

Cd처리가 느타리버섯 균사체 성장에 미치는 영향

박윤진¹ · 김태권² · 조용구² · 장명준^{2*}¹두과농미자원연구센터²공주대학교 식물자원학과Effect of Cd treatment on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*Youn-Jin Park¹, Tae-Kwon Kim², Young-Koo Cho², and Myoung-Jun Jang^{2*}¹Kongju National University Legumes Green Manure Resource Center²Department of plant Resources, Kongju National University

ABSTRACT: In this study, we determined the effect of different concentrations of Cd on the growth of *Pleurotus ostreatus* mycelia, which was confirmed using PDA, PDB, and a column test. The efficacy of treatment was evaluated using Cd at two concentrations, 10 ppm and 100 ppm. The extent of mycelial growth on PDA and PDB was similar to that observed in the untreated groups and those treated with 10 ppm Cd. However, it was found that the mycelial growth was suppressed in a system treated with Cd at concentrations of 100 ppm. Moreover, the extent of mycelial growth observed upon conducting a column test was similar to that obtained using PDA and PDB. When the composition of free amino acids in PDB was determined, their levels in the group treated with 100 ppm Cd were found to be similar to those of the control. However, the amounts of 15 amino acids in the group treated with 10 ppm of Cd had increased compared to those detected in the control.

KEYWORDS: Cd, Concentration, Mycelial growth, Free amino acids

서 론

버섯은 지구 대부분에 존재하며 분해자로서 생태계에서 에너지 재활용에 직접적으로 관여 한다 (Petkovšek *et al.* 2013). 이러한 버섯 중 식용버섯은 전 세계적으로 인기 있는 음식으로 질감과 풍미뿐만 아니라 탄수화물과 단백질, 지질 등의 영양소를 고루 함유하고 있으며, 무기질, 비타

민, 아미노산 등 인체에 중요한 영양성분을 고루 갖추고 있는 식품으로 영양적인 측면에서 높은 가치가 있다 (Latiff *et al.* 1996; Breene *et al.* 2000; Oh and Lee 2005; Kim *et al.* 2017). 버섯은 통상 자연계에서 분해자의 역할을 하면서 다양한 물질을 흡수하고 이를 축적하기도 한다(Liu *et al.* 2015). 이러한 물질들 중에는 인(P) 철(Fe) 코발트(Co), 구리(Cu), 망간(Mn), 크롬(Cr) 및 아연(Zn), 비소(As), 카드뮴(Cd) 및 납(Pb)같은 중금속 등도 포함된다(Garcia *et al.* 1998).

2018년 국내 식용버섯 재배면적은 412 ha이며, 생산량은 135,776M/T 인데, 그 중 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 122 ha의 재배면적에서 39,675(M/T)이 생산되어 식용버섯류의 29% 이상의 생산량을 차지한다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2019). 현재 버섯은 인공재배가 불가한 일부 버섯류를 제외하면 톱밥을 이용하여 인공적으로 배지를 만들어 병 재배를 하는 것이 일반적이다. 국내에서 재배되는 느타리버섯 또한 대부분 병 재배로 재배되고 있으며 배지 재료로는 포플러톱밥, 비트 펄프와 면실박이 주로 사용되고 있는데, 포플러톱밥은 공급량이 매우 불안정하며, 수입에 의존하고 있는 실정이다(Jang *et al.* 2014). 수입되고 있는 버섯배지 재료 및 농업

J. Mushrooms 2020 March, 18(1):79-83
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2020.18.1.79>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Youn-Jin Park(Researcher), Tae-Kwon Kim(Researcher), Young-Koo Cho (Research assistant), and Myoung-Jun Jang(Professor)

