

최 종

연구보고서

민자주방망이버섯의 대량생산과 기능성물질 발굴
Screening Functional Material and Mass Production
of *Lepista nuda*

제 1 세부과제 : 민자주방망이버섯의 특성규명과 육종 및 대량생산
Characteristics, breeding and mass production of *L. nuda*

제 2 세부과제 : 민자주방망이버섯의 기능성 물질의 검
Screening functional material of *L. nuda*

주 연구 기관
대구가톨릭대학교

농 립 부

요 약 문

I 제목 :

민자주방망이버섯의 대량생산과 기능성 물질 발굴

II. 연구개발의 목적 및 필요성

버섯은 고대로부터 인류가 식용 혹은 약용으로 이용해온 주요 생물자원의 하나이고 근래는 이의 인공재배 기술 뿐 아니라 기능성 및 뛰어난 약용 효과들이 밝혀짐에 따라 이를 생산, 가공 및 이용하는 농가와 업체들이 크게 늘어나고 있다. 우리나라의 경우도 2만여 농가 연간 5000억 원 이상의 버섯을 생산하고 있다. 그러나 2002년 WTO 뉴라운드의 출범은 우리나라 농가에도 커다란 영향을 받게 될 전망이다. 특히 연간 600만 톤 이상의 버섯을 생산하는 중국의 WTO 가입에 따라 우리나라의 버섯 농가도 가장 큰 타격을 받을 수 있다는 우려가 나오기도 한다. 그러나 시장개방의 확대는 피할 수 없는 흐름이기 때문에 기본적으로는 이를 받아들이고 이를 계기로 새로운 도약을 할 수 있게 하는 것이 최선의 대책일 것이다. 이러한 관점에서 국내·외 특히 국외의 소비 잠재력이 큰 버섯을 개발하여 국내소비를 촉진시키는 한편 수출 할 수 있는 품종의 개발이 절실히 요구된다.

민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)은 송이과에 속하는 버섯으로 우리나라 대부분의 지역과 북미, 아시아, 호주, 유럽 등 아열대지역을 제외하고 세계적으로 분포하고 있는 종이다. 또한 맛과 향이 뛰어나 특히 미국과 유럽에서 선호가 높은 식용버섯이다. 미식가들에 의하여 항상 상위로 평가받고 있다. 또한 영양성분 및 약리 효과도 뛰어나 생쥐 복수암 억제율이 100%에 이르는 등 항암성, 항균성이 높으며 당대사 조절능, 신경전도 촉진, 각기병 치료 등의 약리효과가 있고(박과이, 1999) 28종의 유리아미노산, 미량금속원소 7종, ergosterol, manitol 등이 확인되었으며 다량의 비타민 B 등이 함유되어 있다(박, 1993).

민자주방망이버섯에 대한 이해가 잘 이루어지지 못하였기 때문으로서 기호성, 식·의학적 가치 등을 고려할 때 이를 육종, 효율적인 인공재배기술의 적극적 개발로 새로운 국내소비 버섯으로 크게 이용될 수 있을 뿐 아니라 수출도 할 수 있을 것이며, 특히 효율적 실내 인공재배 방법이 개발되고 약용 및 영양효과 등이 인식된다면 국내에서도 다량소비가 충분히 이루어질 것으로 생각된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 우리나라에서 자생하고 있고 식·의학적 가치가 매우 높으며 유럽, 북미 등에서 식용으로 널리 이용되고 있는 민자주방망이버섯의 육종, 성분분석 및 인공재배기술의 개선을 통하여 민자주방망이버섯을 대량생산하고, 이의 국내소비 및 수출, 민자주방망이버섯 이용분야 확대 등의 기반을 마련하고자 한다.

내용 및 연구범위

- ◎ 우리나라 민자주방망이버섯의 형태적 특징과 생육조건 규명
- ◎ RAPD, ITS 등에 의한 유전변이와 특성 규명
- ◎ cDNA 분석에 의한 유용 유전자 발굴
- ◎ 계통선발과 단포자 균사융합 등에 의한 육종
- ◎ 자실체 대량생산 조건 규명 및 재배기술의 개발
- ◎ 균사체 및 접종원의 대량배양 조건 확립
- ◎ 균사체 및 자실체의 효소활성 특성의 규명
- ◎ 버섯의 자실체의 일반 성분, 영양성분, 비타민류, 유기산, 아미노산 및 유리당 분석
- ◎ 자실체 및 균사체의 항산화 및 항균성 등 생리활성 물질의 분리 및 분석
- ◎ 자실체와 균사체의 항암성 조사
- ◎ 자실체와 균사체의 당단백질 및 β -glucan의 분리 정제 및 항암성 조사

IV. 연구개발의 결과 및 활용에 대한 건의

최근 버섯에 대한 많은 생리활성물질이 규명되어짐에 따라 버섯의 소비가 급격히 증가하고 있다. 민자주방망이버섯은 송이과버섯의 우수한 식용버섯으로 전 세계적으로 알려져 있다. 향과 맛 향암효과, 콜레스테롤 조절작용의 효과가 있으며 산업적으로 높은 재배기술이 개발되고 있다. 이를 산업적으로 재배하기 위해서는 생태, 영양, 유전학적 특성, 유전적 개량에 대한 구체적인 이해를 필요로 한다. 또한 이를 널리 사용하기 위해 민자주방망이버섯 생리활성물질의 규명이 필요하다. 이러한 관점에서 생태학적특성, 유전적 변이, 교잡, 배양학적 특성과 유용물질 성분 분석이 이루어졌으며, 그 결과는 다음과 같다.

1) 민자주방망이버섯의 생태학적 특성

이 연구는 민자주방망이버섯의 특성 연구에 조금이라도 이바지 하기위해 민자주방망이버섯 서식지의 토양 특성 분석이 이루어졌다. 일곱 가지의 연구 분야에서 수집된 토양 표본은 토양 수분 함유량, 토양 pH와 유기물질, 무기물질 함량과 같은 토양 특성에 대한 조사가 이루어졌다. 토양 수분은 29.7%이며 유기물질의 함량은 32.1%, 전체 질소 0.74%, 토양 pH는 3.6에서 5.20범위, 평균값 4.7로 측정되었다. 무기물질의 함량은 칼륨 183ppm, 망간 21.9ppm, 칼슘 2.02ppm, 아연 2.02ppm이며 철은 1,024ppm으로 가장 높고 마그네슘은 0.51ppm으로 가장 낮았다.

2) 민자주방망이버섯의 형태학적 특성

이 연구는 민자주방망이버섯의 형태학적 특징을 밝히기 위하여 지역별로 채집된 *L. nuda*, *L. irina*, *L. sordida*의 자실체, 균사, 포자의 형태를 관찰하였다. 그 결과 국내 내륙에 자생하고 있는 *L. nuda*와 제주도에 자생하고 있는 *L. nuda*간의 형태적 변이가 큰 것으로 나타났다. 균사의 성장속도에서는 일본의 *L. nuda*가 가장 빠르게 성장하였으며 유럽의 균사가 가장 느리게 성장하였다. 일반적인 *L. nuda* 포자의 형태는 타원형이었으며 대부분 붉은색이나 푸른색을 나타냈으며 지역적인 차이는 크지 않았다.

3) 민자주방망이버섯의 유전학적 특성

(1) RAPD 분석

이 연구는 민자주방망이버섯의 유전학적 특성을 규명하기 위하여 수행되었다. RAPD는 민자주방망이버섯 8개 균주의 종내 변이와 민자주방망이버섯과 국내 광릉자주방망이버섯, 자주방망이버섯아재비와의 중간 계통유전학적 관계를 밝히고자 하였다.

그 결과 5개의 random primer로부터 자료 분석을 위한 187개의 scabble RAPD marker가 최종 분석에 이용되었고, 이를 근거로 Nei-Li의 genetic distance를 이용하여(Nei, 1973) 비유사도 지수행렬을 계산하였다.

비유전적 지수행렬에 의하면 민자주방망이버섯의 종내 변이가 0에서 0.51685사이로 나타났으며 광릉자주방망이버섯의 변이는 0.2584에서 0.4606사이고, 자주방망이버섯아재비의 변이는 0.2696에서 0.3707사이로 나타났다.

비유사도 지수행렬을 근거로 전체 분류군을 PAUP(4.0b) program을 이용하여 UPGMA를 수행한 결과 phylogenetic tree를 얻을 수 있었다. Band의 변이를 기초로 하여 분석한 결과 모두4개의 cluster를 얻을 수 있었다. 국내 내륙의 민자주방망이버섯이 하나의 cluster를 이루었으며 제주도 민자주방망이버섯과 일본민자주방망이버섯(ACM) 그리고 프랑스 민자주방망이버섯이 하나의 cluster를 이루었다. 그리고 광릉자주방망이버섯과 일본민자주방망이버섯(NBRC)이 하나의 cluster를 이루었고 자주방망이버섯아재비가 하나의 cluster를 이루었다.

이 결과로 보아 지역별 특성은 서식지의 지리적 거리와 비교하여 유전적으로 많은 차이를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 제주도 민자주방망이버섯은 민자주방망이버섯이 지리적 변이에 의한 차이라고 판단하기 보다는 다른 종으로 사료된다.

(2) ITS 분석

이 연구는 민자주방망이버섯의 종내 및 종간의 유전관계를 밝히기 위해 ITS I 과 ITS II 그리고 5.8S 영역의 약 673개의 염기배열을 분석하였다. 또한 12개 균주에 대한 염기서열을 비교한 multiple alignment를 시행하여, 이 결과를 근거로 Nei-Li의 genetic distance를 이용한 비유사도 지수행렬을 계산하였다.

이 결과 민자주방망이버섯의 종내 변이는 0에서 0.04951사이로 나타났으며, 광릉자주방망이버섯과는 0.06683에서 0.29196사이의 변이를 나타내었다. 그리고 자주방망이버섯아재비와는 0.02225에서 0.29272사이의 변이를 나타내었다. 그리고 광릉자주방망이버섯과 자주방망이버섯아재비와는 0.08030의 변이를 나타내었다.

정렬된 염기서열을 근거로 전체 분류군을 PAUP(4.0b) program을 이용하여 UPGMA를 수행한 결과 phylogenetic tree를 얻을 수 있었다. 염기변이에 기초하여 neighbour-joining(NJ) 분석 결과, 제주도를 제외한 국내 민자주방망이버섯과 일본의 2 균주, 유럽의 프랑스, 스위스, 포르투갈이 각각 하나씩의 cluster를 형성하였으며, 제주도 균주와 자주방망이버섯아재비버섯이 하나의 cluster를 이루어 4개의 cluster를 이루었다. 그리고 광릉자주방망이버섯이 outgroup으로 하나의 cluster를 이루었다.

위의 실험 결과로 제주도 민자주방망이버섯은 국내에서 채집된 내륙의 민자주방망이버섯과는 유전적으로 많은 차이를 보였으나, 오히려 민자주방망이버섯속의 자주방망이버섯아재비버섯과는 같은 cluster를 이루어 유전적으로 민자주방망이버섯보다 유사한 것으로 분석되었다.

(3) cDNA 분석

이 연구는 민자주방망이버섯의 유용성 물질과 자실체 형성에 관련된 유용유전자를 분석하

기위해 이루어졌다.

이를 위하여 *L. nuda* 의 cDNA library 제작 및 cDNA염기서열 분석을 하였으며 cDNA library로부터 밝혀낸 DNA 염기서열을 NCBI에서 제공하는 Blastx 프로그램을 사용하여 유사성을 비교하였다. 유사성을 비교한 결과는 같은 송이과 버섯으로 재배환경이 비슷한 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)의 serine proteinase에 관여하는 유전자와 61%의 유사도를 보였고, Histone H2B에 관여하는 유전자와 89% 유사도를 보였다.

L. nuda 의 cDNA염기서열을 분석한 결과 유사성이 높은 여러 가지 유전자를 확인하였다.

(4) 민자주방망이버섯의 육종

제주도와 동화사를 제외한 국내 민자주방망이버섯끼리는 교배가 가능하였으며 민자주방망이버섯의 종내 단포자 끼리의 교배한 결과 모두 11개의 mating group(K1xK2, K1xK3, K1xK4, K1xK6, K1xK5, K2xK4, K2xK3, K2xK6, K3xK4, K4xK5, K4xK6)이 형성 되었다. 종간의 교배는 불가능 하였고 이핵균사 사이에 교배또한 이루어지지 않았다. 유럽과 일본의 균주와는 교배가 불가능하였다. 교배가 확인된 균주의 성장속도를 단포자 균사의 성장속도와 비교한 결과 대부분 각각의 단포자 균사보다 교배된 균사의 성장속도가 빨랐으며 균사생장 시 특징은 양쪽의 특징을 모두 나타내었다.(Fig20) 이러한 결과로 볼 때 교배된 품종이 성장속도 면에서 우수하므로 품종 개량 및 대량생산에 유용할 것으로 사료된다.

