

발색반응 분석법을 이용한 표고 교배균주의 세포외효소 분비 능력 평가

권혁우¹ · 김준영¹ · 고한규² · 박흥수² · 김성환^{1*}

¹단국대학교 미생물학과 및 기초과학연구소, ²산림조합중앙회 산림버섯연구소

Assessment of the Ability of Extracellular Enzyme Production in Hybrid Strains of *Lentinula edodes* by Chromogenic Reaction-based Plate Assay

Hyuk Woo Kwon¹, Jun Young Kim¹, Han Gyu Ko², Heung Soo Park² and Seong Hwan Kim^{1*}

¹Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714 Korea

²Forest Mushroom Research Center, National Forestry Cooperative Federation, Yeosu 469-803, Korea.

(Received 21, March 2011., Accepted 11, April 2011)

ABSTRACT : Shiitake breeding requires the procedures of mating of two different parental strains and selection of hybrid strains that have good traits for the mushroom production. In this study, we tested the possibility of the use of chromogenic plate-based assay for extracellular enzyme production in order to assess and find good biochemical properties-possessed hybrid strains that were generated from genetic cross of the monokaryotic strains derived from two different parental strains of *Lentinula edodes* Sanjo-101ho and Sanjo-108ho. We observed that there was difference in the ability of producing β -glucosidase, avicelase, CM-cellulase, amylase, pectinase, xylanase, and protease among the monokaryotic strains. We could also comparatively assess that the ability of the seven extracellular enzymes production in the hybrid strains depended on the mating combination of the monokaryotic strains. Our results demonstrate that the assessment method for extracellular enzyme production using chromogenic plate assay could be usefully applied to the assessment of the hybrid strains derived from the breeding procedure of *L. edodes*.

KEYWORDS : Chromogenic media, Extracellular enzyme, Hybrid strains, *Lentinula edodes*, Mushroom breeding

서론

표고(*Lentinula edodes*)는 분류학적으로 담자균아문 주름버섯목, 낙엽버섯과(*Marasmiaceae*)에 속하는 버섯으로서 봄, 여름, 가을에 걸쳐 참나무류(*Quercus* spp.), 밤나무, 서어나무 등 활엽수에 발생한다(Cannon 등, 2001). 외형상으로 표고의 갓 지름은 6~10 cm이고 표면은 다갈색이며 흑갈색의 가는 솜털 모양의 비늘조각이 덮여 있다. 렌티난(lentinan)이라는 β -D-glucan 계 고분자 물질이 항암 특성을 지니고 있는 것이 밝혀지면서 표고는 약용버섯으로 크게 각광을 받고 있으며 조단백질, 당지질, 회분, 탄수화물, 섬유질, 아미노산 등 여러 가지 영양물질들이 존재함에 따라 식용으로서도 각광을 받고 있다(Chang, 1999). 또한 다양한 버섯 식품류, 버섯스낵, 농후발효유, 버섯스프 등으로 개발이용되고 있으며, 항종양, 혈압저하, 혈당강하, 항혈전 등의 생리활성 성분 연구가 활발히 이루어지고 있다(Ohnuma *et al.*, 2000; Yaoita *et al.*, 1998).

이러한 영양적 성분과 약리작용에 대한 기능성 물질 탐

색을 통해 표고에 대한 가치가 증대되고 있으며 이에 따라 수요가 증대되고 있으며 국내의 경우 일본을 위주로 해외로 수출이 이루어지고 있다. 수요와 가치의 증대로 표고 재배기술의 개발 역시 꾸준히 지속되어 왔다. 재배기술과 함께 표고의 생산성 및 품질에 가장 근본적인 영향을 미치는 주요요인은 품종이 갖는 특성에 있다. 특히 최근 국제식물신품종보호동맹(UPOV)의 협약에 따라 자국의 품종에 대한 보호정책이 시작되었기에 국내의 경우 새로운 표고 품종의 육성이 시급한 실정이다.

