ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2012** Vol. 22. No. 6. 837~843 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.6.837

Comparison of Endo-, Exo-Cellular Enzyme Activity for New Strains of *Hypsizygus marmoreus*

Chang-Yun Lee[1,3], Ho-Sung Song[1], Hyeon-Su Ro[2], Ju-Ri Woo[3], Young-Hyun You[3] and Jong-Guk Kim[3]*

[1]*Greenpeace Mushroom Co, Cheongdo 714-852, Korea*
[2]*Department of Microbiology and Research Institute of Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[3]*Department of Life Sciences and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

Received April 11, 2012 / Revised May 28, 2012 / Accepted May 30, 2012

This study was carried out to investigate the morphological and physiological characteristics of six new cultivars of *Hypsizygus marmoreus* (Hm) and measure endo-, exo-cellular enzyme-specific activity. The domestic wild stain (Hm3-10) and commercial strain in Japan (Hm1-1) were mated by crossing monokaryon mycelia. We gained 58 strains from one of 400 crosses through the 1st cultivation experiment, and selected six strains from one of 58 strains through the 2nd cultivation experiment. When six of the selected new strains were grown during several spawn culture periods (60, 70, 80, 90, and 100 days), a spawn culture period of more 80 days was considered to be excellent as being shorter than 19~20 days. Therefore, we determined the period of spawn culture as 80 days. Three strains such as Hm15-3, Hm15-4, and Hm17-5 showed an excellent result. When endo-cellular enzyme activity measured eight strains, we obtained a result of that specific activity of α-amylase at the highest as 73.9~102.2 unit/mg protein, and chitinase is lower than α-amylase at 8.1~13.1 unit/mg protein. When exo-cellular enzyme activity measured eight strains, we determined the result of that specific activity of α-amylase is the highest at 5,292~1,184 unit/mg protein, and CMCase and xylanase were 1,140~245 unit/mg protein, 94~575 unit/mg protein, compared to each other. However, the enzyme activity of β-glucosidase and chitinase is low.

Key words : *Hypsizygus marmoreus*, α-amylase, CMCase, enzyme activity, new cultivars

서 론

느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus* (Peck.) Bigelow)은 서양에서 "beech mushroom"으로, 일본에서는 "Bunashimeji"로 불리우며, Basidiomycetes, Agaricales, Tricholomataceae에 속하는 식용버섯이다. 동아시아, 유럽 그리고 북아메리카에 분포하고, Beechtree 또는 willow와 같은 활엽수의 죽은 나무 그루터기에서 자란다.

느티만가닥버섯 자실체에 함유되어있는 Hypsin은 항진균 활성과 항종양 효과를 가지며[14], Collagen-binding protein인 HM23 [21]과 높은 항암활성을 가지는 Hypsiziprenol A9[2] 과 다당류들을 함유하고 있은 유용한 식품으로 인정받고 있다[8].

느티만가닥버섯은 독특한 조직감을 가지고 있으며, 맛이 뛰어난 버섯으로 한국을 비롯하여 중국, 일본 그리고 대만에서 대중적인 버섯으로 인식되고 있으며, 저지방 고단백 식품으로 특히, 단백질을 구성하는 아미노산 중에서 지미 성분을 갖는 glutamic acid가 다량 포함되어있는 것이 특징이다[12].

느티만가닥버섯은 주로 고체 배지를 함유한 850 cc용량의 Polypropylene bottle를 이용하여 재배가 이루어지고 있으며, 주요 재배적인 특성으로는 종균 배양일수 가100~120일 소요되고 재배일수는 20~25일 소요되어 대표적인 병재배 버섯인 새송이버섯과 팽이버섯에 비해 2배 이상의 재배기간이 소요되므로 재배 기간을 단축시키는 재배기술의 개발과 품종의 개발이 시급하다.

재배기간을 단축시키기 위해 종균 배양 기간 중에서 일반적인 버섯과는 달리 느티만가닥버섯은 숙성기간을 요구하므로 이러한 숙성기간을 단축할 수 있는 배지재료의 개발과 원기형성 방법의 개선을 위한 연구가 진행되었으며, 배지재료에 함유되어 있는 Mineral 성분 중에서 재배 기간 중에 자실체로 전이되는 미네랄의 종류와 양을 조사한 보고가 있었다[3,16]. 버섯 재배에서 사용되는 배지재료의 종류와 품종에 따라 쓴맛의 편차가 있어 인공재배를 수행할 때 배지재료의 선정과 품종의 선정이 중요한 것으로 보고 되어 있다[5].