5) 민자주방망이버섯의 대량배양

균사 배양을 위한 최적 배양 온도 및 pH는 각각 24℃와 pH 7.0~8.0이었다. 사용된 복합 배지 중 ACM이 우수한 균사생육을 나타내었다. 탄소원으로 다당류인 CMC가 균사 생육에 우수한 탄소원이었으며, 이당류로는 maltose, 단당류로는 mannitol, xylitol이 우수하였다. 유기산으로 gluconate 첨가시 우수한 생육을 보여 주었다. 가장 우수한 질소원은 CSL이었으며, 전반적으로 생육도에서는 비슷하였으나 밀도면에서는 무기질소원보다 유기질소원 첨가시 우수한 생육을 보여 주었다. 아미노산의 경우 균사의 생육에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다. 인산원으로는 (NH₄)₂HPO₄에서 우수한 균사 생육을 나타내었다. 비타민에서는 nicotinic acid에서 우수한 균사 생육을 나타내었다. Sucrose 1%, gluconate 0.1%, CSL 0.4%, (NH₄)₂HPO₄ 0.3%를 첨가하였을 때 , 최적의 C/N 비는 1.57로 가장 우수한 균사생육 및 균사밀도를 나타내었다. 민자주방망이버섯 종균 배양시 panmasi 2 mg/l , thiabendazole 2 mg/l , benomyl 0.2 mg/l , cycloheximide 1 mg/l 에서 종균을 제조할 수 있다. 산소의 농도는 15%에서 균사 밀도나 생육면에서 우수함을 관찰 할 수 있었다. 복합비료의 농도는 0.5~1.5%에서 균사 밀도나 생육면에서 우수함을 관찰 할 수 있었다.. 최적 균사 성장 복합 배지인 LNM 및 ACM 액체 배지를 이용하여 배양된 *L. nuda* DGUM 26501의 세포외 분비 효소의 활성도를 예서는 α -amylase의 효소 활성도가 8.17±1.79 U/mg · protein, 11.7±0.15 U/mg · protein으로 가장 높게 나타났다. 곡물에서 배양한 결과 20일정도의 곡물 종균이 가장 우수하였으며, 그 중 찹쌀, 통밀, 수수, 보리쌀, 울무에서 우수한 균사 생육 및 자주색을 관찰 할 수 있었고 곡물 종균에서의 경제적 우위인 통밀에서 우수함을 관찰할 수 있었다.. 균사체량 변화에서는 LNM이 가장 많은 균사생육을 나타내었으며, ACM에서 당의 농도가 높을수록 오히려 적은 균사생육을 나타내었다. LNM은 시간이 경과함에 따라 초기 pH보다

조금씩 증가하는 것으로 나타났다. ACM에서는 그와는 반대로 조금씩 감소하는 것으로 나타났다. 초기 환원당양은 LNM이 높게 나타났으며, 점차 감소하는 것으로 나타났으며, ACM에서는 3일째 환원당의 양이 급격한 증가 후에 감소하는 것으로 나타났다. α -amylase 효소활성은 LNM에서 높은 효소활성을 나타내었으며, 3일째 가장 높은 활성을 보이다가 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 것으로 나타났다. ACM배지에서는 당 농도가 감소함에 따라 오히려 효소활성이 증가하는 것으로 나타났다. β -glucosidase 효소활성은 LNM에서 ACM보다 높은 효소활성을 나타내었으며 3일 이후 점차 감소하는 것으로 나타났다. 자실체 생산 실험(*in pot*)에서 발효배지에 균사를 접종하여 복토와 관수, 하온충격, 이산화탄소 농도 조절을 하여 원기형성을 관찰할 수 있었다. 자실체 생산 실험(건천버섯농가)에서 발효배지에 균사를 접종하고 복토와 관수, 하온충격, 이산화탄소 농도 조절을 하여 자실체를 유도하였음.

6) 민자주방망이버섯의 영양성분 및 기능성 물질의 검색

민자주방망이버섯의 식품학적 및 기능적 평가를 위한 기초연구로서 그 첫 번째 영양성분의 함량을 조사하였다. 일반성분은 수분 $90.90 \pm 0.09\%$, 탄수화물 $4.38 \pm 0.07\%$, 조단백질 $3.70 \pm 0.03\%$, 조회분 $0.55 \pm 0.04\%$ 그리고 조지방이 $0.47 \pm 0.01\%$ 로 분석되었다. 환원당의 함량은 636.17 mg이었고, 유리당은 galactose, trehalose, maltose, mannose, 그리고 arabinose 등의 순으로 모두 97.42 mg이 함유되어 있었다. 무기질은 K와 Mg가 다른 무기질에 비해 함유량이 높았다. 민자주방망이버섯의 구성아미노산은 총 310.39 mg이었고, 이 중 필수아미노산이 111.50 mg이었으며, valine leucine, lysine 등의 함량이 상대적으로 높았다. 비필수아미노산은 총 198.89 mg이었으며, glutamic acid, aspartic acid, alanine 등의 함량이 높았다. 유리아미노산은 필수아미노산인 isoleucine, threonine의 함량이 높았으며, 비필수아미노산인 184.65 mg으로 glutamic acid와 aspartic acid 등의 함량이 높았다. 아미노산 유도체는 hydroxyproline, citrulline, ornithine, α -aminoisobutyric acid 등의 함량이 높은 것으로 분석되었다. 두 번째, 민자주방망이버섯의 항산화력을 알아보기 위해 환류 추출과 마이크로웨이브 추출방법을 이용하여 물과 70% 에탄올을 용매로 사용한 각 추출물의 추출방법과 농도에 따른 전자공여능, SOD 유사활성, 아질산염 소거능 등을 측정하였다. 전자공여능을 측정한 결과, 1,000 ppm 농도에서 마이크로웨이브 물추출물(MWE)이 87.73%로 가장 높았으며, 마이크로웨이브 에탄올 추출물(MEE)은 84.84%로서 환류 추출방법을 이용한 환류물추출물(RWE)의 60.47%와 환류 에탄올추출물(REE)의 60.13%보다 높은 전자공여능을 나타내었다. SOD 유사활성은 1,000 ppm 농도에서 REE(42.03%), RWE (38.21%)는 MWE(29.24%)와 MEE(24.58%)보다 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. 각 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자공여능과 SOD 유사활성은 증가하는 것으로 나타났다. 아질산염 소거작용은 pH 1.2 조건의 1,000 ppm 농도에서 MWE(29.77%), MEE(25.47%)는 RWE(25.12%)와 REE (22.94%)보다 높은 아질산염 소거능을 나타내는 것으로 분석되었다. 이상의 결과 민자주방망이버섯은 MWE에서 전자공여능과 아질산염 소거능이 가장 높았으며, SOD 유사활성은 REE가 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 민자주방망이버섯의 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 fraction I 과 II는 1 mg/mL의 농도에서 암세포의 종류에 관계없이 높은 암세포 성장 저해율(85.2%~91.8%)을 나타내었다. 열수 추출물의 fraction I 은 1 mg/mL 농도에서 암세포의 증식을 85~90%정도 억제하였다. 당단백질인 다당체인 Fraction II는 45~80 % 정도 암세포 증식을 억제하였다. 마이크로웨이브 추출물 1 mg/mL 처리 시

에 위암 AGS 세포에 대하여 각각 90.7%와 91.8%의 가장 높은 성장저해 효과를 나타내었다. 암세포의 성장억제는 열수 추출물에 비해 마이크로웨이브 추출물이 높았다. 군사체의 암세포 증식의 억제효과는 매우 낮은 것을 나타낸다. 열수추출물과 마이크로웨이브 추출물의 분획물(Ⅱ)를 chromatography를 이용한 분획한 결과 각각 2, 3개의 fraction을 얻었다. 각 fraction의 암세포 증식억제효과는 HepsG2는 1.0mg/ml의 농도에서는 HepG2 와 위암세포인 KATOⅢ, AGS의 증식을 74~87% 정도 저해하는 것으로 나타낸다. HPS-2 fraction은 위암세포인 AGS의 증식을 1 mg/ml 농도에서 79%의 저해율을 나타냈다. 마이크로웨이브에 의한 추출물의 분획물인 MPS-1 fraction은 1 mg/ml의 농도에서 HepG2, KATOⅢ 및 AGS의 세포의 증식을 60 ~ 85% 정도 억제하는 것으로 나타낸다. MPS-3 fraction은 1 mg/ml의 농도에서 HepG2와 AGS의 증식을 각각 79, 89%정도 억제하였다.

이상과 같이 민자주방망이버섯의 생태학적, 유전적 특성 및 단포자 분리 배양 등, 군사배양 최적조건 등에 관한 기본조사 결과는 버섯의 인공배양과 품종개량에 직접적으로 활용할 수 있다. 인공재배의 방법으로 액체배양에 이은 곡물배지 배양에 이은 퇴비 배양을 통하여 민자주방망이버섯은 노지접종, 재배에 이용, 활용되고 있고 퇴비 배양한 것을 자실체 생산에 성공함으로써 이들 민자주방망이버섯 대량생산에 활용할 수 있다. 또한 유전적 변이와 단포자, 분리 배양 및 군사교배에 성공함으로써 육종기반이 마련되었고 특히, 광릉자주방망이버섯과 민자주방망이버섯의 선발 육종 가능성이 제기되어 대형 민자주방망이버섯 생산에 활용할 수 있다. 또한 민자주방망이버섯의 영양성분과 기능성 성분을 분석함으로써 식품영양학적 평가와 더불어 가공식품의 개발과 품질평가가 이루어진다면 민자주방망이버섯의 대량 생산 및 소비가 확대됨에 따라 농가소득은 물론 식품산업의 발전에 기여할 것으로 기대된다.

Summary

1. ABSTRACT

In recent days, the consumption of mushrooms has been increased rapidly because many bio-active substances of mushroom have been identified.

The fungus *Lepista nuda* Tricholomataceae has an international reputation as an excellent edible specie. Aroma, flavor and variable effects such as anti-cancer, control of cholesterol make the development of commercial cultivation techniques highly desirable. Developing techniques for commercial cultivation require a detail understanding of environment, nutritional and genetic characteristics and genetic improvement. Also, it is necessary to identify bioactive substance of *L. nuda* for wild use.

From these viewpoints, ecological characteristic, genetic variation, cross mating, cultivation characteristics and constituents of useful substance were investigated in this research.

The results were as follows

1) Ecological characteristics of *Lepista nuda*

The moisture content, pH, kind and content of organic compound of the soil on which *L. nuda* were collected were analysed. Most of *L. nuda* grew in moisty and shady spots with leaves of oak and pine trees. Moisture content of the soil was 27.84% on the average, and organic compound of the soil was very high (32.58% on the average) compared with that of common soil (6.9%). The pH was 4.26, and Contents of Mg, Ca, K, Fe and N were 0.05ppm, 1.81ppm, 182.41ppm, 1036.72ppm, and 6.95ppm respectively. These results showed that the soil was acidic relatively, and its organic compound was high compared with that of common soil. Also, its cation exchange capacity related with soil fertility was high and showed a tendency of fertile soil, compared with that of common forest soil.

2) Morphological characteristics of *Lepista nuda*

To identify morphological characters pileus, stipe and spore were analyzed in *Lepista*. Size range was 5-10 (cm), and shape was convex to plane, slightly umbonate or depressed at centre in pileus. Colour of pileus was deep and strong violet through to lilac, with or without brownish tints; discolouring with age or drying to sordid, pinkish brown, yellowish brown, drab grey, with or without violet tints. Size range was 5-10 x

1.5-20(cm), and shape was equal or with sub-bulbous base, may be clavate in stipe. Colour of stipe was violaceous grey, concolorous with pileus or darker, dull at the base and may be paler and fading with age, white longitudinally fibrillose, and may or may not be floccose at apex. Size range was 6-9 x 4-5 (μm), and shape was oval shaped in spores.

But morphological characters of Jeju *L. nuda* was differ from other significantly. Therefore, Jeju *L. nuda* was considered as a different species.

3) Genetic characteristics of *Lepista nuda*

(1) RAPD analysis

This study was carried out to investigate the genetic characteristics of *Lepista nuda*. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to analyze the interspecific and intraspecific variations among eight strains of *L. nuda*, and phylogenetic relationships between three species, *L. nuda*, *L. sordida* and *L. irina* in Korea

The RAPD fragments which were amplified with 5 random primers ranged from 4000bp to 150bp, and total of 187 scramble RAPD markers were observed. Intraspecific genetic dissimilarities of eight strains of Korea *L. nuda* were ranged from 0 to 0.51685, *L. nuda* and *L. irina* showed to be 0.2584~0.4606, *L. nuda* and *L. sordida* showed to be 0.2696~0.3707.

In the neighbour-joining analysis using the genetic dissimilarities based on RAPD among the strains of *L. nuda*, *L. sordida* and *L. irina* This group was divided into five clusters. The first cluster consisted of *L. sordida* and the second cluster of Japan *L. nuda*(ACM), *L. irina*. Also the third cluster of France *L. nuda*, Jeju *L. nuda*, Japan *L. nuda*(NBRC), the fourth cluster comprised the other four strains of *L. nuda*.

