

좁나무싸리버섯(*Clavicornona pyxidata*)의 균사체 최적 배양조건 및 세포효소활성 특성

이태희 · 김진만¹ · 한영환*

동국대학교 생명과학과, ¹동국대학교 생물학과

Clavicornona pyxidata DGUM 29005의 균사 생육을 위한 최적 배양조건 및 효소 활성을 조사하였다. 균사 생육을 위한 최적 온도 및 pH는 각각 24°C 및 5.0이었다. 사용된 복합배지 중 malt extract medium (MEM)에서 가장 좋은 균사 생육을 나타내었다. 최소배지로 Czapek-Dox 한천배지를 사용하고 탄소원으로 trehalose, mannitol, sucrose 및 maltose 첨가시 균사 생육이 우수하였다. 전반적으로 무기질소원이 유기질소원보다 균사 생육을 더 촉진하였으며, 무기질소원으로 calcium nitrate를 사용하였을 때 균사 생육이 가장 우수하였다. 인산원으로 Na₂HPO₄를 사용했을 때 균사 생육이 촉진되었으며, 가장 우수한 비타민원은 *p*-aminobenzoic acid이었다. MEM 액체배지를 사용하여 24°C에서 20일간 *C. pyxidata* DGUM 29005를 배양하여 균사의 분비효소 및 균사내 효소의 활성도를 측정 한 결과, 균사의 분비 효소 중 laccase의 활성도가 다른 효소에 비해 높았으며, α -amylase, chitinase, lipase 및 protease의 활성도는 낮거나 없었다.

Key words □ *Clavicornona pyxidata*, enzyme, growth, mycelia

좁나무싸리버섯(*Clavicornona pyxidata* [Pers.: Fr.] Doty)은 맛과 향이 우수한 국수버섯과에 속하는 버섯으로, 여름부터 가을까지 칩엽수나 활엽수의 부패한 나무 등길 위 또는 부식질이 많은 땅 위에 발생하는 갈색부후 담자균류이다(3, 12). 자실체는 산호형이며 하나의 분생포자경에 3~5개의 분자를 가지고 있다. 분자 끝은 술잔형 또는 왕관형을 이루고 있다. 표면은 초기에는 백황색이나 후에 황갈색이 되고, 대는 가늘고 평활하다(8).

좁나무싸리버섯의 생태 및 분자계통분류학적 연구는 외국에서 많이 이루어지고 있다(4, 11). Koske 등(7)은 영양배지에서 30일간 배양하여 좁나무싸리버섯 자실체의 인공재배를 처음 보고하였고, James 등(6)은 자실체의 인공재배시 광조사가 필요함을 보고하였다. 좁나무싸리버섯에서 분리된 clavicornonic acid는 avian myeloblastosis virus (AMV)와 Moloney murine leukemia virus (MMuLV) reverse transcriptase에 대해 우수한 저해활성을 보여 주었으며(5), 최근 Lee(9)는 좁나무싸리버섯의 원형질체 재생 및 융합에 관한 특성을 보고하였다. 그러나, 좁나무싸리버섯 균사체의 생리학적 및 배양학적 특성에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구는 좁나무싸리버섯의 자실체 대량 생산 및 균사체를 이용한 식품 및 식품첨가제의 개발을 목적으로 균사체 배양을 위한 최적 배양조건 규명 및 여러 효소의 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

본 연구에 사용된 좁나무싸리버섯(*C. pyxidata* DGUM 29005, Genbank No. AY588248)은 동국대학교 미생물학실험실에 보관 중인 균주를 계대배양하여 사용하였다(Fig. 1). 균사체 배양용 배지는 Difco사(Detroit, USA), 효소활성 측정용 시약은 Sigma사(St. Louis, USA)의 특급 및 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

배양 조건

최적 균사생육 온도 및 pH의 규명을 위하여, YMG 한천배지(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose)를 이용하여 온도는 16~32°C 범위로 조절된 항온기에 배양하였으며, pH는 초기 pH 4.0~10 범위에서 최적 조건을 결정하였다. 각 영양원 첨가에 따른 균사 생육의 영향을 알아보기 위해 Czapek-Dox 한

