

민자주방망이버섯(*Lepista nuda*) 균사체 배양조건 및 효소활성

김상대¹ · 김지혜 · 김종봉² · 한영환*

¹동국대학교 대학원 생물학과, ²대구가톨릭대학교 생명과학전공, 동국대학교 생명과학과

Lepista nuda DGUM 26501의 균사 생육을 위한 배양조건 및 세포의 분비 효소 활성을 조사하였다. 균사 생육을 위한 최적 온도는 24°C였고, pH 7.0~8.0에서 최적 균사 생육을 나타내었다. 적정 균사생육을 위한 산소분압은 10% 이상이였다. 최소배지로 Czapek-Dox 한천배지에 탄소원을 변경하여 첨가시, maltose, sucrose, manitol, xylitol 등이 우수하였다. 유기산으로 gluconate가 가장 우수한 균사 생육을 보여주었다. 전반적으로 유기질소원이 무기질소원보다 균사 생육이 더 우수하였으며, 유기질소원으로 corn steep liquor (CSL), soytone, protease peptone을 사용하였을 때 균사생육이 우수하였다. 사용한 인산원 중 ammonium phosphate, 비타민원으로 pyridoxine, riboflavin, nicotinic acid 첨가시 우수한 균사 생육을 보여주었다. 24°C에서 10일간 배양된 *L. nuda* DGUM 26501의 균사의 분비효소 중 α -amylase의 활성도가 다른 효소에 비해 상대적으로 높았으며, lipase의 활성도는 미미하게 나타났다.

Keywords □ extracellular enzyme, growth, *Lepista nuda*, mycelia

민자주방망이버섯(*Lepista nuda* [Bull. Ex. Fr] Cooke)은 맛과 향이 우수한 송이과 버섯으로, 가을부터 초겨울에 걸쳐 정원 잡목림 내 땅 위에 단생 또는 군생하는 낙엽 분해균이다. 한국, 일본, 중국 등 북반구 일대와 오스트레일리아에 분포한다(8, 9). 갓은 지름 4~12 cm로 평반구형에서 편평형이며, 갓 표면은 평활하고 처음에는 자주색이나 차차 퇴색하여 갈자색이 된다. 주름살은 끝붙은 형이며 뾰뾰하고 처음에는 자주색이나 후에 담황자색이 된다. 대는 4~9×0.8~2 cm로 표면은 자주색이고 기부는 약간 굵다. 포자는 5~7×3~4 μ m로 타원형이며, 표면은 미세한 돌기가 있고, 포자문은 담홍색이다(11).

민자주방망이버섯은 외생균근으로 균체는 식물체로부터 탄수화물의 공급을 받는데, 한편 토양 중의 부식질을 분해하여 유기질소 화합물을 뿌리가 흡수하여 동화할 수 있는 형태로 식물에 공급한다. 또, 뿌리의 표면을 싸고 있는 펠트와 같은 균사의 막은 수분이 뿌리의 주위에서 없어지는 것을 방지하며, 뿌리에 의한 물 흡수를 쉽게 한다(10). 자작나무과, 너도밤나무과, 소나무과 등의 수목 뿌리에 균이 붙어서 생기는 경우가 많다(12).

민자주방망이버섯에 관한 국내외의 연구는 생태학적 연구(5, 6), 자실체의 인공재배(13) 등 연구가 진행되어 왔으나 아직 실용화에 대한 것은 극히 미흡하다. 본 연구는 맛과 향, 색택 및 조직의 치밀성 등에서 우수한 특징을 지닌 민자주방망이버섯의 다양한 식품소재(2)로의 활용과 자실체의 인공재배를 목적으로 균사체 배양을 위한 배양 조건을 규명하였으며, 자실체의 인공재배의 기초 자료로 활용하기 위하여 피세포의 분비효소의 활성을

조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

경상북도 경주시 석장동 동국대학교 뒷산에서 채집한 버섯을 알코올로 닦아내고 조직의 안쪽부분에서 일부분을 떼어 분리 균사를 yeast extract-malt extract-glucose (YMG) 한천 평판배지를 이용하여 계대 배양하여 사용하였다. 효소활성 측정용 시약은 Sigma사제의 특급시약을 사용하였으며, 질소원, 인산원, 복합배지용 시약은 일반 시약 및 Difco사제를 사용하였다.