버섯은 cellulose, pectin 과 starch와 같은 polymeric compound를 분해할 수 있는 다양한 효소를 생산하고[25], 이러한 효소들에 의해 버섯재배에 주로 사용되는 농업부산물인 sawdust, concob, rice bran 등의 고분자 물질을 분해하여 저분자 상태로 변환하여 버섯을 발생시키고 포자를 생성하는 영양분으로 이용된다.

이러한 특징들로 인해 extracellular enzyme의 활성도를 간

***Corresponding author**
Tel : +82-53-950-5379, Fax : +82-53-955-5379
E-mail : kimjg@knu.ac.kr

편하게 검증하기 위하여 chromogenic media를 이용 방법으로 Proteins, xylan, starch, lipid등을 분해하는 유용한 효소를 생산하는 것으로 잘 알려진 *Penicillium* [18]의 extracellular enzyme 활성도를 chromogenic 반응으로 검증하였고[24], *Ophiostoma*와 *Leptographium*의 Cellulolytic 활성을 탐색하였다[7]. 특히, 재배기간이 3년 이상이 소요되어 신품종 육종에 오랜 시간이 소요되는 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 육종 효율을 증진시키기 위해 우수한 성능을 가진 단핵균사의 선발을 위해 포자들의 생화학적인 특성을 간편하게 검증하기 위해 단핵균사들의 extracellular enzyme 활성을 검증하는 연구가 보고되어 있다[13].

느티만가닥버섯에 대한 효소학적인 연구는 수확 후 선도유지를 위하여 포장필름에 따른 Proteinase, superoxide dismutase와 polyphenol oxidase의 활성도에 미치는 영향이 조사되었고[23], (60)Co-gamma irradiation을 조사한 후, 저장기간 중에 proteinase, superoxide dismutase와 catalase의 활성을 측정한 결과가 보고되어 있다[22].

느티만가닥버섯의 재배적인 단점인 재배기간이 길어지는 단점을 개선하기 위해 신품종 육종을 수행하였고 그 결과 재배기간이 100일(배양기간 80일, 버섯생육기간 20)로 단축되고 쓴맛이 적은 품종들이 개발되었으며[17], 개발된 품종의 재배에 적합한 배지재료를 탐색하고 효소의 활성과 버섯 품질과의 연관관계를 구명하여 버섯 신품종 육종 과정 중에서 많은 시간을 소요하는 실증재배의 기간을 단축하기 위하여 신품종과 모균주의 endo-celluar enzyme과 exo-cellular enzyme의 활성을 측정하고 효소활성과 실증재배를 통해 재배된 버섯과의 연관관계를 구명하기 위한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

느티만가닥버섯 균주 및 배양

본 연구에서 사용된 느티만가닥버섯(*H. marmoreus*) 균주는 9종으로 육종 모균으로 사용된 Hm3-10 (덕유산에서 수집된 야생종), Hm1-1 (일본에서 상업적으로 재배되고 있는 품종), 재배특성 검증을 위해 사용된 Hm6-6 (만가닥 2호, MIKACC51996)과 Hm3-10과 Hm1-1을 모균으로 하여 단핵균사 교배를 통해 육종된 신품종 Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5을 사용하였다(Fig. 1). 각 균주는

