

## 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)의 세포외 효소활성

김지영 · 임창수 · 김재용 · 한영환\*

동국대학교 대학원 생물학과

꽃송이버섯(*Sparassis crispa* DSMZ 5201)의 균사를 사용하여 균사의 효소활성을 측정하였다. Yeast-malt extract-glucose 배지를 사용하여 24°C에서 15일간 배양 후 배양여액을 조효소원으로 사용하여,  $\alpha$ -amylase 효소의 활성은 44.27 unit/mg-protein이었다. 배양여액 중의 protease, CMCase,  $\beta$ -glucosidase, chitinase 및 exo- $\beta$ -1,4-glucanase의 세포외 효소활성은 상대적으로 높았으나, xylanase의 효소활성은 낮게 나타났다.

**Key words** □ amylase, extracellular enzyme, saprotroph, *Sparassis crispa*

생리학적으로 사물기생(saprotroph)과 활물기생(parasite)의 중간적 성격을 갖고 있는 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 씹는 맛이 좋은 육질의 식용 버섯으로, 한국과 일본, 중국, 북아메리카, 유럽, 오스트레일리아에 분포하며, 가을에 침엽수의 뿌리 부근 땅 위나 그루터기 위에 단생하는 근주 심재 갈색 부후성 버섯이다. 현재 꽃송이버섯의 연구는 생태학적 연구와 인공배양에 대한 연구(15)가 이루어져 있으나 생리학적 연구는 현재까지 미흡한 편이다.

사물기생버섯은 식물의 세포벽을 구성하는 cellulose와 hemicellulose 등의 섬유소를 분해하여 성장하나, 활물기생 버섯은 살아있는 숙주식물이 생산하는 영양소를 이용하여 성장하는 특징적 차이점이 있다(10). 꽃송이버섯은 사물기생버섯과 활물기생버섯의 특성을 동시에 갖고 있어 인공적으로 재배하기가 어려운 주요인으로 지적되고 있다. 본 연구는 꽃송이버섯 균사 배양액의 효소활성을 측정하여 생리학적 특성을 조사하고 현재 밝혀진 몇몇 사물기생버섯과 활물기생버섯의 효소활성을 꽃송이버섯과 비교하였다.

본 연구에 사용된 *S. crispa*는 DSMZ 5201 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에서 분양받아 사용하였다. 꽃송이버섯 균사의 계대배양을 위하여 YMG 한천배지(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, 1.5% agar, pH 4.0)를 사용하였으며, 접종한 후 24°C에서 15일간 배양하였다. 배양된 꽃송이버섯 균사를 cork borer(직경, 8 mm)를 사용하여 한천배지에서 떼어낸 다음, YMG 액체배지(100 ml/250-ml Erlenmeyer flask)에 5개씩 접종하였다. 균사배양은 24°C에서 15일간 진탕배양(120 rpm)하였다.

효소활성 측정을 위한 조효소액과 단백질 농도의 측정 방법은 다음과 같다. 15일 동안 배양한 꽃송이 균사 배양액을 여과지

(Toyo, 90 mm)로 여과하여 그 여액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법(1)을 사용하였으며, bovine serum albumin을 표준품으로 사용하였다.  $\alpha$ -Amylase의 활성은 Uriyo와 Eigel의 방법(17), CMCase 활성은 Kanda 등의 방법(6), exo- $\beta$ -1,4-glucanase의 활성은 Min과 Han의 방법(13),  $\beta$ -glucosidase 활성은 Tokao 등의 방법(16)을 각각 사용하였으며 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mol의 포도당이 생성되는 양으로 정의하였다. Xylanase의 활성은 Kim의 방법(7)으로 수행하였으며, 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mol의 xylose가 생성되는 양으로 정의하였다. Colloidal chitin의 제조는 Hsu와 Lockwood의 방법(4)을 변형하여 준비하였으며, chitinase 효소활성은 Jeong과 Lee의 방법(5)으로 수행하였으며, 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mol의 N-acetylglucosamine (NAG)이 생성되는 양으로 정의하였다. Protease의 활성은 Brown과 Schmitz의 방법(2)으로 수행하였으며, 1 unit는 420 nm에서 1분간 흡광도 값이 0.01 증가하는 것으로 정의하였다. 환원당 측정은 Miller의 방법(12)을 사용하였다.

꽃송이버섯 균사 배양여액에서 가장 높은 효소활성(specific activity)은  $\alpha$ -amylase로 44.27 unit/mg-protein이었다(Table 1).  $\alpha$ -

**Table 1.** The extracellular enzyme activities in a mycelial culture broth of *Sparassis crispa* DSMZ 5201

Enzyme	Activity ( $\mu$ mol/ml/min)	Conc. of protein (mg protein/ml)	Specific activity (unit/mg protein)
$\alpha$ -Amylase	9.74	0.22	44.27 <sup>a</sup>
$\beta$ -Glucosidase	0.12	0.22	0.55
Exo- $\beta$ -1,4-glucanase	0.06	0.22	0.27
CMCase <sup>b</sup>	0.09	0.22	0.41
Xylanase	0.03	0.22	0.14
Chitinase	0.06	0.22	0.27
Protease	0.21	0.22	0.95

<sup>a</sup>The values are the averages for three replicates.

