

젓빛만가닥버섯의 변이체 유도 및 실용적 인공재배에 대한 연구

이대진^{1*}, 이원정¹, 권미성¹, 장주원¹, 이원재¹, 허정란², 최창현², 황철호², 이병의^{1*}
히니버섯영농조합법인¹, 단국대학교²

Studies on the mutant introduction and new practical artificial cultivation of *Lyophyllum decastes*

Dae-Jin Lee^{1*}, Won-Jung Lee^{1,2}, Mi-Sung Kuen¹, Ju-Won Jang¹, Jeong-Ran Her², Chang-Hyun Choi², Cheol-Ho Hwang²
and Byung-Eui Lee¹

¹Honeymush Agricultural Cooperative, Ipjang, Seobukgu, Cheonan, Chungnam 330-820, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, College of Bio-Resources Science, Dankook University, San 29, Anseo-Dong, Dongnam-gu, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

(Received April 1, 2011, Revised April 18, 2011, Accepted April 26, 2011)

ABSTRACT: Artificial cultivation of *Lyophyllum decastes* is costly because the high expense is required for soil covering and bark. Therefore, most farmers of *Lyophyllum decastes* have recognized it is difficult to cultivate it. The purpose of this study is to reduce the cost of cultivation of *Lyophyllum decastes* by applying new cultivation method and introducing mutation of fungi. In this study, a new method of practical artificial cultivation was developed through many experiments using fermented pine sawdust and wheat bran. In conclusion, the method of practical artificial cultivation of *Lyophyllum decastes* is simple and cost efficient because neither soil covering nor bark is required.

KEYWORDS : Artificial cultivation, Bark, Human health, *Lyophyllum decastes*, Soil covering

서 론

주름버섯목(Agaricales) 송이과(Tricholomataceae)의 젓빛만가닥버섯(*Lyophyllum decastes*(Fr. : Fr.)Sing.)은 한국 등 북반구에 자생하며 갓의 지름이 4~9cm로 비교적 큰 편인 식용버섯이다(박완희 등, 2003). 향암(Ukawa 등, 2000; Gu 등, 2006)을 비롯한 고향압(Yasushi 등, 2005), 2형 당뇨병(Toshihiro 등, 2002), 아토피치료(Yuuichi 등, 2007) 등 기능성이 우수하고 식감도 매우 뛰어나 독특한 밀가루 맛을 가져 어린이들에게도 친숙한 버섯이다. 현재 일본에서는 3가지 품종이 재배되고 있으나 다른 버섯에 비하여 안정적인 재배가 쉽지 않은 현실이다. 국내에서도 오래전부터 인공재배(강안석 등, 1994)에 관심을 가지고 연구되었으나 다른 버섯류에 비하면 재배에 어려움이 많고, 또한 인공재배를 하는데 있어서 원재료로 고가의 수피를 사용하고 복토(경북전문대, 2007)를 해주어야 하는 번거로움으로 현재까지는 실용적인 재배가 이루어지지 않았다(우성미 등, 2009). 이에 본 연구에서는 일반 톱밥보다 수배나 고가인 수피 사용을 일반 톱밥으로 전환하고 대량생산 단계에서 난해한 공정한 복토 과정을 없애고 재배할 수 있는 재배 방법을 연구의 목표로

선정하고 젓빛 만가닥버섯에 대한 생육환경에 대한 분석, 적합한 균주의 확보에 대한 재배연구를 진행한 결과 복토와 수피 사용 없이 젓빛 만가닥버섯을 재배할 수 있는 인공 재배법을 개발하였으며 또한 보다 용이하게 재배할 수 있는 변이체를 유도, 개발하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 접종원

본 실험에 사용한 균주는 인천대학교 버섯균주은행에서 분양받은 4개 균주와 일본에서 수집한 1개 균주를 원균으로 관리하며 변이체 유도방법으로 품종을 육종하여 활력이 우수한 균주를 선발하였다. 원균 관리는 PDA(patato dextrose agar, Duchefa) 배지에서 3개월 간격으로 계대 배양하여 활력을 유지시켰으며, 접종원은 1,000ml 삼각플라스크를 이용하여 2주간 액체 종균으로 배양한 다음, 배양액을 균질기로 균질화하여 사용하며 반복적인 활성검정을 통해 우수한 품종을 선정하여 실험에 사용하였다.