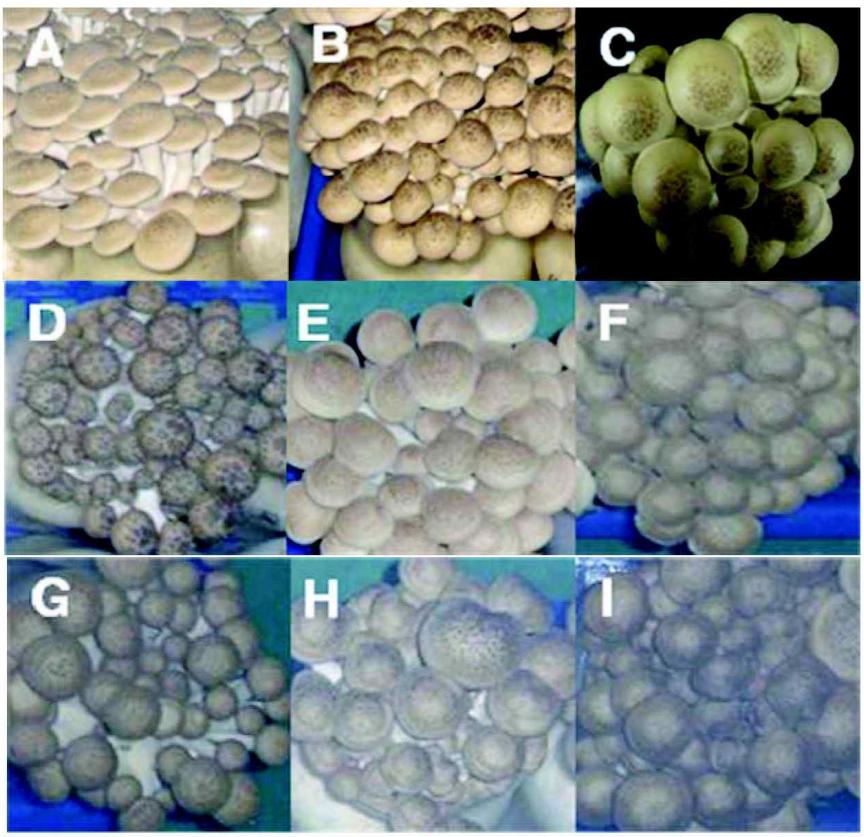

Fig. 1. Morphology of parental and selected 6 strains. A is named Hm3-10 and collected from Deog-Yu Mt., Korea. B is named Hm1-1 and cultivated strains in Japan. C is named Hm6-6 and registered as Mangadak 2 ho in Korean Seed & Variety Service. D, E, F, G, H, I are cultivars that were breeded for mating between monokaryon mycelia of Hm3-1 and Hm1-1 (D: Hm15-3, E: Hm15-4, F: Hm15-5, G: Hm16-1, H: 16-2, I: 17-5).

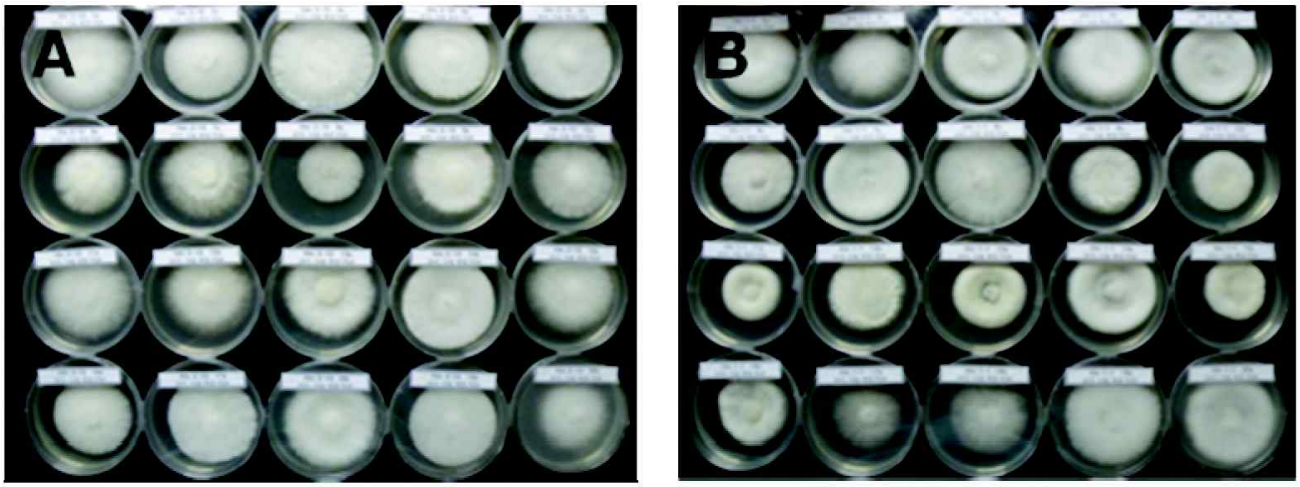

Fig. 2. Morphology of selected 20 monokaryon mycelia. A: Monokaryon mycelia of Hm3-10, B: Monokaryon mycelia of Hm1-1

potato-dextrose agar (PDA) 배지에 계대배양한 후, 보관하여 실험에 사용되었다.