균사체 배양 조건

균사 생육에 영향을 미치는 물리화학적 조건을 결정하기 위해 YMG 배지(조성: yeast extract 0.4%, malt extract 1.0%, glucose 0.4%)를 이용하여 배양 온도 및 초기 pH 최적 조건을 결정하였다. 각 영양원 첨가에 따른 균사 생육의 영향을 알아보기 위해 Czapek-Dox 한천배지(CD: glucose 1.0%, NaNO₃ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, NaCl 0.05%, KCl 0.05%, FeSO₄ 0.001%, MgSO₄ 0.05%) 중에서 탄소원, 질소원 및 인산원을 제외한 대신 1.0%의 다양한 탄소원, 0.3%의 무기질소원, 0.3%의 유기질소원을 각각 첨가하여 실험하였다. 인산원의 농도는 0.1%를 각각 첨가 하여 실험하였으며, 비타민의 경우 0.5 mg/l의 농도로 첨가하여 결정하였다. 사용한 모든 배지는 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하였다.

균사체 생육 측정

YMG 한천배지에서 전 배양된 균사를 cork borer(diameter, 5

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

mm)를 이용하여 떼어내어 한천배지 상에 위치한 후, 24°C에서 10일간 배양하였다. 성장한 균사의 직경을 mm 단위까지 측정하고 밀도를 관찰하여 균사 생육도를 결정하였다. 실험은 3회 이상 반복 수행하여 균사 직경의 평균 및 표준편차를 구하였다.

산소 농도의 조정

The Gaspak anaerobic system을 이용하여 O₂ 농도와 N₂ 농도를 조정하여 산소분압에 따르는 균사 생육도를 측정하였다. 균사체를 YMG 한천배지의 중앙에 위치하도록 접종하여 24°C에서 10일간 배양 후, 각 산소분압 농도별로 균사 생육의 직경을 mm 단위까지 측정하였다.

세포외 분비효소의 활성 측정

균사의 분비 효소의 특성을 알아보기 위해 LNM 액체배지(조성: sucrose 1%, gluconate 0.1%, corn steep liquor (CSL) 0.4%, NH₄H₂PO₄ 0.1%, (NH₄)₂HPO₄ 0.3%, MgSO₄ 0.05%, KCl 0.05%, F₂SO₄ 0.001%, NaCl 0.05%, nicotinic acid 0.5 mg/l. pH 7.0)에 접종한 다음, 24°C에서 10일간 진탕 배양하였다(120 rpm). 배양 후 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 균사와 배양액을 분리한 다음 배양 여액을 조효소원으로 균사의 분비 α-amylase, β-glucosidase, CMC(CMC; carboxy methyl cellulose), laccase 및 xylanase의 효소 활성을 측정하였다(4). 효소의 비활성도(specific activity) 측정을 위한 단백질 정량은 Bradford 방법(1)을 사용하였고, 표준곡선은 bovine serum albumin을 사용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

동국대학교 경주캠퍼스 주변(경상북도 경주시 석장동, 상수리 나무 및 아카시아 혼합림)에서 채집한 균주를 전보의 Lee 등(3, 5, 7)의 방법으로 분리 동정하여 *Lepista nuda* DGUM 26501로 명명하였다(Fig. 1).

온도, pH 및 산소 분압의 영향

YMG배지에서 3일간 배양했을 때 균사생육을 위한 최적 온도

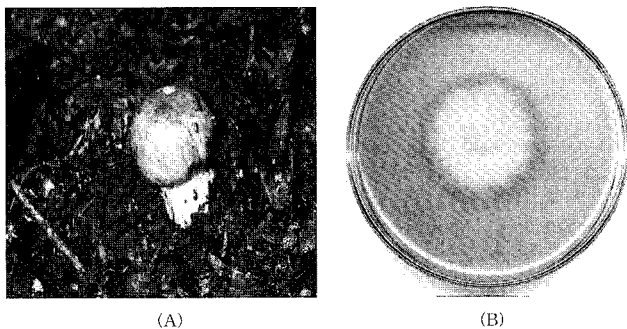


Fig. 1. Morphological features of fruting body (A) and the mycelial colony (B) of *L. nuda* DGUM 26501.

