Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 26, No. 4, 262-267, 2013
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2013.26.4.262

Separation and growth monitoring of oyster mushroom spores using gravitational field-flow fractionation (GrFFF)

Sun Tae Kim[1], Eun Young Ji[1], Jae Chan Lee[2] and Seungho Lee[1,★]

[1]Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea
[2]Jung-do mushroom laboratory, Gongju 314-921, Korea
(Received July 25, 2013; Revised August 3, 2013; Accepted August 3, 2013)

중력 장-흐름 분획법을 이용한 느타리버섯 포자의 분리 및 성장 모니터링

김선태[1] · 지은영[1] · 이재찬[2] · 이승호[1,★]

[1]한남대학교 화학과, [2]중도 버섯 연구소
(2013. 7. 25. 접수, 2013. 8. 3. 수정, 2013. 8. 3. 승인)

Abstract: Gravitational field-flow fractionation (GrFFF) is a separation technique that utilizes earth's gravity as the external field. GrFFF is a convenient tool for the size and/or density-based separation of micron-sized particles of various origins. In this study, GrFFF was employed for size-based separation of oyster mushroom spores. Oyster mushroom spores have smooth surface and are of cylindrical to narrow kidney-shapes with 5 to 12 ìm in longer dimension and 3 to 4 ìm in shorter dimension, as was confirmed by optical microscope (OM). GrFFF conditions were optimized for separation and characterization of spores by varying the channel flow rate from 0.5 to 1 mL/min. During the GrFFF elution of the spores, 3 fractions were collected to confirm the growth of oyster mushroom spore. The collected fractions were incubated for 30 days in water to examine the influence of the size on the growth of the spores. Results suggested that the oyster mushroom spores collected at the middle part of the GrFFF fractogram grew faster than those collected at the beginning or at the end of the fractogram.

요 약: 중력 장-흐름 분획법 (GrFFF)은 외부장을 중력으로 사용하며 마이크론 크기의 입자들을 분리하고 그들의 특성을 분석하는 데에 유용한 기술이다. 본 연구에서는 느타리버섯 포자들을 크기에 따라 분리하고, 그들의 성장을 모니터 하기 위하여 GrFFF를 응용하였다. 느타리버섯의 포자는 부드러운 표면과 타원체의 모양을 가지는데, 크기는 장축이 약 5~12 μm, 단축이 약 3~4 μm의 범위에 있음을 광학현미경을 통하여 확인하였다. 느타리버섯 포자의 분리를 위한 최적유속을 찾기 위하여 0.5~1 mL/min 범위에서 GrFFF 채널 유속을 변화하였다. 또한 성장과정에 미치는 포자 크기의 영향을 알아보기 위하여 최적조건에서 얻은 GrFFF fractogram으로부터 3개의 fraction을 분획하여, 이들을 동일조건에서 30일간 배양하였다. 그 결과, GrFFF fractogram의 중간 부분에서 수집한 포자들, 즉, 중간크기를 가지는 포자들이 fractogram의 앞이나 뒤 부분에서 수집한 포자들보다 상대적으로 더 빨리 성장함을 확인하였다.

Key words: gravitational field-flow fractionation (GrFFF), oyster mushroom spore, Size distribution

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)42-629-8822 Fax : +82-(0)42-629-8811
E-mail : slee@hannam.kr

www.kci.go.kr

1. 서 론

느타리버섯(oyster mushroom)은 담자균류 주름버섯목 느타리과에 속하는 버섯으로서, 계절이나 환경 및 조건에 따라 갓 표면이 약간 회백색, 진한 밤색, 혹은 검은색 등의 다양한 색깔을 띄며, 갓이 도톰할수록 선도가 좋고, 국거리나 전골재료로, 혹은 삶아서 먹을 수 있는 식용버섯이다. 느타리버섯의 약리작용으로는 항산화작용,[1] 항암작용,[2,3] 콜레스테롤 저하 효과,[4] 고혈압 및 당뇨병 예방효과와 느타리 자실체로부터 혈전 분해물질의 분리정제가 보고되었다.[5,6]

느타리버섯의 포자는 부드러운 표면과 타원체의 모양을 가지는데, 크기는 장축이 7.5~12 μm, 단축이 3~5 μm의 범위를 가지는 것으로 알려져 있다.[7] 느타리버섯 포자가 버섯으로 성장하기 위해서는 습도, 온도, 열, 등의 다양한 배양조건들의 최적화가 요구된다.[8] 느타리버섯 포자의 크기 분포의 결정 및 크기와 성장속도 사이의 상관관계에 대한 연구는 아직까지 진행되지 않았다.