버섯을 육종하는 방법으로 품종을 조절된 환경에 순화시키는 법, 균주 수집에 의한 선발육종법, 균주간의 교배에 의한 교잡육종법, 유전공학적 육종법, 돌연변이육종법 등 다양한 기술이 연구되고 있다. 이 중 가장 대표적이면서 보편적으로 사용되고 있는 방법은 선발된 모균주를 교배하여 하여 교잡균주 얻는 교잡육종법이다. 교잡육종을 수행하는 과정에서 수많은 교잡균주가 만들어지고, 만들어진 교잡균주는 톱밥배지 또는 원목에 접종하여 키운 후 새로운 형질을 지니는 버섯을 선발하는 과정을 거치게 된다. 이렇듯 신품종 육성 과정은 상당한 시간과 비용을 요

*Corresponding author <E-mail: piceae@naver.com>

하는 과정이다. 이 과정에서 비용과 시간을 줄이기 위해 만들어진 교잡균주들을 인공배지에서 키운 후 단지 생육이 우수한 균주만을 선별하여 재배평가를 수행하고 있다. 교잡균주가 지닌 잠정적인 능력을 생장으로만 평가하여 적용하는 데는 한계가 있는바 생장 특성 이외에 교잡균주의 능력을 평가할 수 있는 부가적인 평가 방법의 개발이 요구되고 있다.

이에 따라 본 연구에서는 배지를 이용한 발색반응법이 교잡육종 과정에 생겨나는 많은 교잡균주들의 생화학적 특성을 평가하는 간편한 수단이 될 수 있는지 알아보기 위하여 두 계통의 모균주에서 얻은 단핵균주들과 이들 계통이 다른 단핵균주들 간에 교배를 수행하고 얻어진 이핵체의 교잡균주들을 대상으로 여러 가지 세포외 기질분해 효소의 능력을 조사 비교하였다.

재료 및 방법

표고버섯 단핵 및 교잡 균주

본 실험에 사용한 단핵균주 및 교잡균주는 산림조합중앙회 산림버섯연구소 등록균주인 산조101호와 산조108호를 모균주로 활용하여 선발한 균주를 사용하였다. 참나무 원목 재배를 통하여 버섯 자실체를 얻은 후 자실체의 주름살로부터 약 12시간동안 자연낙하 하는 담자포자를 받았다. 담자포자는 PDA 배지에 발아시켜 자라난 균사를 현미경을 이용하여 검정 후, 껍쇠연결체가 없는 균주만을 선택하였다. 선택된 균주 중 PDA 상에서 균사 활력이 우수한 단핵균주를 20균주씩 각각 선발하여 사용하였다 (Kwon *et al.*, 2008). 이들 2가지 서로 다른 모균주 계통에서 나온 단핵균주를 대상으로 산조101호 유래 단핵균주 하나당 산조108호 유래 단핵균주 20균주에 대해 각각 PDA 상에서 1:1 교배를 실시하고 동시에 그 반대로 산조108호 유래 단핵균주 하나당 산조101호 유래 단핵균주 20균주에 대해서도 각각 PDA 상에서 1:1 교배를 실시하여 총 400균주의 조합으로 시험을 수행하였다. 2-3주간 배양 후 현미경을 통하여 껍쇠연결체(clamp connection)가 있는 이핵체 균사를 선발하였다. 총 163개의 교잡균주가 선발되었고 이들 균주를 PDA에 접종하고 25°C에서 2주간 순수 계대 배양하면서 세포외 효소분해 능력 검정 시험에 사용하였다.

세포외효소 분비 능력 평가

발색배지를 이용한 세포외효소 분비 능력 검정을 위해서는 발색반응(chromogenic reaction)을 위한 시약인 0.5%의 Congo Red (Sigma, USA)와 서로 다른 효소기질(영양원)을 첨가하여 만든 배지(Chromagenic media)를 사용하였다(Hyun *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2007). 발색반응 배지의 공통된 질소원으로 0.1%의 yeast nitrogen base (Difco, USA)를 사용하였고, 유일한 탄소원으로는