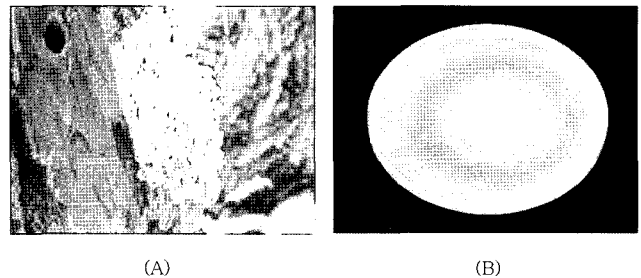


Fig. 1. Morphological features of fruiting body (A) and the mycelial colony (B) of *C. pyxidata* DGUM 29005.

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

천배지(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 인산원의 종류를 변화시켜 사용하였다. 비타민은 최종농도가 0.5 mg/L가 되도록 첨가하여 사용하였다. 사용한 모든 배지는 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하였다.

균사 생육의 측정

YMG 한천배지에서 전 배양된 균사를 cork borer (diameter, 7 mm)를 이용하여 떼어내어 한천배지 상에 위치한 후, 24°C에서 15일간 배양하였다. 성장한 균사의 직경을 mm 단위까지 측정하고 밀도를 관찰하여 균사 생육도를 결정하였다. 실험은 3회 이상 반복 수행하여 균사 직경의 평균 및 표준편차를 구하였다.

조효소액의 제조 및 효소 활성의 측정

균사체 내·외 분비 효소의 특성을 알아보기 위해 MEM 액체 배지에 접종한 다음, 24°C에서 20일간 진탕 배양하였다(120 rpm). 배양 후 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 균사체와 배양액을 분리한 다음 배양 여액을 조효소원으로 균사의 분비 α-amylase, β-glucosidase, xylanase, CMCase, exo-1,4-β-D-glucanase, chitinase, lipase, protease 및 laccase의 효소 활성을 측정하였다 (9). 균사내 효소 측정을 위해서 여과된 균사체를 증류수로 세척한 다음 homogenizer를 사용하여 4°C에서 20초씩 10회 분쇄하였다. French press (Carver Inc., USA)를 사용하여 15,000 psi 압력 하에서 완전히 파쇄 시킨 후, 원심분리(5,000×g)한 다음 그 상등액을 균사내 효소 활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. 효소의 비활성도(specific activity) 측정을 위한 단백질 정량은 Bradford 방법(1)을 사용하였고, 표준곡선은 bovine serum albumin을 사용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

최적 배지의 선별

사용된 모든 복합배지에서의 균사 생육은 차이를 보였으며, MEM을 사용하였을 경우 가장 우수한 균사생육을 보여주었다.

Table 1. Effect of various culture media on the mycelial growth of *C. pyxidata* DGUM 29005

Complex media ^a	Mycelial growth (Diameter, mm) ^b
ACM	52.0±1.0
CDM	55.5±1.5
DTM	65.5±0.5
GPM	52.7±0.6
MCM	60.3±1.4
MEM	72.0±0.0
YMM	65.3±1.5

^aACM; *Agrocybe cylindracea* medium, CDM; Czapeck-Dox medium, DTM; Dongguk *Tricholoma matsutake* medium, GPM; glucose peptone medium, MCM; mushroom complex medium, MEM; malt extract medium, YMM; yeast extract-malt extract medium.

^bMean±standard deviation for triplicates.

DTM, YMM 및 MCM도 비교적 양호한 균사 생육을 나타내었으나, ACM과 GPM에서의 균사 생육은 저조하였다(Table 1).

