 5.3	Urea	13.3 ± 0.58
Ammonium sulfate	65.7 ± 1.2		
Organic nitrogen source (0.3%)			
CD(Control)	33.2 ± 6.3	Protease peptone	82.7 ± 2.5
Bacto peptone	83.3 ± 1.5	Soytone	79.0 ± 2.7
Malt extract	72.0 ± 5.3	Yeast extract	78.3 ± 1.5
Vitamin source (0.5 mg/L)			
CD(Control)	52.3 ± 2.1	PABA	71.0 ± 9.5
Biotin	59.7 ± 4.0	Pyridoxine	55.7 ± 1.2
Folic acid	50.0 ± 1.4	Riboflavin	55.3 ± 4.7
Nicotinic acid	50.0 ± 6.1	Thiamine	53.3 ± 1.4

^aThe values (Dia, mm) are the averages for three replicates

^bThe mycelia were grown at 27°C for 3 days in Czapek-Dox agar plate (pH 4.5) supplemented with 1.0% each carbon source.

을 첨가하여 실험한 결과 protease peptone과 bacto peptone에서 우수한 균사 생장을 나타내었다(Table 2). 대조군으로 CD 한천 배지에서 탄소원 및 질소원을 제외하고 배양하였을 때 균사생장이 나타난 것은 전 배양된 배지를 영양원으로 이용했기 때문인 것으로 사료된다. 최적 비타민원으로는 *p*-aminobenzoic acid (PABA)가 균사 생장에 가장 우수하였다(Table 2).

세포내외 효소 활성

최적 균사 생장 복합 배지인 MEM 액체 배지를 이용하여 배양된 *I. mikadoi* IMSNU 32058의 세포외 분비 효소 및 세포내 효소의 활성도를 측정한 결과, 2.90 U/mg · protein 으로 laccase의

Table 3. The specific activities of exomycelial and endomycelial enzymes of *Inonotus mikadoi*

Enzyme	Specific activity (U/mg-protein)	
	Exomycelial	Endomycelial
α-Amylase	0.347	0.086
β-Glucosidase	0.009	0.011
CMCase	0.013	0.005
Protease	0	0
Xylanase	0.062	0.016
Chitinase	0	0
Lipase	0	0
Laccase	2.889	N/A*

* Not available

효소 활성도가 가장 우수하였고, 0.35 U/mg · protein으로 α-amylase 효소 활성도가 우수하였다. β-glucosidase, CMCase 및 xylanase는 상대적으로 낮은 활성도를 나타내었으며, 측정된 세포외 분비 효소의 활성도가 세포내 효소 활성도에 비해 전반적으로 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 lignin 분해 활성능이 있는 백색 부후균들이 일반적으로 laccase 효소 활성이 높은 것과 일치하는 결과이다. 그러나 protease, chitinase 및 lipase의 활성도는 없었다(Table 3).

참고문헌

1. 이창윤, 홍운표, 정명준, 한영환. 1998. 송이균(*Tricholoma matsutake*) 배양액의 세포외 효소 활성. 한국균학회지 26, 496-501.
2. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
3. Hunt, R.S. and T. White. 1998. First report of *Inonotus tomentosus*, the cause of tomentosus root disease, from the Yukon Territory. *Plant Dis.* 82, 264.
4. Nakajima, A. and T. Sakaguchi. 1993. Accumulation of uranium by basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 574-578.
5. Park, W.H. and H.D. Lee. 1999. Illustrated book of Korean Medicinal Mushrooms. Kyo-Hak publishing Co., Ltd. Pp 550-552.
6. Schwarze, F.W., M.R.D. Lonsdale, and S. Fink. 1995. Soft rot and multiple T-branching by the basidiomycete *Inonotus hispidus* in ash and London plane. *Mycol. Res.* 99, 813-820.
7. Won, C.H., J.S. Kim, and S.S. Park. 1998. A study on decolorization of dyes with an Immobilized white rot fungus *Irpex lacteus*. *J. Kor. Envir. Sci. Soci.* 7, 263-267.

(Received May 31, 2004/Acceptd June 9, 2004)

ABSTRACT : Physiological Characteristics and Optimized Culture Condition of the Mycelia of *Inonotus mikadoi*. Soo-Jung Choi¹, Sung-Jun Kim¹, and Yeong-Hwan Han* (¹Department of Biology, Graduate School, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea, Department of Life Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea)

The culture condition and medium composition for the enhanced mycelial growth of *Inonotus mikadoi* IMSNU 32058 were investigated. The optimal temperature and pH for the mycelial growth were 27°C and pH 4.5, respectively. Among the complex media tested, the malt extract medium and *Phellinus igniarius* medium were very good for mycelial growth of *I. mikadoi*. When Czapek-Dox medium was used as a minimal medium for cultivation of mycelia, xylose, raffinose and carboxymethyl cellulose were very excellent as a carbon and energy source. With respect to carbohydrate, sucrose and glucose were very good carbon sources. In general, organic complex nitrogen sources were better than other inorganic ones. As the organic complex nitrogen sources tested, yeast extract, soytone, proteose peptone and bacto peptone were the best as a source of organic nitrogen. When ammonium sulfate as an inorganic source of nitrogen was used, the enhanced mycelial growth was shown. *p*-Aminobenzoic acid was proved to be most appropriate source of vitamin. After the mycelia of *I. mikadoi* was cultivated at 27°C for 5 days in MEM broth (pH 4.5), the activities of both exomycelial and endomycelial enzymes were determined. Among endomycelial enzymes assayed, the specific activity of laccase was much higher than those of other enzymes. When the fungus was grown in MEM broth, exomycelial specific enzyme activity of laccase was comparatively high. However, little or no enzyme activities of protease, chitinase and lipase were found.