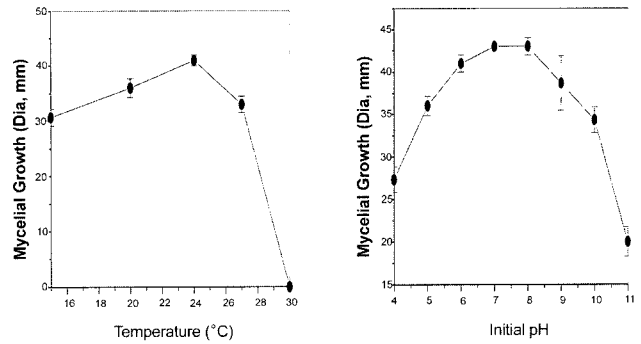


Fig. 2. Effect of temperature and initial pH on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501, respectively. The mycelia were cultivated for 10 days in YMG agar plate.

는 24°C이었다(Fig. 2). 배지의 최적 pH를 규명하기 위해서 YMG배지(24°C)에서 10일간 초기 pH 4.0~11.0으로 배양한 결과, pH 7.0~8.0에서 가장 좋은 균사 성장을 나타내었으며(Fig. 2) 약 산성에서도 어느 정도의 성장을 관찰할 수 있었으나 높은 pH에서의 균사생육은 저조하였다. 산소의 농도를 0~21%의 농도로 조절하여 균사 성장을 관찰한 결과, 10%이상에서 균사 생육이 우수한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3).

탄소원, 질소원, 인산원 및 비타민의 영향

Lepista nuda DGUM 26501 생육에 영향을 미치는 탄소원을 결정하기 위해 CD 한천배지에 각각의 탄소원을 1.0% 첨가하여 실험한 결과, 단당류에서는 mannitol과 xylitol에서 우수한 균사 성장을 나타내었고, 이당류에서는 maltose와 sucrose가 각각 우수하였고 다당류 중에서는 CMC와 starch에서 가장 우수하였다. 본 결과는 CMC의 기질 사용 가능성으로 자실체의 인공재배가 가

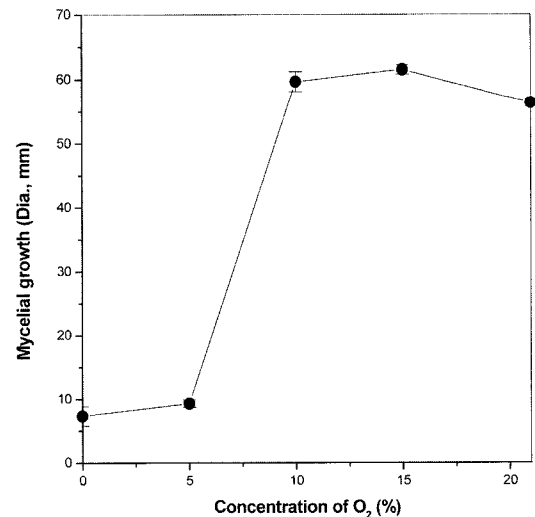


Fig. 3. Effect of oxygen on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501. The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

능함을 내포하며, 또한 starch 사용시 우수한 균사생육 결과는 곡류를 이용하는 식품소재 개발이 가능함을 나타내준다. 유기산에서는 gluconic acid에서 가장 우수한 균사생육을 나타내었다 (Table 1). CD 한천배지에서 0.3%의 무기질소원을 첨가하여 실험한 결과 ammonium phosphate에서 우수한 균사 생장을 보였고, 유기 질소원의 영향을 알아보기 위해 0.3%의 다양한 유기 질소원을 첨가 한 실험한 결과 CSL, soytone 및 protease peptone에서 우수한 균사 생장을 나타내었다 (Table 1). 인산원에서는 ammonium phosphate에서 우수한 균사 생육을 관찰할 수 있었다 (Table 1). 최적 비타민원으로는 nicotinic acid, riboflavin 및