(2) ITS analysis

According to the analysis of ITS region sequence about twelve strains, five Korean strains and five foreign strains of *L. nuda*, and *L. sordida*, *L. irina*.

The intraspecific genetic dissimilarities were in the range of 0~0.04951. In the analysis of ITS region sequence, the genetic dissimilarity of *L. nuda* and *L. sordida* was 0.02225~0.29272, *L. nuda* and *L. irina* 0.06683~0.29196, and *L. sordida* and *L. irina* 0.08030.

Lepista strains were divided into four clusters using neighbour-joining analysis based on ITS region sequence. The first cluster consisted of four Korean strains and France, Portugal, Swiss of *L. nuda*. The second cluster consisted of two of Japan strains of *L. nuda*. The third cluster of *L. sordida* and Jeju island *L. nuda*, and the fourth cluster of *L. irina*.

(3) cDNA analysis

The cDNA library was constructed and sequenced in *L. nuda*. Those DNA sequenced were search for homology with those of Gene Bank using Blastx program. A homology between one sequence of *L. nuda* and a serine proteins gene was 61%. Also, a homology between another sequence of *L. nuda* and histone H2B of *Agaricus bisporus* was 89%. These results showed that various gene could be identified using cDNA analysis.

4) Breeding

Intra-isolate crosses determined eleven mating groups within *L. nuda*. Intra-isolate fertility crosses were made between two single spore isolates (SSIs) from each mating group. Two 5mm discs of different SSIs were placed 20mm apart on modified PDA medium in 90mm sterile Petri-dish and incubated at 24°C (Guinbertear et al. 1991). The interaction zone was visually assessed at day 5 and then at 2 day intervals until 30 day. The production of an arc shaped zone of hyphae different from the individual SSIs at the interaction zone indicated positive cross between two different SSIs resulting in a dikaryon. This zone was often purple in color when observed on the underside of the Petri dish. Dikaryon formation was confirmed by observing clamp connection with a microscope(x400) and DNA analysis.

Dikaryotic crosses were made between isolates of *L. nuda*(K7, K8), *L. sordida*(K9), *L. irida*(K10). Two 5mm discs were placed 15mm apart on PDA medium in 90mm sterile Petri dish and incubated at 24°C. The interaction zone was visually assessed at day 5 and then at 2-day intervals for a DNA analysis.

Korean isolates were mostly compatible forming clamp connections between all SSIs (K1xK2, K1xK3, K1xK4, K1xK6, K1xK5, K2xK4, K2xK3, K2xK6, K3xK4, K4xK5, K4xK6). Korean *L. nuda* between all Dikaryon, and *L. nuda* did not cross with *L. sordida*. Mycellium of almost mating type grow more rapidly than wild types.

5) Cultivation characteristic

The culture condition and media composition for the enhanced mycelia growth of the *L. nuda* DGUM 26501 were investigated. The optimum temperature and pH for the mycelia growth were 24°C and pH 7.0 ~ 8.0, respectively. Among the complex media tested, ACM were the best favorable for stimulating mycelia growth of *L. nuda* DGUM 26501. When Czapek-Dox medium was used as a minimal medium for cultivation of mycelia, CMC and maltose and mannitol, xylitol was very excellent as carbon and energy source. As an organic and inorganic nitrogen source tested, CSL and NH₄H₂PO₄

were the best as a source of nitrogen. As a phosphorus and vitamin source for the mycelial growth, the most favorable one was $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Nicotinic acid. The optimal ratio of sucrose and CSL for mycelia growth was 0.5 ~ 1.0%, 0.2 ~ 0.8%. As an oxygen and compound fertilizer concentration tested, 15% and 0.5 ~1.5%. The mycelia of *L. nuda* DGUM 26501 were used to determine the extracellular enzyme activity in LNM and ACM. The each extracellular enzyme activity of α -amylase was comparatively high. The best measurement of mycelia growth was found in a substrate composed in wheat. The fruiting body formation was tested, fermentation media were used to determine the fruiting body condition, humidity, sprinkle water, planting. Between the LNM and ACM tested, LNM were the best favorable for mass production of mycelia growth. Time course of α -amylase activity, β -glucosidase, and reduction sugar was measured, LNM was comparatively high.

6) Screening nutrients and functional material of *Lepista nuda*

This study was carried out to analyze the nutritional and functional characteristics of *L. nuda*. The contents of moisture were $90.90 \pm 0.09\%$, carbohydrate $4.34 \pm 0.07\%$, crude protein $3.70 \pm 0.03\%$, ash $0.55 \pm 0.04\%$, and crude fat was $0.47 \pm 0.01\%$. The reducing sugar was 636.17 ± 7.50 mg. Total amount of free sugar was 97.32 mg, and the main compounds were galactose (51.98 mg) and trehalose (22.48 mg). In the results of mineral analysis, the content of K was the highest as 103.10 ± 0.18 mg and followed by 56.01 ± 0.20 mg of Mg. The total content of hydrolyzed amino acid was 310.39 mg which consists of essential amino acids including valine (25.40 mg), leucine (22.52 mg), lysine (21.34 mg), and 198.89 mg of non-essential amino acids including glutamic acid (60.72 mg), aspartic acid (30.17 mg), and alanine (29.72 mg), as a major amino acid, respectively. Free amino acids were 220.86 mg which was composed of essential amino acids (36.21 mg) inclusive of isoleucine (21.57 mg) and threonine (11.20 mg), and non-essential amino acids (184.65 mg) including of glutamic acid (42.78 mg) and aspartic acid (32.44 mg) as a major amino acid, respectively. Total content of amino acid derivatives was 187.85 mg, and that of hydroxyproline was the highest as 121.50 mg.

Antioxidant activity of *L. nuda* extracts was evaluated by measuring the electron donating ability (EDA), the superoxide dismutase (SOD) like activity, and the nitrite scavenging ability. The EDA of water and ethanol extracts at 1,000 ppm of the hot water extract of *L. nuda* was 60.47% and 60.13%, respectively and that of water and ethanol extracts by microwave assisted method was 87.73% and 84.84%, respectively. The measurements of SOD like activity were in the range of 24.58%~42.03% at 1,000 ppm. EDA and SOD were increased as the concentrations of extracts were increased.

The nitrite scavenging ability was the highest as 29.77% in the concentration of 1,000 ppm at pH 1.2, and that was decreased as an increment of pH value. These results indicated that MWE from *L. nuda* showed the highest activities on the EDA and nitrate-scavenging ability, while the REE had the highest effect on the SOD like activity.

The fraction I of *Lepista nuda* mushroom extracts strongly inhibited to 71.4~91.8% for the growth of cancer cells. The growth of cancer HepG2, KATOIII and AGS cell which treated with 0.5 and 1 mg/mL of hot water fraction I was inhibited to 71.4% and 85.5%, 45.0 % and 86.6%, 71.6% and 90.7% respectively. The growth of cancer cell HepG2, KATOIII and AGS which treated with 0.5 and 1 mg/mL of microwave fraction I was inhibited to 79.8% and 85.2%, 78.6% and 88.9%, 85.8% and 91.8%, respectively. The inhibition ratios of cancer cell growth were higher by microwave extracts than hot water extracts. And the more fraction were insoluble for water, the more inhibition ratios of cancer cell growth were lower than those of others. Fraction I and II from hot water and microwave extracts were inhibited 85.2 ~91.8% of human tumor colony-forming. Fraction II of glucoprotein was inhibited 45~80% of human tumor colony-forming. Extracts of microwave method was Inhibited 90 % of cancer cell AGS colony-forming. Extracts of hot-water and microwave method were identified by chromatography (Sephose 6B column), Fractions by chromatography were inhibited 74~87% of HepsG2, KATOIII and AGS colony-forming. MPS-1 fraction was inhibited 60~85% of HepsG2, KATOIII and AGS colony-forming. MPS-3 fraction was inhibited 79, 89% for colony-forming of HepG2 and AGS, respectively.

CONTENTS

CHAPTER 1. INTRODUCTION

1. Study Aims and Necessity
2. Annual Study Aims and Contents
3. Development Schemes
4. The table of researchers
5. Practical use plan

CHAPTER 2. Condition of technical development

CHAPTER 3. Result and substance of research and development

CLAUSE 1. Characteristics, breeding and mass production of *L. nuda*

1. Material and Method

- 1) Collection and buying of *L. nuda*
- 2) Ecological characteristics and Morphological characteristics of *L. nuda*
- 3) Genetic Variation and breeding
- 4) Cultivation characteristics and fruiting body production

2. Result

- 1) Ecological characteristics and Morphological characteristics of *L. nuda*
- 2) Morphological characteristics of *L. nuda*
- 3) Genetic Variation and breeding
- 4) Cultivation characteristics and fruiting body production

CLAUSE 2. Screening functional material of *Lepista nuda*

1. Material and method

- 1) Material
- 2) Analysis of general component
- 3) Analysis of reducing sugar
- 4) Analysis of free sugar
- 5) Analysis of mineral
- 6) Analysis of amino acids and amino acid derivatives
- 7) Preparation of extracts
- 8) Antioxidant activity
- 9) Antibacterial activity
- 10) Inhibition activity and cultivation of cancer cell
- 11) Extracts and fractionation of glycoprotein and polysaccharide

- 12) Separation of glycoprotein and polysaccharide by chromatography
- 13) Anti-tumor activity of glycoprotein and polysaccharide out of separation

2. Result and consideration

- 1) Content of general component
- 2) Content of reducing sugar and free sugar
- 3) Content of mineral
- 4) Content of amino acids and amino acid derivatives
- 5) Effect of antioxidant activity
- 6) Effect of antibacterial activity
- 7) Inhibition effect of cancer cell
- 8) Effect of Anti-tumor activity and separation of glycoprotein and polysaccharide

CHAPTER 4. Object achievement of study and contribution in related part

CHAPTER 5. Application project of study result

CHAPTER 6. Reference

목 차

제 1 장 서 론	19
1. 연구개발의 목적 및 필요성	19
1) 연구개발의 필요성	20
2. 연구개발의 목표 및 내용	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
1. 국내외 관련기술의 현황	23
1) 국내의 경우	23
2) 외국의 경우	23
2. 국내외 관련기술의 문제점	24
1) 연구추진상의 문제점	24
3. 앞으로의 전망	24
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	26
제 1 절 민자주방망이버섯의 특성규명과 육종 및 대량 생산	26
1. 재료 및 방법	26
1) 민자주방망이버섯 채집 및 구입	26
2) 민자주방망이버섯의 형태 및 생태학적 특성 규명	26
3) 유전적 특성 규명 및 육종	28
4) 균사 배양학적 특성 규명과 대량생산 및 자실체 생산	37
2. 결과 및 고찰	42
1) 민자주방망이버섯의 형태 및 생태학적 특성 규명	42
2) 유전적 특성 규명 및 육종	54
3) 균사 배양학적 특성 규명과 대량생산 및 자실체 생산	73
제 2 절 민자주방망이버섯(<i>Lepista nuda</i>)의 기능성 물질의 검색	109
1. 재료 및 방법	102
1) 재료	102
2) 일반성분 분석	102
3) 환원당 분석	102
4) 유리당 분석	102
5) 무기질 분석	103
6) 아미노산 및 아미노산 유도체 분석	103

7) 추출물 제조	104
8) 항산화성 측정	105
9) 항균성 측정	105
10) 암 세포주 배양 및 저해 효과 측정	106
11) 당단백질과 다당류의 추출 및 분획	106
12) Chromatography에 의한 당단백질 및 다당류의 분리	106
13) 분리된 당단백질과 다당류의 항암측정	106
2. 결과 및 고찰	115
1) 일반성분	108
2) 환원당과 유리당	108
3) 무기질 분석	110
4) 구성아미노산과 유리아미노산 및 아미노산 유도체 분석	112
5) 항산화 효과	117
6) 추출물의 항균활성	127
7) <i>L. nuda</i> 의 암세포 성장 저해 효과	127
8) <i>L. nuda</i> 의 당단백질과 다당류의 분리 및 항암효과	134
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	138
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	140
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	144
제 7 장 참고문헌	144
(부록)	157

제 1 장 서 론

1. 연구개발의 목적 및 필요성

버섯은 고대로부터 인류가 식용 혹은 약용으로 이용해온 주요 생물자원의 하나이고 근래는 이의 인공재배 기술 뿐 아니라 기능성 및 뛰어난 약용 효과들이 밝혀짐에 따라 이를 생산, 가공 및 이용하는 농가와 업체들이 크게 늘어나고 있다. 우리나라의 경우도 2만여 농가 연간 5000억원 이상의 버섯을 생산하고 있다.

