

사업구분 : 기본연구	Code 구분 : LS0212	버섯(전반기)
연구과제 및 세부과제명	연구기간	연구책임자 및 참여연구원(☎)
버섯균주 활력 검정방법 개발 연구	'03~'06	경기도원 버섯연구소 이윤희(229-6125)
버섯균주 활력 진단방법 개발	'03~'06	경기도원 버섯연구소 이윤희(229-6125) (참여연구원) 하태문, 장명준, 이현주
색인용어	균주활력, 지시약, 진단방법	

## ABSTRACT

In this work we have investigated the changes of medium color including several indicators for the distinction of mycelial activity. Among seven kinds of indicator, Bromothymol Blue(BTB) made a considerably change medium color in the three mushrooms, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*. These three mushrooms showed that the longer periods of storage at high temperature, 35°C resulted in the lower mycelial growth. We could find difference of decolorization level according to storage period in *Pleurotus eryngii*. Therefore, The YPL media(0.45% yeast extract, 0.75% peptone, 0.05% lactose) including BTB indicator, was used as a detector of mycelial activity. The suitable BTB concentration, inoculation content, and incubation period for the detection of change of color were 100ppm, 2.4cm<sup>3</sup>/ml, and three days, respectively. However, productivities of sawdust spawn using non-stored and stored mycelia at 35°C were not different significantly.

Based on these results, we developed a simple method for distinction between fresh mycelia and stored mycelia at high temperature(35°C).

**Key words :** Mycelial activity, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, Bromothymol Blue

## 1. 연구목표

버섯은 야생에서는 포자로 번식을 하지만 인공재배시에는 균사체를 액체배지나 톱밥배지에 증식하여 종균으로 사용하고 있다. 종균제조 과정은 감자추출배지 등 한천배지에 계대배양을 거쳐 균사체를 증식하고 지속적인 종균제조를 위해 시험관에 배양한 균(원균)을 저온에 3-6개월간 보존하는 실정이다. 계속되는 계대배양과 보존을 반복하면서 균사활력

의 저하문제가 제기되고 있으나 보존중인 원균 및 톱밥종균 단계에서 균사의 활력 유무를 판단하기는 쉽지 않다. 왜냐하면, 버섯 수확량에 있어서 원균 및 종균단계에서 균사의 활력도 하나의 요인이지만 그보다 균사배양과 자실체 생육과정의 온·습도, 환기등 환경조건이 미치는 영향이 많은 부분을 차지하므로 건전하고 신선한 종균을 접종하여도 균사배양 및 버섯 생육단계에서 환경조절이 적합하지 않아 재배가 제대로 이루어지지 않을 가능성이 높기 때문이다.

리그닌 및 염료 등 난분해성 물질에 대하여 버섯을 포함한 다양한 백색부후균의 분비효소를 이용하여 탈색반응을 유도하거나 분해를 시도한 연구결과가 보고되어 있으며(Platt 등 1985; Rodriguez 등 1999; Cluas 등 2002; Boer 등 2004), 이러한 염료 중에는 pH 변화에 의해 색이 변하는 지시약이 많이 포함되어 있어 탈색반응의 연구재료로 많이 사용된다. 또한, 지시약 BTB와 탄소원으로 Lactose를 배지에 첨가하여 팽이균사를 접종한 후에 탈색반응을 일으킨 균주는 정상적으로 생육을 하였으나, 탈색반응을 일으키지 않은 균주는 자실체가 형성이 되지 않거나 비정상적으로 성장하여 간편한 색변화로 퇴화균사를 구별할 수 있다는 연구결과(Magae 등, 2006)가 보고되기도 하였다.

본 연구에서는 일반적으로 사용되는 지시약을 이용하여, 버섯균사를 접종했을 때 변색이 잘 일어나는 지시약을 선발하고, 버섯이 분비하는 효소중에서 지시약과 변색반응이 잘 일어나는 효소를 선발하여 효소활성과 변색반응과의 관계를 조사하였다. 또한, 큰느타리버섯 등 주요재배버섯에 대하여 효율적으로 균사활력을 구별할 수 있는 활력검정배지를 개발하기 위해 적정 BTB농도, 균사체접종량, 검정배지에서의 배양기간을 선발하여 간이식 균사활력 검정법을 개발하고, 다른 버섯균사의 적용가능성을 검토하고자 본 시험을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### <시험 1> 버섯균주 활력검정용 pH 지시약 선발

#### 가. 시험버섯

경기도농업기술원 버섯연구소에 보유하고 있는 춘추느타리2호, 큰느타리3호, 팽이2호를 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에 계대배양하여 사용하였다.

#### 나. 시험지시약

본 시험에 사용된 지시약은 Congo red 등 7종으로 변색범위와 pH 범위에 따른 색변화는 표1과 같다.

**표 1. 지시약의 변색범위와 색변화**

지시약	변색 pH 범위	색변화
Congo red	3.0~5.2	Blue → Yellow-orange
Methyl orange	3.1~4.4	Red → Yellow-orange
Bromocresol green	3.8~5.4	Yellow → Blue
Methyl red	4.4~6.2	Red → Yellow-orange
Bromocresol purple	5.2~6.8	Yellow → Purple
Bromothymol blue	6.0~7.6	Yellow → Blue
Phenol red	6.4~8.2	Yellow → Red-violet

#### 다. 활력검정용 배지제조

기본배지는 PDA와 YPL(Yeast extract 4.5g, Peptone 7.5g, Lactose 5.0g, Agar20.0g, 증류수1,000 ml)에 각각의 지시약 농도 250 $\mu$ g/ml로 첨가하여 121 $^{\circ}$ C에 20분간 살균하였다. 또한, 액체배지는 위의 성분에서 Agar를 제외하고 제조하여 균체량 및 pH 변화를 조사하였다.

pH에 따른 군사성장량을 조사하기 위해 각각의 기본배지에 HCl과 NaOH로 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 조절하고 121 $^{\circ}$ C에 20분간 살균하여 살균 후의 pH도 측정하였다.

#### 라. 군사성장량 조사

고체배지는 25 $^{\circ}$ C에서 7-10일간 배양한 후 군사성장정도를 비교하기위하여 성장환 지름을 측정하였고 액체배지는 22 $^{\circ}$ C에서 14일간 정치 배양하여 건물중을 측정하였다.