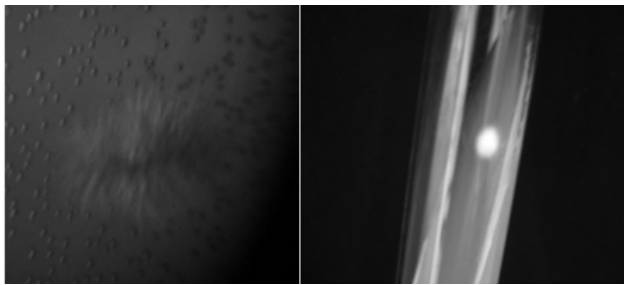
원형질체 제작 및 재분화

14일간 액체 배양한 균사는 배지와 분리하기 위하여 50ml

* Corresponding author (belee316@hanmail.net)

Table 1. Regenerated colony number and colony number to move into medium

Treatment	Recoverd number of colony		Transferred to medium number of colony	
Variety Code	JP	CB	JP	CB
4NQO 0.5 ug/ml 20min	3	4	2	2
4NQO 0.5 ug/ml 40min	12	13	2	2
4NQO 1.0 ug/ml 20min	2	4	2	3
4NQO 1.0 ug/ml 40min	8	5	2	2
Control	74	39		

**Fig. 1.** Hyphae transferred to PDA medium from regenerated protoplasts.

시험관으로 옮겨 800rpm에서 5분 동안 원심분리 후 상층액을 제거하여 균사를 얻었다. 균사를 세척하기 위하여 펠릿 상태가 된 균사에 0.6M mannitol 20ml을 넣어주어 재현탁하고 이를 2회 반복하였다. 원형질체 추출용액은 0.03mg/ml의 chitinase(Sigma)와 10mg/ml의 lysing enzyme(Sigma Co.)이 함유된 0.6mM mannitol 용액을 이용하여 28℃ 암상 상태에서 2시간 동안 30rpm으로 흔들어주며 배양한 후 멸균한 4×4×0.3cm³의 탈지면이 담겨있는 주사기로 효소 처리한 균사 현탁액의 원형질체를 분리하였다. 분리된 원형질체는 0.6M mannitol를 넣고 600rpm에서 5분 동안 원심분리하여 원형질체를 세척한 후 최종 1ml의 0.6M mannitol에 재현탁 하였다. 얻어진 원형질체를 hemocytometer(Superior Co.)를 이용하여 현미경하에서 정량한 후 0.6M mannitol의 PDA에 도말하여 균사를 재분화 하였다(정미나, 2007).

변이체 유도방법

변이체 유도(Bal 등, 1977)는 화학적인 방법인 4NQO(4-nitroquinoline 1-oxide, Duchefa)을 이용하였다. 4NQO 농도를 각각 0.5µg/ml와 1µg/ml에서 각각 20분, 40분씩 처리시간을 달리하고, 대조군은 0.6 M mannitol 용액에서 40분간 처리하였다. 이후 처리가 끝난 즉시 0.6M mannitol 용액으로 2차례 세척하고 hemocytometer로 현미경 하에서 정량한 후, MYG(0.5% maltose, 0.5% Yeast extract, 1% glucose, 0.6M mannitol)에 1만개를 도말하여 28℃ 암상 상태에서 7일 후 재분화된 colony에 임의번호를 부여하는 방식으로 실험

하였다. 이후 기존 품종과 변이체 유도 품종의 유전적 차별성 검증에는 RAPD 분석을 통하여 분석을 시행하였다.