버섯의 생리적, 형태적인 특성검증에 대한 실증재배는 850 cc polypropylene bottle에 pine sawdust (23%), concob (32%), rice bran (32%), soybean hull (22%)를 혼합하여 살균전 수분을 65%로 조절하여 충진하고 99°C 에서 6 hr동안 상압살균과 20°C로 냉각한 후, 15 ml의 액체종균(soybean power 0.3%, sucrose 3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%)을 접종한 후, 실내온도 20°C, 상대습도 75%, CO_2 3,000 ppm에서 60일, 70일, 80일, 90일, 100일 동안 배양하여 실내온도 15°C, 상대습도 98%, CO_2 3,000 ppm에서 재배를 수행하였다.

단핵균사간 mating을 통한 신품종 육종

Hm3-10과 Hm1-1 균주로부터 채집된 포자를 1개의 plate에 30~40개의 포자가 배양될 수 있도록 희석법을 통해 조절하였다. 희석된 spore 희석액을 plate에 포자를 도말한 후, 24°C에서 4일 동안 배양한 후, 독립되어 발아된 균사를 각각 150개씩 채취하여 PDA 배지에 계대배양하여 24°C에서 10일 동안 배양한 후, 현미경 검경을 통하여 clamp connection이 없는 균사를 단핵균사로 판단하여 균총의 모양과 균사의 상태를 관찰하여 각각 20개씩을 확보하였다(Fig. 2). 확보된 20개 각각의 균주는 3×3 mm 조각을 잘라내어 PDA plate에 1 cm 간격을 두고 동시에 접종하여 24°C에서 7일 동안 배양한 후, 현미경 검경을 실시하여 clamp connection이 있는 균주를 이핵 균사로 판단하고 선발하여 실증재배를 실시하였다.

Endo-cellular, exo-cellular 효소 활성도의 측정을 위한 crude enzyme solution의 준비

선발된 6개 균주와 2개의 모균주를 PDB 액체 배지에서 24°C에서 15일 동안 20 rpm으로 shaking 배양한 후, filter paper (Toyo No. 2)를 이용하여 균사를 걸러내어 상등액과 균사를 분리하였다. 상등액은 exo-cellular 효소 활성도 측정을 위한 crude enzyme solution으로 사용하였고, 수집된 균사는 멸균 증류수를 사용하여 3회 세척하고 beed beater를 이용하여 2 min동한 파쇄하여 endo-cellular 효소 활성도 측정을 위한 crude enzyme solution으로 사용하였다. 각각의 crude enzyme solution은 액체질소탱크에 보관하여 실험에 사용하였다. 단백질량은 bovine serum albumin (BSA)을 이용하여 Bradford method를 사용하였다 [1].

Crude enzyme solution에 대한 endo-, exo-cellular 효소 활성도의 측정

α-amylase, β-glucosidase, CMCase, Xylanase의 활성도 측정은 각각Danielsson 방법[4], Tokao 방법[20], Kanda 방법[10]과 Kim 방법[11]을 사용하였으며, 환원당의 측정은 dinitrosalicylic acid (DNS)를 사용하였다[18]. Chitinase의 활성도 측정은 우선 colloidal chitin을 Hsu and Lockwood [6]의 방법으로 제조하였고, 제조된 colloidal chitin을 이용하여 Jeong and Lee [9]의 방법으로 수행하였다. 그리고 1 unit는 1분 동안 1 umol의 환원당(glucose)이 생성되는 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

덕유산에서 채집한 국내 야생종 균주인Hm3-10과 일본 재배종인 Hm1-1균주에서 각각 생장속도와 균총의 형태가 서로 다른 20개의 단핵균사를 선발하여 교배를 실시한 결과 총 400개의 교배 균주 중에서 343개의 이핵 균사를 확보하여 85.8%의 교배율을 나타내었다[17]. 일반적인 4극성 균주간 교배에서 나타나는 25%에 비해 상당히 높은 교배율을 나타내었다. 이것은 동일한 종의 버섯일지라도 한국에서 채집된

종과 일본에서 재배종인 균주간의 유연관계가 멀기 때문인 것으로 판단된다. 총 343개의 균주를 85일 배양하여 전술한 재배방법으로 실증재배를 실시하여 병당수확량(yield per bottle), 버섯갓의 색깔(color of cap), 재배일수(growing day), 버섯유효경수(대길이가 13 cm 이상인 버섯, number of validity stalke), 쓴맛(bitterness), 갓의 형태(Cap shape)의 6가지 기준으로 1차 선발을 실시하여 58개 균주를 선발하였고, 선발된 58개 균주를 2차 재배를 실시하여 목표특성에 적합한 6개의 균주를 선발하여 각각 Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5로 명명하였다(Table 1, Fig. 1D, E, F, G, H, I). 선발된 6개의 균주를 배양일수가 120일 소요되어 국내에서 1990년대에 재배되었지만 현재는 재배되지 않고 있으나, 국내에 품종등록이 되어있는 Hm6-6(만가닥 2호)을 대조품종으로 하여 배양일수 60일, 70일, 80일, 90일, 100일에 따른 재배실험을 실시한 결과 배양일수가 길어짐에 따라 대조품종과 새로 개발된 신품종 6종 모두에서 재배일수가 줄어드는 결과를 나타내었다(Table 2).