#### 마. pH 측정

배양액에 pH 전극을 담아 pH측정기(ThermoRussell Model RL150)로 3반복 측정하였다.

### 〈시험 2〉 버섯의 지시약 변색효소 선발

#### 가. 시험버섯

버섯연구소에서 보유하고 있는 큰느타리3호를 PDA(Potato Dextrose Agar)에 계대배양하여 사용하였다.

#### 나. 시험지시약

〈시험 1〉에서 1차 선발한 지시약 Bromocresol green, Methyl red, Bromothymol purple, Bromothymol blue, Phenol red 5종을 사용하였다.

#### 다. pH 측정

배양액에 pH 전극을 담아 pH측정기(ThermoRussell Model RL150)로 3반복 측정하였다.

#### 라. 흡광도 측정

배양액을 3ml 채취하여 3반복으로 지시약에 따른 적정 파장(Bromocresol green 612nm, Methyl red 230nm, Bromothymol purple 599nm, Bromothymol blue 613nm, Phenol red 558 nm)에서 spectrophotometer(UVIKON 930, KONTRON instruments)로 측정하였다.

#### 마. 색도 측정

백색종이위에 직경 50mm인 plate를 놓고 배양액을 따라 뚜껑을 덮고 색차계(Minolta 200)로 3반복 측정하여 L, a, b 값으로 나타내었다.

### <시험 3> 균주활력과 효소활성과의 관계 구명

#### 가. 시험버섯

<시험 2>와 동일하게 사용하였다.

#### 나. 시험지시약

<시험 1, 2>의 결과 선발된 BTB를 사용하였다.

#### 다. 균주보존조건

큰느타리3호를 직경 87mm인 plate에 PDA 배지를 분주하여 12-14일간 25℃에서 배양완료 후 35℃ 배양기에 10, 20, 30일간 보존하였다.

#### 라. 흡광도 측정

배양액을 300 $\mu$ l 채취하여 3반복으로 지시약에 따른 적정 파장에서 효소반응측정기(TECAN, GENios)로 측정하였다.

#### 마. 색도 측정

<시험 2>에 준하였다.

#### 바. Laccase 활성 측정

멸균된 YPL broth를 직경 18mm 시험관에 10ml을 분주한 후 큰느타리버섯 균체를 접종하여 25℃에 배양하면서 3일간격으로 시험관 각 처리당 3개씩을 측정한다. 시험관에서 자라고 있는

균사체와 배양액 중 균사체를 여과지로 걸러내고 배양액을 100 $\mu$ l 채취하여 125mM Sodium acetate buffer(pH5.0) 800 $\mu$ l 와 0.25M ABTS 100 $\mu$ l 를 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨다. Spectrophotometer(UNICON930)를 이용하여 420nm 파장에서 흡광도를 측정하며, 이때 Blank는 증류수를 사용하고 Control은 균사체를 접종하지 않은 YPL broth 로 하였다.

아래와 같이 계산식을 적용하여 효소활성을 구하였다.

Unit =  $\mu$ mol/min.ml

= (대조구와 실험구의 흡광도차/3.6)  $\times$  (1/5min)  $\times$  10(100 $\mu$ l 를 ml로환산)

## 사. 종균제조 및 생육특성조사

종균용배지는 미루나무톱밥과 미강을 부피비로 4 : 1로 혼합하여 수분함량은 65%내외로 조절하여 850ml Polypropylene 병에 500-540g 담아 고압살균 (121 $^{\circ}$ C, 90분)하여 큰느타리3호를 접종하여 22 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 배양완료 후 종균으로 사용하였고, 생산성 검정용 배지는 미송톱밥과 미강을 부피비로 70 : 30로 혼합 하여 수분함량은 65%내외로 조절하고 배지량은 540-560g 입병하여 고압살균 하였다. 그리고 배양특성, 초발이소요일수, 생육 및 수확일수, 수량, 자실체 특성은 농촌진흥청 조사기준에 준하여 조사하였다.

## <시험 4> 균주활력검정을 위한 표준검정 기준 설정

### 가. 시험버섯

버섯연구소에 보유하고 있는 큰느타리3호를 PDA(Potato Dextrose Agar)에 계대배양하여 사용하였다.

### 나. 시험지시약

<시험 1, 2>의 결과 선발된 BTB를 사용하였다.

### 다. 균주보존조건

큰느타리3호를 직경 87mm인 plate에 PDA 배지를 분주하여 12-14일간 25 $^{\circ}$ C에서 배양완료 후 4 $^{\circ}$ C와 35 $^{\circ}$ C 배양기에 30일간 보존하였다.

### 라. 흡광도 측정

<시험 2>에 준하였다.

### 마. 색도 측정

<시험 2>에 준하였다.

## 바. Laccase 활성 측정

〈시험 2〉에 준하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 〈시험 1〉 버섯균주 활력검정용 pH 지시약 선별

#### 가. 지시약첨가 배지에서의 변색반응

균사활력 검정을 위한 적합한 기본배지를 선별하기위해 PDB와 YPL배지를 pH4.0~8.0 범위로 조절하여 살균전후의 pH의 변화를 조사한 결과(표 2), pH의 변화에 의한 색변화 반응을 위한 기본배지로는 살균 후에도 pH가 변하지 않는 YPL배지가 적합하였다.