β -glucosidase의 경우 D-cellobiose (Sigma, USA)를, avicelase의 경우 Avicel PH-101 (Fluca, Switzerland)을, CM-cellulase의 경우 CM-cellulose (Sigma, USA)를, amylase의 경우 Starch from potato (Sigma, USA)를, pectinase의 경우 polygalacturonic acid (MP Biomedical, France)를, xylanase의 경우 xylan oat spelts (Sigma, USA)를 0.5% 되게 첨가하여 사용하였다. Protease의 경우에는 효소반응을 위한 영양원으로 skim milk powder (Sigma, USA)를 사용하였다 (Yoon *et al.*, 2007). 이상의 각기 다른 영양 기질을 담은 용액 1 l 당 1.5% 분량의 agar 첨가하여 고압살균 후 직경 13 mm Petri plate에 20 ml 씩 분주하여 만든 고체배지를 발색반응배지로 사용하였다. 발색반응배지에서의 균주 간 효소분해능력 비교를 위해 PDA에 동일한 시점에 접종하여 같은 시간동안 배양된 단핵균주와 교잡균주의 균총을 이용하였다. 접종용 균사는 균총에서 동일 생장선상에 위치한 균사 끝부분을 직경 0.3 mm cork borer를 이용하여 agar plug를 떼어낸 다음 각각의 서로 다른 기질영양원을 함유한 발색반응배지에 접종하고 25°C에서 20일간 배양 후 생장균사 주변에 형성된 투명환(clear zone)을 측정하였다. 투명환은 발색반응배지 내에 고르게 분포하여 존재하는 발색시약에 결합된 효소의 기질이 표고균에서 분비된 세포외 효소와 반응하여 기질이 분해되면서 나타나기 때문에 투명환의 크기가 크면 세포외효소 분비 능력이 우수하다고 할 수 있다. 따라서 표고균주간에 세포외효소 분비능력 비교 평가는 균사의 접종원으로부터 투명환이 형성된 부분까지 길이를 측정하여 비교하였다. 0~20 mm의 투명환을 보이는 균주는 효소분비 능력이 약한 균주(weak, W)로, 20~50 mm의 투명환을 형성하는 균주는 중도적인 효소분비 능력을 보이는 균주(moderate, M), 그리고 50 mm 이상의 투명환을 보이는 균주를 효소분비능력이 강한 균주(strong, S)로 구분하여 평가하였다. 비교평가에 사용된 각 영양기질에 대한 세포외효소 분비 능력을 판단하는 기준이 되는 예를 Fig. 1에 제시하였다.

결과 및 고찰

단핵균주에 대한 평가

제시된 기준에 따라 산조101과 산조108에서 유래한 단핵균주를 발색반응배지에 키워 나타난 효소의 분해력 정도를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 대조로 사용한 모균주의 경우 산조101호는 7가지 효소 중 β -glucosidase, pectinase, protease에서 중도적 이상의 세포외효소 분비능력을 보였고 나머지 효소에서는 약한 분비능력을 보였다. 이에 반하여 모균주인 산조108호는 protease만 강한 분비능력을 보였고 다른 6가지 세포외효소에 대해서는 약한 분비능력을 보였다. 이는 모균주 산조101호와 산조108호가 서로 다른 효소 생화학적 특성을 지니고 있음을 보여준다.