그러나 대조품종인 Hm6-6품종은 60일과 100일 배양을 비교하였을 때 재배일수는 각각 34일과 26일을 나타내어 배양기간이 40일 길어질 때에 재배일수는 8일 줄어드는 결과를 나타내었으나, 새로 개발된 신품종에서는 Hm15-3을 제외하고는 배양 80일 이상일 때, 재배기간이 19~22일 소요되어 새로 개발된 신품종이 기존의 대조 품종에 비해 재배회전율을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

특히 Hm15-3을 제외하고는 신품종들에서는 배양 80일을 기준으로 하여 배양일수가 90일, 100일과 비교하여도 재배일수는 20일 전후로 큰 차이를 나타내지 않아 적정 배양일수를 80일로 선정하고 버섯의 형태적인 특성을 측정하기 위한 실험을 진행하였다.

버섯의 형태적 특징은 갓의 넓이(cap width, CW), 갓의 두께(cap thickness, CT), 버섯대의 길이(stalke length, SL), 버섯대의 두께(stalke thickness, ST), 병당 수확량(Yield, YD), 유효경수(number of validity stalke, NS)의 6가지의 항목으로 측정을 실시하였다. 그 결과 갓의 크기는 Hm15-5과 Hm17-5균주가 각각 1.3 cm와 1.6 cm로써 적었으며, 나머지 균주들은 1.9~2.2 cm로써 큰 차이를 나타내지 않았다. 버섯대의 굵기는 대조구를 포함한 모든 균주들에서 0.5~0.8 cm를 나타내어 큰 차이를 나타내지 않았다. 버섯대의 길이는 대조품종이 5.8 cm로써 가장 짧았으며, 신품종들은 6.8~7.7 cm를 나타내어 큰 차이를 나타내지 않았다. 버섯 대의 굵기에서는 대조품종이 0.9 cm로써 높게 측정되었으며 신품종들은 0.5~0.7 cm로써 유사하였다. 수확량은 Hm16-1균주에서 133 g으로 가장 낮았으며, 각각159 g, 155 g이 수확된 Hm16-1, Hm15-4균주가 우수하였고, 나머지 균주들은 145~147 g으로 유사하였으며, 버섯의 유효경수를 측정한 자료에서는 Hm15-3, Hm15-4, Hm17-5 균주에서 각각 11, 11, 12개가 측정되었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 버섯의 형태적 특징으로 판단할 때는 재배일수, 유효경수, 수확량 측면에서 우수한 Hm15-3, Hm15-4, Hm17-5 균주가 재배품종으로 적합한 것으로 판단된다(Table 3).

육종에 사용된 모균주 Hm3-10과 Hm1-1균주와 새로 개발된 6개의 균주들의 endo-, exo-cellular 효소활성도를 측정한결과, endo-cellular 효소 활성도는 α-amylase의 specific activity

Table 1. Characteristics of measurement for selection of cultivars

No.	Characteristics	1 (bad)	2 (common)	3 (good)
1	Yield per bottle	130 g below	131-180 g	181 g more
2	Color of cap	light brown	dark brown	brack-gray
3	Growing day	25 day more	21-24 day	20 day below
[a]4	Number of validity stalke	20 ea below	21-29 ea	30 ea more
5	Bitterness	Strong	Weak	Absent
6	Cap shape	flat	round	concave

[a]stalke length of 13 cm over

Table 2. Comparison of fruit body growing date (GD) for spawn cultural terms

	60 days	70 days	80 days	90 days	100 days
Hm6-6	34±0.6	29±0.6	28±1.0	28±0.6	26±0.6
Hm15-3	28±1.2	25±0.6	25±0.6	24±0.6	22±1.0
Hm15-4	23±1.2	21±1.2	21±0.6	20±0.0	20±1.0
Hm15-5	24±0.6	23±1.2	20±1.5	21±0.6	19±0.6
Hm16-1	22±1.0	20±0.0	20±0.6	19±1.2	20±0.6
Hm16-2	21±1.2	20±1.7	19±0.6	20±0.6	20±1.7
Hm17-5	23±1.2	21±1.0	20±0.0	19±0.6	19±0.6

These results were showed average value for 3 times. Average growing date of mushroom with the standard error of ±1 days.