표 2. 액체배지의 살균전후의 pH 변화

배 지	pH				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
PDB	4.1	4.0	5.8	6.1	6.3
YPL	4.1	5.1	6.2	7.0	7.8

선발된 기본배지 YPL에 7가지 지시약을 같은 농도로 첨가하여 균사생장 후 배지의 변색반응을 조사한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 지시약이 첨가된 고체배지에서의 버섯별 변색반응

지시약 <sup>1)</sup>	춘추2호		큰느타리3호		팽이2호	
	변색반응 <sup>2)</sup>	변색정도 <sup>3)</sup>	변색반응	변색정도	변색반응	변색정도
CR	YO→YO	-	YO→YO	-	YO→YO	-
MO	Y→Y	-	Y→Y	-	Y→Y	-
BG	B→Y	+	B→Y	+++	B→B	-
MR	Y→Y	-	Y→Y	-	Y→Y	-
BP	P→Y	+++	P→Y	+++	P→P	+
BTB	Y→Y	-	Y→Y	-	Y→B	+++
PR	Y→Y	-	Y→Y	-	Y→R	++

1) CR : Congo red, MO : Methyl orange, BG : Bromocresol green, MR : Methyl red, BP : Bromocresol purple, BTB : Bromothymol blue, PR : Phenol red

2) YO : Yellow orange, Y : Yellow, B : Blue, R : Red, P : Purple

3) - : 없음, + : 약함, ++ : 보통, +++ : 강함

CR, MO, MR은 색변화가 없었고, BG, BP, BTB, PR은 버섯에 따라 변화양상은 다르지만 색변화가 있었는데, BG와 BP배지에서는 춘추2호와 큰느타리3호는 노란색으로 변화했으나 팽이2호는 변화가 없었다. 반면, BTB와 PR배지에서는 춘추2호와 큰느타리3호는 색변화가 없었으나 팽이2호는 각각 푸른색과 빨간색으로 변화했다. 변색양상을 보면, 춘추2호와 큰느타리3호는 균사가 성장한 부위의 배지의 색이 노란색으로 변화했고, 팽이2호는 균사성장부위 뿐만 아니라 배지 전체가 BTB는 청녹색, PR배지는 빨간색으로 변색반응을 보였다. 분류학적으로 춘추2호와 큰느타리3호는 느타리속에 속하여 팽이2호와는 다른 변색양상을 보인 것으로 추정되며, 버섯에 따라 변색반응을 보이는 지시약과 변색양상이 다른 것을 알 수 있었다. 또한, 리그닌분해균으로 알려져 있는 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용하여 여러 가지 색소 물질의 탈색반응을 조사한 결과(Rodriquez 등, 1999) Congo red는 탈색반응이 일어나지 않아 균주에 따라 탈색작용을 할 수 있는 물질이 다르다는 것을 알 수 있었다.

표 4. YPL배지에서 버섯별 배양기간에 따른 pH 변화

품종명	배 양 기 간(일)			
	0	4	8	12
춘추2호	7.0	6.9	6.8	6.7
큰느타리3호	7.0	6.9	6.8	6.7
팽이2호	7.0	7.0	6.7	6.7

지시약이 포함된 배지의 색변화가 pH의 변화에 의한 것인지 확인하기 위해 액체배지에서(YPL) 배지의 pH변화를 조사한 결과(표 4), 초기 pH 7.0에서 배양 12일에는 pH는 6.7내외로 거의 변화가 없었는데 표 3의 BG, BP, BTB, PR에서 색변화가 일어난 것은 배지의 pH에 의한 것이 아닌 다른 요인에 의한 것으로 판단되었으며, 여러 가지 염색물질 및 난분해성물질을 분해하기 위해 백색부후균의 리그닌분해능을 이용한다는 연구결과가 보고된 바 있어(Platt 등, 1985; Rodriquez 등, 1999) 본 시험에 사용된 지시약들은 색을 나타내는 염색물질이므로 백색부후균에 속하는 버섯류의 리그닌분해능에 의해 배지가 탈색된 것으로 추정되었다.

#### 나. 고온보존균주의 배지 변색반응

균사활력에 따른 지시약 변색반응을 확인하고자 균주를 25℃에서 배양완료 후 인위적으로 활력저하 조건인 고온(35℃)에서 일정기간 보존하여 선발된 지시약을 포함한 검정배지에서 변색정도를 조사하고 균사생장을 비교하였다.

보존기간에 따른 버섯별 균사생장량(표5)은 PDA배지에서 YPLB(지시약 BTB첨가)배지보다 모든 버섯의 균사생장량이 높았고, 버섯별로 보면 춘추2호는 60일 이후, 큰느타리3호는 40일 이후에 균사생장량이 떨어졌고, 팽이2호는 10일 이후에 급격히 균사생장량이 저조하여 느타리버섯

보다 저온에서 생육하는 팽이의 경우는 고온처리에 의해 활력이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

표 5. 버섯별 보존기간에 따른 균사생장량(mm/7일)

품종명	배지	보존기간(일)					
		0(대조)	10	20	40	60	90
춘추2호	PDA	63.5	62.3	63.4	56.3	61.4	12.4
	YPLB	57.9	36.4	36.6	34.8	40.4	3.3
큰느타리3호	PDA	56.1	58.0	52.9	49.6	49.4	0
	YPLB	41.2	43.9	39.5	35.6	28.8	0
팽이2호	PDA	56.8	14.3	5.2	0	0	0
	YPLB	71.4	52.1	0	0	0	0

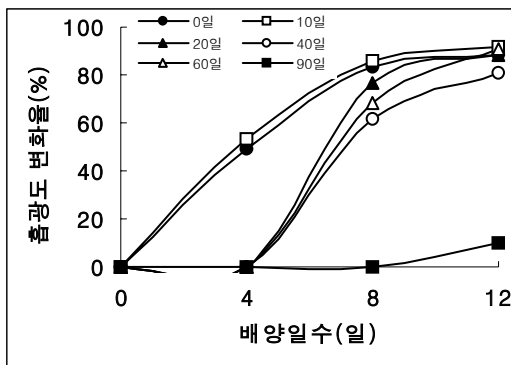
※ 보존온도 : 35℃

35℃에서 보존된 균사를 선발된 지시약배지에 균사를 성장하여 배지의 변색 정도를 조사한 결과(그림 1, A-C), 춘추2호는 90일 보존한 균주는 BP와 BTB 검정배지에서 12일간 배양하여도 흡광도 변화율이 거의 없었고, 큰느타리3호는 BP검정배지에서는 배양 8일까지 모든 보존균주의 변색반응이 나타나지 않았고, BTB검정배지에서는 배양 8일째 보존기간40일 이후는 약한 변색반응을 나타내었다. 팽이2호는 PR과 BTB검정배지 모두 보존균주의 변색반응이 거의 일어나지 않아 지시약 색깔변화의 차이가 뚜렷하였다.

