한 국 균 학 회 지 The Korean Journal of Mycology Research Note

양송이 이핵균주의 생화학적 특성 검정

권혁우[1] · 김준영[1] · 민성환[1] · 최민아[1] · 오연이[2] · 공원식[2] · 김성환[1]*

[1]단국대학교 미생물학과, [2]국립원예특작과학원 인삼특작부

Biochemical Characterization of *Agaricus bisporus* Dikaryon Strains

Hyuk Woo Kwon[1], Jun Young Kim[1], Sung Hwan Min[1], Min Ah Choi[1], Youn-Lee Oh[2], Won-Sik Kong[2] and Seong Hwan Kim[1]*

[1]*Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea*
[2]*Mushroom Research Division, Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Medicinal Crop RDA, Eumseong 369-874, Korea*

ABSTRACT : Button mushroom (*Agaricus bisporus*) strains from diverse origins were compared in this study to obtain basic information on their growth and biochemical properties that are helpful for breeding. Among 31 dikaryotic strains tested, most strains showed better mycelial growth on oatmeal agar than on MEA and PDA. Mycelia of the mushroom strains revealed β-glucosidase activity the most clearly among the seven extracellular enzymes tested. All the strains showed protease activity, but β-glucosidase activity was found in 27 strains and xylanase activity was found in 30 strains. The activity of avicelase, CM-cellulase, amylase, and pectinase was detected in less than 20 strains. These results implied that enzymatic characteristics could be used as a criterion of strain selection for breeding study.

KEYWORDS : ***Agaricus bisporus*, Chromogenic media, Extracellular enzyme activity**

양송이는 button mushroom, white mushroom, table mushroom, champignon mushroom 등의 다양한 이름으로 불린다. 분류학적으로는 담자균문, 담자균강, 담자균목, 주름버섯과, 주름버섯속에 속하며 1871년 영국의 식물학자인 Mordecai Cubtt Gooke에 의해 *Agaricus campestris*의 변종으로 보고가 되었다[1]. 덴마크 균학자인 Jakob Emanuel Lange는 1926년에 이 종을 재평가하면서 *Psalliota hortensis* var. *bispora*로 새로이 명명하였다[2]. 1938년 이 종은 Schäffer와 Møller에 의해 *Psalliota bispora*로 다시 명명이 되었으며, Emil에 의해 지금 사용되는 이름인 *Agaricus bisporus*로 명명이 되었다[3]. 양송이는 lignocellulose가 주요 성분인 다양한 기질에서 자라는데, 이는 양송이의 균사 생장이 양송이가 분비하는 다양한 효소에 의한 농업부산물의 생물학적 변환을 통하여 진행된다는 것을 의미한다[4]. 또한 양송이 균사체가 밀집에서 생장할 때, 많은 양의 extracellular phenol oxidases를 생성하며[5], Mn-peroxidase와 laccase 활성을 지닌다고 보고가 되어있다[6,7]. 이렇듯 세포외 효소의 활성 정도는 양송이 균사체 생장에 있어서 매우 중요하며 동시에 양송이 균주의 특성을 나타내는 한 표현인자이기도 하다.

양송이 생산량의 많은 부분이 유럽, 북아메리카 그리고 아시아에 집중되어있으며, 생산량은 약 천이백만톤으로 추산되어진다[8]. 좋은 버섯을 만들기 위해서는 버섯종균이 중요한 역할을 한다. 양송이 육종에 관한 권리는 국제식물신품종보호협약에 의해 보호를 받기 때문에, 유용한 양송이 품종을 개발하는 것이 중요하다. 국내의 양송이 재배는 현재 외국의 수입품종 종균을 이용하여 주로 재배가 이루어지고 있는 바 국산 재배 품종의 개발이 시급한 상황이다. 특히 수출 지향적 재배생산을 위해서는 고유의 품종 개발이 요구되고 있다. 현재 국내의 양송이 육종 기반은 매우

Kor. J. Mycol. 2014 March, **42**(1): 86-90
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.1.86
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**
E-mail: piceae@dankook.ac.kr

Received February 12, 2014
Revised March 19, 2014
Accepted March 21, 2014

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.