그러나 2002년 WTO 뉴라운드의 출범은 우리나라 농가에도 커다란 영향을 받게 될 전망이다. 특히 연간 600만톤 이상의 버섯을 생산하는 중국의 WTO 가입에 따라 우리나라의 버섯 농가도 가장 큰 타격을 받을 수 있다는 우려가 나오기도 한다. 그러나 시장개방의 확대는 피할 수 없는 흐름이기 때문에 기본적으로는 이를 받아들이고 이를 계기로 새로운 도약을 할 수 있게 하는 것이 최선의 대책일 것이다. 이러한 관점에서 국내·외 특히 국외의 소비 잠재력이 큰 버섯을 개발하여 국내소비를 촉진시키는 한편 수출 할 수 있는 품종의 개발이 절실히 요구된다.

민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)은 송이과에 속하는 버섯으로 우리나라 대부분의 지역과 북미, 아시아, 호주, 유럽 등 아열대지역을 제외하고 세계적으로 분포하고 있는 종이다. 또한 맛과 향이 뛰어나 특히 미국과 유럽에서 선호가 높은 식용버섯이다. 미식가들에 의하여 항상 상위로 평가받고 있으며 1981년 덴마크 균학회에서 조사한바 즐겨먹는 버섯 20여종 중 선호도가 4번째에 이른다고 하였고(Albertsen *et al.*, 1981). 주름이 있는 버섯으로는 선호도가 2번째이다. 이에따라 이미 19세기말에 인공재배가 시도 되었고 현재는 주로 일차적으로 compost등에 키운 것을 노지에 옮겨 재배 방식의 반자연적, 반인공적 재배를 하고 있으나 유럽에서 생산량은 250-300톤 정도이다(Savoie 등, 1999). 또한 영양성분 및 약리 효과도 뛰어나 생쥐 복수암 억제율이 100%에 이르는 등 항암성, 항균성이 높으며 당대사 조절능, 신경전도 촉진, 각기병 치료 등의 약리효과가 있고(박과이, 1999) 28종의 유리아미노산, 미량금속원소 7종, ergosterol, manitol 등이 확인되었으며 다량의 비타민 B 등이 함유되어 있다(박, 1993).

이러한 민자주방망이버섯의 가치 때문에 일본의 경우 1996년부터 8차년계획으로 새로운 버섯에 대한 연구를 대대적으로 추진하고 있는데 2002년도 대상품목에 민자주방망이버섯이 포함되어있다(월간버섯 2002년 6월호).

이와 달리 우리나라에서는 이에 대한 연구도 미비할 뿐아니라 이의 개발과 이용이 거의 이루어지고 있지 못하다. 이는 민자주방망이버섯에 대한 이해가 잘 이루어지지 못하였기 때문으로서 기호성, 식·의학적 가치 등을 고려할 때 이를 육종, 효율적인 인공재배기술의 적극적 개발로 새로운 국내소비 버섯으로 크게 이용될 수 있을 뿐 아니라 수출도 할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 효율적 실내 인공재배 방법이 개발되고 약용 및 영양효과 등이 인식된다면 국내에서도 다량소비가 충분히 이루어질 것으로 생각된다.

1) 연구개발의 필요성

(1) 기술적 측면

농가소득의 차원에서 볼 때 버섯의 활용에 1차적으로 요구되는 기술은 무엇보다도 버섯 생산기술이고 아울러 상품성이 뛰어난 품종을 만들 수 있는 육종기술 및 버섯의 다양한

식·의학적 성분을 밝혀내고 이를 추출 혹은 이용하는 기술의 개발 등일 것이다. 이러한 관점에서 민자주방망이버섯의 기술개발은 다음과 같은 점에서 크게 요구된다.

민자주방망이버섯은 기술개발의 잠재력 혹은 기술개발에 다른 부가가치가 매우 크다.

현재 민자주방망이버섯을 애용하고 인공적으로 생산하고 있는 미국이나 유럽을 볼 때 주로 compost를 이용한 임지 혹은 야지 재배하고 있다. 그러나 이러한 재배방법에는 compost 구성성분, 토양 및 생태학적 조건 등의 여러 가지 요소가 영향을 미치기 때문에 우리나라 임지재배 조건을 밝힌다면 생산성을 높일 수 있고 현재 실내배양은 미흡하기 기술 개발의 여지가 크며 이것이 성공적으로 이루어 질 경우 연중 대량생산이 가능하게 된다.

품종개발 및 버섯 육종 기술개발의 관점에서 필요하다.

민자주방망이버섯은 아열대 및 열대지역을 제외하고 세계적으로 분포하고 이에 따른 색, 맛, 형태, 생태학적 특성 등이 매우 다양하고 이에 따라 품종에 따른 자실체 생산성에도 큰 변이가 있는 것으로 보고되었다. 따라서 우리나라 민자주방망이버섯을 분석하여 육종해나간다면, 국내시장 및 외국시장 등의 요구에 적합한 특질을 갖는 품종들의 개발이 가능하고 실제로 단포자 균사융합 등을 통하여 육종이 이루어지고 있다.

버섯의 유용 유전자 개발의 관점에서 필요하다.

민자주방망이버섯은 특유의 향과 맛, 높은 내한성과 항균성, 다양한 영양성분 등을 가지고 있음이 밝혀졌고 특히 근래살충효과의 단백질들 보고되었다. 이러한 점들과 관련하여 볼 때 민자주방망이버섯은 유용유전자원으로서 잠재적 가치가 매우 크며 따라서 이의개발이 필요하다.

버섯 기능성 물질의 이용기술 개발의 관점에서 필요하다.

민자주방망이버섯은 특이한 색과 향기뿐만 아니라, 높은 항암율과 살충효과, 다양한 영양분 석등이 보고되고 있으나 이러한 효과와 관련된 물질 및 대량 추출, 가공, 관련유전자 등에 관한 연구가 이루어지지 않았다. 이들의 규명 및 추출, 대량생산기술 등이 이루어진다면 매우 높은 부가가치를 창출 할 수 있다.

민자주방망이버섯을 이용한 식품개발의 관점에서 필요하다.

민자주방망이버섯이 구미에서 가장 선호하는 버섯의 하나인데도 우리나라에서 거의 이용되고 있지 못하는 것은 식품에 대한 기호도의 차이도 있지만 이를 이용한 식품의 개발이 이루어지지 않았기 때문이다. 따라서 민자주방망이버섯에 대한 인식의 전환과 더불어 이를 이용 개발한다면 이의 소비가 크게 활성화 될 것으로 사료된다.

(2) 경제 산업적 측면

전술한 바와 같이 우리나라 버섯농가의 현실이 매우 어려워져가고 있어 경제 산업적 측면에서 새로운 소득원이 될 수가 있고 활력을 가질 수 있는 연구개발이 절실하다.

민자주방망이버섯은 국내버섯시장에 새로운 수입을 창출 할 수 있다.

구미에서 높은 선호도를 가지고 있고 다양한 기능성 성분들이 함유되어 있어 적극적으로 개발한다면 새로운 식용버섯으로 각광을 받을 수 있다.

민자주방망이버섯은 수출을 통하여 소득을 증대시킬 수 있다.

현재 민자주방망이버섯이 미국에서 Kg당 15 dollar에 거래되고 있기 때문에 경제성이 있는 생산만 한다면 충분히 수출 될 수 있다.

부가가치를 높일 수 있다.

민자주방망이버섯은 높은 항암률과, 비타민 B₁ 다량함유, 각기병치료효과, 살충효과 등 다

양한 기능성 성분들을 함유하고 있어 이를 개발한다면 경제적 가치를 크게 높일 수 있다.

새로운 식품산업분야의 창출을 위해 필요한 민자주방망이버섯의 특유의 맛, 색소, 향기 및 조리시 지방이 없다는 점 등을 활용하면 새로운 식품원료로 충분히 개발 할 수 있다.

고효율, 저비용 육종이 필요하다.

민자주방망이버섯의 유전적 특성, 총단백질, cDNA library 등의 생물정보를 이용한 유용 자원의 발굴, 육종방향과 방법 등은 능률적이고 경제적으로 다른 버섯자원을 개발하는데 활용될 수 있을 것이다.

(3) 사회 문화적 측면

버섯의 연구와 개발에 관련한 사회, 문화적 측면으로는 우리 생물자원을 개발하여 널리 알릴 수 있다는 점일 것이고, 특히 버섯이 일차적으로 식용으로 주요자원이 있다는 점에서 고유의 식품으로서 개발한다면 식품 문화적 관점에서 의미가 클 것이다. 또한 민자주방망이버섯의 기능성과 기호성을 이용한 기능성 가공 식품의 개발은 재배농가의 소득증대와 더불어 소비시장에 기능성 식품을 제공하고 식품산업의 발전에 기여할 것으로 생각된다. 민자주방망이버섯은 자연상태에서 늦가을 혹은 초겨울에 발생하며 자주빛 등의 특유의 생식과 향기를 가지고 있어 관상용으로 개발 이용할 수 있다.

2. 연구개발의 목표 및 내용

목 적 : 본 연구에서는 우리나라에서 자생하고 있고 식·의학적 가치가 매우 높으며 유럽, 북미 등에서 식용으로 널리 이용되고 있는 민자주방망이버섯의 육종, 성분분석 및 인공재배기술의 개선을 통하여 민자주방망이버섯을 대량생산하고, 이의 국내소비 및 수출, 민자주방망이버섯 이용분야 확대 등의 기반을 마련하고자 하며 그 목표는 다음과 같다.

- ◎ 우리나라 민자주방망이 버섯의 특성 규명에 의한 계통선발과 단포자 균사 융합에 의한 품종개량
- ◎ 자실체 인공재배 생산기술 개발
- ◎ 균사체 및 접종원 생산의 최적조건 규명 및 자실체 인공재배의 생산성 향상 및 생리학적 특성의 규명
- ◎ cDNA분석에 의한 유전자 검색 및 유용유전자 발굴
- ◎ 영양성분, 가공적성, 기호성 물질의 분석 및 식품영양학 적 특성 조사
- ◎ 향암, 항균, 항산화 등 기능성 물질의 탐색과 분석, 이용방법의 개발
- ◎ 자실체와 균사체의 기능성 성분검색

내용 및 연구범위

- ◎ 우리나라 민자주방망이버섯의 형태적 특징과 생육조건 규명
- ◎ RAPD, ITS등에 의한 유전변이와 특성 규명
- ◎ cDNA 분석에 의한 유용 유전자 발굴
- ◎ 계통선발과 단포자 균사융합 등에 의한 육종
- ◎ 자실체 대량생산 조건 규명 및 재배기술의 개발
- ◎ 균사체 및 접종원의 대량배양 조건 확립
- ◎ 균사체 및 자실체의 효소활성 특성의 규명
- ◎ 버섯의 자실체의 일반 성분, 영양성분, 비타민류, 유기산, 아미노산 및 유리당

분석

- ◎ 자실체 및 군사체의 항산화 및 항균성 등 생리활성 물질의 분리 및 분석
- ◎ 자실체와 군사체의 항암성 조사
- ◎ 자실체와 군사체의 당단백질 및 β -glucan의 분리 정제 및 항암성 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 관련기술의 현황

1) 국내의 경우

민자주방망이버섯은 식품으로서의 맛과 향기가 좋고 영양성분이 풍부하여 약용학적 가치가 뛰어남에도 불구하고 우리나라에서 이에 대한 연구개발 및 이용은 극히 미비한 상태이다. 이의 성분에 관한 것으로 미량원소(박, 1993)와 fibrin효소활성도(김 등, 1998)에 대한 연구가 이루어졌고 유전적으로 RAPD에 관한보고(김과 황, 2002)가 있다. 배양학적 특성에 관한 연구로 민자주방망이버섯의 고체배양과 톱밥배양 등의 특성들에 대하여 보고되었다(박 등, 1978; 이 등, 1995, 1996; 김 등, 1997; 이, 2002). 그러나 육종과 이용의 기반이 될 수 있는 우리나라 민자주방망이버섯의 형태적, 생태학적, 유전적 특성에 관한 기초연구가 미비하고 우리나라 농가에서 이를 재배할 수 있는 적절한 재배조건과 재배방법에 대한 기술이 개발, 보급되지 않았던 실정이다. 자연 상태에 대한 연구로는 문 등(2000)에 의한 민자주방망이버섯의 분해와 분해과정에 따른 무기염류의 변화에 관한 것뿐이다.

2) 외국의 경우

민자주방망이버섯은 유럽인들에서 선호도가 높은 재래 야생 버섯이 있기 때문에 이에 대하여 19세기 말경부터 이들의 배양기술을 꾸준히 개발하여 왔다(Vaandrager와 Visscher, 1983; Guinberteau 등, 1991; 1995). 또한 민자주방망이의 맛과 향에 중요한 영양을 끼치는 방향적 화합물에 대한 연구(Audouin 등, 1989; Noel-Suberville 등, 1996)와 항생물질(Sidorvova와 Velikanov, 2001) 등 성분 등에 관하여 다양하게 이루어졌다. 중국에서는 이들의 항암성, 각기병 치료와 신경 등의 약리 효과에 관한 연구(박과미, 1999)가 이루어졌고 대만의 Chen 등(2001)은 단포자 군사용합방법에 의해 민자주방망이버섯의 육종을 시도하였다. 또한 호주의 Stott와 Vrodesick(1996)은 호주민자주방망이버섯의 인공재배 기술을 개선하기 위하여 France 민자주방망이버섯과 온도에 따른 생육, 상태 등에 관한 비교연구를 수행하였으며 생육조건을 개선하기 위해 compost 내의 민자주방망이버섯 extracellular enzyme들을 분석하였다(Ssavoie 등, 1999).