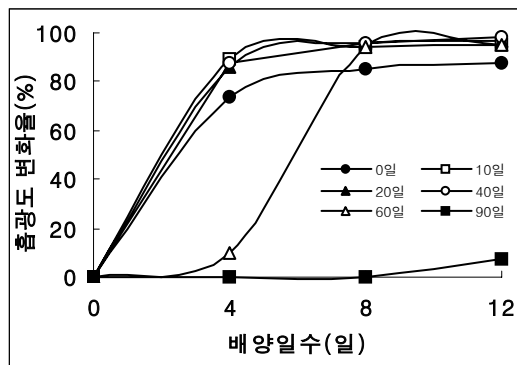
이상의 결과로, 활력이 저하된 균주와 활력이 정상적으로 유지된 균주를 느타리버섯과 팽이버섯에 공통적으로 BTB지시약을 포함한 배지에 일정기간 배양하여 그 변색정도에 따라 균사 활력정도를 판단할 수 있을 것으로 생각된다.

A. 춘추2호

○ BP



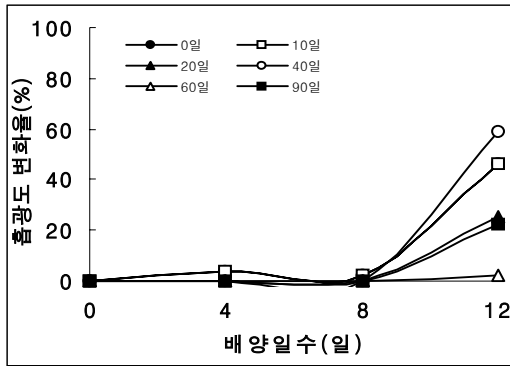
○ BTB



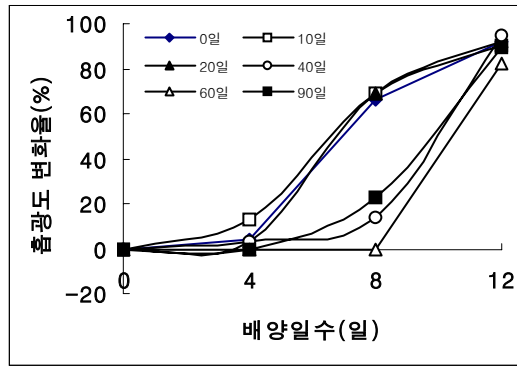


B. 큰느타리3호

○ BP

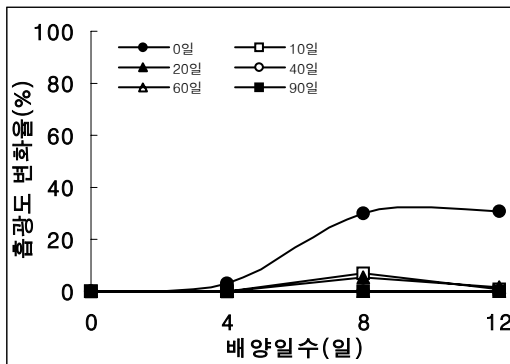


○ BTB



C. 팡이2호

○ PR



○ BTB

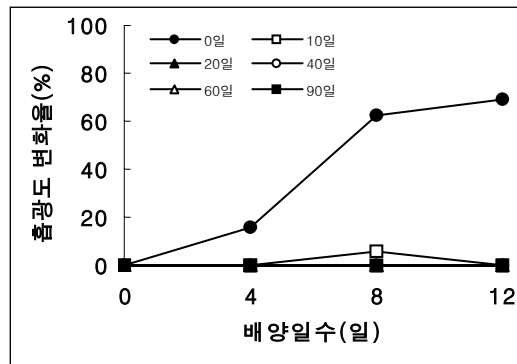


그림 1. 버섯 및 지시약 종류별 배양일수에 따른 흡광도 변화

<시험 2> 버섯의 지시약 변색효소 선발

버섯은 배지의 성분을 여러 가지 효소를 분비하여 이용하는데, 군사의 활력과 효소활성과의 관계를 알아보기 위해 선발한 5종의 지시약과 버섯이 분비하는 효소 5종과의 변색 반응을 조사하여 변색반응을 뚜렷이 나타내는 지시약과 효소를 선발하고자 큰느타리 군사의 지시약 함유배지에서의 배양 전·후 변색정도를 조사한 결과는 표 6과 같다.

표 6. 큰느타리버섯 균사의 지시약종류별 색변화정도

지시약	접종전 · 후의 색차( $\Delta E$ )	접종전후의 흡광도차( $\Delta OD$ )	접종전후의 pH차이
NR <sup>↓</sup>	5.6	0.0680	0.1
MR	9.1	0.0168	0.1
BP	22.6	0.1291	0.2
BTB	29.3	0.1369	0.1
PR	3.5	0.0158	0.1

↓ NR : Neutral red, MR : Methyl red, BP : Bromocresol purple  
 BTB : Bromothymol blue, PR : Phenol red

모든 지시약에서 큰느타리 균사 접종전후의 pH변화는 거의 없었으나, BP와 BTB 용액에서 색도 및 흡광도의 차이 및 변색정도가 심하였다. 따라서, 이러한 변색반응은 배지의 pH에 의한 것보다 버섯균사가 지시약을 분해하거나, 균사의 대사산물과 지시약성분과의 반응에 의한 것으로 추정된다. 일반적으로 지시약은 리그닌의 성분과 비슷한 벤젠링을 포함한 페놀화합물의 화학구조를 갖고 있어(Merck Index, 11<sup>th</sup> edition) 버섯균사가 지시약을 분해하여 배지의 색을 연하게 탈색시키는 것으로 추정된다.

또한, 버섯균사가 분비하는 효소 중 5가지와 지시약용액과의 변색반응을 조사하였다(표 7). NR, BP, BTB는 Laccase, MR은  $\beta$ -glucanase, PR은 Esterase와의 반응에서 색차가 심하였고, 특히 BTB가 첨가된 배지에서는 Lignin-peroxidase,  $\beta$ -glucanase, Laccase 등 리그닌분해효소와 당분해효소등 다양한 효소와의 변색반응이 높아 활력검정용 배지에는 지시약으로는 BTB가 적합하였고, 모든 지시약과의 변색반응을 보면 Laccase 효소액이 색차와 흡광도변화량이 가장 커서 지시약을 이용한 균사활력 검정을 위해서는 Laccase 가 적합하리라 판단되었다.

