

민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 균사배양 및 유전적 특성에 관한 연구

김종봉* · 황성구

대구가톨릭대학교 생물학과

A STUDY ON THE MYCELIA CULTURE AND GENETIC CHARACTERISTICS IN *Lepista nuda*

Jong Bong Kim* and Seong Goo Hwang

Department of Biology, Catholic University of Daegu, Kyongsan, 712-702, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the cultural characteristics and the genetic characteristics in *Lepista nuda*. The mycelial cultural characteristics which include the specificity for pH, carbon source, nitrogen source and medium were studied using petridish culture and liquid media culture respectively. The genetic characteristics were also investigated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. To find out the mycelial growth rate by various medium, mycelia was cultured for 25 days in PDA, YM, MEA, GPB and Yamanaka. The Yamanaka was superior to the other media in supporting the mycelial growth. pH6 produced the best result in the test of an optimal pH. In experiment for optimal carbon source, starch shows 46.8 ± 1.7 mm of diameter of mycelial colony as the best and for nitrogen source, yeast extract showed a good effect as well. In investigation for genetic characteristics, *Lepista nuda* was amplified by 7 primers among 10 primers and *Pleurotus ostreatus* was also amplified by 7 primers. From the RAPD analysis between two species, the band patterns were different.

Key words – *Lepista nuda*, Mycelia, Culture, DNA, RAPD

서 론

버섯은 세계적으로 약 200종 정도가 식용가능한 것으로 보고되고 있으나, 실제 식용으로 널리 이용되고, 인공재배되는 것은 25종 정도에 불과하다[10]. 우리나라의 경우에는 약 60여종의 야생버섯이 식용가능한 것으로 보고되었고, 이 중 35종이 지역에 따라서 이용되고 있으나, 인공재배되

어 식용으로 이용되고 있는 버섯은 표고(*Lentinus edodes*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 팽이(*Flammulina velutipes*), 만가닥(*Lyophyllum cinerascens*), 맛버섯(*Pholiota nameko*) 등 십 여종에 불과하다[1]. 민자주방망이버섯[*Lepista nuda*(Bull. ex Fr.) Cooke]은 한국, 일본, 중국, 북유럽 등 북반구 일대와 오스트레일리아 등에 자생하는 버섯으로, 아직까지 우리나라에서는 널리 알려져 있지 않으나 북유럽과 중국, 호주 등지에서는 식용으로 애용되고 있는 버섯이다. 이 버섯은 맛과 향이 뛰어나고 특징적인 연보라색의 빛깔을 가지고 유리아미노산 28종, vitamin B₁, pectin lignin 등의 성분을 함유하고 있고, fibrin 분해활

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-850-3775, Fax : 053-850-3775
E-mail : jbkim@cuth.cataegu.ac.kr

성도가 매우 높으며[3], 항종양작용이 높은 것으로 연구되어 있어[8], 유효성분의 추출과 정제 및 유전공학적인 방법을 통한 효소 등 단백질의 대량생산을 이용하여 약제화의 가능성도 매우 높은 버섯으로 생각된다.

민자주방망이버섯의 배양에 관한 연구는 이 등[4,5]이 민자주방망이버섯의 고체배양과 톱밥배양에 관한 연구를 보고한 바 있고, 박 등[9]은 야생버섯의 인공재배 검토에 관한 연구에서 민자주방망이버섯을 비롯한 여러 야생버섯에서 배지와 온도, 질소원, 중금속첨가물에 대한 실험을 수행한 바 있다. 또한 김 등[11]은 미생물유전자원 개발연구의 일환으로 야생버섯분류동정 및 자원수집이라는 과제에서 수집한 810점의 버섯 중 민자주방망이버섯을 포함하여 최적배지, 온도, 산도 등에 관한 연구를 수행한 바 있고, 민자주방망이버섯의 fibrin 분해활성에 대한 연구에서는[3] 민자주방망이버섯을 비롯한 송이과 버섯들의 높은 효소활성에 대한 보고가 있었다. 한 편 Stott등은 오스트레일리아에 자생하는 민자주방망이버섯과 프랑스원산의 민자주방망이버섯의 온도와 배지첨가물에 의한 반응에 대하여 연구한 바가 있으며[10], Noelsuberville은 민자주방망이버섯의 지방산과 방향물질의 관계에 대한 연구에서 갓주름에서 분비되는 1-octen-3-ol이 주성분임을 밝힌 바 있다[7]. 또한 민자주방망이버섯의 DNA에 관한 연구는 김 등[2]이 송이버섯의 분류 및 유전적 특성에 관한 연구에서 RAPD 분석을 통하여 자주방망이버섯속과 느타리버섯속을 유전적 유사 그룹으로 분류한 바가 있다.