Table 3. Comparison of fruit body characteristics for spawn cultural terms (80 days)

Items	80 days						
	CW (cm)	CT (cm)	SL (cm)	ST (cm)	YD (g)	NS (ea)	GD (day)
Hm6-6	2.2±0.7	0.7±0.1	5.8±0.8	0.9±0.2	145±7.0	5±5.0	28±1.0
Hm15-3	2.2±0.4	0.8±0.1	7.7±0.7	0.6±0.1	159±3.2	11±4.0	25±0.6
Hm15-4	1.9±0.4	0.7±0.1	7.3±0.7	0.7±0.1	155±3.5	11±1.7	21±0.6
Hm15-5	1.3±0.1	0.5±0.1	6.8±0.4	0.5±0.0	145±13.5	8±3.5	20±1.5
Hm16-1	2.2±0.5	0.8±0.1	7.6±0.7	0.7±0.1	133±4.7	7±3.2	20±0.6
Hm16-2	2.2±0.4	0.9±0.1	7.2±0.7	0.6±0.1	147±2.1	7±2.1	20±0.6
Hm17-5	1.6±0.3	0.7±0.1	7.2±0.5	0.6±0.1	147±2.5	12±2.5	20±0.0

These results were showed average value for 30 ea mushroom, excepted growing date (GD).
CW: cap width, CT: cap thickness, SL: stalke length, ST: stalke thickness, YD: Yield, NS: number of validity stalke, GD: growing date

Table 4. The specific activity for exo-, endo-enzyme of *H. marmoreus*

Strain NO.	Specific activity (Units/mg protein)									
	α-Amylase		β-Glucosidase		Chitinase		CMCase		Xylanase	
	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme
Hm1-1	1,505±251	79.2±1.7	42.1±0.8	0.4±0.0	70.2±1.3	8.6±0.1	432.4±22.6	0.4±0.0	450.5±26.4	0.0
Hm3-10	979±55	74.7±0.9	22.2±0.7	0.4±0.0	36.5±0.2	8.5±0.0	230.2±10.3	0.3±0.0	240.8±5.7	0.0
Hm15-3	2,340±137	82.0±1.1	54.9±0.5	0.5±0.0	94.8±2.9	10.0±0.2	598.3±18.2	0.3±0.0	574.5±22.1	0.0
Hm15-4	1,250±35	65.7±0.8	28.6±0.7	0.4±0.0	46.9±0.5	8.1±0.0	295.2±12.9	0.3±0.0	275.0±13.0	0.0
Hm15-5	2,834±373	97.6±0.8	61.3±0.8	0.5±0.0	107.8±3.6	12.1±0.1	610.8±47.0	0.4±0.0	615.4±22.9	0.0
Hm16-1	5,292±465	102.2±0.8	89.7±5.0	0.6±0.0	202.9±5.6	13.1±0.3	1,140±99.2	0.4±0.0	508.5±27.6	0.0
Hm16-2	1,890±158	88.5±0.7	39.0±0.4	0.5±0.0	72.5±3.7	11.2±0.0	409.9±36.4	0.4±0.0	174.6±24.8	0.0
Hm17-5	1,184±67	73.9±0.2	25.5±1.4	0.5±0.0	46.3±1.4	9.5±0.0	244.6±19.6	0.3±0.0	94.2±3.6	0.0

These results were showed average value for 3 times.

가 73.9 (Hm17-5)~102.2 (Hm16-1) unit/mg protein으로 가장 높았으며, Chitinase의 specific activity가 8.1 (Hm15-4)~13.1(Hm16-1) unit/mg protein이었으며 β-glucosidase, CMCase, Xylanase의 specific activity는 거의 없었다. 각 균주간에 활성도의 차이가 나타나기는 하지만 거의 유사한 결과를 나타내고 있고, 특히, α-amylase의 활성도가 높은 것은 버섯 재배의 대표적인 배지재료인 rice bran의 분해와 연관이 된 것으로 판단된다.