*Corresponding author
 E-mail : plant119@kongju.ac.kr
 Tel : 82-41-330-1204

Received December 6, 2019
 Revised December 16, 2019
 Accepted March 13, 2020

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

부산물에서 중금속이 허가 기준치를 초과하지는 않지만 존재하고 있는 것으로 확인되고 있다(Kim *et al.* 2017). 버섯은 기본적으로 농업부산물 또는 톱밥을 이용하여 배지를 만들어 재배되고 있으며, 이에 따라 버섯의 중금속 함량에 대한 연구는 진행되어왔다(Kim *et al.* 2012). 그러나 배지상 중금속 함량에 따른 균사체의 생육에 대한 연구는 자료가 부족한 실정이다. 본 연구는 Cd의 처리농도에 대한 고체, 액체 배지 및 컬럼상의 균사 생장특성을 확인하고 유리아미노산 분석을 통해 Cd 처리에 따른 액체 배지내의 균사체의 양분 소비변화를 확인하고자 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

공시균주

공시균주는 경기도버섯연구소에서 보존중인 느타리버섯 품종 흑타리(ASI 0655)를 분양받아 공시균주로 사용하였다.

중금속에서의 균주 배양

공시균주를 이용한 배지 내 중금속 처리 시 균사 배양 시험은 기본 배양 배지를 PDA(difco, USA) 및 PDB(difco, USA)를 사용하였으며, 배지에 Cd를 각각 10 ppm 및 100 ppm으로 첨가하여 121°C에서 15 min 동안 autoclave(HVA-85, Hirayama, Japan)로 가압 멸균하여 사용하였다. 시험은 공시균주를 접종한 후 진행하였다. PDA 배지는 25°C에서 7일간 배양한 다음, 균총의 직경을 측정하였으며, PDB 배지는 25°C, 120rpm 조건으로 10일간 배양하여 균체량을 측정하였다.

균사생장량 조사

균주는 PDA 평판배지에서 5일간 배양한 후 균사의 생육이 80% 이상 진행된 플레이트를 선택하여 사용하였다. 처리구는 PDA 배지를 control로 하여 Cd를 10 ppm 100 ppm (w/v)이 되도록 첨가하여 제작하였다. PDA 상에서 미리 배양된 균주를 Corkborer를 이용하여 잘라내었고, 백금이를 이용하여 평판배지 표면에 접종하였다. 접종된 배지는 25°C, 암조건으로 설정된 incubator에서 7일간 생육하였다. 생육기간 중 48 h 마다 균사의 생육정도를 확인하기 위해 균사밀도와 균사생장량을 측정하였다.

컬럼테스트

Cd 처리에 의한 균사의 생육 특성을 확인하기 위하여 컬럼테스트(Column test)를 진행하였다. 컬럼테스트에는 30×200 mm의 Test tube를 사용하였으며, 충전한 배지의 조성은 포플러톱밥:면실피:콘코브:비트펠프:면실박을 73:87:8:40:35 (w/w)로 하여 제작하였다. 수분함량은 65%로 조절하였으며, Cd는 배지 건물중에 맞추어 10 ppm 및

100 ppm 으로 녹여 배지에 혼합하여 제작하였다. 충전이 완료된 Test tube는 121°C에서 40 min 동안 autoclave(HVA-85, Hirayama, Japan)로 가압 멸균하여 사용하였다. 가압멸균 후 식힌 배지에 PDA plate에서 80% 이상 균사 생육이 진행된 공시균주를 Corkborer를 이용하여 잘라 넣었다. 접종된 Test tube는 25°C, 암조건으로 설정된 incubator에서 24일간 생육하였다. 생육기간 중 7일 마다 균사의 생육정도를 확인하기 위해 균사밀도와 균사생장량을 측정하였다.

아미노산 분석을 위한 전처리

유리아미노산을 분석하기 위하여 PDB 배지에 무처리, Cd 10 ppm, 100 ppm 처리 하였으며, 시료는 증류수로 5배 희석하고 제단백을 위해 희석한 시료에 5% trichloroacetic acid(TCA)를 1:1로 희석한 후, 15분간 12,000rpm에서 원심분리 상등액은 n-hexane을 처리하여 지질 및 색소 등의 비극성 물질을 제거하고, 0.2 µl Syringe filter를 이용하여 여과한 후 -10°C에서 보관하면서 분석에 이용하였다.