위의 여러 가지 문헌들을 참고해 본 결과, 민자주방망이버섯은 식용과 약용 등의 가치가 매우 높고, 국내에도 널리 자생하는 버섯임에도 불구하고, 국내에서의 식용 및 의약적 이용을 위한 기초적인 배양연구와 유전학적인 연구가 부족한 실정이다. 이에 인공재배와 유용성분검색 및 분류의 기초가 되는 배양특성과 유전적 특성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

채집 및 분리

실험에 사용한 민자주방망이버섯은 2000년 9월 초순경, 경상북도 경산시 하양읍에 소재한 대구가톨릭대학교 북편 야산의 참나무와 소나무, 아카시아나무 혼합림에서 채집하

였다. 채집한 버섯으로부터 조직의 일부분을 분리하여 PDA배지와 Yamanaka배지에 접종하여 25℃ incubator에서 배양하였다. 균사의 성장과정 중 육안과 현미경상으로 균사의 색깔과 모양 등에서 기존의 문헌에서 서술한 민자주방망이버섯과 일치하는 특징을 나타내는 균사를 *Lepista nuda*로 간주하여 계대배양하였고, 그 중 성장속도가 빠른 균주를 분리하여 실험에 사용하였다.

균사의 성장속도 측정

배지에 따른 민자주방망이버섯 균사의 성장속도를 알아보기 위하여, 일반적으로 버섯균사의 배양실험에서 많이 사용하는 4종의 배지(PDA, YM, GPB, MEA)와 균근성버섯의 배지로 많이 사용하는 1종의 배지(Yamanaka)를 선정하였다. 이들 배지 중 PDA배지의 경우는 PDA 39.0 g/l, pH 5.4로 조제하였으며, MEA배지는 MEA 33.6g/l, pH 5.4로 조제하였다. 그리고 YM배지는 glucose 10.0 g, peptone 5.0 g, malt extract 3.0 g, yeast extract 3.0 g, agar 20.0 g/l, pH 5.4로, GPB배지는 glucose 10.0 g, peptone 10.0 g, KCl 0.3 g, potassium phosphate 0.87 g, magnesium sulfate 0.5 g, agar 1.5%, pH 5.4로, Yamanaka배지는 glucose 20.0 g, ammonium tartrate 2.0 g, potassium phosphate 1.0 g, calcium chloride 5 mg, citric acid 1.0 g, ferric chloride 100 mg, zinc sulfate 5 mg, cupric sulfate 10 mg, manganese sulfate 0.5 mg, magnesium sulfate 1.5 g, thiamine HCl 3 mg, nicotinic acid 0.3 mg, folic acid 0.1 mg, HEPES 7 g, agar 15g/l, pH 5.4로 조제하여, 121℃(1.2 kg/cm²)에서 20분간 멸균하고, clean bench 하에서 E.O Gas로 멸균된 직경87 mm의 Petri dish에 50 ml씩 분주하여 완전히 식힌 후, 직경 5 mm의 cork borer를 이용하여 접종하였다. 접종 후 25±1℃의 incubator에서 25일간 배양하여 균총의 직경을 측정하여 평균하였다.

pH별 균사의 성장속도를 알아보기 위하여 Yamanaka배지를 기본배지로 하여 1M HCl과 1M NaOH로 pH 4, 5, 6, 7, 8로 각각 조절한 뒤, 121℃(1.2 kg/cm²)에서 20분간 멸균하고, 고체배지의 경우 E.O Gas로 멸균한 직경 87 mm의 Petri-dish에 50 ml씩 분주하여 완전히 식히고 직경 5 mm의 cork borer로 접종한 후, 25±1℃의 incubator에 25일간 배양하여 균총의 직경을 측정하여 평균하였다. 액체배지의 경우는 250 ml flask에 100 ml의 배지를 분주하여 1M HCl

