

# 아미노산 첨가에 따른 느타리 균사체 성장 및 laccase 활성 비교

최성주<sup>1</sup> · 박태민<sup>1</sup> · 박윤진<sup>2</sup> · 오탈석<sup>1</sup> · 조영구<sup>1</sup> · 장명준<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>공주대학교 식물자원학과

<sup>2</sup>두과농미자원연구센터

## Comparison of the growth and laccase activity of *Pleurotus ostreatus* mycelium after supplementation with amino acids

Seong-Ju Choi<sup>1</sup>, Tae-Min Park<sup>1</sup>, Youn-Jin Park<sup>2</sup>, Tae-Seok Oh<sup>1</sup>, Young-Koo Cho<sup>1</sup>, and Myoung-Jun Jang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of plant Resources, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

<sup>2</sup>Kongju National University Legumes Green Manure Resource Center

**ABSTRACT:** In this study, we aimed to compare the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* after medium supplementation with various amino acids at different concentrations to select the optimal medium nutrient composition for mycelial growth. The mycelial growth of *P. ostreatus* was investigated after adding four amino acids (tryptophan, threonine, methionine, and lysine) at 0.5% or 1% to the medium. The rate of *P. ostreatus* mycelial growth was faster in the potato dextrose agar (PDA) medium supplemented with threonine at 0.5% or 1% than that of the control, whereas it was inhibited by tryptophan treatment. Supplementation of sawdust medium with all amino acids, except tryptophan, at 0.5% did not alter the mycelial growth, compared to the controls. However, addition of any amino acid to sawdust medium at a higher concentration (1%) inhibited the mycelial growth. The laccase activity of *P. ostreatus* mycelium cultured in PDA medium was the highest when threonine was added, and the lowest when tryptophan was added, consistent with the results of the mycelial growth. Therefore, the addition of threonine, methionine, or lysine to PDA medium at a concentration of 0.5-1% was effective for increasing the mycelial growth of *P. ostreatus*; however, it inhibited mycelial growth in sawdust medium, suggesting that the effects of amino acids depended on the medium nutrient composition.

**KEYWORDS:** Amino acid, Laccase activity, *Pleurotus ostreatus*

## 서론

버섯은 효소를 이용해 목질과 같은 영양원을 가진 물질을 분해하여 영양분을 흡수하고 산소로 호흡하는 특성을 가진다(Yoo *et al.*, 2005). 또한, 버섯은 전 세계적으로 인기 있는 음식으로 질감과 풍미뿐만 아니라 탄수화물과 단백질, 지질 등의 영양소를 고루 함유하고 있으며(Breene *et al.*, 1990; Latiff *et al.*, 1996), 국내에서 재배되고 있는 버섯 중 느타리는 비타민, 무기질 및 필수아미노산 함량이 풍부하며 열량이 낮아 영양 측면에서 약용 및 식품으로서 높은 가치가 있다(Kang *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2001). 느타리는 2019년 재배면적 29.7% 생산량 31.6%를 차지하는 우리나라 주요 식용버섯이다(MAFRA, 2020).

버섯배지 원료는 대부분 수입에 의존하고 있어(Jang *et al.*, 2014) 안정적인 배지 수급을 위해 지속적으로 대체배지를 탐색하는 연구가 이루어졌다(Jang *et al.*, 2010).

배지 성분 중 아미노산에 대한 영향을 연구한 결과로,

J. Mushrooms 2023 June, 21(2):53-57  
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2023.21.2.53>  
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853  
 © The Korean Society of Mushroom Science

Seong-Ju Choi (Master), Tae-Min Park (Master), Youn-Jin Park (Post doctor), Tae-Seok Oh (Professor), Young-Koo Cho (Assistant), Myoung-Jun Jang (Professor)

\*Corresponding author

E-mail : plant119@kongju.ac.kr

Tel : +82-41-330-1204

Received March 24, 2023

Revised April 19, 2023

Accepted June 19, 2023

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

수확 후 배지에 아미노산 비료 보충으로 인해 수확 횟수에 영향을 미친다는 보고가 있으며(Naim *et al.*, 2020), 동충하초 성장 보조제로 아미노산의 효과를 분석하였다(Kaushik *et al.*, 2020). 또한, 탄소원, 질소원, 아미노산 등 영양원 첨가로 인해 느타리 균사체 성장에 영향을 미친다는 연구결과가 있다(Adebayo-Tayo *et al.*, 2011a).