Table 1. Effect of carbon, organic acid, inorganic nitrogen, organic nitrogen, phosphorus and vitamin sources on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501^a

Source	Mycelial growth (Diameter, mm) ^b	Source	Mycelial growth (Diameter, mm) ^b
Carbohydrate (1.0%)			
Lactose	24.0±0.0	Cellulose	43.3±12.6
Starch	42.7±7.2	Trehalose	38.3±0.6
Glycerol	40.0±1.0	Maltose	57.0±3.6
Xylitol	58.0±1.0	Fructose	31.0±0.0
Mannitol	58.0±2.6	Galactose	16.3±1.5
CMC	43.7±1.2	Xylose	20.0±0.0
Erythritol	30.0±2.0	Sucrose	54.0±1.7
Glucose	37.3±1.2		
Organic acid (0.1%)			
Formate	7.7±0.6	Oxalate	10.3±0.6
Lactate	35.7±0.6	Fumarate	27.0±1.0
Acetate	8.3±1.5	Citrate	18.0±1.0
Succinate	26.7±0.6	Gluconate	39.0±2.6
Inorganic nitrogen (0.3%)			
Urea	22.7±0.6	NH ₄ -molybdate	22.3±1.2
NaNO ₂	28.3±0.6	NH ₄ Cl	37.7±1.5
NaNO ₃	36.0±1.0	(NH ₄) ₂ SO ₄	39.7±2.1
NH ₄ -Phosphate	43.5±0.7	Ca(NO ₃) ₂	29.7±0.6
(NH ₄) ₂ CO ₃	14.3±3.2		
Organic nitrogen (0.3%)			
CSL	53.0±0.0	Peptone	45.3±1.5
Tryptone	51.0±2.6	Protease peptone	50.0±0.0
Yeast extract	35.0±1.4	Malt extract	45.3±2.9
Soytone	53.3±0.6		
Phosphorus (0.1%)			
CaH ₃ PO ₄	42.0±1.7	Na ₂ HPO ₄	39.5±2.1
K ₂ HPO ₄	42.3±2.1	NH ₄ H ₂ PO ₄	48.0±4.6
KH ₂ PO ₄	40.0±0.0	(NH ₄) ₂ HPO ₄	48.3±0.6
NaH ₂ PO ₄	41.0±3.0		
Vitamin (0.5 mg/L)			
Folic acid	44.0±2.6	Riboflavin	48.0±1.7
p-aminobenzoic	41.0±1.0	Pyridoxine	48.0±1.0
Nicotinic acid	48.0±1.0	Thiamine	47.3±2.1

^aThe mycelia were grown at 24°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate (pH 7.0).

^bThe values (Diameter, mm) are the averages for three replicates.

Table 2. The specific activities of extracellular enzyme of *L. nuda* DGUM 26501

Enzyme	Specific activity (U/mg · protein) ^a
α-Amylase	8.17±1.79
β-Glucosidase	0.28±0.03
CMCase	0.35±0.09
Xylanase	0.15±0.03
Exo-β-1,4-glucanase	0.14±0.02
Laccase	0.48±0.03
Lipase	0.01

^aThe values are the averages for three replicates.

pyridoxine을 첨가하였을때 균사 생장이 가장 우수하였다 (Table 1).