Table 1. Effect of various substances on *Lepista nuda*

Substances		Diameter of colony	Mycelial dry weight
		(mm/25days)	(mg/25days)
Media	PDA	52.8±3.3 ^{a)}	-
	MEA	29.3±2.6	-
	YM	8.3±1.7	-
	GPB	30.3±2.1	-
	Yamanaka	54.3±3.6	-
pH	4	5.0±0.0	8
	5	41.8±0.9	26
	6	69.5±1.7	39
	7	65.8±3.3	31
	8	47.0±6.9	16
Carbon sources	glucose	19.0±2.2	23
	sucrose	39.3±2.8	42
	starch	46.8±1.7	65
Nitrogen sources	ammonium tartrate	18.8±1.7	8
	yeast extract	31.0±3.2	43
	peptone	24.5±1.7	32
	asparagine	21.0±2.2	21

^{a)}All values are mean±standard deviation.

과 1M NaOH로 pH를 각각 4, 5, 6, 7, 8로 조절한 후 121 °C(1.2 kg/cm²)에서 20분간 멸균하고 접종한 뒤, shaking incubator에서 25°C, 120 rpm으로 25일간 배양하고 배양액을 filter paper로 여과시킨 후, 80°C의 dry oven에서 24시간 건조시켜 균사의 건조량을 측정하였다.

탄소원의 변화에 따른 균사의 성장속도를 알아보기 위하여 첨가탄소원으로 단당류인 glucose, 이당류인 sucrose, 다당류인 starch의 3종을 선정하여, pH 5.4의 기본배지에 각각의 탄소원을 20.0 g씩 첨가하여 제조하였고, 질소원의 변화에 따른 균사성장속도를 알아보기 위하여 첨가질소원으로 무기태질소원 중 암모늄태인 ammonium tartrate, 유기태질소원인 yeast extract, 복합질소원인 peptone, 그리고 유기태질소원 중 아미노산태인 asparagine의 4종의 질소원을 선정하여 위와 동일한 방법으로 배양, 측정하였다.

유전적특성분석(PCR-RAPD)

민자주방망이버섯의 균사로부터 DNA를 추출하기 위하여 균사 500 mg을 pre-cooled mortar에 넣고 liquid nitrogen으로 잘 마쇄 한 다음, 마쇄한 분말을 1.5ml tube에

옮기고 Lysis buffer (50mM Tris-HCl:pH 7.2, 50mM EDTA:pH 7.2, 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol) 500 µl를 넣어서 잘 섞고, 65°C의 Water bath에서 1시간 동안 배양하여, 12,000 g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 micropipette으로 채취하여 동량의 phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)을 넣어 잘 섞은 뒤, 다시 12,000 g에서 5분간 원심분리하였다. 다시 동량의 phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)을 넣어 섞은 뒤 12,000 g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 채취하여 2배의 냉장한 70% ethanol을 넣고 12,000 g에서 3분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. pellet을 제외한 용액은 버리고, 냉장한 80% ethanol을 200 µl정도 넣어 섞은 후 12,000 g에서 3분간 원심분리하였다. pellet은 30분정도 실온에서 건조시키고, TE buffer 100 µl을 넣어 PCR 재료로 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 대전에 소재한 Genotech사에 주문제작하여 사용하였다.

PCR을 위한 reaction mixture의 조성은 Takara PCR kit에 첨부된 사용지침에 따랐다. *Lepista nuda*의 genomic DNA 1 µl에 Taq polymerase 0.5 µl(Takara), 10X buffer 10.0 µl(Takara), dNTPs mixture 8.0 µl(Takara), MgCl₂ 6.0

μl (Takara), primer 1.0 μl (Genotech)를 넣고 D.D.W.를 100 μl 까지 채웠다. PCR에 사용한 thermal cycler는 영국 Techne사의 Progene였으며, PCR 조건은 박 등(1997)의 방법에 따라 수행하였다. Denaturation을 위해 94°C에서 2분간 1 cycle을 program하고, 45 cycle을 94°C에서 30초간 denaturation, 40°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension한 후 최종적으로 1 cycle을 72°C에서 5분간 extension하였다. PCR한 product들을 ethidium bromide를 첨가한 1% agarose gel에서 TAE buffer를 사용하여 85volt로 전기영동한 후 UV상에서 나타나는 band 들을 관찰하였다.