장-흐름 분획법(Field-flow fractionation, FFF)은 고분자 및 단백질을 비롯하여 수 나노미터에서부터 수 마이크론 크기의 입자성 시료들을 분리하는 데에 유용한 분리방법이다. FFF의 중요한 특징 중의 하나는 시료의 용리 시간으로부터 시료의 크기 및 크기 분포와 분자량과 같은 물리적 혹은 화학적 성질들을 직접 결정할 수 있다는 점이다. 이러한 특징으로 인하여 현재 생화학, 의・약학, 고분자 및 무기재료와 환경입자 시료들에 대한 FFF의 응용연구가 활발히 진행되고 있다. 중력 장-흐름 분획법(Gravitational FFF, GrFFF)는 FFF의 여러 가지 부수 기술 중의 하나로서, 중력장을 외부장으로 이용하므로 다른 FFF 부수 기술보다 상대적으로 제작이 용이하고, 작동 방법이 간단하다. GrFFF는 세포,[9] 실리카 입자,[10] 전분입자,[11] 이스트,[12] 줄기세포[13] 그리고 박테리아[14] 등을 포함한 다양한 마이크론 크기의 입자성 물질들을 분리하고 크기분포를 결정하는 데에 사용되었다.

본 연구에서는, 느타리버섯 포자들을 크기에 기초하여 분리하기 위하여 GrFFF를 사용하였으며 GrFFF 결과를 광학현미경(optical microscopy, OM) 결과와 비교하였다. 또한 GrFFF 로부터 용리되어 나오는 5~12 μm의 크기분포를 가지는 느타리 버섯 포자들을 크기 별로 분획하여 각각을 배양시킴으로써, 느타리버섯 포자의 크기에 따른 느타리버섯 성장을 모니터링 하였다.

2. 실험방법

2.1. 시료의 준비

2.1.1. 느타리버섯 포자의 수집

신선한 버섯 주름 (버섯의 갓 뒤쪽)을 깨끗한 현미경용 슬라이드에 올린 후, 버섯의 증발을 최소화 시키기 위하여 위쪽에 용기를 덮어 기류가 방해되지 않도록 하였다.[8] 2일동안 방치한 후, 버섯을 옮기면 버섯의 모양대로 포자가 하얗게 생성된다. 포자들이 손상되지 않도록 세균 배양용 Petri dishes에 옮긴 후, GrFFF 및 광학현미경 측정에 사용하였다.

2.1.2. 감자한천배지의 준비

감자한천배지는 감자와 dextrose의 영양분과 한천의 고체화하는 성질을 이용하여 미생물을 배양하는 배지로써 다음의 방법으로 준비하였다. 먼저, 껍질을 벗기지 않은 채 얇게 썬 감자 200 g을 1 L의 증류수에 넣어 30 분 동안 끓인 후, 멸균된 여과지에 통과 시킨다. 그 다음, Dextrose 20 g과 agar 20 g을 감자에 섞어준 후, 이들을 용해시키기 위하여 끓인다. 용해시킨 성분을 살균된 15 × 100 mm Petri dishes에 25 mL씩 나누어 얇게 도포한다.

2.1.3. 느타리버섯 포자의 배양

느타리버섯 포자를 배양하기 위해서는 습도, 빛의 양, 산소 그리고 온도의 적절한 조절이 요구된다. 일반적으로 느타리버섯 포자는 온도 20~30 ºC, 습도 60~75%, 어두운 조명에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 GrFFF 로부터 분획한 3개의 fraction들을 감자한천배지에 옮기고, 온도 25 ºC, 습도 70%의 조건 하에서 어두운 조명의 chamber에서 30일간 배양하였다.[15]

2.2. 중력 장-흐름 분획법 (GrFFF)