이에, 본 연구에서는 배지에 아미노산을 첨가하여 느타리 균사체 성장에 미치는 영향을 분석하고, 배지의 아미노산이 균사체 및 자실체에 전이 연구와 대체 배지 선발에 활용을 위한 기초자료로 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

시험에 사용한 느타리 품종은 흑타리 (*Heuktari*) 이며 경기도농업기술원 친환경 미생물연구소에서 분양받아 3 회 계대배양하여 사용하였다.

### Agar 배지 균사체 배양

PDA 배지를 control로 하여 tryptophan, threonine, methionine, lysine (Ajinomoto, USA)을 각각 0.5, 1.0% (w/v)를 첨가하고 121°C에서 1시간 멸균 후 petri dish (90 × 15 mm, SPL Life Sciences, Korea)에 25 mL 분주하여 사용하였다. 접종원을 5 mm corkborer를 이용하여 아미노산을 첨가한 배지에 접종하여 25°C에서 6일간 암 배양한 뒤 균사체의 성장 속도를 조사하기 위해 직경을 측정하였다.

### 톱밥 배지 균사체 배양

배지 조성은 포플러 톱밥, 비트펠프, 면실박을 5:3:2 (v/v)의 비율로 혼합하여 수분함량을 65%로 조절하였으며, tryptophan, threonine, methionine, lysine (Ajinomoto, USA)을 비트펠프와 면실박의 무게비로 하여 각각 0.5%, 1.0%를 추가한 뒤 혼합하여 시험관에 80 g씩 충전하였다.

시험관은 고압멸균기(HV-50, Hirayama, Japan)를 이용하여 121°C에서 1시간 동안 멸균하여 상온까지 식힌 뒤 PDA 접종원을 corkborer를 이용하여 일정한 크기로 잘라 접종하고 25°C에서 21일간 배양하여 7일 간격으로 균사체 성장 길이를 조사하였다.

### Laccase 활성 조사

아미노산을 첨가한 PDA 배지에서 성장한 균사체의 laccase 활성을 조사하기 위해 균사체 200 mg에 PBS buffer 1 mL를 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 균사체에서 추출된 단백질을 얻고자 10°C에서 14,000rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액 700  $\mu$ L를 분리하여 효소용액으로 사용하였다. 정량 분석을 위한 standard는 laccase from *Agaricus bisporus* powder, deep brown

(Sigma-Aldrich, Korea)를 이용하여 0 - 25  $\mu$ g/mL의 농도로 희석하여 사용하였다.

Laccase 활성 측정은 Tien과 Kirk (1988)의 방법을 응용한 것으로 ABTS를 반응 기질로 사용하였고, ABTS 190  $\mu$ L에 효소액 10  $\mu$ L를 혼합하여 10분간 반응시켰다. 측정은 spectrophotometer(TECAN, Korea)를 이용하여 420 nm 파장에서 흡광도 측정을 하였다. Beer의 법칙에 따라 laccase 활성도를 계산하였으며, 1 unit은 1  $\mu$ M ABTS가 1분 동안 산화되는 것으로 정의하였다.

### 통계 분석

실험 데이터의 통계분석은 R package (version 4.2.2)를 이용하여 평균값과 표준편차를 산출하였고, 다중검정(Duncan) 및 최소유의차 검정(LSD)을 통하여 그룹 간 유의적 차이를 검정하였으며, 결과 분석은 신뢰도 95% 구간에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 균사체 성장 조사

아미노산 0.5% 첨가에 따른 균사체 생장은 Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 배양 6일 차 threonine에서 7.5 cm로 무처리와 tryptophan 처리보다 높게 나타났다. 위 결과는 아미노산이 느타리 균사체 성장에 영향을 미친다는 연구결과(Adebayo *et al.*, 2011b)와 유사한 경향이였다.

1.0% 아미노산을 첨가한 배지에서 균사체 생장은 Fig. 3과 Fig. 4와 같다. 무첨가 6.9 cm 대비 threonine과 methionine 첨가배지는 각각 7.6 cm, 7.4 cm로 생장이 빨랐으며, tryptophan처리는 4.9 cm로 가장 낮게 나타났다.