Exo-cellular 효소 활성도는 α-amylase의 specific activity가 5,292~1,184 unit/mg protein으로 가장 높았으며, CMCase의 specific activity가 1,140~245 unit/mg protein으로 α-amylase 다음으로 높은 활성도를 나타내었으며, Xylanase의 specific activity는 94~575 unit/mg protein이었으나, β-glucosidase, chitinase의 활성은 상대적으로 적었다.

6개의 신품종들의 exo-cellular 효소 활성도에서는 Hm16-1 균주에서 α-amylase, CMCase, Xylanase의 활성도가 모균주와 다른 5개의 새로운 균주들에 비해 높게 측정되었다. 특히, α-amylase는 다당류내의 α-1,4-glucan bonds의 가수분해를 촉매하는 효소로써 활물기생버섯인 송이버섯(*Tricholoma matsutake*) 배양여액에서 6,142.3 unit/me protein을 나타낸다고 보고되어 있어[15], 본 연구에서 전술한 효소활성도가 큰 차이를 보이지 않아 대부분의 버섯들이 starch에 대한 이용도가 높다고 판단된다. Cellulose 를 분해하는데 중요한 역할을 하는 Cellulase는 Carboxymethyl cellulose, Avicelase와 β-glucosidase 등으로 이루어진 효소 복합체이다. 그래서 본 연구에서 CMCase와 β-glucosidase의 효소 활성도를 측정한 CMCase의 활성도는 높았으나, β-glucosidase의 효소활성도가 낮은 것으로 측정되었다. 이러한 요인에 대해서는 추후 더 많은 연구가 요구된다.

효소 활성도만으로 판단할 때는 Hm16-1균주가 가장 우수한 것으로 판단되지만 형태적, 생리적 특성을 고려하여 종합적으로 판단한 결과 효소활성이 높은 것이 반드시 형태적, 생리적 특성이 우수한 품종의 선발 요건은 아닌 것으로 판단된다. 그러나 대표적인 목재 분해 효소들인 β-glucosidase, CMCase, Xylanase의 exo-cellular 효소 활성도와 버섯 품질과의 연관성은 더욱 연구되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 농림기술개발사업

과 버섯수출연구사업단에서 연구비를 지원받았기에 이에 감사 드립니다.