미진한 실정이며 육종소재에 대한 기본정보마저 부족한 상황이다. 이에 따라 본 연구에서는 양송이 육종에 필요한 기본 자료를 얻고자 다양한 출처의 양송이 이핵균주를 대상으로 생육 및 생화학적 특성을 비교 검정하였다. 실험에 사용된 이핵균주는 총 31균주로서 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과에서 분양을 받아 실험을 진행하였다. 이 시험 균주들은 총 17개국에서 수집되었으며 대한민국을 포함한 아시아 4개국에서 수집된 11균주, 캐나다를 포함한 북미 2개국에서 수집된 6균주, 남미인 브라질에서 수입된 2균주, 프랑스를 포함한 유럽 5개국에서 수집된 8균주, 호주를 포함한 오세아니아 2개국에서 수집된 4균주로 구성되어있다(Table 1). 시험균주들을 potato dextrose agar (Difco, USA), malt extract agar (BD, USA), oatmeal agar (Difco, USA)에 접종하여 25°C에서 14일간 배양하며 시험균주들의 기질선호도를 평가하였다(Table 1).

대부분의 균주가 다른 배지에 비해서 oatmeal agar (OA)에서 균사 생장이 빠르게 나타났다. 그 다음으로 malt extract agar (MEA) 배지에서 생육이 양호하였고 potato dex-

Table 1. List and characteristics of the *Agaricus* strains used in this study

NO	ASI Strain No.	Source	Characteristics	[a]Substrate preference		
				PDA	MEA	OA
1	ASI1151	Korea	White color, banded agaricus	+++	++	+++
2	ASI1337	Korea	White color (cultivar: Saeah)	+	++	+++
3	ASI1338	Korea	White color (cultivar: Saejeong)	+	++	+++
4	ASI1347	Korea	White color (cultivar: Saeyeon)	+++	++	+++
5	ASI1348	Korea	White color (cultivar: Saedo)	++	++	+++
6	ASI1146	Korea	Brown color	+++	+++	+++
7	ASI1153	Korea	Cream color	+	+	++
8	ASI1024	Taiwan	White color	+	++	+++
9	ASI1047	Japan	White color	+	++	+++
10	ASI1177	Japan	Cream color	+	++	+++
11	ASI1060	India	White color	+	++	+++
12	ASI1031	USA	White color	+	+	+++
13	ASI1032	USA	Cream color	+	+++	+++
14	ASI1038	USA	Brown color	++	+++	+++
15	ASI1171	USA	Banded agaricus	+	++	++
16	ASI1085	Canada	White color	+	++	+++
17	ASI1086	Canada	Brown color	+	+++	+++
18	ASI1330	Brazil	Portobello	+	+++	++
19	ASI1336	Brazil	Brown color	+	++	+++
20	ASI1050	France	Brown color	+++	+	+++
21	ASI1054	France	White color	+	++	+++
22	ASI1164	Germany	Brown color	++	++	+++
23	ASI1095	Germany	White color	++	++	++
24	ASI1138	Germany	White color, banded agaricus	++	++	++
25	ASI1072	Denmark	White color	+	++	++
26	ASI1096	Switzerland	White color	+	++	+++
27	ASI1320	Netherlands	Brown color	++	++	++
28	ASI1324	Australia	White color	+	++	++
29	ASI1323	New Zealand	Brown color	+	+++	+++
30	ASI1326	New Zealand	White color	+	++	++
31	ASI1328	New Zealand	Portobello	+	++	++

[a]PDA (Potato dextrose agar), MEA (Malt extract Agar), OA(Oatmeal agar), +++: mycelium length is more than 50 mm, ++: mycelium length is more than 30 mm and less than 50 mm, +: mycelium length is less than 30 mm.

trose agar (PDA)에서는 균사 생장이 가장 더디게 나타났다. 흥미롭게도 같은 균주이지만 배지에 따라 생육정도가 같은 정도를 나타내는 균주(예, ASI1146, ASI1098, ASI 11389)도 존재하였다. ASI1146 균주의 경우는 유일하게 비교 평가한 3개 배지에서 모두 생장이 우수하였다. 이러한 결과는 배지에 따라 양송이 균주 간에 균사 생장특성에 차이가 존재할 수 있음을 보여준다. 특히 oatmeal agar는 다른 배지에 비하여 식이섬유가 더 포함이 되어있는 것을 고려하면 양송이가 퇴비에서 재배가 이루어지는 진균인 것으로 보아 균주의 기질 선호도가 다르기 때문에 이런 결과가 나왔을 가능성이 있는 것으로 생각되어진다.