표 7. 지시약종류 및 효소종류별 변색반응

지시약종류 <sup>↓</sup>	효소종류	색차 <sup>b</sup> ( $\Delta E$ )	흡광도차 <sup>a</sup> ( $\Delta OD$ )
NR	Esterase	14.4	0.0771
	Cellulase	14.4	0.1857
	Lignin-peroxidase	17.4	0.0041
	$\beta$ -glucanase	22.0	0.0797
	Laccase	35.1	0.2223
MR	Esterase	11.5	0.1775
	Cellulase	18.8	0.0142
	Lignin-peroxidase	18.4	0.0428

지시약종류 <sup>ㄱ</sup>	효소종류	색차 <sup>ㄴ</sup> (ΔE)	흡광도차 <sup>ㄹ</sup> (ΔOD)
BP	<i>β</i> -glucanase	42.3	0.0791
	Laccase	20.3	0.0791
	Esterase	4.3	0.0008
	Cellulase	5.9	0.0439
	Lignin-peroxidase	6.6	0.0264
	<i>β</i> -glucanase	36.0	0.0105
BTB	Laccase	47.1	0.0607
	Esterase	12.9	0.0313
	Cellulase	6.8	0.1164
	Lignin-peroxidase	39.2	0.0808
	<i>β</i> -glucanase	56.4	0.1472
	<b>Laccase</b>	<b>78.1</b>	<b>0.4494</b>
PR	Esterase	32.7	0.1089
	Cellulase	10.4	0.0878
	Lignin-peroxidase	4.3	0.0025
	<i>β</i> -glucanase	17.4	0.0708
	Laccase	6.7	0.2610

ㄱNR : Neutral red, MR : Methyl red, BP : Bromocresol purple, BTB : Bromothymol blue, PR : Phenol red

$$\Delta E = \sqrt{(L\text{지시약}-L\text{효소액첨가후})^2 + (a\text{지시약}-a\text{효소액첨가후})^2 + (b\text{지시약}-b\text{효소액첨가후})^2}$$

$$\Delta OD = OD\text{지시약}-OD\text{효소액첨가후}$$

※ 지시약 첨가농도 : 500ppm

Glenn(1983) 등의 연구결과에 의하면 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium* 의 phenol oxidase 와 리그닌분해활성이 부족한 균주는 Poly B-411 등 여러 가지 중합색소의 탈색작용이 일어나지 않았으며, 느타리버섯도 색소의 탈색작용 중에 Laccase와 manganese peroxidase 의 활성이 높았고, Laccase 활성이 낮은 *Pleurotus florida* 변이균주는 균사생장이 저조하고 자실체생성이 되지 않았다(Das 등, 1997)는 연구결과, Laccase 활성은 버섯 균사활력에 많은 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다.

표 8. Laccase 반응온도별 BTB 용액의 색차<sup>ㄴ</sup>(ΔE)

반응온도(℃)	25	30	35	40	45
색차(ΔE)	25.3	26.7	27.1	27.7	23.7

$$\Delta E = \sqrt{(L\text{지시약}-L\text{효소액첨가후})^2 + (a\text{지시약}-a\text{효소액첨가후})^2 + (b\text{지시약}-b\text{효소액첨가후})^2}$$

※ BTB농도 : 5000ppm

BTB용액과 Laccase 반응에 적합한 온도를 알아보기 위해 온도별 색차를 조사한 결과(표8.), 온도에 따른 차이가 없어 지시약 BTB를 이용한 활력검정배지에서 버섯균사에서 분비된 Laccase는 온도에 영향을 받지 않고 활성을 나타내리라 추정되었고, Laccase는 폭넓은 기질특이성을 갖고 있으며 여러 종류의 염색물질의 탈색작용을 일으키며, 적정 반응 pH는 4.5이나 pH 3.0~10.0 범위에서 24시간 상온에서 안정된 특성을 가진 효소이므로(Munoz 등, 1997), 버섯의 균사활력을 측정하는데 적합한 효소라고 판단되었다.

### 〈시험 3〉 균주활력과 효소활성과의 관계 구명

#### 가. 버섯균주 활력검정 배지에서의 효소활성에 따른 변색반응

버섯 균사단계에서 색변화와 효소활성과의 관계를 구명하기위해, 활력저하 조건인 고온(35℃)에서 30일간 보존하여 색변화 및 Laccase 활성을 조사하고 고온보존균사를 톱밥 균주(대조)로 제조하여 배양 및 생육특성에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다.

큰느타리버섯 균사를 배양완료 후 고온 35℃에서 30일간 보존하여 10일간격으로 시료를 채취하여 활력검정배지에서 흡광도 및 색도변화를 3일 배양하면서 조사한 결과(표 9, 10), 보존기간에 따른 탈색율은 보존기간이 길수록 낮아졌으며 보존하지 않은 균주(대조)보다 보존균주가 낮았다. 배양기간에 따른 탈색율은 보존기간에 관계없이 2일 배양에서 높았다. 보존기간과 배양기간에 따른 색차변화는 탈색율과 비슷한 경향을 나타내었다. 이상의 BTB를 포함한 활력검정배지의 탈색 및 색차 조사 결과, BTB 농도 25ppm 일 경우에는 고온보존 균주와 보존하지 않은 균주를 2일간 25℃에 배양하면 구별할 수 있을 것으로 생각되었다.