변이체 DNA 분석

자실체 100 mg을 액화질소와 막자사발을 이용하여 곱게 갈아준 후 DNeasy Plant Mini Kit(Promega)를 이용하여 Genomic DNA를 추출하여 -20℃에 보관하였다. PCR 반응은 95℃에서 5분간 DNA를 완전히 denature 시킨 후 94℃에서 1분, 각각의 OPT random primer(Operon)에 따른 annealing temperature에서 1분, 72℃에서 1분 조건에서 40cycle을 수행하였다. PCR 생성물은 1.4% agarose gel에서 전기영동을 통해 야생형과 DNA 밴드 양상을 비교하였다.

pH별 균사성장

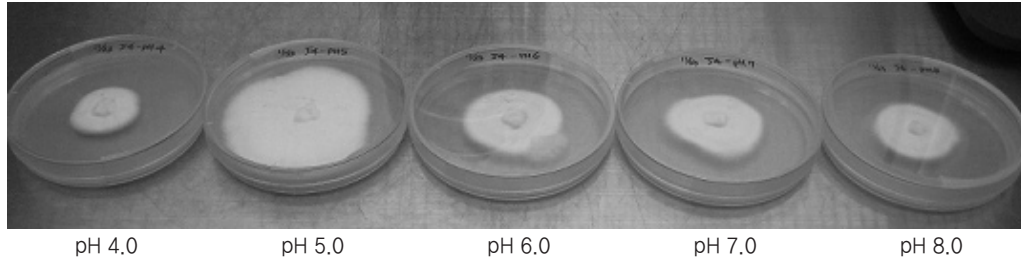
갯빛 만가닥버섯 균주의 적정 pH 조건을 확인하기 위해 pH에 따른 균주의 성장 및 활성도를 측정하였다. pH 적정도 실험은 10cm 페트리디쉬를 이용하여 PDA배지에 1M NaOH와 1N HCl를 이용해서 pH 4, 5, 6, 7, 8 등 5개의 실험군으로 제조하여 인큐베이터에서 갯빛 만가닥버섯 균사배양 최적온도인 25℃를 유지하며 24일간 배양상태를 확인하였다.

원재료 수증 선정실험

최적의 톱밥 수증 선정을 위한 실험은 수피(나무껍질), 미송을 발효시킨 톱밥과 포폴라나무 톱밥을 사용하였으며, 영양제는 미강을 사용하여 Table 3과 같이 4개의 실험군으로 선정하여 배지의 수분은 63%(v/v)로 맞춘 후, 1,100ml polypropylene 용기를 이용하여 입병, 121℃에서 90분 동안 고압 살균 후 냉각실에서 24시간 방치하여 배지의 온도가 실온으로 충분히 내려감을 확인하여 분쇄한 액체중균을 20~30ml 접종하였다. 접종 후 배양실에서 25℃로 30~40일간 배양시킨 후 충분한 숙성을 위해 20일 정도 더 배양하였다. 이후 균 굵기 한 후 재배실로 이송하여 온·습도를 관찰하며 발이과정을 확인한 후, 온도 18℃, 습도 90% 및 광도 300~500Lux 범위로 관리하며 재배하였다. 2차 재배실험에서는 Table 4와 같이 톱밥은 미송을 발효시킨 톱밥만을 사용하고 영양원으로는 미강, 밀기울 및 면실박을 배합하여

Table 2. Comparisons of the mycelia growth to pH value

Treatment	Incubation times(day)		
	8	15	24
pH 4.0	10 mm	20 mm	30 mm
pH 5.0	23 mm	46 mm	75 mm
pH 6.0	18 mm	26 mm	43 mm
pH 7.0	18 mm	27 mm	45 mm
pH 8.0	12 mm	23 mm	39 mm

**Fig. 2.** Effect of the pH of media on the mycelial growth in *Lyophyllum decastes*.**Table 3.** The composition of various media

Treatment	Main material(%)	Nutrition material(%)
Group 1	Bark 80	Rice bran 20
Group 2	Fermented pine sawdust 80	Rice bran 20
Group 3	Fermented pine sawdust 40 Broadleaf sawdust 40	Rice bran 20
Group 4	Broadleaf sawdust 80	Rice bran 20