온도 및 pH의 영향

YMG 한천배지에서 쯤나무싸리버섯의 균사체를 15일간 배양했을 때, 균사 생육을 위한 최적 온도는 24°C이었다(Fig. 2). 배양 초기의 배지 pH 5.0에서 가장 좋은 균사 성장을 나타내었으며, 약 산성에서도 어느 정도 성장을 관찰할 수 있었으나 pH 6.0 이상에서의 균사 생육은 저조하였다(Fig. 3).

탄소원과 질소원의 첨가에 따른 균사 생장의 영향

쯤나무싸리버섯의 균사 생육에 영향을 미치는 탄소원을 결정하기 위해 CD 한천배지에 각각의 탄소원을 1.0% 첨가하여 실험

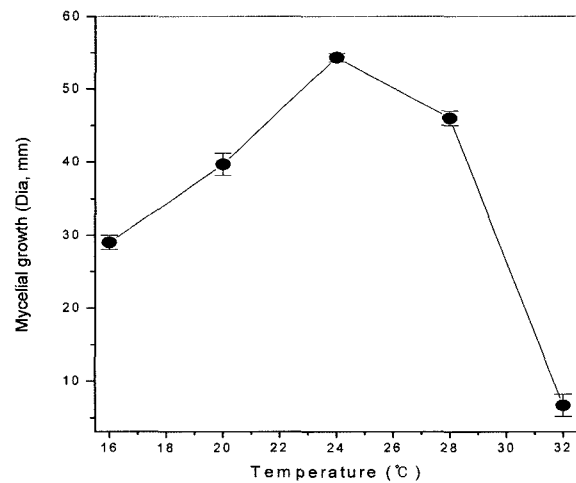


Fig. 2. Effect of temperature on mycelial growth of *C. pyxidata* DGUM 29005. The cultivation was carried out for 15 days in the YMG agar plate (pH 5.0).

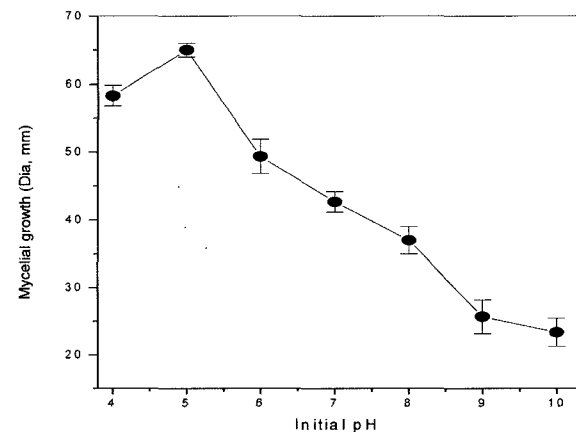


Fig. 3. Effect of initial pH on mycelial growth of *C. pyxidata* DGUM 29005. The cultivation was carried out for 15 days in the YMG agar plate (pH 5.0).

한 결과, 단당류에서는 mannitol과 galactose에서 우수한 균사 생장을 나타내었고, 이당류에서는 trehalose가 가장 우수하였고, 다당류 중에서는 starch와 cellulose에서 가장 우수하였다(Table 2). James 등(6)은 fructose와 maltose의 첨가시 좁나무싸리버섯 자실체의 생산수율이 증가함을 보고하였다. 이러한 결과는 좁나무싸리버섯의 균사체 배양 및 자실체의 인공 재배시 탄소원으로 maltose의 사용이 좋을 것으로 사료된다. 무기질소원 첨가에 따른 균사 생육에 미치는 영향을 실험한 결과, calcium nitrate에서 가장 우수한 균사 생장을 보였고, sodium nitrite를 첨가한 경우에는 균사 생육이 매우 저조하였다(Table 2). Sodium nitrite가 아미노산을 탈아미노화하여 독성을 나타냈거나, 배지에 축적되어서 질소 요구성을 충족시킬 수 없었을 것으로 사료되며, 이는 다른 진균의 배양형태와 유사한 경향을 나타내었다. 유기 질소원의 영향을 알아보기 위해 0.3%의 다양한 유기 질소원을 첨가하여 실험한 결과, malt extract가 우수한 균사 생육을 보여주었으나, 다른 종류의 유기질소원 첨가 시에는 비교적 저조하였다(Table 2).