<sup>b</sup>CMC ; carboxy methyl cellulose.

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

Amylase의 효소활성이 높은 버섯으로는 송이(*Tricholoma matsutake*) (8), 백강균(*Beauveria bassiana*)(14), 싸리버섯(*Ramaria botrytis*) (11), 영지(*Ganoderma lucidum*)(3)이며, 각각의 효소활성 값은 1458.3, 297.0, 6.39, 13.05 unit/mg-protein으로 꽃송이버섯의  $\alpha$ -amylase 효소활성이 송이와 백강균의 효소활성 보다 낮았으나, 싸리버섯과 영지 보다 높았다. 꽃송이버섯의 protease의 효소활성은 0.95 unit/mg-protein로 비교적 낮게 나왔다. 송이(8), 백강균(14)과 능이(9)의 protease 효소활성은 각각 8.3, 22.8, 4.9 unit/mg-protein로 꽃송이버섯 보다 높게 나타났다.

Cellooligosaccharide 기질에 작용하는 특성을 가진 CMCase와 cellooligosaccharide를 가수분해하고 trans-glucosylation 활성을 갖는  $\beta$ -glucosidase의(13) 효소활성은 각각 0.41와 0.55 unit/mg-protein이었다.

사물기생버섯이 식물 세포벽 구성물질인 cellulose와 hemicellulose 등의 섬유소를 분해하여 영양소를 섭취한다는 보고(13)에서 알 수 있듯이, 꽃송이버섯이 cellulose와 hemicellulose를 분해하는 효소활성이 사물기생버섯의 효소활성과 유사함을 알 수 있다. 특히 꽃송이버섯의 경우 cellulose 분해에 관여하는 효소인 endoglucanase (CMCase), exoglucanase ( $\beta$ -glucosidase)가 모두 존재하는 것으로 나타나 꽃송이버섯이 분비하는 섬유소 분해효소는 exo-, endo-형의 두 효소를 다 분비하고 있음을 알 수 있다.

## 참고문헌

- 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.
- Brown, V. and G. Schmitz. 1980. Excretion of protease of *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 124, 55-61.
- Do, J.H. and S.D. Kim. 1985. Properties of amylase produced from higher fungi *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 13, 173-178.
- Hsu, S.C. and L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes on water soil. *Appl. Microbiol.* 29, 422-426.
- Jeong E.U. and Y.H. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitoooligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 187-196.
- Kanda, T., K. Wakabayashi, and K. Nisizawa. 1976. Purification and properties of an endocellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tuliferus*). *J. Ferment. Technol.* 60, 381-383.
- Kim, D.J., H.J. Shin., B.H. Min, and K.H. Yoon. 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermally stable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 304-310.
- Lee, C.Y., O.P. Hong, M.J. Jung, and Y.H. Han. 1998. The extracellular enzyme activities in culture broth of *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Mycol.* 26, 496-501.
- Lee, J.H., C.S. Jung, and J.S. Cho. 2001. Purification and characterization of protease from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Kor. J. Food Cookery Sci.* 17, 497-502.
- Lee, S.S., J.K. Ha, and Y.J. Choi. 1996. Studies on the isolation and identification of rumen fungi, characterization of cellulolytic fungal enzymes, and its industrial utilization. *Kor. J. Ankm. Nutr. Food* 20, 51-63.
- Lee, T.H. and Y.H. Han. 2001. Enzyme activities of the fruit body of *Ramaria botrytis* DGUM 29001. *Kor. J. Mycol.* 29, 173-175.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Min, E.G. and Y.H. Han. 2000. Characteristics of extracellular  $\beta$ -glucosidase in *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Biotech. Bioeng.* 15, 9-13.
- Min, E.G. and Y.H. Han. 2002. Optimal condition for mycelial growth of *Beauveria bassiana* and its extracellular enzyme activity. *Kor. J. Microbiol.* 38, 50-53.
- Shim, J.O., S.G. Son, S.O. Yoon, and Y.S. Lee. 1998. The optimal factors for the mycelial growth of *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 26, 39-46.
- Tokao, S., Y. Kamagata, and T. Sasaki. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. *J. Agri. Sci. Camb.* 93, 217-222.
- Uriyo, M. and W.E. Eigel. 1999. Duration of killing treatment on  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase and endo-(1,3)(1,4)- $\beta$ -D-glucanase activity of malted sorghum (*Sorghum bicolor*). *Process Biochemistry* 35, 31-37.

(Received July 13, 2004 / Accepted August 30, 2004)

## ABSTRACT: The Extracellular Enzyme Activities in Culture Broth of *Sparassis crispa*.

Ji-Young Kim, Chang-Soo Lim, Jae-Yong Kim and Yeong-Hwan Han\*

(Department of Biology, Graduate School, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea)

The mycelia of *Sparassis crispa* DSMZ 5201 were cultivated at 24°C for 15 days in yeast-malt extract-glucose broth (pH 4.0) and the filtrate was used as crude enzyme solution to determine the extracellular enzyme activity. The specific activity of  $\alpha$ -amylase was 44.27 unit/protein. The specific activities of protease, CMCCase,  $\beta$ -glucosidase, chitinase, exo- $\beta$ -1,4-glucanase were relatively high. However, a very little activity of xylanase was found.