유리아미노산 분석

유리아미노산 분석은 전처리된 시료를 아미노산분석기인 HITACHI L-8900 Amino Acid Analyzer(HITACHI, Japan)을 이용하여 분석하였다. 아미노산분석을 위한 Solution 중 Elution buffer로는 PF1, PF2, PF3, PF4, PF-RG를 사용하였으며, Coloring solution으로는 Wako Ninhydrin Coloring Solution kit for HITACHI를 사용하였다. 분석 컬럼은 ion exchange column #2622PF(HITACHI, Japan)을 사용하였으며, 유리아미노산의 표준 물질은 Wako PF standard(Type B), AN-II(Wako, Japan)을 사용하였다.

통계분석

PDA, PDB, Column test 등 모든 결과는 3회 이상 반복 실험을 통해 평균값±표준편차로 나타내었으며, 실험 결과는 SAS(statistic analysis system, version 9.4)를 이용하여 통계분석을 실시하였다. one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test를 통하여 그룹간의 유의적 차이를 검정하였으며 모든 결과의 분석은 신뢰도 95% 구간에서 실시하였다.

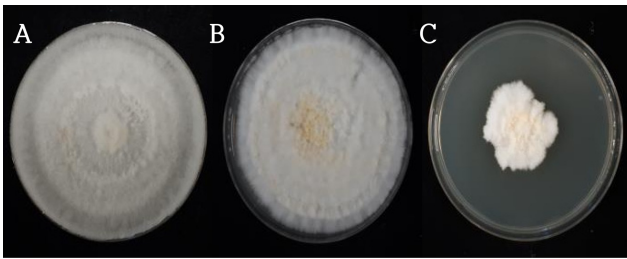
결과 및 고찰

PDA 배지 내 Cd 첨가에 따른 균사생장량을 확인한 결과는 Table 1과 Fig 1와 같다. 균사의 생장량은 Control의 경우 배양 2일차 32.0 mm 배양 4일 59.3 mm 배양 6일 86.0 mm 배양 8일 87.0 mm를 나타내었으며, Cd 10 ppm은 배양 2일 29.3, 배양 4일 52.8, 배양 6일 82.5, 배양 8일 87.0 mm를 나타내었다. Cd 100 ppm의 경우 배양 2일

Table 1. Mycelial growth according to Cd concentration in PDA

Treatment	Incubation period (days/mm)			
	2	4	6	8
Control(ASI 0655)	32.2±3.4 ^a	59.3±5.4 ^a	86.0±2.0 ^a	87.0±0.5 ^a
Cd_10 ppm	29.2±5.9 ^a	52.8±2.8 ^a	82.5±0.5 ^a	87.0±0.9 ^a
Cd_100 ppm	14.0±6.7 ^b	20.0±7.8 ^b	27.0±7.3 ^b	36.4±5.5 ^b

^{a,b} Value in the same column not sharing a common superscript are significantly different by Duncan's test($p<0.05$).

**Fig. 1.** Mycelium growth morphology with addition of Cd concentration

*A: Control(ASI 0655); B: Cd 10 ppm; C: Cd 100 ppm.

14.0, 배양 4일 20.0, 배양 6일 27.0, 배양 8일 36.4 mm를 나타내었다. Cd 첨가량에 따라 균사생장량을 확인하였을 때 Cd 10 ppm 처리의 경우 배양일 간 Control과 큰 차이를 나타내지 않음을 확인하였으나, Cd 100 ppm 처리의 경우 배양 기간 중 균사 생장이 저하되어 Control과 균사생장량에서 큰 차이를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 Cd 50 ppm 처리 배지에서 송이속 균주의 균사생장특성을 보았던 Kang *et al.*(2018)과 Lee *et al.*(2008)의 보고와 유사한 경향을 확인할 수 있었으며, 고농도의 Cd 처리가 균사의 생장에 영향을 미치는 것으로 보인다. 이러한 고농도의 중금속 처리가 균사의 성장만을 억제하는 것인지 혹은 중금속이 균사로 전이되어 생육이 억제되는 것인지 는 추후 시험을 통해 확인해봐야 할 것으로 생각된다.