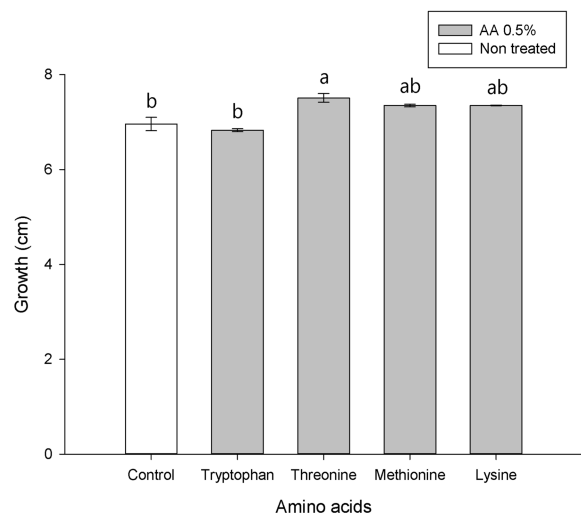
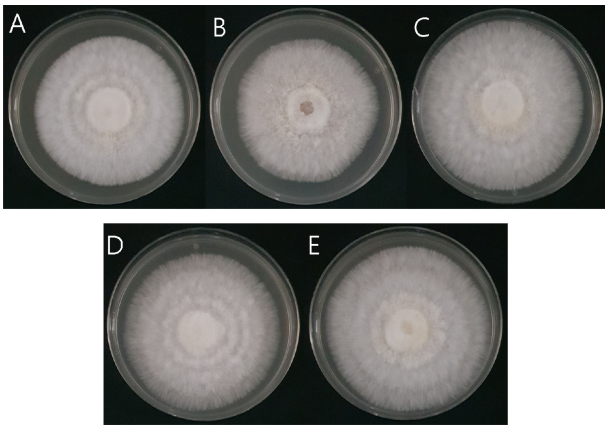
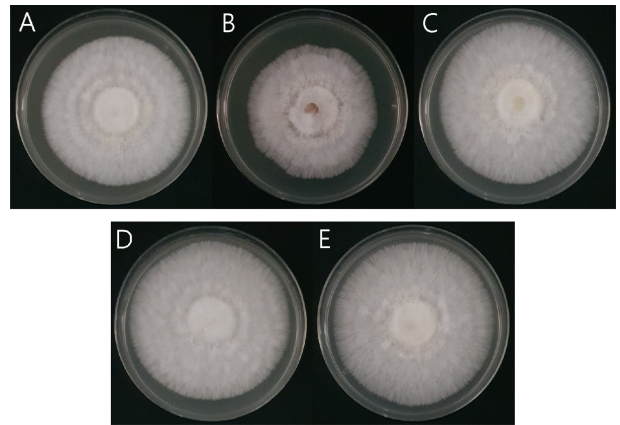


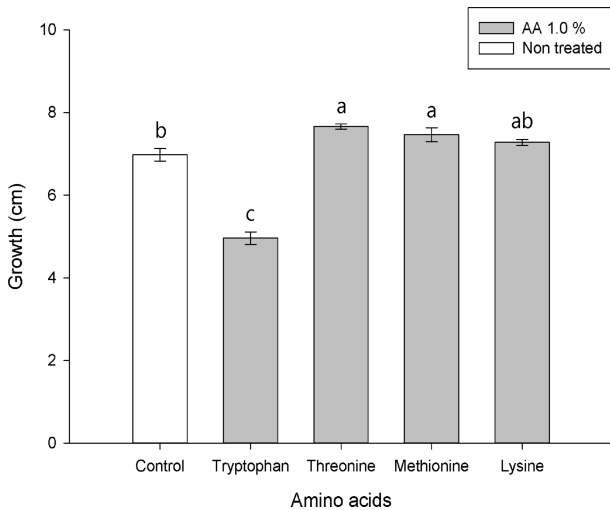
Fig. 1. Mycelium growth of *P. ostreatus* in PDA medium supplemented with 0.5% (w/w) amino acid in 6 days; Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ); AA: Amino acid.



**Fig. 2.** Morphology of *P. ostreatus* mycelium in PDA medium supplemented with 0.5% (w/w) amino acid on 6th day after inoculation. A, Control; B, Tryptophan; C, Threonine; D, Methionine; E, Lysine.



**Fig. 4.** Morphology of *P. ostreatus* mycelium in PDA medium supplemented with 1.0% (w/w) amino acid on 6th day after inoculation. A, Control; B, Tryptophan; C, Threonine; D, Methionine; E, Lysine.