GrFFF 채널은 두 장의 유리판에 사이에 Mylar spacer를 끼우고, 두 장의 아크릴 블록(acryl block)으로 유리판들을 조임으로써 제작하였다.[16] GrFFF 채널의 길이, 두께, 폭은 각각 51, 0.02, 2 cm이다. 용매의 전달을 위하여 영린 M720 HPLC 용 펌프(안양, 대한민국)를 사용하였고, GrFFF 채널로부터 용리되어 나오는 시료는 영린 M930 UV/VIS 검출기를 이용하여 254 nm에서 모니터 하였다. 6, 8, 12, 20, 40 μm 직경을 가지는 폴리스티렌(polystyrene) 라텍스 표준입자는 Duke Scientific Corporation (Palo Alto, CA, USA) 으

www.kci.go.kr

로부터 구입하였다. 모든 GrFFF 실험에서의 운반용매로는 증류수를 이용하였으며, 시료 간 혹은 시료-채널 벽 간 불필요한 화학적 상호작용을 최소화 하기 위하여 0.1% (w/v) FL-70 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)을, 박테리아의 생성을 방지하기 위하여 0.02% (w/v) sodium azide (NaN_3)를 첨가하였다.

2.3. 광학현미경 (OM)

광학현미경은 Olympus BX51TF optical microscopy (Shinjuku Monolith, Shinjuku-ku, 일본)를 이용하여 느타리버섯 포자의 크기 및 모양을 확인하였다. 모든 OM 분석은 500~1000 개의 포자를 Image Inside software (Focus, Daejeon, Korea)를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. GrFFF의 검정 및 느타리버섯 포자의 크기 및 모양 관찰

Fig. 1(a)는 40, 20, 12, 8, 6 μm 직경을 가지는 폴리스티렌 라텍스 표준입자의 GrFFF fractogram들을 보여준다. 입자들의 원활한 분산을 위하여 0.1% FL-70를, 박테리아의 생성을 방지하기 위하여 0.02% NaN_3를 첨가한 물을 운반용매로 사용하였으며, 1 mL/min의 유속에서 실험을 수행하였다. *Fig.* 1(a)에서 보여주듯이, GrFFF는 비교적 넓은 크기범위를 가지는 마이크론 크기의 입자들의 크기에 기초한 분리에 유용하다. 이 때 큰 입자가 작은 입자 보다 먼저 용리된다.

Fig. 1(b)는 *Fig.* 1(a)로부터 얻은 검정곡선을 보여준다. 데이터들을 일차함수로 fitting하여 얻은 검정함수는

$$\text{Log } t_r = -0.8362 \log d + 2.0585 \quad (1)$$

이었으며, 여기에서 t_r은 머무름시간, d는 입자의 직경이다. 상관 계수 (R^2)는 0.9921로서 비교적 양호하였다.

Fig. 2는 물에 분산시킨 느타리버섯 포자들의 OM 이미지 들을 보여주는데, *Fig.* 2의 (a), (b), (c), (d)는 물에 분산시킨 후 각각 2 분, 42 분, 87 분, 132 분이 경과된 후 얻은 OM 이미지 들이다. *Fig.* 2에서 보듯이, 느타리버섯의 포자는 타원체의 모양을 가지며, 비교적 부드러운 표면을 가짐을 알 수 있다. 또한 포자의 크기는 장축이 약 5~12 μm, 단축이 약 3~4 μm의 범위에 있음을 확인하였다.

Fig. 3은 *Fig.* 2의 OM 이미지들로부터 얻은 느타리버섯 포자의 크기분포들을 보여준다. 여기에서 각 포자의 크기는 타원체의 장축의 길이를 측정하였다. *Fig.* 3에서 보듯이, 물과의 접촉시간이 증가하여도 포자의 크기와 모양이 눈에 띌 정도로 크게 변화하지 않음을 알 수 있다.