민자주방망이버섯의 인공재배는 1차 군사배양된 것을 compost에 접종하여 실외에서 재배하는 방식이다. 이는 재배비가 적게 소요되는 장점이 있으나, 자실체 형성을 위해서는 저온 충격이 필요하기때문에 연중 1회만 생산된다는 단점이 있다. 그러나 구미에서는 중견회사들이 배양한 군사들을 일반 분양하여 상업적으로 생산하는 시스템을 구축하였고 그 가격은 군사체 배양한 것이 Petri-dish 당 125 dollar이다.한편 Scott등(1996)의 연구에 의하면 프랑스 민자주방망이버섯과 호주 민자주방망이버섯의 온도에 대한 생육상태, 중간 군사용합 등의 특성에 있어 큰 차이가 있음을 밝혀내었다. 이러한 점들과 관련하여 이웃 일본은 민자주

방망이버섯의 개발이 늦었지만 정부지원아래 개발대상 버섯의 하나로 선정하여 2002년부터 본격적으로 연구를 진행되고 있다.

2. 국내외 관련기술의 문제점

1) 연구추진상의 문제점

기초연구가 되어있지 않다.

생물자원의 활용은 위한 기본은 다른 연구와 마찬가지로 그 생물에 관한 생태, 생리, 유전 등의 기초연구가 선행되어야 한다. 그러나 우리나라 민자주방망이버섯의 경우 이러한 관점에서의 국내의 연구는 극히 미흡한 실정이다. 따라서 외국의 것과 형태적 생태적, 구성성분 등에 어떠한 차이가 있는지는 밝혀야 한다.

균사체 배양과 실외 compost 배양에 의한 자실체 생산은 이루어지고 있으나, 실내 대량 생산 및 자실체 생산의 기술이 확립되지 않았다.

민자주방망이버섯은 균사체의 배양이 이루어지고 있고 생산성이 현재까지 만족할만한 정도는 이루고 있지 않으나 자실체형성도 유도할 수 있다. 그러나 인공생산량은 많지 않다. 이는 일차 compost 배양한 것을 실외 재배하기 때문에 생산시기도 년 1회에 한정되고 입지가 제한되는 등의 원인으로 대량생산에 어려움이 있다. 이에 따라 실내 연중생산의 기술을 개발해야 한다.

자실체발생에 관련된 배양배지 및 환경조건에 관한 체계적인 연구가 부족하다.

민자주방망이버섯의 자실체가 인공적으로 배양할 수 있는데도 불구하고 이것이 대량생산을 할 수 없는 것은 이의 체계적인 연구가 이루어지고 있지 못하기 때문이다. 즉, 이의 개발에 배경이 될 수 있는 자실체 형성의 환경, 생리, 배지조건 등에 관하여 충분히 이루어지고 있지 못하다.

국내에는 민자주방망이버섯의 식용적 가치 및 약용적 가치의 인식이 이루어져 있지 않다. 구미에는 식용버섯으로 높은 선호도를 가지고 있으나 국내에는 이에 대한 인식이 이루어져 있지 않아 거의 이용되고 있지 않다.

3. 앞으로의 전망

- 1) 민자주방망이버섯은 자연상태에서의 생육조건이 규명되고 이를 바탕으로 인공재배 방법을 개발함으로써 대량생산체제를 확립할 수 있을 것으로 본다.
- 2) 민자주방망이버섯 균사체의 대량배양 조건의 확립 및 대량배양기술을 개발함으로써 공급을 확대할 수 있게 될 것이다.
- 3) 민자주방망이버섯에 대한 지속적인 육종을 통하여 관능미, 영양가의 의학적 효과 등을 개선하여 기능성 버섯으로의 소비를 촉진시킨다.
- 4) 다양한 생산기술을 보급하여 대량생산이 이루어지고 국내소비를 촉발시키고 국외의 시장을 개척하여 수출을 확대할 수 있다.
- 5) 민자주방망이버섯의 식품영양학적 평가에 의한 식품으로 이용 가치성을 증대될 것이다.
- 6) 민자주방망이버섯의 성분분석을 통한 기능성 물질의 추출을 통하여 유효성분들이 밝혀

지게 될 것이고 이들의 정제기술이 발달할 것이다.

- 7) 밝혀진 유용 유전자들을 유전공학적 방법으로 대량생산 할 수 있을 것으로 생각된다.
- 8) 민자주방망이버섯의 기능성 물질의 이용 및 산업화할 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 민자주방망이버섯의 특성규명과 육종 및 대량생산

1. 재료 및 방법

1) 민자주방망이버섯 채집 및 구입

민자주방망이버섯은 크게 국내 여러 자생지와 국외의 일본, 프랑스, 포르투갈, 스위스 등에서 분양 및 구입하였다. (Table 1) 2003년, 2004년, 2005년 등의 10월부터 12월에 걸쳐 채집, 동정하였으며 채집지역은 강화도, 경기도 동구릉과 용인 상현동, 전라도 덕유산, 경상북도 직지사, 동화사, 경산 등과 제주도 등이었다. 프랑스 등의 유럽 민자주방망이버섯은 Institute National de la Recherche Agronomique(Champignons)의 Dr. Jacques Guinberteau로부터 분양 받았다. 일본 민자주방망이버섯은 NITE Biological Resource Center Department of Biotechnology National Institute of Technology and Evaluation로부터 2개의 품종을 구입하였다.

2) 민자주방망이버섯의 형태 및 생태학적 특성 규명

형태 및 생태학적 특성의 집적조사는 국내 민자주방망이버섯을 대상으로 실시하였고 외국 품종은 문헌을 참고하였다. 국내 채집에 따라 갓의 색, 직경, 대의 직경과 길이 등을 측정하였고 포자를 채취하여 현미경 하에서 색, 형태를 관찰하였다.

생태학적 특성을 규명하기 위하여 채취시의 날짜와 온도, 자생지역의 지형적 특성을 조사하였고, 토양을 채취 pH, 수분 및 유기물, 무기물 함량 분석을 하였다.

토양의 수분 함량은 Brower *et al.* (1977)의 방법에 따라 105°C의 dry oven에서 48 시간 동안 건조시킨 후 습도와 건토의 차를 건량에 대한 백분율로 계산하였으며, 토양의 유기물 함량은 작열 소실법으로 측정하였다(George 1976, Brower *et al.* 1977, Page *et al.* 1982). 전질소의 함량은 Micro-Kjeldahl 법으로 측정하여 백분율로 나타내었으며(Page *et al.* 1982, Sposito 1989), 토양 pH는 Page 등(1982)의 방법에 따라 실내에서 풍건한 토양 10 g에 증류수 50 ml를 가하여 1 시간동안 진탕 여과한 다음 glass pH-meter (Istek 725P, Korea)를 사용하여 측정하였다. 토양의 무기물 함량은 토양 1 g에 40% Hydrofluoric acid 4 mL와 65% Nitric acid 20 mL를 가한 다음 microwave digestion system (ETHOS-1600, USA)을 사용하여 전처리한 후, 0.45 μ m filter로 여과하고 원자흡수분광광도계(atomic absorption spectrophotometer; Shimadzu AA-6701, Japan)를 이용하여 Mg (285.2 nm), Ca (422.7 nm), K (766.5 nm), Mn (279.5 nm), Fe (248.3 nm) 그리고 Zn (213.9 nm)을 분석 정량하였다 (Yun *et al.* 2003).

Table 1. The source of strains

No.	Locality	No.	Locality
K1	Gyeongbuk Gyeongsan Yeungnam Univ. <i>L. nuda</i> Single spore isolates	J4	Japan ACM8236 <i>L. nuda</i>
K2	Gyeonggi-do Guri <i>L. nuda</i> Single spore isolates	J5	Japan ACM8104 <i>L. nuda</i>
K3	Gyeongbuk Gimcheon <i>L. nuda</i> Single spore isolates	J6	Japan ACM30139 <i>L. nuda</i>
K4	Gyeongbuk Gyeongsan Daegu Catholic Univ. I <i>L. nuda</i> Single spore isolates	J7	Japan NBRC30878 <i>L. nuda</i>
K5	Gyeongbuk Gyeongsan Daegu Catholic Univ. II <i>L. nuda</i> Single spore isolates	J8	Japan NBRC8104 <i>L. nuda</i>
K6	Gyeonggi-do Yongin <i>L. nuda</i> Single spore isolates	J9	Japan NBRC30484 <i>L. nuda</i>
K7	Chungnam Geumsan <i>L. nuda</i> Single spore isolates	J10	Japan NBRC8230 <i>L. nuda</i>
K8	Jeonbuk Muju-gun Deogyu Mt <i>L. nuda</i> Single spore isolates	E1	France <i>L. nuda</i>
K9	Daegu Palgong Mt. <i>L. nuda</i> Single spore isolates	E2	Swiss <i>L. nuda</i>
K10	Jeju Island <i>L. nuda</i> Single spore isolates	E3	Portugal <i>L. nuda</i>
K11	Gyeonggi-do Yongin <i>L. irina</i> Single spore isolates	Cross Mating	
K12	Gyeongbuk Gyeongsan <i>L. sordida</i> Single spore isolates	M1	K1xK2 <i>L. nuda</i>
KD1	Bupezong-gu Incheon, Korea <i>L. nuda</i> Dikayon	M2	K1xK3 <i>L. nuda</i>
KD2	Jeju Island <i>L. nuda</i>	M3	K1xK4 <i>L. nuda</i>
KD3	Gyeonggi-do Guri <i>L. nuda</i>	M4	K1xK6 <i>L. nuda</i>
KD4	Gyeongbuk Gyeongsan <i>L. nuda</i> Daegu Catholic Univ.	M5	K1xK5 <i>L. nuda</i>
KD5	Chungnam Geumsan <i>L. nuda</i>	M6	K2xK4 <i>L. nuda</i>
KD6	Gyeongbuk Gyeongsan <i>L. sordida</i>	M7	K2xK3 <i>L. nuda</i>
KD7	Gyeongbuk Gyeongsan <i>L. sordid</i> Daegu Catholic Univ.	M8	K2xK6 <i>L. nuda</i>
KD8	Gyeonggi-do Yongin <i>L. irina</i>	M9	K4xK3 <i>L. nuda</i>
J1	Japan ACM30484 <i>L. nuda</i>	M10	K4xK6 <i>L. nuda</i>
J2	Japan ACM8326 <i>L. nuda</i>	M11	K4xK5 <i>L. nuda</i>
J3	Japan ACM30878 <i>L. nuda</i>	M12	K3xK6 <i>L. nuda</i>

3) 유전적 특성 규명 및 육종

(1) RAPD에 의한 유연관계 분석

Genomic DNA 추출은 PDA 배지에서 20일에서 23일간 배양한 균사를 사용하였으며, DNA 추출은 Lee등(1988)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 배양한 균사를 0.2g-1g 채취하여 mortar에 넣고 liquid nitrogen으로 급냉시켜 냉동상태에서 미세하게 마쇄한 다음 500 μ l lysis buffer[1% 2-mercaptoethanol, 3% SDS, 50mM EDTA in 50mM Tris-HCl(pH 7.2)]를 넣고 65°C에서 1시간 반응시킨 후, 12,000rpm 4°C에서 15분간 원심분리 한 후 상등액만 취하였다. 여기에 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)용액을 첨가, 15000rpm에서 5분간 원심분리 하여 새로운 tube에 상등액만 취하였다. DNA가 녹아있는 상

등액에 2배의 absolute ethanol을 넣고 -20℃에서 30분간 DNA를 침전시켜 15000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. pellet을 확인 한 후, 70% ethanol을 넣고 15000rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액을 제거하고 실온에서 완전히 건조시켜 100 μ l의 d₃H₂O에 녹였다. DNA 함량과 순도를 측정하기 위해 DNA를 100배 희석하여 spectrophotometer(Shimadzu UV-VIS 1201, Japan) 260nm와 280nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 PCR을 위한 template DNA로 사용하였다.