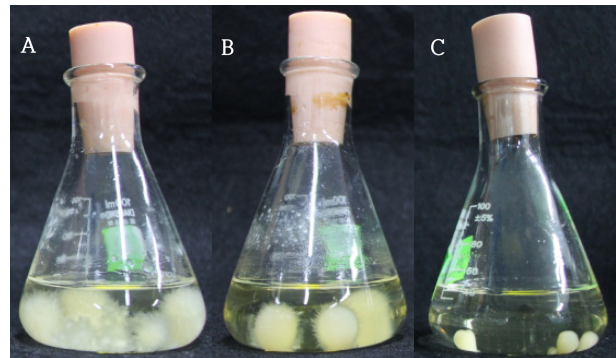
PDB 배지 내에서 균사생장량을 확인하기 위해 생체중과 건물중을 확인하였으며, 이는 Table 2 및 Fig 2에서 확인할 수 있다. PDB에서 15일간 배양한 후 균사체의 무게를 측정된 결과 Control 처리구는 생체중 0.82±0.07 g, 건물중 0.06±0.01 g 으로 확인되었으며, Cd 처리구는 10 ppm 처리구에서 생체중 0.79±0.05 g, 건물중 0.05±0.01 g 으로 확인되었고, 100 ppm 처리구에서 생체중 0.45±0.10 g, 건물중 0.03±0.01 g으로 확인되었다. 생체중과 건물중의 차이로 균사체량을 확인한 결과 Control 처리구와 Cd 처리구간의 차이를 확인할 수 있었으며, 이는 PDA plate에서 확인할 수 있었던 균사생장량과 그 내용을 같이 한다고 할 수 있다.

툽밥배지 내에서의 균사생장 특성을 확인하기 위해 진행된 컬럼테스트 결과는 Table 3 및 Fig 3과 같다. 무처리

Table 2. Mycelial growth according to Cd concentration in PDB

Treatment	Mycelial wight (g)	
	Fresh weight	dry wight
Control(ASI 0655)	0.82±0.07 ^a	0.06±0.01 ^a
Cd_10 ppm	0.79±0.05 ^a	0.05±0.01 ^a
Cd_100 ppm	0.45±0.10 ^b	0.03±0.01 ^b

^{a,b} Value in the same column not sharing a common superscript are significantly different by Duncan's test($p<0.05$).

**Fig. 2.** Mycelium growth morphology with addition of Cd concentration in PDB

*A: Control(PDB); B: PDB + Cd 10ppm; C: PDB + Cd 100 ppm.

구와 Cd 10 ppm 처리구는 컬럼테스트에서 균사생장 특성을 확인하였을 때 균사생장량은 PDA상에서의 균사생장량과 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 무처리의 경우 배양 24일차에 132.1±0.3 mm의 균사생장량을 확인할 수 있었고, Cd 10 ppm은 배양 24일차에 128.7±1.9 mm의 균사생장량을 확인할 수 있었다. Cd 100ppm 처리의 경우 배양 24일차에 84.4±1.7 mm로 무처리구 및 Cd 10 ppm 처리구에 비해 균사의 생육이 더딘 것을 확인할 수 있었다. 배양기간이 PDA 및 PDB보다 길어짐에 따라 Cd 100 ppm에서도 균사생장이 진행되는 것을 컬럼테스트에서 확인할 수 있었으며, 이는 PDA 및 PDB와 달리 배지 조성물질의 질소원 및 탄소원의 함량이 변화하여 균사의 생육이 PDA 및 PDB 보다 원활하여 생장량의 변화가 생긴 것으로 보인다.