조금 더 정확한 기질 선호도를 알아보기 위해 세포외효소의 활성을 검정하였다. 세포외 효소의 활성 정도를 비교하기 위해서 주요 탄소원이 포함된 평판배지에 접종하여 발생반응의 결과로 생성된 분해환의 크기를 비교하여 평가하였다. 검정한 세포외효소는 β-glucosidase, avicellase, CM-cellulase, amylase, pectinase, xylanase, proteinase 총 7가지였다. 세포외효소의 활성정도 비교는 발색배지에 형성된 분해 환의 크기를 이용하여 비교하였다. 활성 검정을 위해서 PDA에서 배양된 이핵균주를 발색반응 배지로 옮겼다. 발색반응 배지에로는 0.1%의 yeast nitrogen base (Difco, USA), 효소반응을 위한 탄소원으로는 0.5%의 D-cellobiose (Sigma, USA), Avicel PH-101 (Fluka, Switzerland), CM-cellulose (Sigma, USA), Polygalacturonic acid (MP Biomedical, France), Xylan oat spelts (Sigma, USA) 등을 각각 사용하였으며, 발색반응을 위해서는 0.5%의 Congo Red dye (Sigma, USA)를 그리고 1.5%의 agar powder를 넣어주었다[9]. 시험균주가 접종된 chromogenic media를 25°C에서 약 14일 간 배양 후 분해환(clear zone)의 길이를 측정하였다. 분해환의 길이는 시험균주가 접종된 곳부터 환이 형성된 곳까지를 측정하였다. 분해환의 색은 congo red를 발색시약으로 사용한 β-glucosidase, avicelase, CM-cellulase, amylase, pectinase, xylanase를 검정한 시험에서 β-glucosidase의 검정 시험에서는 시험균주에 의해 분비된 세포외효소에 의해서 붉은 배지색이 검은 색으로 변한 지점까지 측정을 하였다. β-glucosidase를 제외한 congo red를 사용