PCR 실험시 RAPD를 위해 사용한 primer의 code name과 sequence(5' to 3')는 Table에 나타내었으며 G+C의 함량은 60-70%이었다(Table 3). PCR을 위한 reaction mixture의 조성은 Bioneer PCR kit를 사용하였다. PreMix kit에 genomic DNA 1.0 μ l를 넣고 전체 반응 용액이 20 μ l가 되도록 d₃H₂O를 첨가하였다.(Table 2)

Table 2. Concentration of components in 20 μ l for PCR of nucleic acid

Component	Volume(μ l)	Manufacturer
Template DNA	1.0-2.0	
	Taq polymerase 1U	
	Tris-HCl(pH 9.0)	
Premix kit	10mM	Bioneer
	dNTPs mixture 250 μ M	
	MgCl ₂ 1.5mM	
Primer	1.0	Genotech
d ₃ H ₂ O	17.0	
Total	20.0	

본 실험의 RAPD증폭반응은 MJ Research PTC 150 minicycler에서 thermal cycle의 program은 Park 등(1997)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. Template DNA 변형을 위해 94℃에서 3분간 predenaturation 한 다음, 94℃에서 30초간 denaturation, 40℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 elongation을 5분씩 처리하여 DNA를 증폭시키는 것을 1 cycle로 하였으며 모두 45 cycle을 수행하였다. DNA 증폭이 끝난 후 최종적인 합성을 위해 72℃에서 5분간 안정화한 다음 4℃에서 보관 사용하였다. (Fig. 1) 이때 각각의 primer 별로 3회 이상의 반복실험을 수행하여 재현성이 뚜렷한 것만을 유용한 primer로 결정하였다.

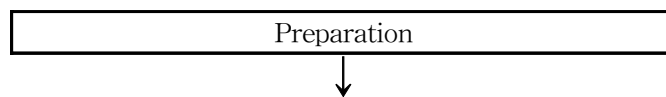
Table 3. The list of 10 primers used of RAPD analysis

Primer NO.	Sequence(5'to3')	Primer NO.	Sequence(5'to3')
OPA-1	CAGGCCCTTC	OPB-1	GTTTCGCTCC
OPA-2	TGCCGAGCTG	OPB-2	TGATCCCTGG
*OPA-3	AGTCAGCCAG	OPB-3	CATCCCCCTG
OPA-4	AATCGGGCTG	OPB-4	GGACTGGAGT
OPA-5	AGGGGTCTTG	OPB-5	TGCGCCCTTC
OPA-6	GGTCCCTGAC	*OPB-6	TGCTCTGCCC
OPA-7	GAAACGGGTG	OPB-7	GGTGACGCAG
*OPA-8	GTGACGTAGG	OPB-8	GTCCACACGG
OPA-9	GGGTAACGCC	OPB-9	TGGGGGACTC
OPA-10	GTGATCGCAG	OPB-10	CTGCTGGGAC
OPA-11	CAATCGCCGT	OPB-11	GTAGACCCGT
*OPA-12	TCGGCGATAG	OPB-12	CCTTGACGCA
*OPA-13	CAGCACCCAC	OPB-13	TTCCCCGCT
OPA-14	ACTGTGCTGG	OPB-14	TCCGCTCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC	OPB-15	GGAGGGTGTT
OPA-16	AGCCAGCGAA	OPB-16	TTTGCCCGGA
OPA-17	GACCGCTTGT	OPB-17	AGGGAACGAG
OPA-18	AGGTGACCGT	OPB-18	CCACAGCAGT
OPA-19	CAAACGTCGG	OPB-19	ACCCCCGAAG
OPA-20	GTTGCGATCC	OPB-20	GGACCCTTAC

* : Reaction primer

RAPD를 수행한 PCR product는 5ng/100ml의 농도로 ethidium bromide를 첨가한 1.2% agarose gel(Sigma Co.)에서 1X TAE buffer에서 50mV로 electrophoresis 하였으며, UV transilluminator상에서 나타나는 DNA band를 확인하였다.

Data 분석은 반응이 나타난 band를 코드화 하였으며(Sneath and Sokal, 1973; Nei, 1987; Smith and Anderson, 1989), 전체 OTU에 대한 자료행렬을 작성하였다.(Appendix 1). 분지도는 UPGMA(unweighted pair-group method, arithmetic average method) 방법을 사용하였고, phylogenetic analysis에서 PAUP 4.02b version(Swofford, 2001)을 사용하여 parsimony analysis를 실시하였으며, 분석방법으로는 Heuristic search를 이용하였다. 이에 따른 option으로 ACCTRAN, MULPARS 및 TBR을 이용하였다. 또한 Nei(1973)의 유전적 거리지수를 다소 변형한 Nei-Li의 거리지수를 이용하여 상사도 행렬을 도출하였다. 도출된 자료행렬에 따라 산출된 유전적 유사도를 기초로 하여 neighbour joining tree(NJ)를 작성하였다.(Saitou and Nei, 1987) 그리고 종간의 유전적 유사도 계수(similarity coefficient)는 Sneath와 Sokal(1973)의 방법에 따라 구하였다. 또한 각 분계도의 지지정도는 jack-knifing(Farris et al., 1996), bootstrap(Felsenstein, 1985)을 이용하여 분석하였다. 이러한 분석방법은 1000회 반복 실시하였다.



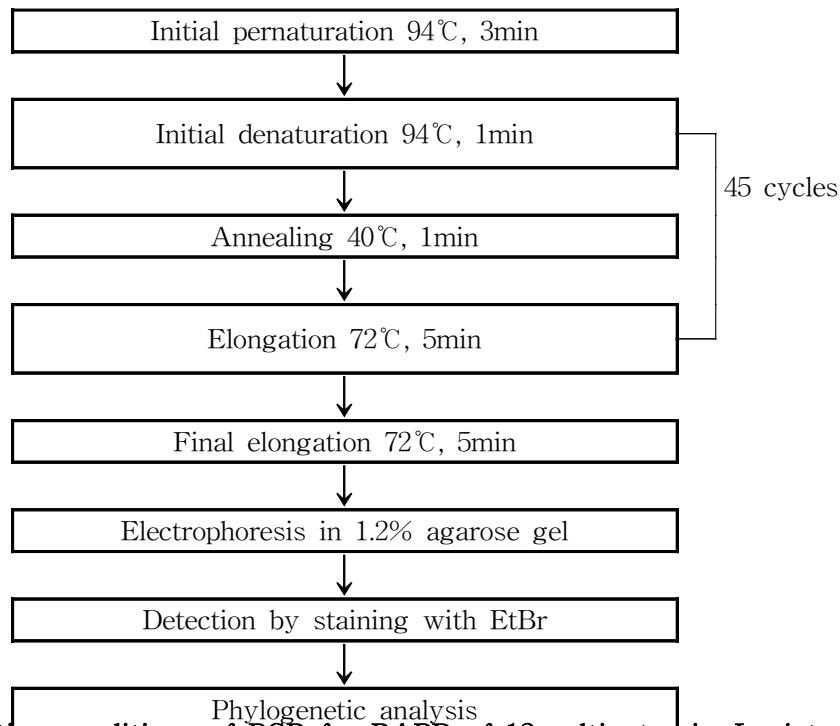
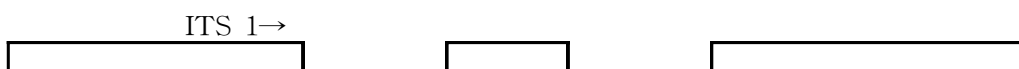


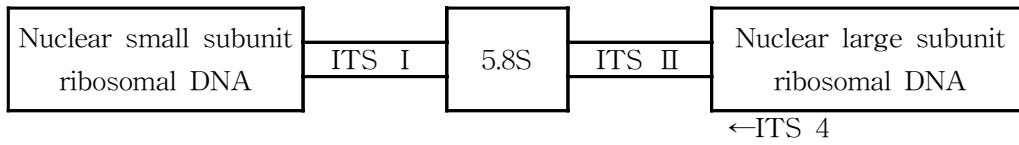
Fig. 1. Reaction conditions of PCR for RAPD of 12 cultivates in *Lepista* species.

(2) ITS 분석

ITS영역을 증폭하기 위하여 White 등(1990)에 의해 보고된 fungi의 ITS영역 증폭 primer를 이용하였으며, 이들의 oligomer 염기서열과 진균류의 일반적인 rDNA gene cluster로서 ITS I 과 5.8S 그리고 ITS II영역을 나타내었다(Fig. 2). ITS를 위한 PCR reaction mixture 조성 및 PCR thermal cycle program은 RAPD와 동일한 방법으로 실시하였으며 primer는 ITS1과 ITS4를 사용하여 실험하였다. ITS 영역의 PCR product는 RAPD에서와 같은 방법으로 electrophoresis하여 DNA band를 확인한 후 QIA-quick PCR purification kit(Quagen Inc., USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR product를 Perkin-Elmer applied biosystems ABI 377A sequencer(Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 protocol에 따라 PRISM Dye Dideoxi Terminator Cycle Sequencing Kit를 이용하여 분석하였다(Fig. 3).(Smith et al., 1986; Gyllensten, 1989; Hiraishi, 1992).

염기서열은 Sequencher(Gene codes Co., USA), Clustal X를 이용하여 alignment 시킨 후 최종 세부 정렬은 수작업으로 보강하였다. 분석된 염기 서열의 phylogenetic analysis는 PAUP 4.02b version(Swofford, 2001)을 사용하여 parsimony analysis를 실시하였으며 분지도는 UPGMA 방법을 사용하였다. 분석방법으로는 Heuristic search를 사용하고 이에 따른 option으로 ACCTRAN, MULPARS 및 TBR을 이용하였다. Two-parameter method로 산출된 염기변이 값을 기초로 neighbour joining tree(NJ)를 작성하였다. 그리고 그 종간의 유전적 유사도 계수(similarity coefficient)는 Sneath 와 Sokal(1973)의 방법에 따라 구하였다. 또한 각 분계도의 지지정도는 jack-knifing(Farris et al., 1996), bootstrap(Felsenstein, 1985)를 이용하여 분석하였다. 이런 한 분석방법은 1000회 반복 실시하여 이를 통한 계통수를 작성하였다.





Forward primers	Reverse primers
ITS-1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS-4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

Fig. 2. Location and sequences of primers for the amplification and sequencing. ITS primers were those designed by White et al., (1990)

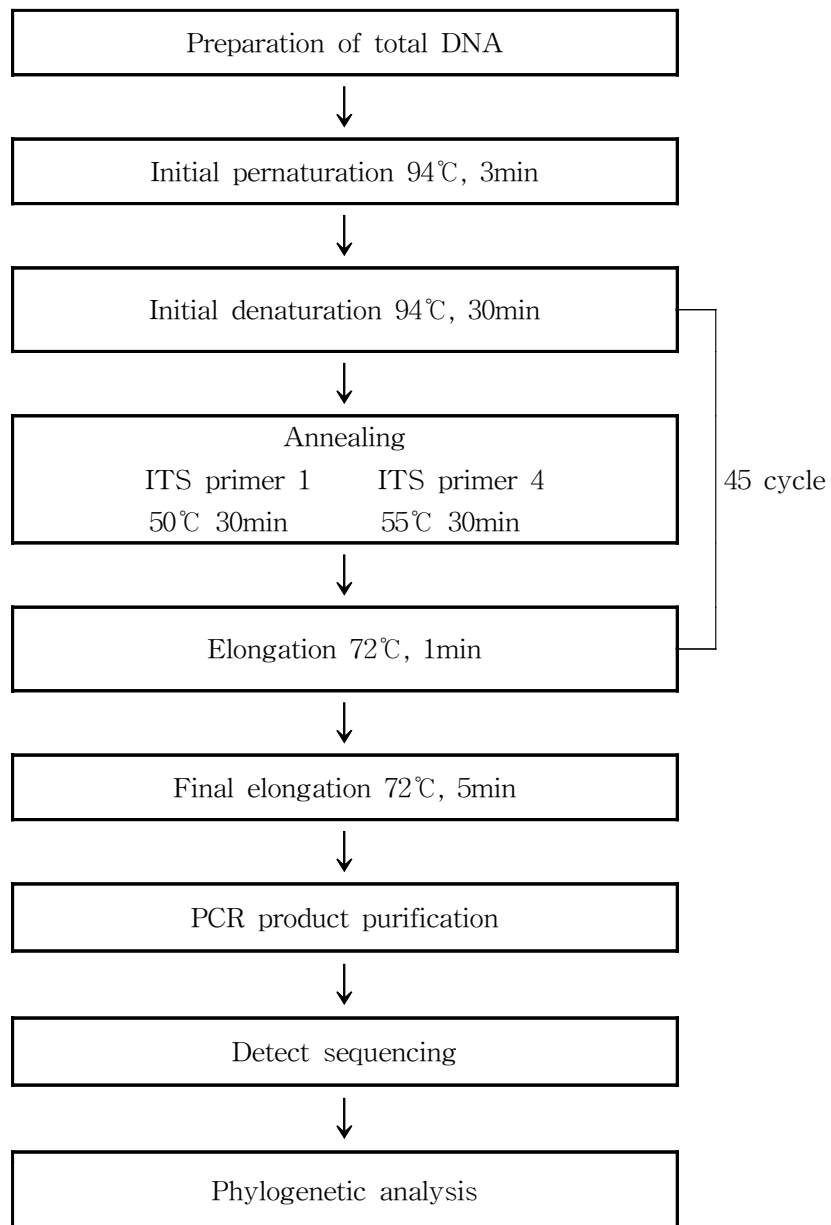


Fig. 3. Reaction conditions of PCR for ITS region of 8 cultivates in *Lepista* species.