표 9. 보존기간 및 배양기간에 따른 활력검정배지의 흡광도 및 탈색율

보존기간(일)	배양기간(일)					
	1		2		3	
	흡광도	탈색율 <sup>↓</sup> (%)	흡광도	탈색율(%)	흡광도	탈색율(%)
0	0.337	21.6	0.197	54.2	0.292	32.1
10	0.355	17.4	0.253	41.2	0.306	28.8
20	0.369	14.2	0.269	37.4	0.263	38.8
30	0.371	13.7	0.278	35.3	0.321	25.3

↓ 탈색율(Decolorization Ratio,%) = [(흡광도 배양전-흡광도 배양후)/흡광도 배양전] ×100  
 ※ 검정배지 : YBL+BTB(25ppm), 초기흡광도 : 0.430

표 10. 균주 보존기간에 따른 활력검정 배지의 색차( $\Delta E$ )<sup>↓</sup>

보존기간(일)	배양기간(일)		
	1	2	3
0	13.9	18.9	10.1
10	10.8	12.5	7.5
20	8.8	6.9	10.2
30	8.1	5.7	5.2

$$\downarrow \Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

※검정배지 : YPL+BTB(25ppm).

표 11에서는 효소활성을 분석한 결과를 나타내었는데, 배양기간이 길수록 Laccase 활성은 점차 증가하였으나, 30일보존 균주는 배양 3일째에 감소하였다. Laccase 활성, 탈색율, 색차의 상관계수를 분석한 결과(표12), Laccase 활성과 색차, 탈색율과 색차의 상관계수는 낮았으나, Laccase 활성과 탈색율과의 상관계수는 0.699로 5% 수준에서 유의성이 있어(표12), BTB를 포함한 배지에서 탈색율이 높으면 균사의 Laccase 활성이 높은 것으로 추정할 수 있었다. 또한, 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*의 phenol oxidase 와 리그닌분해활성이 부족한 균주는 Poly B-411 등 여러 가지 중합색소의 탈색작용이 일어나지 않았으며(Glenn 등, 1983), 느타리 버섯 균사배양액의 Laccase 활성이 탈색과정에 관여한다는 연구결과(Rodriguez 등, 1999)와 일치하였다.

표 11. 보존기간 및 배양기간 에 따른 Laccase 활성

보존기간(일)	배양기간(일)		
	1	2	3
0	0.43±0.08 <sup>↓</sup>	0.55±0.10	0.61±0.08
10	0.22±0.07	0.31±0.01	0.47±0.01
20	0.19±0.04	0.45±0.13	0.52±0.05
30	0.24±0.01	0.43±0.20	0.32±0.01

※검정배지 : YPL+BTB(25ppm), Laccase activity(unit) = umol/min, ml

↓표준편차

표 12. Laccase 활성, 탈색율, 색차의 상관계수

	Laccase 활성	탈색율	색차
Laccase 활성	-		
탈색율	0.699	-	
색차	0.276	0.450	-

## 나. 균주보존기간에 따른 버섯생육특성 조사

고온보존 기간별로 생산력을 검정한 결과(표 13), 생육단계별 소요일수는 고온 보존기간에 따른 차이가 없어 총재배소요일수는 54~56일이 소요되었지만, 고온보존기간이 길수록 배양율은 저하되었으나, 자실체 품질 및 수량은(표 14) 고온보존 기간에 따른 차이가 거의 없었다.

표 13. 큰느타리 균주 보존기간에 따른 배양적 특성과 재배소요일수

보존기간 (일)	배양율 <sup>↓</sup> (%)	오염율 (%)	미배양율 (%)	재배일수(일)				
				배양	발이	생육	수확	계
0	95.9	2.3	1.8	30	10	8	8	56
10	95.1	2.1	2.8	30	9	8	7	54
20	89.6	5.6	4.8	31	9	8	7	55
30	84.0	2.1	13.9	32	9	8	7	56

↓ 접종 후 30일 조사

표 14. 균주 보존기간에 따른 수량 및 자실체 품질

보존기간 (일)	발이경수 (개/병)	유효경수 (개/병)	대길이 (mm)	대굵기 (mm)	갓크기 (mm)	수량 (g/병)
0	3.3	1.8	109.1	29.9	44.6	96.8 a <sup>↓</sup>
10	3.2	1.7	106.2	29.4	45.4	93.8 a
20	3.2	1.5	105.4	29.4	45.0	95.1 a
30	3.9	1.7	105.4	28.3	44.0	100.7 a

↓ DMRT(95%)

균사활력 검정배지의 색변화 및 Laccase 활성은 결과에서는(표 9, 표 10, 표 11) 고온에서 30일 보존하면 Laccase 활성이 저하되어 탈색정도도 낮아지는데, 균사배양 및 자실체 생육에는 보존하지 않은 균주와 차이를 보이지 않은 것은 종균제조 및 버섯 재배과정에서의 환경요인(배지조성, 온도, 습도, 환기조건 등)이 크게 작용하여 균활력 저하가 상쇄된 것으로 추정된다.

## 〈시험 4〉 균주활력검정을 위한 표준검정 기준 설정

### 가. BTB농도, 균사체접종량 및 배양기간에 따른 탈색율 변화

균사상태에서 활력여부를 간편하게 판단하기 위해서 활력검정조건에 따른 배지의 색변화 및 Laccase 활성을 조사하였다. PDA배지에서 균사(큰느타리3호)배양 후에 보존하지 않은 균사(대조)와 저온 4℃와 고온 35℃에 30일간 보존한 균사를 활력 검정배지에 접종

하여, BTB농도, 균사체접종량, 배양기간에 따른 탈색율을 비교하였다(표 15-1, 표 15-2, 표 15-3). 탈색율은 BTB의 적정 파장 610nm에서 반응전후의 변화율을 백분율로 계산한 값으로 높을수록 배지의 색이 연한 노란색으로 변하여 육안으로 쉽게 구별이 가능하다.

표 15-1. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 활력검정배지의 탈색율<sup>1</sup> (BTB농도 : 25ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	11.2	30.9	10.0
	2	22.6	42.4	17.5
	3	24.7	52.8	12.9
2.4	1	14.6	25.7	13.7
	2	29.6	36.0	28.1
	3	48.6	46.1	30.2
3.6	1	24.2	33.8	17.5
	2	35.8	35.0	22.2
	3	46.0	44.4	22.4

<sup>1</sup>탈색율(Decolorization Ratio,%) = [(흡광도 배양전-흡광도 배양후)/흡광도 배양전] ×100  
 ※보존기간 : 30일

배양기간이 길수록 탈색율은 증가하였으며, 배양 3일째의 탈색율을 비교하면 BTB농도가 높을수록 탈색율은 증가하거나 100ppm 일때 증가하다가 200ppm에서 감소하는 경향을 보였는데, 보존하지 않은 균주와 4°C 보존 균주는 100ppm 일때 가장 탈색율이 높았고, 35°C 보존균주는 200ppm에서 탈색율 증가량이 감소하여 큰느타리 균사의 분비효소에 의한 탈색반응에 적합한 BTB 농도는 100ppm 으로 판단되었다.