결 과

균사의 생장

배지별 균사생장속도는 Yamanaka배지가 균총의 직경이 $54.3 \pm 3.6\text{mm}$ 로 가장 양호했으며, PDA배지도 $52.8 \pm 3.3\text{mm}$ 로 거의 동일한 수준으로 양호하였다. MEA배지와 GPB배지는 $29.3 \pm 2.6\text{mm}$ 과 $30.3 \pm 2.1\text{mm}$ 으로 비교적 저조하였으며 YM배지의 경우는 $8.3 \pm 1.7\text{mm}$ 으로 거의 성장하지 못하였다. pH별 균사생장속도는 pH6의 경우가 고체배지에서 균총직경 $69.5 \pm 1.7\text{mm}$, 액체배지에서 균사건중량 39mg으로 가장 양호하였으며 pH7, 8의 경우 고체배지에서 $65.8 \pm 3.3\text{mm}$, 액체배지에서 31mg과 고체배지에서 $47.0 \pm 6.9\text{mm}$, 액체배지에서 16mg으로 pH6에 비하여 조금 둔화된 생장을 보였다. pH5에서는 고체배지에서 $41.8 \pm 0.9\text{mm}$, 액체배

지에서 26mg으로 pH8과 비슷하였으나, pH4의 경우는 전혀 성장하지 못하였다. 탄소원의 변화에 따른 균사의 생장속도는 다당류인 starch를 탄소원으로 첨가한 배지가 고체배지의 경우 균총의 직경이 $46.8 \pm 1.7\text{mm}$, 액체배지의 경우 균사의 건중량이 65mg로 가장 양호하였고, 그 다음은 이당류인 sucrose를 탄소원으로 첨가한 배지가 $39.3 \pm 2.8\text{mm}$, 42mg이었으며, 단당류인 glucose의 경우 $19.9 \pm 2.2\text{mm}$, 23mg으로 생장이 저조하였다. 질소원의 변화에 따른 균사생장속도는 유기태질소원인 yeast extract와 복합질소원인 peptone을 질소원으로 첨가한 배지가 고체배지에서의 균총의 직경이 $31.0 \pm 3.2\text{mm}$, 액체배지에서의 균사의 건중량 43mg과 균총직경 $24.5 \pm 1.7\text{mm}$, 균사건중량 32mg으로 양호하였고, 무기태질소원 중 암모늄태인 ammonium tartrate를 질소원으로 첨가한 배지에서는 균총직경 $18.8 \pm 1.7\text{mm}$, 균사건중량 8mg으로 생장이 저조하였다.

DNA의 RAPD pattern

민자주방망이버섯의 경우는 Primer OPA-02, 03, 04, 07, 08, 09, 10에서 2~5개의 밴드를 나타내었으며 증폭된 단편의 크기는 450~2500 bp이었고 OPA-05, 06, 12에서는 증폭된 밴드를 나타내지 않았다

비교종인 느타리버섯의 경우는 Primer OPA-04, 05, 07, 08, 09, 10, 12에서 2~6개의 밴드를 나타내었으며, 증폭된 단편의 크기는 450~2,000 bp였으며, OPA-02, 03, 06에서는 증폭된 밴드가 관찰되지 않았다(Fig. 1, Table 2).