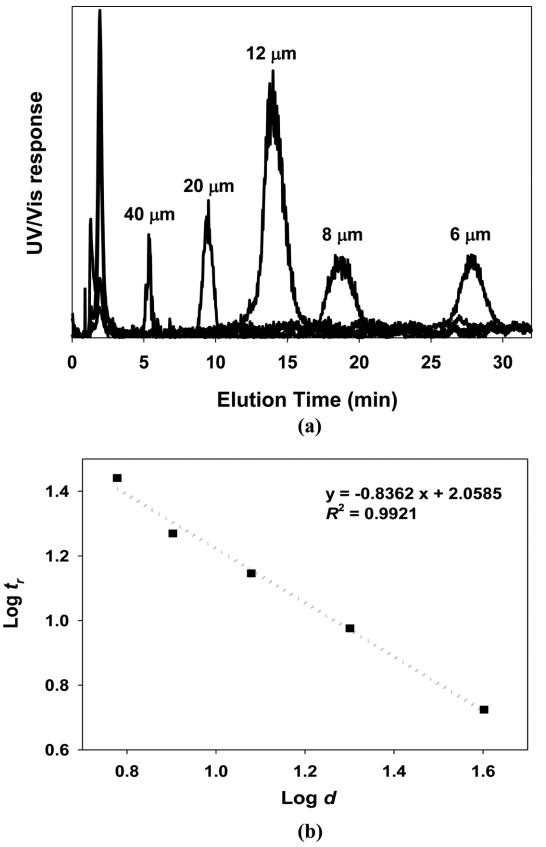


Fig. 1. GrFFF fractograms (a) of polystyrene latex beads having nominal diameters of 6, 8, 12, 20, and 40 μm and a calibration curve (b). The carrier liquid was water containing 0.1% FL-70 with 0.02% NaN3 and the flow rate was 1 mL/min.

Fig. 4는 물과의 다양한 길이의 접촉시간 후에 얻은 느타리버섯 포자의 GrFFF fractograms들을 보여준다. OM 결과와는 달리 물과의 접촉시간의 길이에 따라 포자의 GrFFF fractogram의 모양이 변화함을 볼 수 있는데, 이는 포자들이 물과 접촉하여 팽윤(swelling)됨을 보여주는 것이다. 느타리버섯 포자들이 물에 분산된 후 2 시간이 경과한 시점까지만 보면, 물과의 접촉시간이 증가함에 따라 포자들이 점점 더 빨리 용리됨을 볼 수 있다. 하지만 2 시간이 경과한 이후에는 접촉시간이 증가하여도 GrFFF fractogram의 용리 시간에는 변화가 거의 없다. 이는 포자들의 팽윤이 약 2

www.kci.go.kr

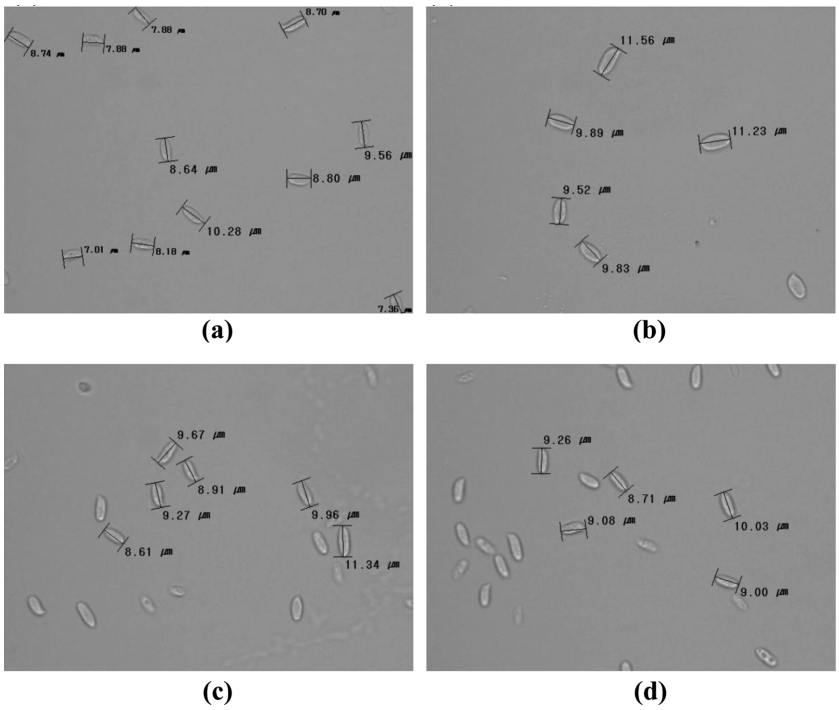


Fig. 2. OM images of oyster mushroom spores dispersed in water. Images were taken at 2 (a), 42 (b), 87 (c), and 132 min (d) after dispersing of the spores.