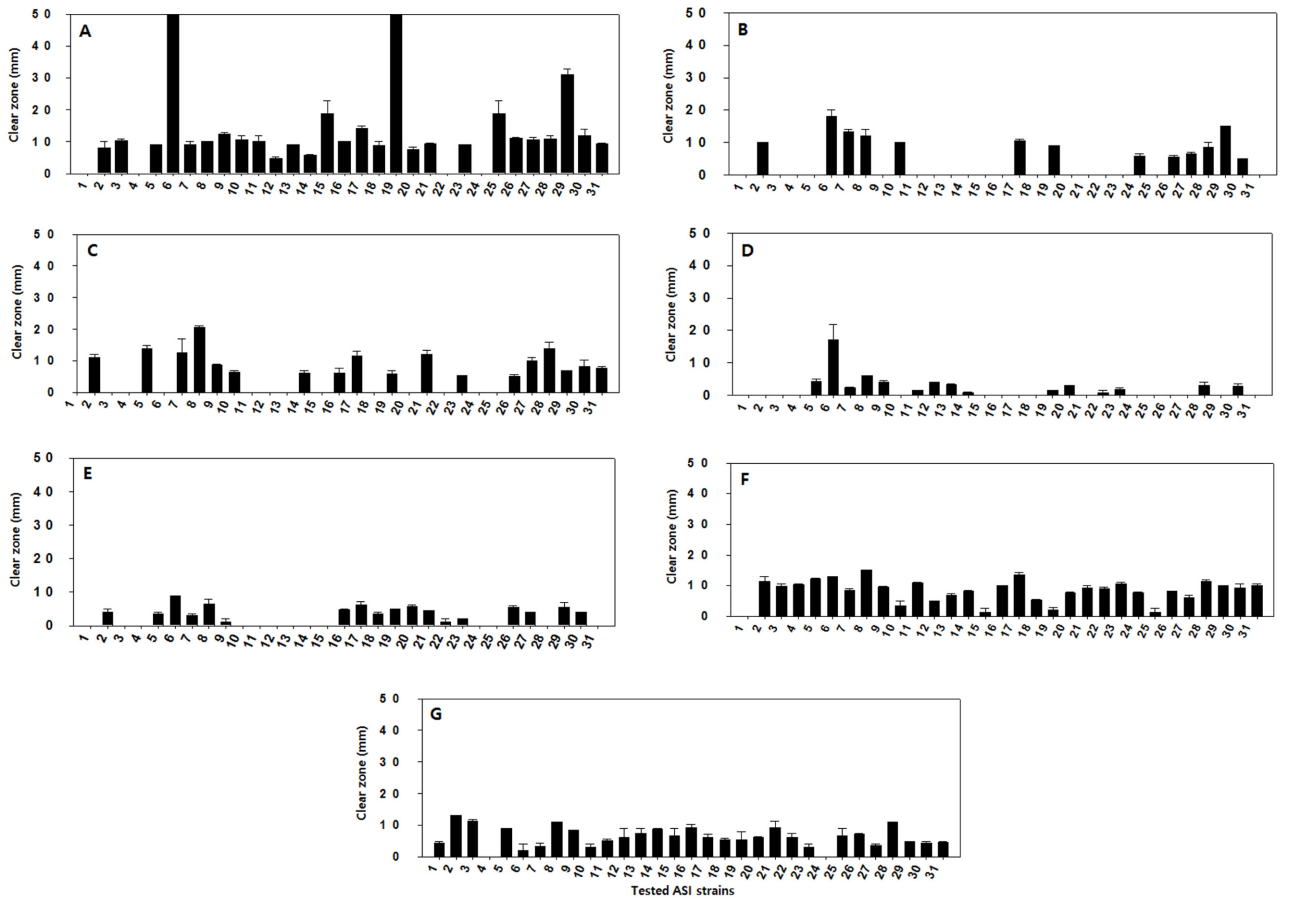

Fig. 1. Comparison of the tested *Agaricus bisporus* strains's extracellular enzyme activity. A, activity of β-glucosidase; B, activity of avicelase; C, activity of CM-cellulase; D, activity of amylase; E, activity of pectinase; F, activity of xylanase; G, activity of protease. Tested ASI strains (1: 1151, 2: 1337, 3: 1338, 4: 1347, 5: 1348, 6: 1146, 7: 1153, 8: 1024, 9: 1047, 10: 1177, 11: 1060, 12: 1031, 13: 1032, 14: 1038, 15: 1171, 16: 1085, 17: 1086, 18: 1330, 19: 1336, 20: 1050, 21: 1054, 22: 1164, 23: 1095, 24: 1138, 25: 1072, 26: 1096, 27: 1320, 28: 1324, 29: 1323, 30: 1326, 31: 1328).

하는 나머지 다섯가지 세포외효소 검정시험에서는 시험균주에 의해 분비된 세포외효소에 의해서 붉은 배지색이 오렌지색으로 바뀌거나 투명해지는 지점까지 측정하였다. Protease를 검정하는 시험에서는 시험균주가 분비한 세포외효소에 의해서 배지의 색이 투명하게 바뀌는 지점까지 측정하였다. 검정한 7가지 세포외 효소 중에서 protease의 활성은 모든 실험균주가 지니고 있었고, 7개 균주를 제외한 31개 균주가 β-glucosidase 활성을 보이는 것을 알 수 있었다(Fig. 1G). 또한 4개 균주를 제외한 34개 균주가 xylanase 활성을 보였다(Fig. 1F). 그러나 실험균주 중에서 절반 이하의 균주에서만 avicelase, CM-cellulase, amylase, pectinase 활성을 보였다(Fig 1B, C, D, E). 본 실험에 사용된 균주들 중에서 β-glucosidase의 활성정도가 검정한 7가지 세포외 효소 중에서 가장 강한 것을 알 수 있었다. 한국에서 수집된 ASI1146 균주, 브라질에서 수집된 ASI1336 균주의 경우에는 다른 시험균주에 비하여 월등히 강한 β-glucosidase의 활성을 보였다. ASI1146균주의 경우에는 β-glucosidase 이외에도 avicelase와 amylase에서 다른 균주에 비해서 강한 활성을 보였으며, 균사 생육배지인 PDA, MEA, OA에서도 우수한 생장을 보였다. 주목할 사항 6가지 효소 모두 균주간 차이를 보는 데 충분함을 보여주고 있다는 점이다. 특히 β-glucosidase, avicelase, CM-cellulase, amylase 등의 경우 균주간 활성이 높고 낮음 또는 활성이 있고 없고 하는 특성이 뚜렷이 확인되었다. 시험배지 위에서 균사의 생장 정도를 비교하였을 때, avicelase, CM-cellulase, amylase, pectinase, xylanase 활성 검정용 배지에서의 균사생장은 매우 적게 일어났으며, 자라난 균사의 밀도 역시 낮았다. β-glucosidase 활성 검정용 배지에서의 균사생장은 avicelase를 포함한 다른 5개 배지에 비해서 조금 더 많이 일어났으며, 균사의 밀도 역시 상대적으로 높은 양상을 보였다. Protease 활성 검정용 배지에서의 균사 생장이 가장 좋았고 생장한 균사의 밀도 역시 가장 높게 나타났다.