Table 4. The composition of sawdust and nutrition material

Treatment	Sawdust(%)	Nutrition material(%)
Group 1	Fermented pine sawdust 68.0%	Rice bran 32.0
Group 2	Fermented pine sawdust 41.0	Rice bran 59.0
Group 3	Fermented pine sawdust 71.0	Wheat bran 29.0
Group 4	Fermented pine sawdust 51.0	Rice bran 20.6 and Wheat bran 49.9
Group 5	Fermented pine sawdust 58.8	Rice bran
Group 6	Fermented pine sawdust 70.6	Cottonseed bark 29.4

상기와 같은 조건에서 재배실험을 진행하였다.

결과 및 고찰

pH별 균사성장

젯빛 만가닥버섯 균사 성장에 가장 적합한 pH를 규명하기 위하여 PDA 배지를 이용하여 페트리디쉬에 배양하여 균사 생육 및 치밀도를 조사하였으며, 그 실험결과 젯빛 만가닥버섯 균주는 pH 5에서 균사 생장이 가장 우수하였다.

변이체 선발 및 PCR 검정

변이체 유도방법은 Bal 등(1977)에 따라 2주 배양된 균사체를 분쇄하여 원형질체를 분리, 4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide)처리하고 재생된 균사를 PDA 사면배지로 옮기고 colony의 임의번호를 부여하였다.

야생에서 분리한 버섯 균주들의 유전적 다양성을 확인하거나 상이한 균주간의 원형질체 융합 후 융합체를 분석하기 위한 방법으로 RAPD는 효과적이었다(Tomizawa 등, 2007; Sunagawa 등, 1995). 이에 기존 품종과 육성 품종의 유전적 차별성 검증에는 RAPD 분석을 통하여 분석결과 RAPD 분석

Table 5. Option number of processing conditions

Treatment of JP	Number	Treatment of CB	Number
JP-4NQO 0.5 ug/ml 20 min-1	J1	CB-4NQO 0.5 ug/ml 20 min-1	C1
JP-4NQO 0.5 ug/ml 20 min-2	J2	CB-4NQO 0.5 ug/ml 20 min-2	C2
JP-4NQO 0.5 ug/ml 40 min-1	J3	CB-4NQO 0.5 ug/ml 40 min-1	C3
JP-4NQO 0.5 ug/ml 40 min-2	J4	CB-4NQO 0.5 ug/ml 40 min-1	C4
JP-4NQO 1.0 ug/ml 20 min-1	J5	CB-4NQO 1.0 ug/ml 20 min-1	C5
JP-4NQO 1.0 ug/ml 20 min-2	J6	CB-4NQO 1.0 ug/ml 20 min-2	C6
JP-4NQO 1.0 ug/ml 40 min-1	J7	CB-4NQO 1.0 ug/ml 20 min-3	C7
JP-4NQO 1.0 ug/ml 40 min-2	J8	CB-4NQO 1.0 ug/ml 40 min-1	C8
		CB-4NQO 1.0 ug/ml 40 min-1	C9

Table 6. Used random primer and annealing temperature

Primer number	5' to 3'	Annealing temperature(°C)
OPT- 1	GGGCCACTCA	33.9
OPT- 2	GGAGAGACTC	25.6
OPT- 3	TCCACTCCTG	29.0
OPT- 4	CACAGAGGGA	29.0
OPT- 5	GGGTTTGCA	34.9
OPT- 6	CAAGGGCAGA	32.4
OPT- 7	GGCAGGCTGT	33.9
OPT- 8	AACGGCGACA	35.1
OPT- 9	CACCCCTGAG	31.5
OPT-10	CCTTCGGAAG	32.8
OPT-11	TTCCCCGCGA	40.5
OPT-12	GGGTGTGTAG	26.9
OPT-13	AGGACTGCCA	31.5
OPT-14	AATGCCGAG	35.6
OPT-15	GGATGCCACT	31.3
OPT-16	GGTGAACGCT	31.8
OPT-17	CCAACGTCGT	32.1
OPT-18	GATGCCAGAC	28.8
OPT-19	GTCCGTATGG	30.0
OPT-20	GACCAATGCC	31.8

을 통한 변이체를 wild type과 비교한 결과 계통적 차이가 있음을 확인하였다. 차별 밴드의 종류 1) wild type에는 있지만 변이체에는 없는 밴드(-), 2) wild type에는 없지만 변이체에는 있는 밴드(+), 3) wild type에도 있으나 변이체에서는 증폭되는 밴드(×) 등 3가지로 분류하여 평가하였다.