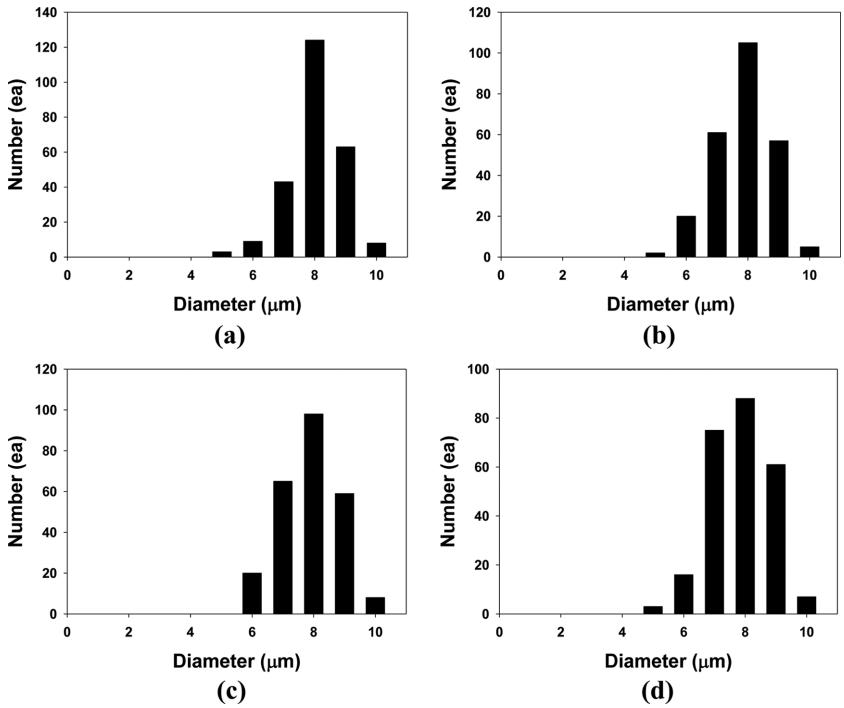


Fig. 3. OM Size distributions of oyster mushroom spores shown in Fig. 2. Sizes were measured for the longer dimensions of ellipsoids after various contact times of (a) 2, (b) 42, (c) 87, and (d) 132 min.

www.kci.go.kr

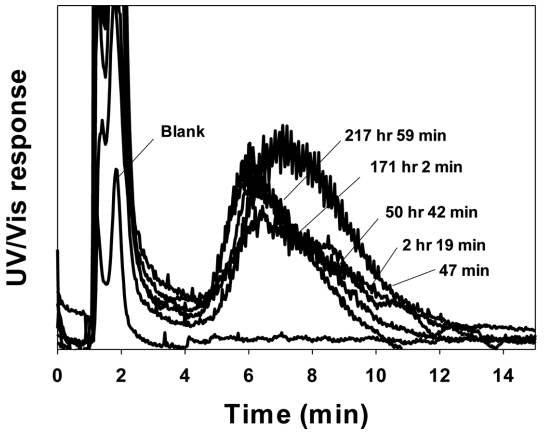


Fig. 4. GrFFF fractograms of oyster mushroom spores obtained after various contact times. Experimental conditions were the same as that used in Fig. 1.

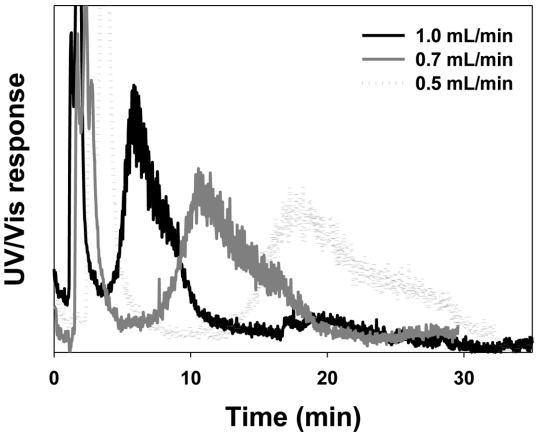


Fig. 5. GrFFF fractograms of oyster mushroom spores obtained at various flow rates.