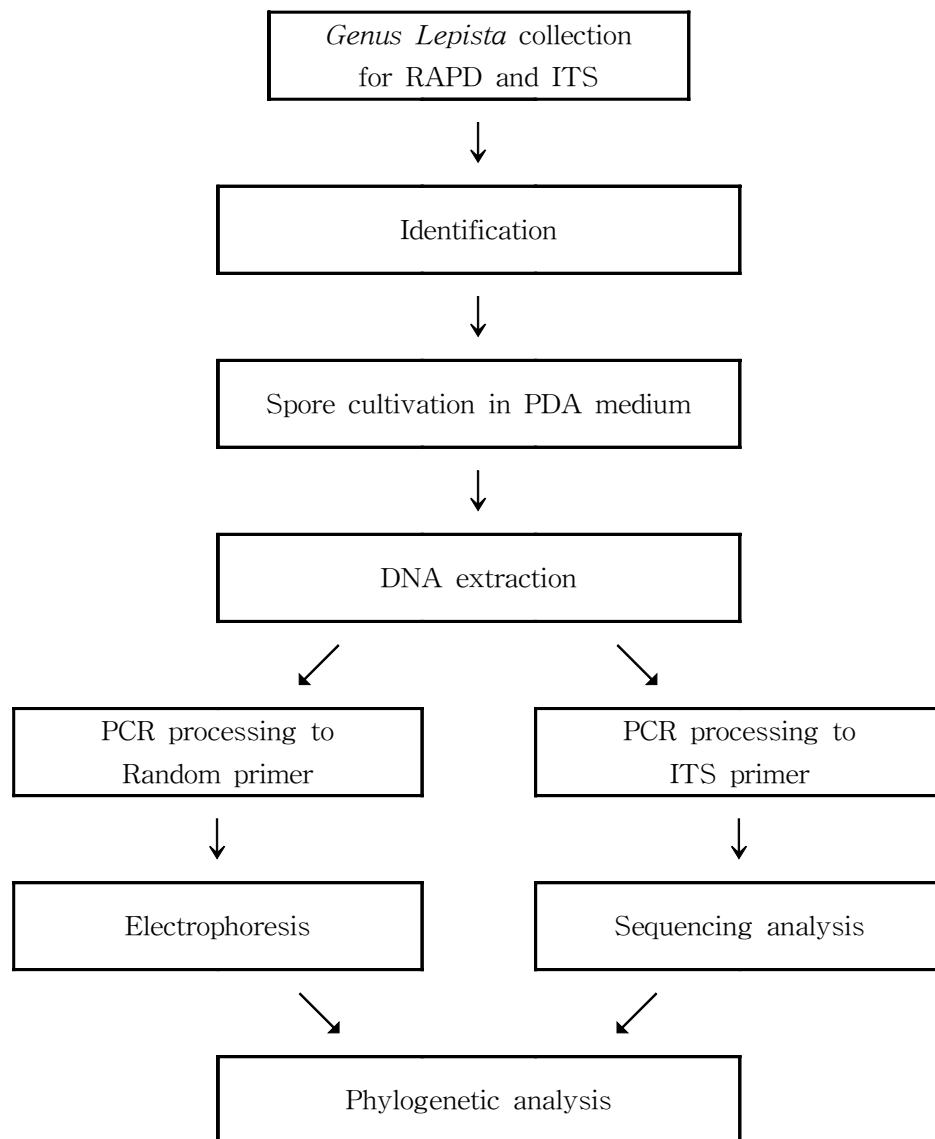


Fig. 4. Schematic diagram of molecular approaches used in this study.

(3) cDNA library 제작 및 cDNA 염기서열 분석

Total RNA purification는 Trizol Reagent를 사용하였으며 Total RNA로부터 mRNA분리는 PolyA Ttract mRNA isolation System(Promega)을 사용하였고, cDNA synthesis

method는 cDNA Synthesis Kit (Stratagene) 사용하였다. (진, 2003) cDNA library 제조는 *EcoRI* on the 5'(5'-AATTC-GGCACGAG-3') and *XhoI* on the 3' end 5'-TCGAGTTTTTTTTT-3')을 말단으로 갖는 순도 높은 cDNA를 100ng을 Uni-ZAP XR vector 1 μ g과 혼합하여 ligation 시켰다. Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene)에 ligation 혼합물을 첨가하여 상온에서 1시간 45분간 반응시켰다. cDNA library 클론의 염기서열 분석은 Gigapack III Gold Packaging extract kit(Stratagene)를 사용하여 packaging 한 후, 확보된 phage형태의 cDNA library 클론들을 helper phage를 이용하여 pBluescript SK(-) phagemid내로 kit를 이용하여 *in vivo* excision시킨 후, ampicillin이 함유된 LB agar 배지 12~18시간 배양하여 무작위로 선발하였다(Sambrook et al., 1989). 무작위로 선발된 플라스미드 DNA를 추출하여 염기서열을 분석하였다. 무작위로 선발된 클론들의 DNA 크기가 500 bp이상 되는 클론을 확보하여 AccuPrepTM Plasmid extraction kit (Amersham Pharmacia, Sweden)을 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하고 이 클론들의 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열은 Dynamic ET terminator cycle sequencing kit(Amersham Pharmacia, Sweden)를 사용하여 DNA를 증폭시킨 다음 RISA-384 automatic sequencer(Shimadzu, Japan)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 위에서 얻어진 염기서열(ESTs)은 NCBI의 blast search를 이용하여 조사하였다.

(4) 단핵균사 교배에 의한 육종

민자주방망이버섯의 포자는 유전적 차이가 있는 것으로 판명된 국내지역에서 채집한 버섯들로부터 포자를 분리하였다. 포자의 분리는 신선한 자실체의 갓을 주름부분을 아래로 향하게 하여 petri-dish에 놓고 24시간 동안 포자를 받는다. 받아진 포자를 멸균한 증류수에 10000배에서 100000배까지 희석시켜 YM 고체배지 상에서 한 plate에 포자수가 5개 이하로 되게 접종하였다. 같은 방법으로 유럽과 일본의 민자주방망이버섯 및 같은 민자주방망이속에 속하는 자주방망이버섯아재비와 광릉자주방망이버섯으로부터 포자를 분리하여 YM배지에서 배양하였고 받아되어 나온 포자를 PDA배지로 계대배양 하여 단핵균사를 얻었다. 이들 단핵균사를 2차배지상에서 대치배양 하였다.(Fig. 5, Table.4) 대치배양 된 균사를 다시 새로운 PDA 배지에 계대하여 배양하였고 clamp connection 확인과 DNA PCR을 통하여 이들의 교배가 되었는지 확인하였다.

Clamp connection 확인은 24 $^{\circ}$ C에서 20 \pm 5일간 배양한 균사를 70% Alcohol로 소독한 슬라이드 글라스 위에 needle로 얇게 펼쳐 놓고 methylen blue 또는 Congo red로 염색하여 광학현미경 상에서 관찰하였다. DNA PCR을 통한 확인은 genomic DNA를 추출하여 PCR하였고 PCR product를 electrophoresis하여 확인하였다. 교배가 확인된 균사는 PDA 배지에서 20 \pm 5일간 배양하여 단핵균사와 성장속도를 비교하였다.

Fig. 5. Cross mating of *Lepista*

Table 4. Cross mating of *Lepista*



	K7	K8	K7	KD7	K8	K11	K7	K2	K7	K7	K12	K8
K7												
K8	●											
K7	●	●										
KD7	●	●	●									
K8	●	●	●	●								
K11	●	●	●	●	●							
K7	●	●	●	●	●	●						
K2	●	●	●	●	●	●	●					
K7	●	●	●	●	●	●	●	●				
K7	●	●	●	●	●	●	●	●	●			
K12	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
K8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	

	K9	K11	K1	K2	K4	K3	K6	K10	KD6	KD7	KD1	KD2	K5
K9													
K11													
K1													
K2			●										
K4			●	●									
K3			●	●	●								
K6			●	●	●	●							
K10													
KD6													
KD7													
KD1					●								
KD2									●				
K5			●		●								

4) 균사 배양학적 특성 규명과 대량생산 및 자실체 생산

(1) 배양학적 특성

경상북도 경주시 석장동 동국대학교 뒷산에서 채집한 버섯의 형태적 특성에 따라 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)으로 동정하였고 분리 균사를 ACM (*Agrocybe cylindrace* medium) 한천 평판배지에 계대 배양하여 사용하였다. 또한 국내에서 분리한 (동구릉, 금산, 617, 38870, 30484)의 5종의 균주와 해외에서 분양받은 (포르투갈, 스위스, 프랑스)의 3종의 민자주방망이 버섯균을 사용하였다.

사용된 시약, 배지 및 배양 조건 본 연구에 사용된 배지제조를 위한 탄소원 및 효소활성측정 등의 시약은 Sigma사제의 특급시약을 사용하였으며, 질소원, 인산원은 일반 시약을 사용하였다. 복합배지용 시약은 Difco사제를 사용하였다.

복합배지의 균사 생육도에 관한 영향의 규명과 효소활성 측정 그리고 대량 액체 배양을 위해 이미 진균의 배양에 많이 사용되고 있는 여러 종류의 배지를 사용하였다 여기에서 생육이 가장 좋은 ACM배지를 접종원 으로 액체 및 고체 종균을 사용하였다. 균사생장에 적합한 온도 및 pH의 물리화학적 영향을 검토하기 위하여 온도는 15, 24, 30, 37, 40℃로 조절된 항온기에서 배양하여 생육도를 측정하였으며, pH는 4.0에서 11.0의 범위에서 수행하였다. 액체배양은 100 ml의 액체배지를 250-ml 삼각플라스크에 넣어 제조 후 멸균하여 사용하였다. 각 액체배지에 3%(v/v)의 전 배양된 액체 종균을 접종하여 24℃에서 10일간 120 rpm으로 진탕배양 하였다. 탄소원, 질소원(유기질소원, 무기질소원, 아미노산), 인산원, 비타민의 이용성에 대한 실험은 Czapek-Dox 최소배지를 사용하였다.

탄소원으로 당은 3.0%, 유기산은 0.1%를 첨가하여 실험하였으며, 질소원으로 0.3%의 유기·무기 질소원을 첨가하였다. 인산원은 0.1%를 최소배지에 첨가하여 사용하였으며, 비타민원은 최종농도가 0.5 mg/l 이 되도록 한 후 막 여과하여 사용하였다.

(2) 균사 대량 생산

대량생산을 위한 배지조성의 규명을 위하여 고체배지에서 가장 우수한 활성을 보인 LNM, ACM을 사용하였다 (Table 5). 여기에서 생육이 가장 좋은 ACM배지를 접종원으로 서 액체 및 고체 종균을 사용하였다. 균사생장에 적합한 온도로 24℃로 조절하여 항온기에서 배양하여 각 배지 조성별로 pH, 환원당, 효소활성측정 및 균사체 성장량을 측정하였다. 대량생산을 위해 15ℓ 생수병을 멸균하여 배지를 제조한 다음 고온고압 멸균 후 배양된 액체 종균을 5%로 접종하여 공기를 주입하여 배양하였다.

각 배지별로 15 ℓ 생수병에 배양된 균사체 배양액의 pH를 2일 간격으로 측정하였다. 각 배지에 민자주 방망이 버섯 액체 종균을 5% 접종한 후 시간대별로 배양액을 취하여 Watman No. 1 여과지로 여과하여 걸러진 균사체를 70℃에서 3 hr 동안 열풍건조하여 건조된 균사체의 무게를 측정하였다. 대량 액체배양시 조건별 pH 변화 측정 각 배지별로 15 ℓ 생수병에 배양하여 배양시간에 따른 균사체 배양액의 pH 변화를 3일 간격으로 측정하였다. 대량 액체배양시 조건별 세포내·외 효소활성 변화 측정 효소 활성도 측정은 각 배지별 배양시간에 따른 분비하는 효소의 활성도를 측정하기 위하여 각 배지에 민자주 방망이 버섯액체 종균을 5% 접종한 후 시간대별로 배양액을 취하여 Watman No. 1 여과지로 여과하였다.1) Extracellular enzyme 제조. 여과된 상등액을 효소원으로 하여 extracellular enzyme activity 측정에 사용하였다.