표 15-2. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 활력검정배지의 탈색율<sup>1</sup> (BTB농도 : 100ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	7.3	34.5	7.9
	2	25.3	31.0	17.3
	3	43.6	67.8	22.9
2.4	1	28.6	34.3	12.7
	2	36.5	51.3	24.2
	3	55.2	41.7	36.3

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
3.6	1	35.5	55.1	20.6
	2	39.0	61.2	28.4
	3	48.2	61.8	32.2

↓ 탈색율(Decolorization Ratio,%) = [(흡광도 배양전-흡광도 배양후)/흡광도 배양전] ×100  
 ※보존기간 : 30일

표 15-3. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 활력검정배지의 탈색율<sup>↓</sup>(BTB농도 : 200ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	5.4	37.0	12.5
	2	50.6	30.4	26.0
	3	41.5	41.1	22.6
2.4	1	28.8	37.6	17.6
	2	47.0	44.8	28.3
	3	44.2	51.4	32.7
3.6	1	42.3	47.5	16.5
	2	46.1	50.9	28.7
	3	50.3	57.5	37.1

↓ 탈색율(Decolorization Ratio,%) = [(흡광도 배양전-흡광도 배양후)/흡광도 배양전] ×100  
 ※보존기간 : 30일

접종량에 따른 탈색율은 접종량이 많을수록 증가하였으나, 4°C 보존균주는 BTB 농도가 25ppm, 100ppm 일때는 접종량을 적게하여도 탈색반응이 잘 일어나고 200ppm 일때는 접종량이 많을수록 탈색율이 증가하여, 균주의 활력정도에 따라 탈색작용에서 기질로 작용하는 BTB의 농도가 다르다는 것을 추정할 수 있다. 보존균주별로 보면, 4°C에 보존한 균주가 보존하지 않은 균주에 비하여 탈색율이 높게 나타나고, 35°C에 보존한 균주는 낮게 나타나 보존온도에 따른 활력의 변화가 일어남을 추정할 수 있었고, 4°C에 보존하는 경우는 활력이 유지되어 탈색율이 높게 나타나고, 35°C 보존 균주는 고온에 의한 활력의 저하로 탈색율이 낮게 나타난 것으로 판단되었다.

#### 나. BTB농도, 균사체접종량 및 배양기간에 따른 Laccase 활성 변화

BTB농도, 접종량, 배양기간별 리그닌분해 효소중의 하나인 Laccase 활성을 조사한 결과는 표 16-1, 표 16-2, 표 16-3에서 보는바와 같다.



표 16-1. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 Laccase 활성 (BTB 농도 : 25ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	0.075	0.292	0.032
	2	0.306	0.352	0.105
	3	0.191	0.338	0.113
2.4	1	0.127	0.406	0.066
	2	0.410	0.601	0.320
	3	0.532	0.647	0.455
3.6	1	0.225	0.551	0.110
	2	0.540	0.633	0.436
	3	0.654	0.645	0.467

<sup>1</sup>Laccase activity(unit) = umol/min. ml

※보존기간 : 30일

접종량이 1.2cm<sup>3</sup>/10ml 일 때는 BTB 농도가 높을수록 증가하였으나, 접종량이 2.4cm<sup>3</sup>/10ml 이상일 때는 100ppm에서 높았다. 배양기간이 길수록 Laccase 활성이 증가하는 추세였으며 배양 2일 이후에는 활성의 증가량이 적거나 감소하는 경우도 있었다.

표 16-2. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 Laccase 활성 (BTB 농도 : 100ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	0.059	0.340	0.040
	2	0.164	0.381	0.068
	3	0.107	0.249	0.149
2.4	1	0.214	0.404	0.092
	2	0.316	0.406	0.203
	3	0.288	0.515	0.354
3.6	1	0.332	0.526	0.223
	2	0.507	0.549	0.316
	3	0.444	0.567	0.338

<sup>1</sup>Laccase activity(unit) = umol/min. ml

※보존기간 : 30일

표 16-3. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 Laccase 활성 (BTB 농도 : 200ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	0.049	0.207	0.038
	2	0.058	0.333	0.218
	3	0.099	0.423	0.174
2.4	1	0.425	0.420	0.059
	2	0.227	0.401	0.253
	3	0.368	0.406	0.258
3.6	1	0.265	0.390	0.167
	2	0.351	0.454	0.240
	3	0.409	0.435	0.299

<sup>J</sup>Laccase activity(unit) = umol/min. ml

※보존기간 : 30일

접종량이 많을수록 Laccase 활성이 증가하였고, 4°C보존균주가 보존하지 않은 균주보다 높은 활성을 나타내었고, 35°C보존균주는 가장 낮은 활성을 나타내어, 앞의 탈색율 결과(표 15-1, 표 15-2, 표 15-3)와 같이 저온 4°C에서 30일간 보존하여도 Laccase 활성이 저하되지 않았음을 추정할 수 있었다.

#### 다. BTB농도, 균사체접종량 및 배양기간에 따른 색차

BTB농도, 접종량, 배양기간에 따른 활력검정배지의 색차는 백색도(L값), 적색도(a 값), 황색도(b 값)의 반응전후의 색변화를 분석한 결과는 표 17-1, 표 17-2, 표 17-3에서 보는 바와 같다.