적요

본 연구에서는 기 확보한 균주에 대하여 활성이 좋은 균주를 1차 선발하였고, 활성이 우수한 균주는 변이체 유도법을 통한 육종으로 17종의 균주를 새로 확보한 뒤 반복적인

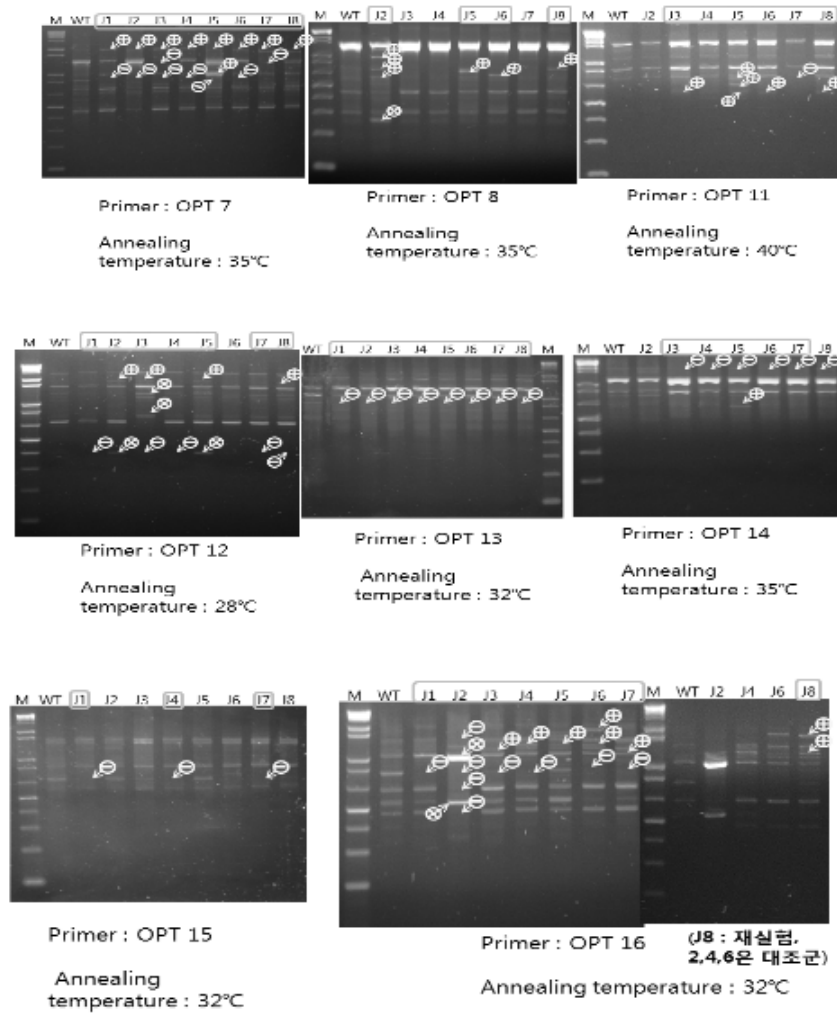


Fig. 3. RAPD (random amplification of polymorphic DNA) band of the mutants.