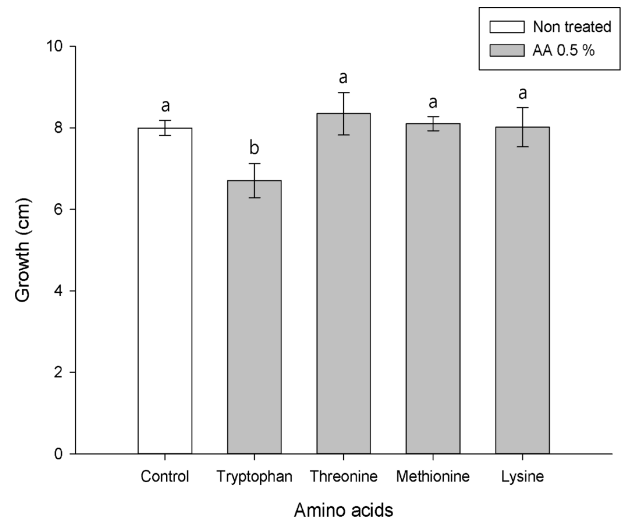


**Fig. 3.** Growth of *P. ostreatus* mycelium in PDA medium supplemented with 1.0% (w/w) amino acid on 6th day after inoculation, AA: Amino acid, Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

이러한 결과는 꽃송이버섯 균사체 배지에 threonine을 첨가한 배지에서 균사체 생장이 양호하고 밀도가 높게 나타난 연구결과(Seo *et al.*, 2005)와 동충하초 배양에 있어서 tryptophan 처리구에서 균사 생장이 상대적으로 늦어 영양원으로 적절하지 않으며(Dong *et al.*, 2005), 균사체 성장을 억제한다는 연구결과(Park *et al.*, 2010)와 유사한 경향이였다. 따라서, threonine 및 methionine 0.5~1.0% 첨가는 느타리 균사체 성장을 촉진하며, tryptophan은 억제하는 것으로 판단된다.

**톱밥 배지 균사체 성장량 조사**

0.5% 아미노산을 첨가한 톱밥 배지에서 느타리 균사체



**Fig. 5.** Mycelium growth in sawdust medium supplemented with 0.5% (w/w) amino acid on 21th day after inoculation; AA: Amino acids, Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

의 생육 양상을 비교하고자 시험관에 균사체를 배양한 결과는 Fig. 5와 Fig 5에 나타냈다.

아미노산 0.5% 첨가 배지의 균사체 생육 21일 차의 threonine, methionine, lysine, control이 각각 8.3, 8.1, 8.0, 7.9 cm로 유의적인 차이가 없었으며, tryptophan은 6.7 cm로 생육이 억제되는 것을 확인하였다. 위 결과는 PDA 배지에서 tryptophan이 균사체 성장을 억제한 결과와 같은 경향을 나타내었다.

배양 21일에 아미노산 1.0% 첨가 배지의 느타리 균사체 생장은 Fig. 7과 Fig. 8에서 보는바와 같이, 무첨가 배지에서 8.0 cm로 성장 속도가 가장 빨랐고, tryptophan 6.7 cm, lysine 6.6 cm, threonine 5.4 cm, methionine 4.6 cm로 아미노산을 첨가한 배지에서 성장량이 저조하였다.

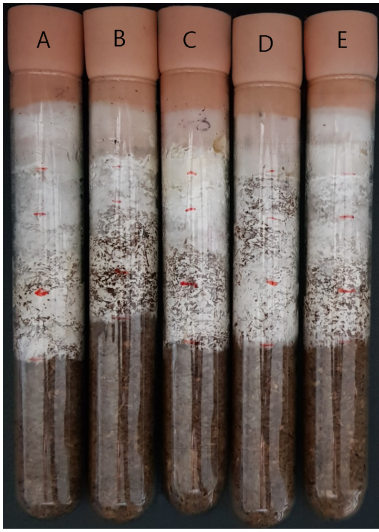


Fig. 6. Mycelium growth in sawdust medium supplemented with 0.5% (w/w) amino acid on 21th day after inocultaion; A, Control; B, Tryptophan; C, Threonine; D, Methionine; E, Lysine.

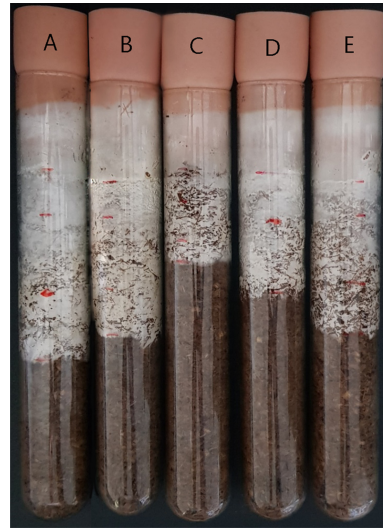


Fig. 8. Mycelium growth in sawdust medium supplemented with 1.0% (w/w) amino acid on 21th day after inocultaion; A, Control; B, Tryptophan; C, Threonine; D, Methionine; E, Lysine.