Table 2. The number and size of amplified fragments

Code	Sequence 5' to 3'	No. of amplified fragments		Size of fragments (bp)	
		<i>L. nuda</i>	<i>P. ostratus</i>	<i>L. nuda</i>	<i>P. ostratus</i>
OPA-02	TGCCGAGCTG	2	0	800~500	-
OPA-03	AGTCAGCCAC	2	0	900~300	-
OPA-04	AATCGGGCTG	5	4	2100~800	2000~700
OPA-05	AGGGGTCTTG	0	3	-	1150~550
OPA-06	GGTCCCGTAC	0	0	-	-
OPA-07	GAAACGGGTG	4	2	2300~450	1950~1200
OPA-08	GTGACGTAGG	5	3	2500~700	1500~700
OPA-09	GGGTAACGCC	4	4	1600~650	2100~450
OPA-10	GTGATCGCAG	3	6	1100~450	2000~450
OPA-12	TGCCGATAG	0	3	-	1600~1000

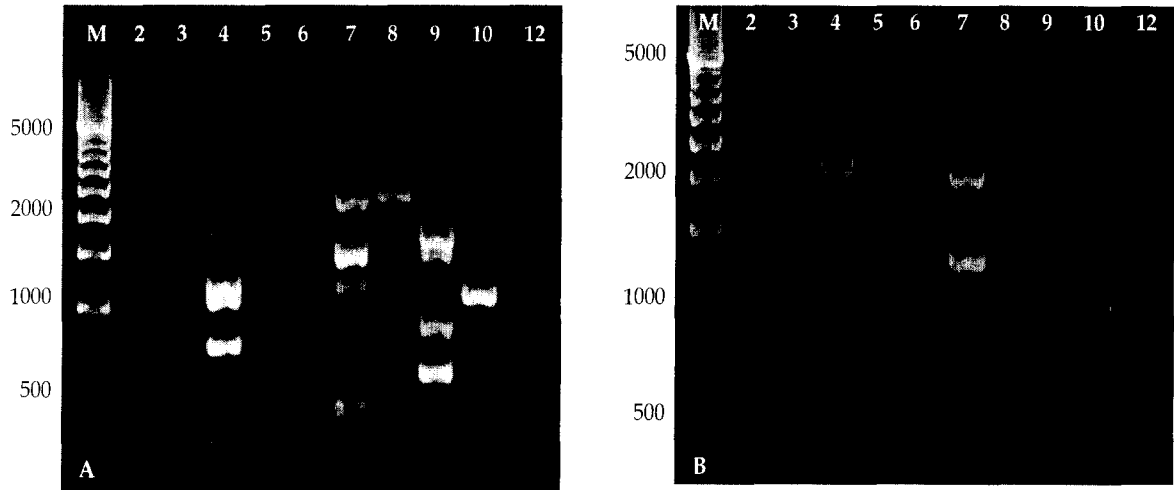


Fig. 1. RAPD patterns of *Lepista nuda*(A) and *Pleurotus ostreatus*(B). M: 500 bp molecular ruler, 2~12: primers

고찰

배지에 따른 균사의 성장속도비교실험 결과, Yamanaka 배지에서 가장 좋은 성장을 보였는데, 이 배지는 여러 가지 미량원소들을 함유하고 있어서, 균근성버섯에 대한 적정배지로 보고되고 있으므로 낙엽분해성 또는 일부수종에서 균근성으로 보고된[4] 민자주방망이버섯의 균사배지로 적합한 것으로 보인다. pH에 따른 균사의 성장속도 비교실험 결과 pH 6에서 가장 양호한 성장을 보여 주었는데, 이는 같은 속의 *Lepista sordida*가 pH 6에서 균사생장이 가장 양호하다는 보고[11]와 일치된 결과를 보여주고 있다. 그러나 pH 7과 8에서의 성장도 비교적 양호하고 배양초기부터 균사가 특유의 연보라색을 띠고 있어 민자주방망이버섯은 초기 pH가 중성과 약알칼리에서도 생장이 가능한 사실과, 초기pH가 높을수록 균사의 색깔이 일찍 발현되는 현상이 관찰되었다. 질소원에 따른 균사성장속도비교실험의 결과, yeast extract에서 가장 좋은 성장을 보이고 ammonium tartrate에서 가장 저조한 성장을 보였는데, 이로 미루어 볼 때 민자주방망이버섯의 경우는 무기태질소원보다 유기태질소원의 이용이 용이한 것으로 보여진다. 이는 같은 과에 속하는 송이버섯의 균사생육에 yeast extract가 가장 양호한 결과를 나타내었다는 보고[6]와 일치한 결과를 보인다. 탄소원과 질소원의 배지내 적정비율에 대한 실험은 실시하지 못하였는데, 이 또한 균사의 성장에 중요한 변수 중의 하나이므로 이에 대한 실험을 보강하여야 할 것

으로 사료된다.