현장 재배를 통해 복토와 수피 사용이 필요 없는 재배실험을 진행하였다. 1차 재배실험에서는 복토와 수피의 사용 없이도 재배가 가능한 품종 선정에서 주배지로서 후숙 미송톱밥의 사용이 좋은 결과를 보였으며, 2차로 이어서 후숙 미송톱밥과 영양제 실험으로 미강, 밀기울, 면실피등을 배합하여 재배 실험을 반복적으로 진행함으로써 실험결과 발효 미송톱밥 71.0%와 영양제로 밀기울을 29.0%를 사용한 실험군에서 가장 균사 성장이 빠르고 복토와 수피 사용 없이 잿빛 만가닥버섯 재배할 수 있음을 확인하였다. 또한 육성된 품종에 따라 동일한 조건에서 갓의 색깔과 모양에서 차이가 있음을 확인하였으며, 이상의 실험결과 복토와 수피 사용 없이 잿빛 만가닥버섯을 재배할 수 있는 있음이 가능함을 반복적인 재배실험을 통해 확인하였으며, 향후 첨가제 등 보충 실험을 통해 수확량 증가와 시장에 적합한 모양의 규격을 설정하는 등 현실적으로 경제성을 갖춘 잿빛 만가닥

버섯을 재배할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품 연구개발사업(108006-3)의 연구비를 지원 받아 수행된 연구입니다.

참고문헌

강안석, 차동열, 장현유, 홍인표, 유승현. 1994. 잿빛만가닥버섯의 인공재배법 개발. 농업과학논문집 36 : 696-700.
 경북전문대학 산학협력단. 2007. 잿빛만가닥버섯 재배용 배지 및 이를 이용한 잿빛만가닥버섯의 재배방법. 특허청.



Fig. 4. The artificial cultivation process without soil covering and bark. A, B, C : After removing the hypha body, the growth process of fruiting body.



Fig. 5. Wild type and fruit bodies cultivated by artificial cultivation.

등록번호 1007867440000.

박완희, 이호득. 2003. 한국 약용버섯도감. 교학사. 194-195.

우성미. 2009. 잣빛만가닥 (*Lyophyllum decastes*) 버섯의 인공재배 및 유연관계 분석. 강원대학교 석사학위논문.

정미나. 2007. 기능성 증진 큰느타리버섯 육성을 위한 변이체 유도. 단국대학교 석사학위논문.

Bal, J., Kajtaniak, EM. and Pieniazek, NJ. 1977. 4-nitroquinoline-1-oxide : a good mutagen for *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.* **56** : 153-156.

Gu, Y. H., Nakamura, T., Cho, K. H., Maenaka, T., Ito-kawa, Y., Yamashita, T., Tano, K., Choi, I. B. and Kang, K. M. 2006. Radioprotection and anti-cancer effect of hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes*). *Research Reports of Suzuka University of Medical Science.* **13** : 17-24.

Sunagawa, M., Tamai, Y., Neda, H., Miyazaki, K. and Miura, K. 1995. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. I. Analyses of fusants in edible mushrooms. *Mokuzai Gakkaishi* **41** : 945-948.

Tomizawa, M. M., Dias, E. S., de Assis, L. J., Gomide, P. H. O. and Bosco dos Santos, J. 2007. Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei*

using RAPD markers. *Ciencia e Agrotecnologia* **31** : 1242-1249.

Toshihiro, M., Mizue, K., Yasushi, I., Naoki, I., Motoshi, K., Park, S. R., Yuuichi, U., Yukio, K. and Iku-katsu, S. 2002. Antidiabetic Activity of *Lyophyllum decastes* in Genetically Type 2 Diabetic Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **25** : 1224-1237.

Ukawa, Y., Ito, H. and Hisamatsu, M. 2000. Antitumor effects of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan and (1 \rightarrow 6)-beta-D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.). *J Biosci Bioeng.* **90** : 98-104.

Yasushi, K., Takafumi, N., Hajime, S. and Yukio, F. 2005. Effect of Frying with Edible Oil on Antihypertensive Properties of hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom. *Food Sci. Technol. Res.* **11** : 330-343.

Yuuichi, U., Yoshiya, I., Takayuki, O., Tetsunari, T., Shoichi, I. and Yasushi, K. 2007. Oral Administration of the Extract from hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom Inhibits the Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **53** : 293-296.