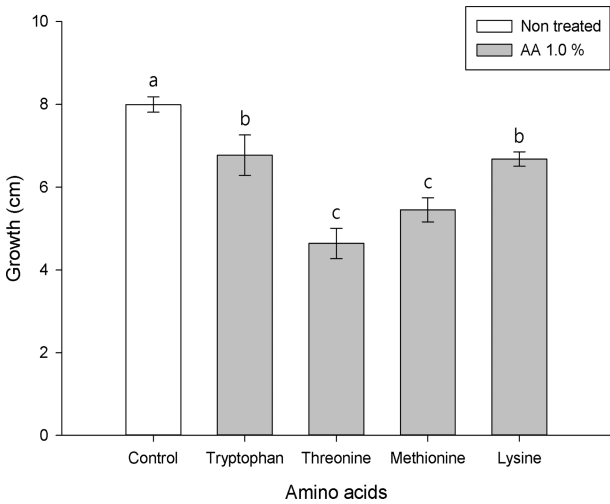


Fig. 7. Mycelium growth in sawdust medium supplemented with 1.0% (w/w) amino acid on 21th day after inocultaion; AA: Amino acids; Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

Threonine, methionine, lysine 첨가농도 0.5%보다 1.0%에서 균사체 생장이 지연되었으며, tryptophan는 첨가농도에 따른 균사 생장은 동일하였다. 이러한 결과로, 느타리 균사생장은 아미노산 종류와 첨가농도에 따라 반응이 다름을 알 수 있었다. 또한, 느타리 균사생장에 적합한 아미노산 종류와 첨가농도 결과를 기반으로 적합배지 개발에 활용이 가능할 것이다.

**Laccase 활성 조사**

버섯은 목재의 리그닌 부후 효소인 laccase를 이용하여

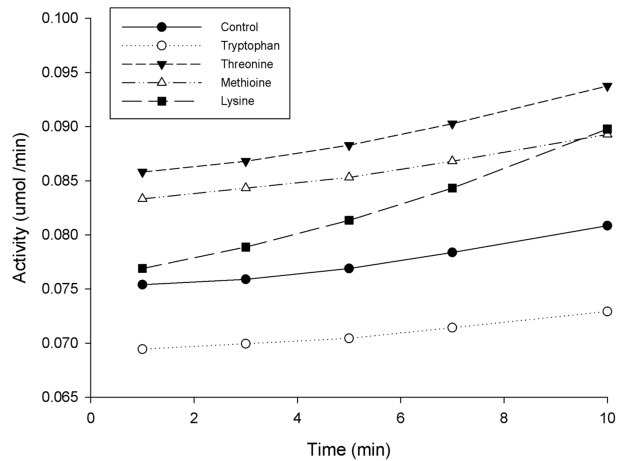


Fig. 9. Laccase activity of *P. osteratus* mycelium supplemented with 1.0% amino acids.

영양원을 이용하며, PDA 배지에서도 효소 생산 능력이 우수하고(Abdel-Raheem *et al.*, 2002) 구름버섯 균사체에 필수아미노산 혼합물을 첨가했을 때 laccase 활성도가 증가했다는 연구결과가 있다(Dong *et al.*, 2005). Fig. 1의 0.5% 아미노산 첨가 시 균사체 생장에 유의한 차이가 없었지만 Fig. 3의 1.0% 아미노산 첨가 시 균사체 생육에 변화가 나타나 성장량과 효소 활성을 비교하기 위해 아미노산 1.0% 첨가 배지 균사체의 laccase 활성을 조사하였다.

Laccase 활성도는 Agar 배지에서 배양한 느타리 균사체의 laccase와 ABTS가 10분간 반응했을 때 control 0.081 unit 대비 threonine이 0.094 unit으로 가장 높았으며, lysine 0.090, methionine 0.089 순이었고, tryptophan 이 0.073으로 가장 낮게 나타냈다. Lysine의 경우 1분간

반응했을 때 laccase 활성도가 methionine보다 낮은 경향을 나타내고 있지만, 10분간 반응했을 때 각각 0.090, 0.089 unit으로 나타났다. 위 결과는 Fig. 3의 균사체 성장과 유사한 경향이었다

Lysine을 처리한 느타리 laccase 활성은 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였고 아미노산의 종류에 따라 laccase활성이 다를 수 있었다.(Fig. 9.)