References

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
2. Chang, J. S., Son, J. K., Gao, L. and Oh, E. J. 2004. Inhibition of cell cycle progression on HepG2 cells by hypsiziprenol A9, isolated from *Hypsizygus marmoreus*. *Cancer Lett.* **212**, 7-14.
3. Chi, J. H., Park, W. K. and Kim, Y. H. 2000. Studies on improvement of cultural practice for *Lyophllum ulmarium*. *Kor. J. Mycol.* **28**, 88-92.
4. Danielsson, C. E. 1947. Molecular weight of alpha-amylase. *Nature* **160**, 899.
5. Harada, A., Gisusi, S., Yoneyama, S. and Aoyama, M. 2004. Effects of strain and cultivation medium on the chemical composition of the taste components in fruit-body of *Hypsizygus marmoreus*. *Food Chem.* **84**, 265-270.
6. Hsu, S. C. and Lockwood, L. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water soil. *Appl. Microbiol.* **29**, 422-426.
7. Hyun, M. W., Yoon, J. H., Park, W. H. and Kim, S. H. 2006. Detection of cellulolytic activity in *Ophiostoma* and *Leptographium* species by chromogenic reaction. Microbiology **34**, 108-110.
8. Ikekawa, T., Saitoh, H., Feng, W., Zhang, H., Li, L. and Matsuzawa, T. 1992. Antitumor activity of *Hypsizygus marmoreus*. Ⅰ. Antitumoractivity of extracts and polysaccharides. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1954-1957.
9. Jeong, E. U. and Lee, Y. H. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chito-oligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 187-196.
10. Kanda, T., Wakabayashi, K. and Nisizawa, K. 1976. Purification and properties of an endo-cellulase of avicelase type from *Irpx lacteus (Polyporus tuliferae)*. *J. Ferment. Technol.* **60**, 381-383.
11. Kim, D. J., Shin, H. J., Min, B. H. and Yoon, K. H. 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulose-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 304-310.
12. Kim, H. S., Ha, H. C. and Kim, T. S. 2003. Research and prospects in new functional mushroom-*Tremella fuciformis, Grifora frondosa,* and *Hypsizygus marmoreus*. *Kor. J. Food Sci. Ind.* **36**, 42-46.
13. Kwon, H. W., Back, J. B., Ko, H. G., You, C. H. and Kim, S. H. 2008. Extracellular enzyme activities of the monokaryotic strains generated from basidiospores of shiitake mushroom. Microbiology **36**, 74-76.
14. Lam, S. K. and Ng, T. B. 2001. Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **285**, 1071-1075.
15. Lee, C. Y., Hong, O. P., Jung, M. J. and Han, Y. H. 1998a. The extracellular enzyme activities in culture broth of *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Mycol.* **26**, 496-501.
16. Lee, C. Y., Park, J. E., Kim, B. B., Kim, S. M. and Ro, H. S. 2009b. Determination of mineral components in the cultivation substrates of edible mushrooms and their uptake into fruiting bodies. Microbiology **37**, 109-113.
17. Lee, C. Y., Park, J. E., Lee, J. A., Kim, J. K. and Ro, H. S. 2012. Development of new strains and related SCAR markers for and edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*. *FEMS Microbiol Lett.* **327**, 54-59.
18. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
19. Techapun, C., Poosaran, N., Waanabe, M. and Sasaki, K. 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial celluase-free xylanase produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem.* **38**, 1327-1340.
19. Tokao, S., Kamagata, Y. and Sasaki. 1985. Cellulase production by *Penicillium purogenum*. *J. Agri. Sci. Camb.* **93**. 217-222.
20. Tsuchida, K., Aoyagi, Y., Odani, S., Mita, T. and Isemura, M. 1995. Isolation of a novel collagen-binding protein from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*, which inhibits the Lewis lung carcinoma cell adhesion to type Ⅳ collagen. *J. Biol. Chem.* **270**, 1481-1484.
21. Xing, Z., Wang, Y., Feng, Z. and Liu, X. 2007. Effect of 60Co-irradiation on postharvest quality and selected enzyme activities of *Hypsizygus marmoreus* Fruit bodies. *J. Agaric. Food Chem.* **55**, 8126-8132.
22. Xing, Z., Wang, Y., Feng, Z. and Tan, Q. 2008. Effect of different packaging films on postharvest quality and selected enzyme activities of *Hypsizygus marmoreus* mushrooms. *J. Agaric. Food Chem.* **56**, 11838-11844.
23. Yoon, J. H., Hong, S. B., Ko, S. J. and Kim, S. H. 2007a. Detection of extracellular enzyme activity in Penicillium using chromogenic media. Microbiology **35**, 166-169.
24. Yoon, J. H., Park, J. E., Suh, D. Y., Hong, S. B., Ko, S. J. and Kim, S. H. 2007b. Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi. Microbiology **35**, 21-24.

초록 : 느티만가닥버섯의 신품종에 대한 endo-, exo-cellular 효소 활성도의 비교

이창윤[1,3] · 송호성[1] · 노현수[2] · 우주리[3] · 유영현[3] · 김종국[3]*
([1]그린피스버섯연구소, [2]경상대학교 미생물학과 [3]경북대학교 생명과학부)

본 연구는 새롭게 개발된 느티만가닥버섯의 6개 품종에 대한 형태적, 생리적 특성을 조사하고 endo-, exo-cellular 효소 활성을 측정하기 위해서 수행되었다. 국내 야생종인 Hm3-10과 일본 재배종인 Hm1-1과의 단핵균사 교배를 통하여 343개의 교배 균주를 획득하여 재배를 실시하여 58개 균주를 1차 선발하고 2차로 6개 균주를 선발하였다. 6개 선발 균주를 대상으로 배양 일수 별로 재배를 실시한 결과 배양일수가 80일 이상에서는 재배일수가 19~20일로 단축되어 최적 배양일수를 80일로 결정하였다. 80일 배양일수에서 각 품종별 형태적 특성을 검증한 결과 Hm15-3, Hm15-4, Hm17-5의 3균주가 재배에 적합한 균주로 판명되었다. 각 균주의 endo-cellular 효소 활성도를 측정한 결과, α-amylase의 효소 활성도가 73.9~102,2 unit/mg protein으로 가장 높았으며, chitinase 의 효소 활성도가 8.1~13.1 unit/mg protein으로 측정되었다. Exo-cellular효소 활성도를 측정한 결과, α-amylase의 효소 활성도가 5,292~1,184 unit/mg protein으로 가장 높았으며, CMCase와 Xylanase의 효소 활성도가 각각 1,140~245 unit/mg protein, 94~575 unit/mg protein으로 측정되었다. 그러나 β-glucosidase와 chitinase의 활성도는 비교적 낮은 활성도를 나타내었다.