본 연구를 통하여 배지 종류에 따라 그리고 세포외효소 종류에 따라 양송이 이핵균주 간에 균사 생육 특성과 효소 특성이 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 여러 출처에서 수집된 양송이 육종의 모본을 평가하기 위한 간단한 방법으로서 서로 다른 생화학적 특성을 지닌 균주를 선별하기 위해 사용되는 발생반응 검정법이 이용 가능함을 제시한다. 이러한 방법은 향후 균주의 보존에 사용되는 퇴비배지에서 균주 간 구분이 힘들 경우 균주간의 구분에 사용되는 생화학적 마커로 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 연구에 사용된 양송이 균주는 국내 연구 기관에서 분양을 받을 수 있으므로 본 연구에서 얻어진 결과는 균주를 분양 받아 양송이 육종 또는 양송이 효소특성을 연구하고자 하는 연구자들이 분양 균주 선택에 귀중한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구에서는 양송이 육종에 필요한 기본 정보를 얻고자 다양한 출처의 양송이 이핵균주를 대상으로 생육 및 생화학적 특성을 비교 검정하였다. 시험한 31균주 중 대부분의 균주가 Oatmeal agar에서 MEA나 PDA에서 보다 균사생장이 우수하였다. 7가지 세포외효소 활성 비교에서 양송이 균주는 대체로 β-glucosidase가 가장 뚜렷한 활성을 나타내었으며 protease의 활성은 모든 균주가 지니고 있었다. β-glucosidase 활성은 27개 균주에서 xylanase 활성은 30개 균주에서 나타났다. 이에 반해 avicelase, CM-cellulase, amylase, pectinase 활성은 20균주 이하에서만 나타났다. 본 연구 결과는 국내 양송이 육종을 위한 균주 선발 기준 중 하나로 이용될 수 있을 것이다.

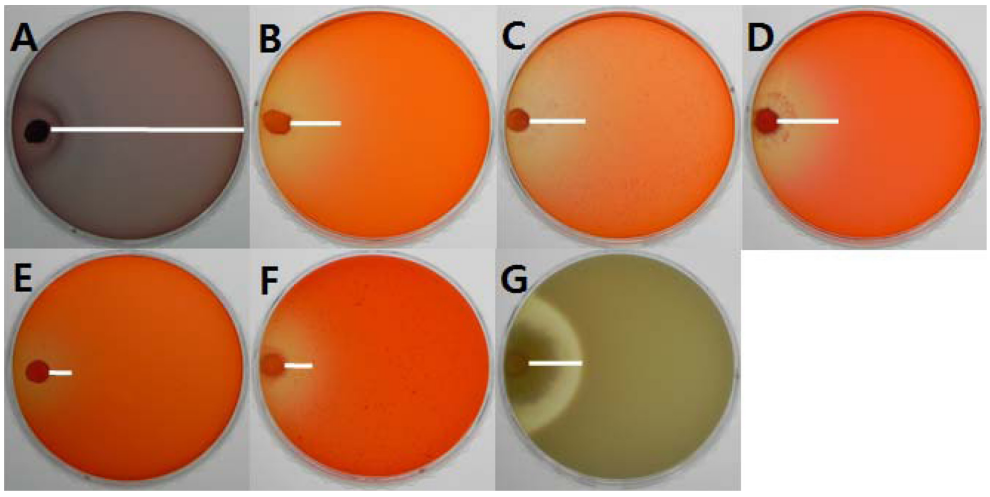

Fig. 2. One of examples of each extracellular enzyme activity on chormogenic medium shown by a tested strain in this study. A, activity of β-glucosidase; B, activity of avicelase; C, activity of CM-cellulase; D, activity of amylase; E, activity of pectinase; F, activity of xylanase; G, activity of protease. Bars indicate measured enzyme activity zone.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호: 213003-04-1-SBJ10)에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cooke MC. Handbook of British Fungi, London: Macmillan and Co, 1871.
2. Lange JE. Studies in the agarics of Denmark. Part VI. *Psailota.* Russula. Dansk botanisk Arkiv. 1926;4:1-52.
3. Cappelli and Alberto. Fungi Europaei: Agaricus. Italy: Saronno, Glovanna Biella, 1984; p. 123-125.
4. Trejo-Hernandez MR, Lopez-Munguia A, Quinotero Ramirez R. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. Process Biochem 2001;36:635-639.
5. Wood DA. Production, purification and properties of extracellular laccase of Agaricus bisporus. J Gen Microbiol 1980; 117:327-328.
6. Inama K, Stone BA, Macauley BJ. Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. Appl Environ Microbiol 1994;60:1538-1546.
7. Bollag JM, Dec J, Huang PM. Formation mechanisms of complex organic structures in soil habitats. Advances in Agronomy 1997;63:237-265.
8. Suman BC and Sharma VP. Mushroom cultivation in India, Delhi: Daya Publishing house, 2007; p. 18-22.
9. Yoon JH, Park JE, Suh DY, Hong SB, Ko SJ, Kim SH. Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi. Mycobiology 2007;35:21-24.