## 적 요

아미노산 4종류(threonine, methionine, lysine, tryptophan)를 0.5%와 1.0%를 배지에 첨가하여 느타리 균사생장을 분석하였다. PDA 배지의 느타리 균사체 생장은 무첨가 대비 threonine 0.5, 1.0%에서 생육이 우수하였으며, tryptophan 0.5%, 1.0% 첨가 배지는 생장이 억제되었다. 톱밥 배지에서 아미노산 0.5% 첨가는 tryptophan을 제외하고 균사체 생장이 동등하였고, 4종류 아미노산 1.0% 첨가시 균사생장이 억제되었다.

PDA 배지에서 배양한 균사체 laccase 활성은 threonine 첨가에서 가장 높았으며, tryptophan 첨가는 가장 낮아 균사체 배양 결과와 일치하였다.

PDA 배지에 tryptophan을 제외한 threonine, methionine, lysine 0.5%와 1.0% 첨가는 느타리 균사체 성장에 효과적이었고, 톱밥 배지는 아미노산 1.0% 첨가가 억제효과를 나타낸 것은, 배지의 영양조건에 따라 아미노산 첨가 효과가 다르게 나타난 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- Abdel-Raheem A, Shearer C. 2002. Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Divers* 11: 1-19.
- Adebayo-Tayo BC, Jonathan SG, Popoola OO, Egbomuche RC. 2011. Optimization of growth conditions for mycelial yield and exopolysaccharide production by *Pleurotus ostreatus* cultivated in Nigeria. *Afr J Microbiol Res* 5: 2130-2138.
- Breene WM. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J Food Prot* 53: 883-894.
- Cho SH, Lee SD, Ryu JS, Kim NG, Lee DS. 2001. Change in quality of king oyster mushroom during modified atmosphere storage. *Kor J PostharvestSci Technol* 8: 367-373.
- Dong CH, Yao YJ. 2005. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* submerged culture. *J Appl Microbiol* 99: 483-492.
- Jang MJ, Lee YH, Kang YZ, Ju YC. 2014. Effect of albasia sawdust in *Pleurotus ostreatus* by bottle cultivation. *J Mushroom* 12: 8-11.
- Jang MJ, Lee YH, Ju YC. 2010. Selection of a substitute sawdust material in *Pleurotus ostreatus* by bottle cultivation. *Kor J Mycol* 38: 142-145.
- Kang MS, Kang TS, Kang AS, Shon HR, Sung JM. 2000. Studies on mycelial growth and artificial cultivation of *Pleurotus eryngii*. *Kor J Mycol* 28: 73-80.
- Kaushik V, Singh A, Arya A, Sindhu SC, Sindhu A, Singh A. 2020. Enhanced production of cordycepin in *Ophiocordyceps sinensis* using growth supplements under submerged conditions. *Biotechnol Rep* 28: e00557.
- Latiff LA, Daran ABM, Mohamed AB. 1996. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. *Food Chem* 56: 115-121.
- Ministry for Agriculture, Food, Rural Affairs (MAFRA). 2020. Special crop production statistics. pp. 109. Republic of Korea.
- Naim L., Alsanad MA, Shaban N, El Sebaaly Z, Abou Fayssal S, Sassine YN. 2020. Production and composition of *Pleurotus ostreatus* cultivated on Lithovit®-Amino25 supplemented spent substrate. *AMB Express* 10: 1-10.
- Park EJ, Lee WY. 2010. Tryptophan enhanced accumulation of phenolic compounds via chorismate mutase activation in the *Ganoderma neo-japonicum* mycelia. *Appl Biol Chem* 53: 364-370.
- Seo SY, Yoo YJ, Jung GT, Ryu J, Ko BR, Choi JS, Kim MK. 2005. Optimal condition for mycelial growth of *Sparassis crispa*. *J Mushroom* 3: 45-51.
- Tien M, Kirk TK. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In *Methods in enzymology*, Academic Press 161: 238-249.
- Yoo YB, Kong WS, Oh SJ, Cheong JC, Jang KY, Jhune CS. 2005. Trends of mushroom science and mushroom industry. *J Mushroom* 3: 1-23.