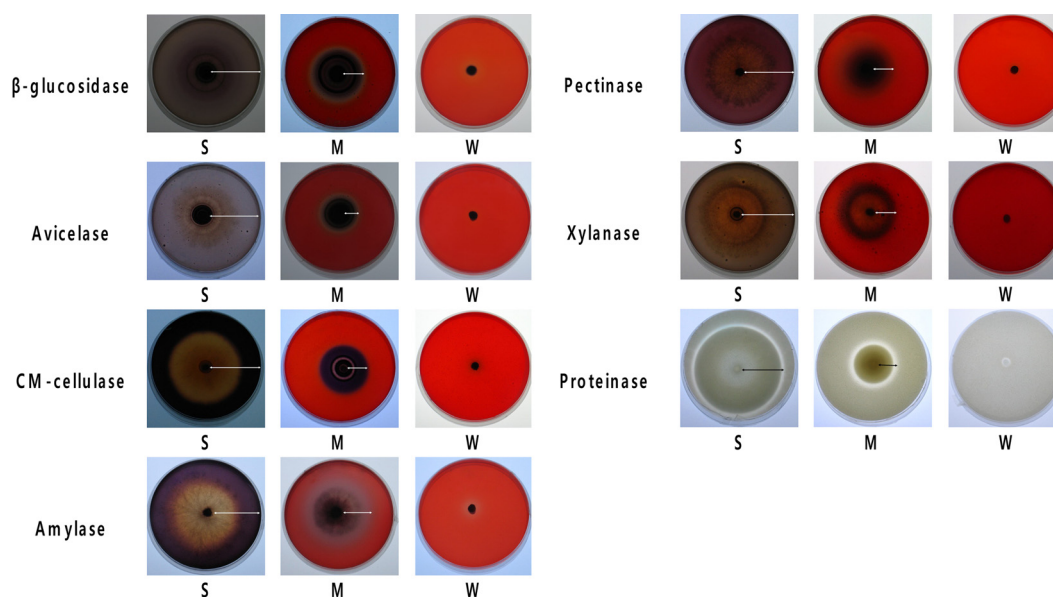


Fig. 1. Examples of observation of extracellular enzyme production shown by hybrid strains of *L. edodes* on chromogenic media. Arrow indicates clear zone (enzyme production zone). S : Strong production, M: Moderate production, W : Weak or no production.

Table 1. Degree of extracellular enzyme production shown by the monokaryotic strains derived from their parental strain *L. edodes* Sanjo-101ho and Sanjo-108ho

Enzyme	Degree of production	Parental strain Sanjo-101ho	Parental strain Sanjo-108ho	Monokaryotic strain from Sanjo-101ho	Monokaryotic strain from Sanjo-108ho
β -glucosidase	Strong	1/1*		3/20	18/20
	Moderate			5/20	2/20
	Weak		1/1	12/20	0/20
Avicelase	Strong			3/20	4/20
	Moderate			3/20	8/20
	Weak	1/1	1/1	14/20	8/20
CM-cellulase	Strong			0/20	9/20
	Moderate			3/20	6/20
	Weak	1/1	1/1	17/20	5/20
Amylase	Strong			0/20	7/20
	Moderate			2/20	3/20
	Weak	1/1	1/1	18/20	10/20
Pectinase	Strong	1/1		2/20	1/20
	Moderate			2/20	7/20
	Weak		1/1	16/20	12/20
Xylanase	Strong			0/20	6/20
	Moderate			0/20	1/20
	Weak	1/1	1/1	20/20	13/20
Protease	Strong		1/1	0/20	0/20
	Moderate	1/1		15/20	9/20
	Weak			5/20	11/20

*Number of strains shown the enzyme production/total number of strains.

이러한 상이한 특성을 지닌 모균주들로부터 유래한 단핵균주들에 대하여 7가지 세포외효소의 분비능력을 비교한 결과는 Table 1에 나타내었다. 산조101호에서 유래한 20개의 단핵균주 중 효소활성이 강하게 검출된 효소는 β -glucosidase, avicelase, pectinase 등 이었으며 균주의 비율은 20개 균주 중 2-3개 균주 수준으로서 분비 능력이 뛰어난 균주의 빈도는 낮았다. 검출된 균주의 활성 정도를 살펴볼 때 모균주에 비하여 단핵균주가 서로 다른 정도의 분비 능력을 지니는 균주로 나누어져 있음을 알 수 있었다. 이는 모균주의 자실체에서 감수분열이 일어나면서 생겨나는 담자포자들이 서로 다른 효소분비능력을 지니는 담자포자들임을 보여준다. 산조108호에서 유래한 20개의 단핵균주 중 분비가 우수하게 검출된 효소는 β -glucosidase, avicelase, CM-cellulase, amylase, pectinase, xylanase 였으며 검출 균주의 비율은 20개 균주 중 1개에서 최대 18개 까지 이르는 수준으로서 분비 능력이 우수한 균주의 빈도는 다양하게 나타났다. 검출된 균주의 세포외 효소 분비 능력 정도를 모균주와 비교하였을 때 단핵균주 중에 서로 다른 정도의 분비 능력을 지니는 균주들이 존재하

였고 이중에 모균주 보다 우수한 분비 능력을 보이는 균주도 존재함을 알 수 있었다. 이러한 Table 1의 결과로 볼 때 표고 모균주 자실체에서 생겨나는 담자포자들 중에 모균주와 비교하여 세포외 효소 분비 능력이 서로 다른 포자가 존재하고 있음을 결론 할 수 있다. 따라서 이들 담자포자로부터 얻어진 단핵균주들이 교잡을 위한 소재로 활용 될 수 있음을 본 연구의 발색반응을 이용한 세포외 효소 평가는 보여준다.