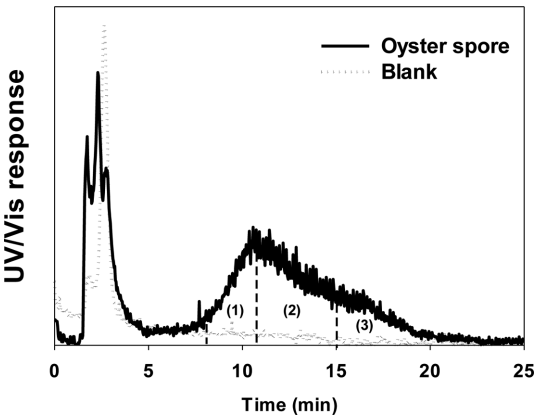


Fig. 6. GrFFF fractograms of oyster mushroom spores dispersed in water and blank obtained at flow rate of 0.7 mL/min. Also shown are 3 fractions (numbered) collected. The carrier liquid was the same as that used in Fig. 1.

시간 내에 완료됨을 말해준다. *Fig.* 3과 *Fig.* 4의 결과로부터 볼 때, GrFFF가 느타리 버섯 포자의 팽윤 현상을 관찰하는 데에 OM보다 유용함을 알 수 있다.

3.2. GrFFF 최적 조건을 위한 유속의 변화

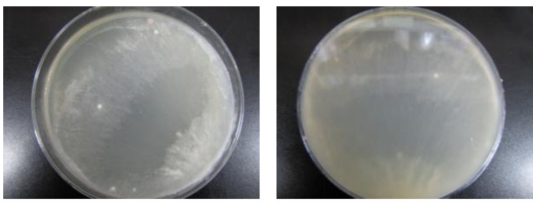
GrFFF는 세기가 일정한 중력장을 외부장으로 이용한다 (즉 외부장의 세기는 일정하다). 따라서 GrFFF를 최적화 하는 과정에서는 운반용매의 성분이나 유속을 변화시켜 최적 분리조건을 찾는 것이 일반적이다.[17] 본 연구에서는 운반용매의 조성을 고정시키고(0.1% (w/v) FL-70와 0.02% (w/v) NaN_3를 함유하는 물), 유속을 변화시켜 보았다. *Fig.* 5는 운반용매의 다양한 유속에서 얻은 느타리버섯 포자의 GrFFF fractogram들을 보여준다. 유속이 1 mL/min일 때에는 시료의 용리가 너무 빨라 포자들이 void peak로부터 완전히 분리되지 않았다. 반면에, 0.7과 0.5 mL/min의 유속에서는 시료들이 void peak로부터 잘 분리된다. 하지만 0.5 mL/min에서는 유속이 너무 느려 느타리버섯 포자의 용리 시간이 지나치게 길고(약 35분), 띠넓힘 (band broadening)과 꼬리끌기(tailing) 현상이 발견된다. 이상의 결과를 고려하여 본 연구에서는 운반용매의 유속으로 0.7 mL/min를 선택하였다.

3.3. GrFFF로부터의 크기별 분획 및 포자의 배양

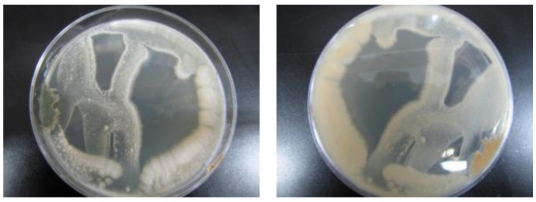
Fig. 5에서 결정한 최적 유속인 0.7 mL/min에서 얻은 느타리버섯 포자의 GrFFF fractogram을 *Fig.* 6에 나타내었다. *Fig.* 6에는 독자들의 이해를 돕기 위하여 blank의 fractogram을 함께 보여주고 있다. 느타리버섯 포자의 크기에 따르는 성장현상을 모니터 하기 위하여, fractogram을 3 개 구역으로 나누어 GrFFF로부터 용리되는 느타리버섯 포자들을 크기별로 분획하였다. 각 fraction 의 수집시간의 범위는 각각 8~11 분, 11~15 분, 15~20 분이었으며, 수집된 각 fraction은 앞의 2 절(督피癰疫凶)에서 설명한 방법으로 동일한 조건에서 실온에서 30일간 배양하였다.