표 17-1. 큰느타리 균사체 접종량 및배양기간에 따른 색차(ΔE)<sup>J</sup> (BTB 농도 : 25ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	2.8	18.7	2.5
	2	6.1	23.3	3.1
	3	7.4	30.9	3.0
2.4	1	4.5	22.9	7.5
	2	12.3	20.2	8.2
	3	22.8	25.5	6.5

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
3.6	1	3.7	25.5	6.1
	2	9.7	22.6	8.5
	3	8.4	28.2	6.0

$$^J \Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

※보존기간 : 30일

BTB농도 100ppm 일때 색차가 증가하다가 200ppm에서 감소하였는데 이는 배지색이 녹색에서 연두색으로 탈색하면서 백색도와 황색도 값의 변화량이 색차에 영향에 의한 것으로 판단되었다. 접종량별 3일 배양 후의 색차는 접종량이 많을수록 증가하였으나 보존하지 않은 균주와 4°C 보존균주는 BTB 농도가 25ppm과 100ppm 일 때 감소하는 경우도 있었다. 배양기간에 따른 색차는 보존하지 않은 균주는 배양기간이 길수록 증가하는 추세였으나 35°C보존한 균주는 배양기간이 길수록 색차가 감소하였다. 4°C에서 30일 보존한 균주에서 색차가 가장 높아 앞의 탈색율과 Laccase 활성 결과와 일치하였다.

표 17-2. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 색차( $\Delta E$ )<sup>J</sup> (BTB 농도 : 100ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(°C)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	6.3	10.7	9.2
	2	13.1	30.7	15.1
	3	29.1	115.1	7.5
2.4	1	27.5	62.7	22.7
	2	40.6	95.5	31.0
	3	80.7	40.8	19.9
3.6	1	35.0	176.6	37.0
	2	43.8	147.6	49.8
	3	52.3	141.0	23.2

$$^J \Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

※보존기간 : 30일, 접종원 : 큰느타리3호 균사체

표 17-3. 큰느타리 균사체 접종량 및 배양기간에 따른 색차(ΔE)<sup>1</sup>

(BTB 농도 : 200ppm)

접종량 (cm <sup>3</sup> /10ml)	배양기간 (일)	보존온도(℃)		
		무보존(대조)	4	35
1.2	1	2.4	34.8	7.5
	2	3.9	7.3	6.3
	3	8.0	14.2	0.5
2.4	1	10.1	72.1	15.4
	2	40.8	23.9	9.7
	3	17.9	25.7	9.3
3.6	1	42.1	101.5	20.8
	2	29.3	57.9	7.2
	3	28.5	70.7	9.1

$$^1 \Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

※ 보존기간 : 30일, 접종원 : 큰느타리3호 균사체

BTB농도 100ppm 처리에서 가장 큰 색차를 나타내어 육안으로 처리간의 색구별 하기에 적합한 농도라고 판단되었다. 이상의 결과를 종합적으로 볼 때, BTB는 기본배지 YPL에 100ppm 농도로 첨가하고, 균사체는 2.4cm<sup>3</sup>/10 ml 접종하여 25℃에서 3일간 배양한 후 배지의 탈색정도를 비교하여 균주의 활력을 간편하게 구별할 수 있을 것으로 판단되었다.

#### 4. 적 요

버섯균주의 활력을 지시약을 이용하여 간편하게 구별하기 위한 방법 개발을 위해 수행한 결과는 아래와 같다.

- 가. 춘추2호와 큰느타리3호는 BP와 BTB를 첨가한 고체배지의 색이 자색에서 노란색으로 변화하였으며, 팽이2호는 PR 고체배지에서는 주황색에서 적색으로, BTB 고체배지에서는 녹색에서 청록색으로 색변화가 일어나 버섯별 색변화 양상에 차이가 있었다.
- 나. 버섯균주의 고온보존기간이 길수록 균사생장량이 저하되었으며, 춘추2호, 큰느타리3호, 팽이2호 순으로 고온에 의한 균사생장 저해 영향을 적게받아, 팽이2호는 고온에서 10일간 보존하여도 균사생장속도가 급격히 저하되었다.
- 다. 지시약과 효소용액과의 변색반응을 조사한 결과, BTB용액에 Laccase 효소액을 넣었을 때 흡광도와 색도에서 변화량이 가장 높아 BTB를 첨가하여 활력검정배지를 개발하고 laccase 활성을 조사하였다.
- 라. 고온 35℃에 30일간 보존하여 10일 간격으로 색변화를 조사한 결과, Laccase 활성은 30일보존 균주가 가장 낮았다.

- 마. 고온 보존 균주를 이용하여 생산력을 검정한 결과, 20일 보존 균주가 배양기간 중 오염율이 5.6%로 가장 높았으나 수량에는 처리간 차이가 없었다.
- 바. 기본배지 YPL에 BTB를 100ppm 첨가하고, 균사체는 2.4cm<sup>2</sup>/10ml 접종하여 25℃에서 3일간 배양하면, 고온보존균주는 배지의 색변화가 거의 없었으며 보존하지 않은 신선한 균주는 녹색에서 연두색으로 탈색작용이 일어나 두 균주를 구별할 수 있었다.

## 5. 인용문헌

- Boer C G, Obici L, de Souza G M, Peralta R M. 2004. Decolorization of synthetic dye by solid state cultures of *Letinula(Letinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology* 94 : 107-112.
- Claus H, Faber G, Konig H. 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 : 672-678
- Das N, Sengupta S, Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied and Environmental Microbiology* 63 : 4120-4122
- Glenn J K, Gold M H. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 45 No.6. pp.1741-1747
- Linke D, Bouws H, Peters T, Nimtz M, Berger R G, Zorn H. 2005. Laccase of *Pleurotus sapidus* : Characterization and cloning. *J. Agric. Food Chem* 53 : 9498-9505
- Magae Y, Akahane K, Nakamura K, Tsunoda S. 2005. Simple colorimetric method for detecting degenerate strains of the cultivated basidiomycete *Flammulina velutipes*(Enokitake). *Applied and Environmental Microbiology* 71 : 6388-6389
- Munoz C, Guillen F, Martinez A T, Martinez M J. 1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology* 34 : 394-396
- Platt M. W, Hadar Y., Chet I. 1985. The decolorization of the polymeric dye Poly-Blue(polyvinylamine sulfonate-anthroquinone) by lignin degrading fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21 : 394-396
- Rodriguez E, Pickard M A, Vazquez-Duhalt. 1999. Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38 : 27-32

## 6. 연구결과 활용제목

- 지시약 BTB(Bromothymol Blue)를 이용한 큰느타리버섯 균사 활력 간이판별법 (2006, 영농활용)