인산원과 비타민 첨가에 따른 균사체 생장의 영향

CD 한천배지에 각각의 인산원을 0.1% 첨가하여 실험한 결과, Na₂HPO₄ 첨가시 대조군보다 증가된 가장 우수한 균사 생육을 보여 주었다. NH₄H₂PO₄와 K₂HPO₄도 우수한 균사 생육을 보여 주었다(Table 3). 최적 비타민원으로 p-aminobenzoic acid, riboflavin 및 folic acid를 첨가하였을 경우 균사 생육이 우수하였다(Table 3).

세포내·외 효소활성

MEM 액체배지를 이용하여 24°C에서 20일간 배양된 좁나무싸

Table 3. Effect of phosphorus and vitamin sources on the mycelial growth of *C. pyxidata* DGUM 29005

Source	Mycelial growth (Diameter, mm) ^b	Source	Mycelial growth (Diameter, mm)
Phosphorus (0.1%)			
CaHPO ₄	59.6±2.5	NaH ₂ PO ₄	55.6±3.1
K ₂ HPO ₄	69.0±1.0	(NH ₄) ₂ HPO ₄	61.7±1.6
KH ₂ PO ₄	67.3±2.3	NH ₄ H ₂ PO ₄	72.0±1.0
Na ₂ HPO ₄	81.5±1.6		
Vitamin (0.5 mg/L)			
Riboflavin	63.0±1.0	Folic acid	62.5±2.1
Pyridoxine	60.3±1.6	Nicotinic acid	60.7±2.3
p-Aminobenzoic acid	65.1±2.6	Biotin	60.5±1.5
Thiamine	60.5±1.7		

^aThe cultivation was carried out at 24°C for 15 days in CDM agar plate (pH 5.0).

^bMean±standard deviation for triplicates.

Table 4. The specific activities of exomycelial and endomycelial enzymes of *C. pyxidata* DGUM 29005

Enzyme	Specific enzyme activity (unit/mg protein)	
	Exomycelial	Endomycelial
α-Amylase	0.01	0.00
β-Glucosidase	0.48	0.52
Xylanase	0.13	0.28
CMCase	0.13	0.25
Exo-1,4-β-D-glucanase	0.12	0.01
Chitinase	0.03	0.06
Lipase	0.03	0.08
Protease	0.00	0.00
Laccase	13.88	7.05

Table 2. Effect of carbon and nitrogen sources on the mycelial growth of *C. pyxidata* DGUM 29005

Source	Mycelial growth (Diameter, mm) ^b	Source	Mycelial growth (Diameter, mm)
Carbohydrate (1.0%)			
Fructose	62.3±1.5	Lactose	33.0±2.0
Galactose	74.0±1.0	Trehalose	81.7±2.6
Glucose	71.7±2.1	Maltose	77.3±1.7
Xylose	56.3±1.6	Raffinose	75.5±0.5
Arabinose	73.2±1.3	Starch	69.3±3.1
Glycerol	35.0±1.0	CMC ^c	17.5±0.5
Mannitol	79.5±2.2	Cellulose	69.0±0.0
Sucrose	77.5±1.0		
Inorganic nitrogen (0.3%)			
Ammonium sulfate	61.0±1.2	Ammonium chloride	45.6±2.1
Calcium nitrate	71.7±1.6	Sodium nitrite	12.3±0.7
Sodium nitrate	58.3±0.6	Urea	35.6±2.3
Organic nitrogen (0.3%)			
Proteose peptone	45.1±1.6	Tryptone	37.3±1.3
Bacto peptone	38.8±3.5	Malt extract	64.6±2.5
Yeast extract	47.5±1.4	Soytone	46.2±1.5

^aThe cultivation was carried out at 24°C for 15 days in CDM agar plate (pH 5.0).

^bMean±standard deviation for triplicates.

^cCarboxymethyl cellulose.