세포의 효소 활성

LNM 액체 배지를 이용하여 24°C에서 10일간 배양된 *L. nuda* DGUM 26501의 세포의 분비 효소의 활성도를 측정된 결과, 8.17±1.79 U/mg · protein으로 각각의 효소 중 α-amylase의 효소 활성도가 가장 우수하였다. Lee 등(4)이 보고한 송이(*Tricholoma matsutake*) 균사체 배양액에서 α-amylase의 효소 활성이 높은 결과와 유사하였다. 이 결과는 송이과 버섯인 민지주방망이버섯의 식품소재로의 활용시 고체 배양용 기질로 곡류 사용 가능성을 나타내 준다. β-glucosidase, CMCase, laccase는 α-amylase 비해 상대적으로 낮았으며, lipase는 거의 활성이 없는 것으로 나타내었다 (Table 2).

감사의 말

본 연구는 농림부 농림기술개발연구과제의 연구비에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 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.
- Hashioka, Y. and I. Arita. 1978. Mushroom Science X (part II). Naturalization of several saprophytic mushrooms under rice-straw-culture. pp. 127-135. In: J. Delmas (ed.), Proc. Tenth Int. Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, France.
- Lee, C.Y., O.P. Hong, M.J. Jung, and Y.H. Han. 1997. Effect of carbon sources and vitamin on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Kor. J. Mycol.* 25, 226-232.
- Lee, C.Y., O.P. Hong, M.J. Jung, and Y.H. Han. 1998. The extracellular enzyme activities in culture broth of *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Mycol.* 26, 496-501.
- Lee, S.S. and K.J. Choi. 1995. Solid culture of *Lepista nuda*. *Kor. J. Mycol.* 23, 105-113.
- Lee, S.S., K.J. Choi, and C.H. Oh. 1996. Sawdust cultures of *Lepista nuda*. *Kor. J. Mycol.* 25, 274-279.
- Lee, S.S. and C.K. Sung. 1997. The mycelia isolate from the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 25,

- 121-129.
8. Modess, O. 1941. Zur kenntnis der mykorrhizabildung von kiefer und fichts. *Symb. Bot. leps.* 1, 1-147.
 9. Norkrans, B. 1950. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. *Bot. Ups.* 11, 1-126.
 10. Park, W.H. 1991. Colored Fungi of Korea. Kyo-Hak Pub. Co. Ltd., Seoul.
 11. Park, W.H. and H.D. Lee. 1999. Illustrated Book of Korea Medicinal Mushrooms. Kyo-Hak Pub. Co. Ltd., Seoul.
 12. Scott, K.G. 1998. Characteristics of Australian edible fungi in genus *Lepista* and investigation into factor affecting cultivation. Ph. D. Thesis. Univ. of Western Sydney, Hawkebur.
 13. Wright, S.H. and W.A. Hayes. 1978. Nutrition and fruitbody formation of *Lepista nuda* (Bull. Ex. Fr) Cook. *Mushroom Science*. X, 873-884.

(Received May 16, 2005/Accepted August 9, 2005)

ABSTRACT : Mycelial Culture Conditions of *Lepista nuda* and Extracellular Enzyme Activity

Sang-Dae Kim¹, Ji-Hye Kim, Jong-Bong Kim², Yeong-Hwan Han* (¹Department of Biology, Graduate School, Dongguk University, Seoul 100-715, ²Department of Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, *Department of Life Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea)

The culture condition and medium composition for the enhanced mycelial growth of *Lepista nuda* DGUM 26501 were investigated. The optimal temperature and pH for the mycelial growth were 24°C and 7.0~8.0, respectively. The partial pressure of oxygen for the enhanced mycelial growth was more than 10% O₂. When Czapek-Dox medium was used as a minimal medium, manitol and xylitol were very good carbon sources. Organic nitrogen sources were better than inorganic ones for mycelial growth. As the nitrogen source tested, corn steep liquor, soytone and protease peptone were the best as a source of organic nitrogen sources. When ammonium phosphate as phosphorus sources was used, the enhanced mycelial growth was shown. Nicotinic acid was proved to be the most appropriate source of vitamin. After the mycelia of *L. nuda* DGUM 26501 was cultivated at 24°C for 10 days in LNM broth (pH 7.0), the activities of extracellular enzyme were determined. The specific activity of α -amylase was much higher than those of other enzymes. However, little or no enzyme activities of β -glucosidase, CMCcase, laccase and lipase were found.