RAPD의 결과, 느타리버섯속과 자주방망이버섯속을 유전적다형성에 의한 분류에서 유사군으로 분류한 보고[2]와는 달리 primer에 따른 밴드패턴이 상이한 점을 발견하였는데, 이는 본 실험에서 사용한 primer의 수가 적어서 확인에 어려움이 있으므로, 가능한 한 많은 수의 primer와 sample을 이용한 RAPD 분석을 실시하여 유사도지수분석을 통해 확인을 해야 할 것으로 생각된다. 또한 실험에 사용한 민자주방망이버섯은 채집한 균주이므로 공시균주와의 RAPD를 통한 PCR band pattern 비교분석과, 차후 자실체와 균사의 DNA를 PCR-RAPD band pattern의 비교분석을 통하여 확인해 볼 필요가 있다.

요약

민자주방망이버섯 균사의 배양특성을 알아보기 위하여 PDA, YM, MEA, GPB, Yamanaka의 5종의 배지를 사용하여 배양한 결과, 균근성버섯의 적정배지로 보고된 바 있는 Yamanaka배지에서 가장 양호한 성장을 보여 주었다. pH 별 균사성장속도를 알아보기 위하여 pH 4, 5, 6, 7, 8의 조건으로 배양실험을 실시한 결과 pH 6이 가장 양호하였으며, 적정탄소원에 대한 실험에서는 glucose, sucrose, starch 중 starch를 탄소원으로 첨가한 배지에서 가장 왕성한 성장을 보여 주었다. 적정질소원에 대한 실험에서는 ammonium tartrate, yeast extract, peptone, asparagine 중 yeast

extract와 peptone을 첨가한 배지에서 성장이 활발하므로 유기태질소원의 이용이 용이한 것으로 보인다. 유전적특성을 조사하기 위하여 RAPD분석을 시행한 결과, 느타리버섯속과 자주방망이버섯속의 비교에서 primer에 따른 밴드 패턴의 상이한 점을 발견하였다.

참 고 문 헌

1. Cha, D. Y. 1981. Investigation on artificial cultures for new edible wild mushroom(II). *Kor. J. Mycol.* **9**, 123-128.
2. Kim, J. H. 1997. Classification and genetic characteristics of *Tricholoma matsutake*. *Food Industry and Nutrition* **2(2)**, 109-109.
3. Kim, J. H., H. Y. Lee, K. H. Yoo, Y. S. Kim, S. J. Seok and Y. S. Kim. 1998. The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushroom in Mt. Chiak. *Kor. J. Mycol.* **26(4)**, 589-593.
4. Lee, S. S. and K. J. Choi. 1995. Solid culture of *Lepista nuda*. *Kor. J. Mycol.* **23(2)**, 105-113.
5. Lee, S. S., K. J. Choi and C. H. Oh. 1996. Sawdust culture of *Lepista nuda*. *Kor. J. Mycol.* **24(4)**, 274-279.
6. Min, E. G., K. K. Chung and Y. H. Han. 1998. Effect of Complex Nitrogen Source on Mycelial Growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Kor. J. Mycol.* **26(3)**, 361-364.
7. Noelsuberville C. 1996. Correlation between fatty acid content and aromatic compound release in fresh blewit(*Lepista nuda*). *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **44(5)**, 1180-1183.
8. Park, W. H. and H. D. Lee. 1999. *Illustrated book of Korean medicinal mushrooms*, Kyo-Hak Publishing, Seoul. 186-187
9. Park, Y. H., Y. S. Kim and D. Y. Cha. 1978. Investigation on artificial culture for new edible wild mushrooms. *Kor. J. Mycol.* **6(2)**, 25-28.
10. Stott, K. and A. Broderick. 1996. Response of Australian strains of the mushroom *Lepista nuda* to temperature and substrate. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. 476-479.
11. 김양섭, 석순자, 박동석, 박용환. 1997. 야생버섯 분류동정 및 자원수집. 시험연구사업보고서, 농촌진흥청농업과학기술원. 785-834.

(Received June 29, 2001; Accepted August 17, 2001)