리버섯의 세포외 분비 효소 및 세포내 효소의 비활성도를 측정
한 결과, 13.88 U/mg protein으로 laccase의 효소 활성도가 가장
우수하였다. 이와 같은 결과는 Choi 등(2)이 보고한 황갈색시루
뻥버섯(*Inonotus mikadoi*) 균사체 배양액에서 laccase의 효소 활
성이 높은 결과와 유사하였다. 섬유소 분해 효소인 β -glucosidase,
CMCase, exo-1,4- β -D-glucanase의 효소 활성도 우수하였다. α -
Amylase, chitinase 및 lipase는 상대적으로 낮은 효소 활성을 나
타내었으며, 측정된 세포내 효소의 활성도가 세포외 분비효소 활
성도에 비해 전반적으로 높은 것으로 나타났다. 그러나 protease
의 활성은 없었다(Table 4).

감사의 말

본 연구는 2006학년도 동국대학교 연구년 자원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

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. Choi, S.J., S.J. Kim, and Y.H. Han. 2004. Physiological character-

- istics and optimized culture conditions of the mycelia of *Inonotus mikadoi*. *Kor. J. Microbiol.* 40, 100-103.
3. Corner, E.J.H. 1970. A monograph of *Clavaria* and allied Genera. *Beih. Nova Hedwigia* 33, 1-299.
4. Dodd, J.L. 1972. The genus *Clavicornora*. *Mycologia* 64, 737-773.
5. Erkel, G and T. Anke. 1992. Clávicoronic acid, a novel inhibitor of reverse transcriptases from *Clavicornora pyxidata* (Pers.: Fr.) Doty. *J. Antibiotics* 45, 29-37.
6. James, S.W. and D.J. McLaughlin. 1988. The influence of carbohydrate source and concentration and light on fruit body development in *Clavicornora pyxidata*. *Mycologia* 80, 89-98.
7. Koske, R.E. and C.R. Leathers. 1969. Sporophore production by species of *Clavicornora* in pure culture. *Mycologia* 61, 999-1002.
8. Lee, J.Y. 1988. Coloured Korean Mushrooms. p. 204-213. Academic Publishing Co., Ltd., Seoul.
9. Lee, T.H. 2004. Ph.D. thesis. University of Dongguk, Seoul, Korea.
10. Lee, T.H. and Y.H. Han. 2001. Enzyme activities of the fruit body of *Ramaria botrytis* DGUM 29001. *Mycobiology* 29, 171-175.
11. Lickey, E.B. 2002. Ph.D. thesis. University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA.
12. Miller, O.K. 1977. Mushrooms of North America. E.P. Dutton. Academic Press, New York.

(Received March 13, 2006/Accepted May 4, 2006)

ABSTRACT : Optimized Culture Condition and Enzyme Activity of the Mycelia of *Clavicornora pyxidata*
Tae-Hee Lee, Jin-Man Kim¹, and Yeong-Hwan Han* (Department of Life Science, College of Natural Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea, ¹Department of Biology, Graduate School, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea)

The culture conditions for the enhanced mycelial growth of *Clavicornora pyxidata* DGUM 29005 were investigated. The optimal temperature and pH for the mycelial growth were 24°C and 5.0, respectively. It was shown that trehalose was the best supplement of carbon sources in Czapek-Dox medium as a minimal medium for enhanced mycelial growth. In general, inorganic nitrogen sources were better than organic ones for mycelial growth. Calcium nitrate was the best out of the inorganic nitrogen tested. The appropriate phosphorous and vitamin were Na₂HPO₄ and *p*-aminobenzoic acid, respectively. After the mycelia of *C. pyxidata* DGUM 29005 was cultivated at 24°C for 20 days in MEM broth (pH 5.0), the specific activities of both exomycelial and endomycelial enzymes were determined. Among the exomycelial enzyme assayed, the specific activity of laccase was much higher than those of other enzymes. However, little or no enzyme activities of α -amylase, chitinase, lipase and protease were found.