교잡균주에 대한 평가

단핵균주에 대한 발색반응 평가를 바탕으로 이들 균주들 간의 조합으로 선발한 163개 교잡균주에 대한 평가를 실시한 결과는 Table 2에 제시하였다. 흥미롭게도 교잡균주의 경우 7가지 효소 모두 강하게 분비하는 균주들이 존재하였다. 163개 교잡균주 중 강한 분비 능력을 보인균주가 50% 이상의 비율로 나타난 효소는 7가지 효소 중 β -glucosidase, avicelase, CM-cellulase 등 이었다. 이들 효소는 모두 목재의 주요 구성분인 cellulose 분해에 관여하는 효소들임을 볼 때 이핵체인 교잡균주에서 이 3가지 효

Table 2. Degree of extracellular enzyme production shown by the 163 hybrid strains generated by combinational mating between the monokaryotic strains derived from *L. edodes* Sanjo-101ho and Sanjo-108ho

Enzyme	Degree of production	Parental strain (Sanjo-101ho)	Parental strain (Sanjo-108ho)	No. of hybrid strain
β -glucosidase	Strong	1/1*		88/163
	Moderate			18/163
	Weak		1/1	57/163
Avicelase	Strong			84/163
	Moderate			24/163
	Weak	1/1	1/1	55/163
CM-cellulase	Strong			90/163
	Moderate			17/163
	Weak	1/1	1/1	56/163
Amylase	Strong			29/163
	Moderate			54/163
	Weak	1/1	1/1	80/163
Pectinase	Strong	1/1		65/163
	Moderate			52/163
	Weak		1/1	46/163
Xylanase	Strong			41/163
	Moderate			22/163
	Weak	1/1	1/1	100/163
Protease	Strong		1/1	18/163
	Moderate	1/1		130/163
	Weak			25/163

*Number of strains shown the enzyme production/total number of strains.

소의 분비 능력이 높은 것은 매우 흥미롭다고 할 수 있다. 특히 단핵균주에서는 avicelase, CM-cellulase 등의 분비 능력이 우수한 균주가 많지 않았는데 교잡 후 이들 효소의 분비 능력이 강한 균주가 많이 나타난 점을 미루어 본다면 원목 재배를 위한 교잡균주의 평가에 있어서 이러한 우수한 cellulose 분해효소 분비 능력을 지닌 균주를 사전에 파악할 수 있다면 육종적 측면에서 도움이 되는 정보가 될 것으로 사료된다. 그리고 목재에는 cellulose 이외에도 펙틴, 자일란 같은 성분이 존재하고 이러한 성분은 톱밥재배의 경우 톱밥 이외에도 배지에 혼합하는 여러 식물성 농업부산물에도 존재하기 때문에 pectinase, xylanase 등의 분비능력이 우수한 교잡균주를 검출하는 것도 톱밥재배용 표고균주의 육성 평가에 중요한 정보가 될 수 있다. Table 2에서 보듯이 본 연구에서 선발한 163개 교잡균주 중 pectinase와 xylanase 분비 능력이 우수한 균주가 65개와 41개로 각각 나타남을 볼 때 발색반응을 이용한

세포외효소 평가는 이러한 목적으로 사용하기에 부적합함을 보여준다.

163개 교잡균주가 나타낸 세포외효소 분비 능력정도가 어떠한 정도의 효소분비 능력을 지닌 단핵균주들 간의 교배조합으로 나타나게 됐는지 분석한 결과를 Table 3에 제시하였다. 놀랍게도 전반적으로 효소의 분비 능력이 강한 교잡균주의 생성은 반듯이 효소 분비 능력이 강한 단핵균주간의 조합에 의존해서 나타나는 것이 아니라 비록 단핵균주가 효소 분비 능력이 약하더라도 교잡을 통하여 강한 효소 분비 능력을 나타내는 교잡균주가 될 수 있다는 것을 보여주었다. 즉 단핵균주일 때 효소 분비 능력이 약하더라도 계통이 다른 단핵균주를 만나면 효소 분비 능력이 약한 교잡균주에서부터 중도적인 교잡균주, 강한 교잡균주를 각각 만들 수 있다는 자료를 제시하고 있다. 이것은 유전적으로 볼 때 상당히 귀중한 정보이다. 이는 단핵균주 때 세포외효소 유전자의 발현이나 효소분비 관련 유전자의 발현