PDB 배지를 이용한 아미노산 분석 결과는 Fig 4. 와 같다. PDB 배지 내 유리아미노산은 8종의 필수 아미노산을 포함하여 Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, g-ABA, Orn, Lys, His, Arg, Pro 등 18종이 확인되었다. Cd 10 ppm을 처리하였던 PDB 배지에서 Met, g-ABA, Orn의 3종의 아미노산을 제외한 15종의 아미노산에서 Control 대비 증가하는 것을 확인하였는데, 증가량은 최소 5~30 ppm 수준이 증가했음을 확인하였고, Cd 100 ppm 처리구에서는 Control 대비 아미노산의 양이

Table 3. Mycelial growth according to Cd concentration in column test

Treatment	Incubation period (days/mm)			
	6	12	18	24
Control(ASI 0655)	14.0±2.1 ^a	38.1±1.7 ^a	82.0±1.2 ^a	132.1±0.3 ^a
Cd_10 ppm	13.6±1.8 ^a	35.8±2.2 ^a	79.6±1.6 ^a	128.7±1.9 ^b
Cd_100 ppm	6.8±1.2 ^b	25.3±2.3 ^b	57.6±3.2 ^b	84.4±1.7 ^c

^{a,b} Value in the same column not sharing a common superscript are significantly different by Duncan's test(p<0.05).

* Column test composition : Poplar tree sawdust+Cottonseed hulls+Corn cob+Beet pulp+Cottonseed meal (73:87:8:40:35; w/w)

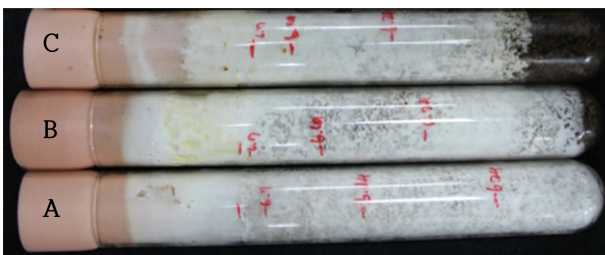


Fig. 3. Mycelium growth morphology with addition of Cd concentration

*A: nontreatment; B: Cd 10 ppm; C: Cd 100 ppm.

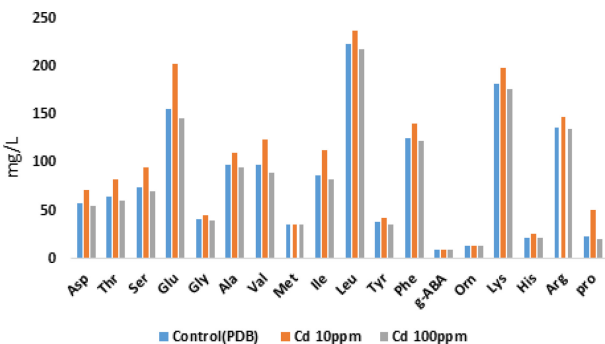


Fig. 4. Expression level of free amino acids of Cd concentration in PDB medium.

큰 변화가 없음을 확인하였다. PDB 배지 내 아미노산의 증가양상은 균사체가 성장하면서 PDB 내의 양분을 소비 하면서 그 양상이 변화하는데, Cd 10 ppm의 경우 PDB내의 아미노산 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 저농도의 중금속이 균사체의 양분 소비 변화와 관련하여 영향을 주는 것으로 생각되며, 추후 분석을 통해 대사경로와 기작과 관련된 연구가 필요할 것으로 보인다.