Fig. 7은 앞에서 분획된 3개의 fraction을 30일간 배양한 후 얻은 결과들을 보여준다. *Fig.* 7에서 보듯이, fraction 2에서의 느타리 버섯 포자의 성장이 fraction 1과 3에서 보다 더 활발히 진행되었음을 알 수 있다. 포자의 크기에 따르는 느타리버섯 포자의 성장의 재

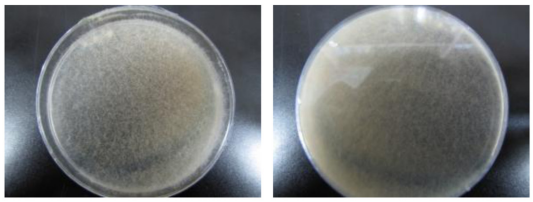
www.kci.go.kr



Fraction 1



Fraction 2



Fraction 3

Fig. 7. Pictures of oyster mushroom spores in three GrFFF fractions cultured for 30 days.

현성을 확인하기 위하여 위 과정을 반복해 본 결과 동일한 결과를 얻었다. 이상의 결과를 종합해 보면, 5~12 μm 범위의 크기를 가지는 느타리버섯 포자들 중에서 중간범위의 크기를 가지는 포자들이 그들보다 작거나 큰 포자들에 비하여 성장이 상대적으로 더 활발함을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 느타리버섯 포자의 크기 및 크기분포 결정과 크기 별 분획을 위하여 GrFFF를 응용하였다. 느타리버섯 포자의 크기는 장축이 약 5~12 μm, 단축이 약 3~4 μm 범위를 가지며, 부드러운 표면을 가짐을 광학현미경을 통하여 확인하였다. 느타리버섯 포자는 물에 분산되면 팽윤(swelling)되는데, 팽윤은 약 2 시간 이내 완료되는 것으로 보인다. 느타리버섯 포자(약 5~12 μm) 중에서 중간범위의 크기를 가지는 포자들이 가장 빠른 성장 속도를 나타내었다.

감사의 글

This work was supported by Hannam University.

참고문헌

1. I. C. Jung and J. S. Lee, *J Korean Society for Hygenic Science,* **5**(1), 19-24 (1999).
2. Y. Yoshioka, T. Ikekawa, M. Noda and F. Fukuoka, *Chem. Pharm. Bull.,* **20**(6), 1175-1180 (1972).
3. H. Wang, J. Gao, and T. B. Ng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **275**(3), 810-816 (2000).
4. P. Bobek, L. Ozdín and S. Galbavý, *Nutrition,* **14**(3), 282-286 (1998).
5. S.-t. Chang and P. G. Miles, 'Edible mushrooms and their cultivation', CRC Press, 1989.
6. H. S. Choi and H. H. Shin, *Mycologia,* **90**(4), 674-679 (1998).
7. P. Stamets, 'Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms', Ten Speed Press, 2000.
8. R. Scrase, *Mycologist,* **9**(2), 53-56 (1995).
9. S. Rasouli, E. Assidjo, T. Chianéa and P. J. P. Cardot, *J. Chromatogr. B,* **754**(1), 11-21 (2001).
10. P. Reschiglian, D. Melucci, G. Torsi and A. Zattoni, *Chromatographia,* **51**(1-2), 87-94 (2000).
11. C. Contado, P. Reschiglian, S. Faccini, A. Zattoni and F. Dondi, *J. Chromatogr. A,* **871**(1-2), 449-460 (2000).
12. R. Sanz, L. Puignou, M. T. Galceran, P. Reschiglian, A. Zattoni and D. Melucci, *Anal. Bioanal. Chem.,* **379**(7-8), 1068-1075 (2004).
13. E. Urbánková, A. Vacek and J. Chmelík, *J. Chromatogr. B,* **687**(2), 449-452 (1996).
14. P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, S. Casolari, M. H. Moon, J. Lee, J. Jung, K. Rodmalm and G. Cenacchi, *Anal. Chem.,* **74**(19), 4895-4904 (2002).
15. S. B. Cho, In 'Oyster Mushroom Cultivation', pp 1-3, MushWorld, Seoul, Korea, 2004.
16. S. T. Kim, S. Y. Seo and S. Lee, *Anal. Sci. Technol.,* **24**(4), 249-255 (2011).
17. M. R. Park, D. Y. Kang, J. Chmelik, N. Kang, J. S. Kim and S. Lee, *J. Chromatogr. A,* **1209**(1-2), 206-211 (2008).

www.kci.go.kr