Table 3. Analysis of the 163 hybrid strains showing different degree of extracellular enzyme production based on mating combination of the monokaryotic strains having different degree of extracellular enzyme production, derived from *L. edodes* Sanjo-101ho and Sanjo-108ho

Enzyme	Degree of production	Mating combination resulted in hybrid strain									Total no. of strains
		*S1 × S2	S1 × M2	S1 × W2	M1 × S2	M1 × M2	M1 × W2	W1 × S2	W1 × M2	W1 × W2	
β-glucosidase	Strong	16**	3	36	24	4			5		88
	Moderate	1			8			9			18
	Weak	10	1	25	17	2			2		57
Avicelase	Strong	2	3	5	5	12	3	11	23	20	84
	Moderate			1	1	2	1	4	7	8	24
	Weak	1	1	4	1	7	7	9	14	11	55
CM-cellulase	Strong				5		2	42	19	19	87
	Moderate			8	2	2		3	5	20	
	Weak				2	1		28	14	11	56
Amylase	Strong				1	1	2	14	2	9	29
	Moderate				2	2	5	8	7	30	54
	Weak				5	2	5	23	8	37	80
Pectinase	Strong		4	6		1	4	5	13	32	65
	Moderate		1	2			4	2	10	33	52
	Weak		1	5	2	2	3	2	4	27	46
Xylanase	Strong							11	2	28	41
	Moderate							1		21	22
	Weak							20	4	76	100
Protease	Strong					12	4		1	1	18
	Moderate					40	62		11	7	120
	Weak					7	12		2	4	25

*Mating type combination. **Number of hybrid strain.

S: strong production, M: moderate production, W: Weak or no production.

1: Monokaryotic strains from Sanjo-101ho, 2: Monokaryotic strains from Sanjo-108ho.

이 억제되어 있다가 교잡이 일어나면서 억제가 무마되고 발현이 회복되는 어떠한 기작이 존재하는 것을 시사한다.

7가지 효소를 대상으로 교잡의 조합내역을 간단히 살펴 보면 β -glucosidase 의 경우 산조101호와 산조108호로부터 유래한 단핵균주 중 분비 능력이 좋은 산조101호 유래 단핵균주와의 조합에서 대체로 분비 능력이 좋은 교잡균주가 분포하였다. Avicelase 의 경우는 흥미롭게도 7개 효소 중에 유일하게 모든 조합에서 폭넓게 분비 능력이 우수한 교잡균주가 만들어졌다. 이는 어쩌면 avicel 형태의 cellulose 기질을 이용하는 효소의 형성이 표고균주에서는 보편적으로 존재하는 특성인지도 모른다. 이에 반해 CM-cellulase의 경우는 특정 조합에서는 전혀 분비 능력이 강한 교잡균주가 없는바 Carboxyl-methyl 형태의 cellulose 기질 이용은 표고균주의 보편적인 특성으로 보이지 않았다. 그 밖에 다른 나머지 효소들도 특정 조합에서는 분비 능력이 강한 교잡균주 뿐만 아니라 약한 교잡균주 조합도 만들어지지 않는 조합의 분포를 보였다. 이는 이들 효소의 경우 기질을 이용하는 능력이 교잡하는 단핵균주의 유전적 소인에 크게 좌우됨을 시사한다. 따라서 유전적 소인에 따라 세포외효소의 분비능력 정도가 달라지는 균주를 선별하는데 발색반응 배지가 쓰일 수 있음을 Table 3의 결과를 통해 확인 할 수 있었다.