결론

Cd의 함량에 따른 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 균사체의 균사생장 특성을 확인하기 위해 시험이 진행되었

다. 균사의 생장특성은 PDA, PDB 및 컬럼테스트를 통해 확인하였다. Cd의 처리는 10 ppm 및 100 ppm의 두 가지 처리를 통해 시험하였으며, PDA 및 PDB 균사생장은 무처리구와 10 ppm 처리구에서는 생육기간동안 균사 생장이 비슷한 양상을 확인하였다. 그러나 100 ppm 처리의 경우 균사의 생장이 억제되는 것을 확인하였으며, 컬럼테스트를 통한 균사생장 특성 또한 PDA 및 PDB와 비슷한 양상으로 균사가 생장함을 확인하였다. 또한 PDB 내의 유리아미노산 변화 양상을 보았을 때 Cd 10 ppm에서 Control 대비 아미노산이 증가하는 양상을 확인하였는데, 저농도의 중금속 처리가 PDA 및 PDB에서 무처리구와 균사 생장상에서는 큰 차이가 보이지 않았던 것과 달리 PDB 내의 양분 소비가 있었던 것으로 보인다. 따라서 고농도의 Cd 처리는 균사의 생장을 억제하는 기작이 있을 것으로 보이며, 저농도 처리에서는 균사 생장과 관련된 사항은 다르지 않았지만 PDB 내에서 아미노산의 변화가 일어남을 확인함에 따라 추후 균사체 생육 억제 기작에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 농림식품기술기획평가원의 지원을 받아 수행된 연구임(318019032HD030).

REFERENCES

- Breene W. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J Food Prot* 53: 883-894.
- Garcia MA, Alonso J, Fernández MI, Melgar MJ. 1998. Lead content in edible wild mushrooms in northwest Spain as indicator of environmental contamination. *Arch Environ Contam Toxicol* 34: 330-335.
- Jang MJ, Lee YH, Kang YZ, Ju YC. 2014. Effect of albasia sawdust in *Pleurotus ostreatus* by bottle cultivation. *J Mushrooms* 12: 8-11. <https://doi.org/10.14480/JM.2014.12.1.8>
- Kang JA, Ka KH, Kim JY, Kim SH. 2018. Mycelial growth properties of domestically collected ectomycorrhizal *Tricholoma* mushrooms in various culture conditions. *Kor J Mycol* 46: 271-280.
- Kim JY, Kim SS, Kim SH. 2018. Investigation of bacteria in the agricultural by-products imported for the use as media materials in mushroom cultivation. *Korean J Microbiol* 54: 410-419.
- Kim JY, Yoo JH, Lee JH, Kim MJ, Kand DW, Ko HS, Hong SM, Im GJ, Kim DH, Jung GB, Kim WI. 2012. Monitoring and risk assessment of heavy metals in edible mushrooms. *Korean J Environ Agric* 31: 37-44.
- Kim KJ, Im SB, Yun KW, Je HS, Ban SE, Jin SW, Jeong SW, Koh YW, Cho IK, Seo KS. 2017. Content of proximate compositions, free sugars, amino acids, and minerals in five *Lentinula edodes* cultivars collected in Korea. *J Mushrooms* 15: 216-222.

- Kim YI, Bae JS, Huh JW, Kwak WS. 2007. Monitoring of feed-nutritional components, toxic heavy metals and pesticide residues in mushroom substrates according to bottle type and vinyl bag type cultivation. *J Anim Sci Technol* 49: 67-78.
- Latiff LA, Daran ABM, Mohamed AB. 1996. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. *Food Chemistry* 56: 115-121.
- Lee KH, Seok SJ, Weon HY, Kim SH, Kim WG, Sung JM. 2008. Effect of Heavy Metals on Mycelial Growth of Color Mutants at *Pleurotus ostreatus*. *Kor J Mycol*. 36: 172-177.
- Liu B, Huang Q, Cai H, Guo X, Wang T, Gui M. 2015. Study of heavy metal concentrations in wild edible mushrooms in Yunnan Province, China. *Food Chem* 188: 294-300.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2019. 2018 Production performance of Industrial Crop.
- Oh SI, Lee MS. 2005. Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* Krast extracts. *Kor J Food Nutr* 18: 54-62.
- Petkovšek SAS, Pokorny B. 2013. Lead and cadmium in mushrooms from the vicinity of two large emission sources in Slovenia. *Sci Total Environ* 443: 944-954.