단핵균주나 교잡균주들 간의 효소 생화학적 특성 차이를 평가하기 위해서는 전분 겔이나 아크릴아마이드 겔을 이용하여 단백질을 분리 후 동위효소(isozyme)를 분석하는 생화학적 방법을 활용할 수 있는데 이는 추출과 염색, 단백질 정량 등의 과정과 분석기기의 구입을 필요로 하고 시간과 비용이 많이 들고 생화학적 지식과 기술을 요하기 때문에 누구나 쉽게 접근하기에는 제한적인 방법이다. 이에 반해 발색배지를 이용한 간이 평가법은 누구나 손쉽게 저비용으로 세포외효소 분비 능력 검정에 활용 할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이러한 장점에 힘입어 최근 영지버섯, 목이버섯 등에서도 버섯균의 세포외효소 검정을 위하여 발색배지를 사용하였다(Jo et al., 2009, Jo et al., 2010). 표고균으로부터 세포외효소를 검정한 사례로는 벚짚이나 유칼립투스 부산물을 기질로 이용한 Mata와 Savoie(1998), Silva 등(2005)을 들 수 있다. 그러나 지금까지 하나의 계통에서 유래하는 균주들에 대한 체계적인 평가를 통하여 교배 전후 변화하는 특성을 평가하는데 발색반응배지의 활용 가능성을 보여준 사례는 본 연구가 유일하다.

적요

표고버섯의 육종은 두 개의 다른 모균주에 의한 교배와 버섯생산에 좋은 형질을 지닌 교잡균주의 선발이 요구된다. 본 연구에서는 서로 다른 두 계통의 표고 모균주에서 유래한 단핵균주와 이들 단핵균주간의 교배로부터 만들어

진 교잡균주에 대하여 발색반응 배지를 이용하여 세포외효소의 분비능력 정도를 비교하여 생화학적 특성이 우수한 균주를 선발할 가능성에 대하여 조사하였다. 모균주로부터 유래한 단핵균주들 간에 β -glucosidase, avicelase, CM-cellulase, amylase, pectinase, xylanase, protease의 분비능력에 차이가 있음을 확인하였다. 교잡균주에 있어서도 단핵균주의 조합에 따라 효소 분비능력이 달라지는 것을 볼 수 있었다. 이에 따라 발색반응배지를 이용한 세포외효소 평가법이 표고의 육종과정 중에 생성되는 교잡균주들의 평가에 활용 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(306008-05-3-WT011)에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Cannon, P. F., David, J. C., Staplers, J. A. and Kirk, P. M. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi. 9th ed. CABI Publishing.
- Chang, S. T. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinula edodes* in China. *Int. J. Med. Mushroom.* 1:291-300.
- Hyun, M. W., Yoon, J. H., Park, W. H. and Kim, S. H. 2006. Detection of cellulolytic activity in *Ophiostoma* and *Leptographium* species by chromogenic reaction. *Mycobiology* 34:108-110.
- Jo, W. S., Bae, S. H., Cho, D. H., Park, S. D., Yoo, Y. B. and Park, S. C. 2009. Optimal medium conditions for the detection of cellulolytic activity in *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology* 37(4):313-316.
- Jo, W. S., Bae, S. H., Choi, S. Y., Park, S. D., Yoo, Y. B. and Park, S. C. 2010. Development of detection methods for cellulolytic activity of *Auricularia auricularjuda*. *Mycobiology* 38(1):74-77.
- Kwon, H. W., Back, I. J., Ko, H. G., You, C. H. and Kim, S. H. 2008. Extracellular enzyme activities of the monokaryotic strains generated from basidiospores of shiitake mushroom. *Mycobiology* 36(1):74-76.
- Mata, G. and Savoie, J. -M. 1998. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World. Microbiol. Biotechnol.* 14:513-519.
- Ohnuma, N., Amemiya, K., Kakuda, R., Yaoita, Y., Machida, K. and Kikuchi, M. 2000. Sterol constituents from two edible mushrooms, *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake*. *Chem. Pharm. Bull.* 48(5):749-751.
- Silva, E. M., Machuca, A. and Milagres, A. M. F. 2005. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochem.* 40:161-164.
- Yaoita, Y., Amemiya, K., Ohnuma, H., Furumura, K., Masake, A., Matsuki, T. and Kikuchi, M. 1998. Sterol constituents from five edible mushrooms. *Chem. Pharm. Bull.* 46(6):944-950.
- Yoon, J. H., Park, J. E., Suh, D. Y., Hong, S. B., Ko, S. J. and Kim S. H. 2007. Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi. *Mycobiology* 35:21-24.