Table 5. The composition of complex media used in this study

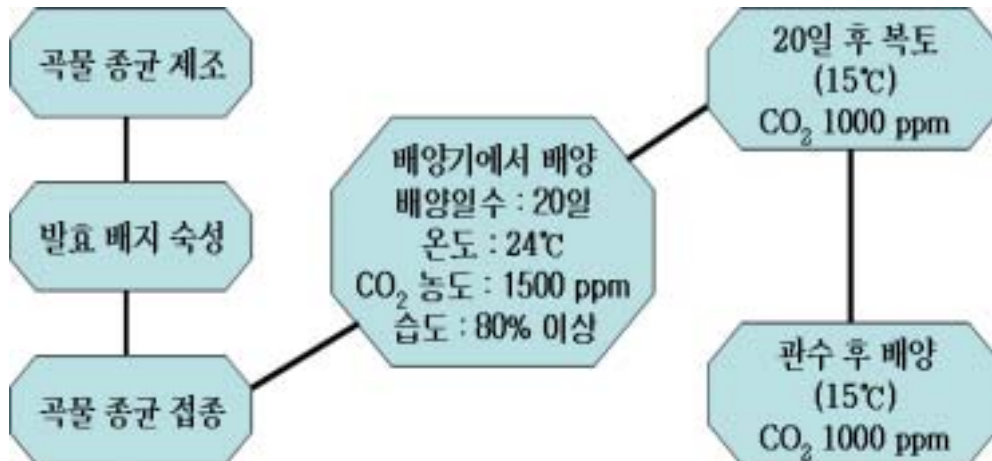
Composition	Composition (g/L)											
	LNM	CDM	MCM	MMM	MYGM	PDM	ACM	DTM	PIM	LEM	MEM	YMM
Glucose		30	20		4			20		20		10
Gluconate	1											
Sucrose	10											
Starch	5						20	30		20		
Peptone			2								5	5
Malt extract					10				70		20	3
Yeast extract			2		4		6	4	2	6		3
Tryptone	7											
Bacto- soyto ne							4	2	3			
CSL	4											
NaNO ₃		3										
K ₂ HPO ₄		1	1	1			1			1		
KH ₂ PO ₄			0.46	0.46			0.46			0.46		
NH ₄ (H ₂)PO ₄	3											
NH ₄ HPO ₄	1											
KCl		0.5										
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.01										
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5			0.5	0.6		0.5		
NaCl	0.5	0.5										
KCl	0.5											
FeCl ₃								0.02				
Pyridoxin								0.001				
Potato dextrose						24						
Agar	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

(3) 자실체 생산

액체배양한 균사로 곡물을 이용한 종균을 만들고 이를 퇴비배지에 접종, 복토, 저온처리 등을 거쳐 자실체를 생산하였다. 자실체 생산은 소규모 실험실 재배(3평)과 아울러 양송이 재배농가의 시설을 이용하여 대량재배를 실시하였다(Fig. 6).

Fig. 6 . Fruiting body induced by *L. nuda*.

① 곡물 종균의 제조



LNM액체배지에서 24°C에서 10일간 현탁 배양한(120 rpm), 액체 종균을 조, 찰수수, 흰콩, 찹쌀, 통밀, 옥수수, 팥, 현미, 율무, 보리쌀을 LNM배지를 이용 10배 희석하여 12시간 침지시킨 후 121°C 60분간 고압 멸균한 다음 3% 접종하여, 24°C에서 10일 간격으로 30일 동안 관찰하였다(Table 6).

Table 6. The spawn culture condition of grain types

glutinous rice	+++
wholemeal	+++
soybean	++
hulled millet	++
polished grain millet	+++
polished barley	+++
unshelled grains of adlay	+++
corn	+
brown rice	+++
red bean	+

② 퇴비배지(Compost) 제조

볏짚100 kg 당 계분 10~15%, 미강 5%, 요소 1.2~2.0%, 석고 1~3%를 배합하여 45~60°C에서 10일간 발효시켰으며 수분은 70~75%로 유지시켰다(Table 9).

③ 접종

실험실 재배에서는 가로 50cm, 세로 30cm, 높이 20cm의 플라스틱 상자를 배양용기로 사용하였다. 퇴비배지 한 층에 종균을 접종하고 다시 퇴비배지를 쌓아 종균을 접종하는 방식으로 하였다. 시설 농가를 이용한 접종은 가로 150cm, 세로 150cm의 대량 관에 위와 같은 방식으로

접종하였다.

CO₂ 농도를 높이기 위하여 실험실 배양시에는 플라스틱 상자를 닫아 공기의 유통을 제한하였으며 시설농가의 경우 신문으로 접종한 위를 덮고 재배사를 폐쇄하여 공기의 유통을 제한하였다. 적정량의 종균량을 결정하기 위하여 종균과 퇴비배지 비율을 달리하여 접종하였다 (Table 7).

Table 7. Spawn rate

Spawn	Compost	Growth
1	100	+
2	100	++
3	100	+++
4	100	+
5	100	+

Table 8. The culture condition of mycelium

temperature(°C)	24 °C
humidity(%)	80-85%
CO ₂ (ppm)	above 1500 ppm
period of time	20 days

④ 복토

민자주방망이버섯 균사가 퇴비배지에 충분히 활착한 후 복토하였다. 복토는 생태학적 특성에서 나타난 토양특성을 고려하여 황토, 황토와 토탄을 혼합하여 실시하였다(Table 9).

⑤ 재배

복토 후 10°C-12°C의 온도로 저온처리 한 후 15°C의 온도조건으로 배양하였고 습도는 90%-95%로 하였다. 8일동안 빛을 주었고 강력한 환기가 이루어지도록 하였다(Table 9).

Table 9. casing and Fruiting body condition

Casing	peat : yellow soil = 1 : 1				
Temperature	mycelium incubation; 24°C				
	low temperature shock 10°C It maintains with 15°C				
Humidity	90%-95%				
Light	8 days				
Composition of compost	rice	poultry	rice	urea(%)	gypsum(%)
	straw(kg)	manure(%)	flour(%)		
	100	10~15	5	1.2~2.0	1~3

Fermentation of compost	temperature 40~60℃	humidity 70%	period of time 10 days
----------------------------	-----------------------	-----------------	---------------------------

2. 결과 및 고찰

1) 민자주방망이버섯의 형태 및 생태학적 특성 규명

(1) 형태적 특성 분석

① 자실체 특성

민자주방망이버섯 자실체의 일반적인 특징은 어린자실체의 경우 색이 진하고 대가 굵으며 길고 성숙한자실체의 경우 어린자실체에 비해서 색이 연하며 갓이 큰 것일수록 대가 짧고 굵었다. 채집 지역별 자실체 특징은 Table 10과 같다. 대구 팔공산에서 채집한 민자주방망이버섯과 제주도에서 채집한 민자주방망이버섯은 일반적인 민자주방망이버섯과 형태적인 차이가 있었다. 팔공산에서 채집한 민자주방망이버섯은 일반적인 민자주방망이버섯에 비해 색이 연하고 갓의 형태가 아래로 더 내려온 원추형이었으며(Fig. 7-B) 제주도 민자주방망이버섯은 크기가 작고 색이 연하며 갓의 모양이 평평하였다(Fig 7-C). 광릉자주방망이버섯의 경우 갓의 크기가 크며 아이보리 색으로 민자주방망이버섯과는 큰 차이가 있다(Fig. 7-D).



A. *L. nuda* in Korea



B. *L. nuda* in Daegu Palgong Mt. Korea



C. *L. nuda* in Jeju island Korea



D. *L. irina*

Fig. 7. *Lepista nuda* and *Lepista irina*.

Table 10. Fruiting body's Morphologic characteristics of *L.nuda*

	stipe length (cm)	stipe thick (cm)	pileus size (cm)	pileus Shape	Color
Daegu Palgong Mt.	5~9	1~1.5	5~7	round and low cone shaped. waves shaped in the edge	pale purple young fruit body is pale brown
Gyeongbuk Gimcheon	5~9	1~2	5~10	round and flat the edge is getting up as it grows the edge is roundish and turned brown from the middle.	blueish purple and turned pink as time goes by.
Gyeonggi-do Yongin	5~7	0.7~1	4~7	round and flat.	pale purple and darker purple in the stipe than in the cap
Gyeongbuk Gyeongsan Yeungnam Univ.	5~10	0.7~1	5~7	round and ride up into inner part up headed as it grows	very pale purple
Chungnam Geumsan	4~6	0.5~0.7	3~5	round and ride up into inner part	blueish pale purple
Gyeongbuk Gyeongsan Daegu catholic Univ. I	4~5	0.3~0.6	3~5	round and flat in the edge up headed as it grows	redish pale purple
Gyeongbuk Gyeongsan Daegu catholic Univ. II	4~7	0.7~1.5	3~10	round and ride up into inner part	blueish purple
Jeju Island	3~7	0.3~0.6	5~8	round and flat in the edge up headed as it grows	very pale pinkish purple and greyish in the edge.
Gyeonggi-do Yongin <i>L. irina</i>	3~5	1~2	5~15	wide round and concave in the middle. wave shaped in the edge and up headed as it grows	pale ivory and grey in the middle

② 균사 특성

우리나라에서 채집한 민자주방망이버섯 균주의 균사는 대체적으로 부피가 있으나 밀도는 낮은 편이었다. 금산 민자주방망이버섯은 푸른색에 가까운 자줏빛이고 약간의 부피가 있으며 밀도는 낮고 금산 민자주방망이버섯 단핵균사는 2핵 균사보다 부피와 밀도가 높다. 동구릉에서 채집된 민자주방망이버섯 또한 푸른색에 가까운 자주색이며 부피가 있으며 밀도는 낮았다. 동구릉 민자주방망이버섯 단핵균사의 경우 민자주방망이버섯 균사 중 가장 색이 진

하였으며 2핵 균사보다 부피가 작으며 PDA배지에서 배양할 때 배지 속으로 깔려서 자란다. 덕유산 민자주방망이버섯 균사는 부피가 있으나 산발적으로 부피차이가 나며 가장자리가 푸른색에 가까운 자주색이며 PDA배지에서 배양할 때 배지색이 접종부위부터 진한 갈색으로 변한다. 덕유산 민자주방망이버섯의 단핵균사는 2가지 유형으로 하나는 2핵 균사에 비해 색은 더 진하고 밀도감이 있으며 다른 하나는 색이 연하나 부피와 밀도는 크다. 인천 민자주방망이버섯 균사는 진한 푸른색이며 자라는 동안 균사 활력 부위의 색깔 차이로 2개

정도 의 띠가 생긴다. 하양 민자주방망이버섯 균사는 연한 자주색으로 부피가 있으며 균사 가장자리보다 가운데 색이 더 진하다. 제주도 민자주방망이버섯 균사는 부피가 크며 색은 연한 푸른색을 띤다. 균사 밀도는 중간 정도이며 PDA배지에서 배양할 때 배지의 색이 처음에는 연한 회색으로 변하다가 점점 진한 적갈색으로 변한다. 영대 민자주방망이버섯 균사는 색이 매우 진하고 균사가 자랄 때 나무의 나이트 같은 무늬가 생긴다.

광릉자주방망이버섯 균사는 부피와 밀도는 보통이며 연한 노란색을 띤다. 광릉자주방망이버섯 단핵균사의 경우 연한 노란색이며 부피가 있으며 밀도는 적다. 주로 배지에 깔려서 자라고 균사가 자라면서 산발적으로 뭉친 듯이 보이는 흰색 덩어리가 생긴다.

자주방망이아제비버섯 균사는 진한 푸른색으로 성장속도가 매우 빠르며 부피, 밀도 모두 크다. 균사활력이 있는 부위와 그렇지 않은 부위의 색깔 차이가 확연하다.

일본 민자주방망이버섯 균사는 전체적으로 수분이 많고 질기며 성장속도가 매우 빠르다. 일본 민자주방망이버섯 균사는 두 가지 유형으로 하나는 아이보리 색으로 마치 털을 눕혀 놓은 것처럼 결이 있고 질기며 수분이 많다. 다른 하나는 흰색으로 약간의 부피가 있으며 마치 눈이 내린 것처럼 보인다. 접종부위에서 1mm 가량은 부피가 없으며 1mm떨어진 부위의 균사가 가장 부피감이 있어 띠처럼 보인다.

유럽 민자주방망이버섯 균사는 성장속도 느리며 비교적 균사밀도가 높고 색은 노란색에 가깝다. 스위스 민자주방망이버섯 연한 노란색이며 배지에 깔려서 자라며 성장속도가 유럽균사 중 가장 느리다. 프랑스 민자주방망이버섯 균사와 포르투갈 민자주방망이버섯 균사는 연한 노란색이며 성장속도는 보통이다.

균사 성장속도를 비교해 보면 plate가 가득 차는데 걸린 시간은 일본균사가 10일로 성장속도가 가장 빨랐으며(Table 12) 한국균사는 하양 민자주방망이버섯과 인천, 제주도가 15일로 빠른 편이었다(Table 11). 한국 민자주방망이버섯의 일반적인 속도는 약25일이었으며 자주방망이아제비와 본교자주방망이버섯이 15일이었으며 광릉자주방망이버섯이 25일로 비교적 느린 성장을 보였다. 한국 단포자의 경우 자주방망이버섯이 민자주방망이버섯보다 속도가 확연히 빠르게 나타났으며 민자주방망이버섯의 경우 덕유산sp와 금산sp, 동구룡sp가 빠른 편이었으며 색은 동구룡이 가장 진하였다(Table 13). 자주방망이sp의 경우 약 15일 정도 걸렸는데 광릉자주방망이는 이보다 느리게 25일정도 걸렸다. 유럽균사 중에는 프랑스가 25일로 가장 빠르게 자랐으며 스위스가 가장 느리게 자라는 것으로 나타났다(Table 14).

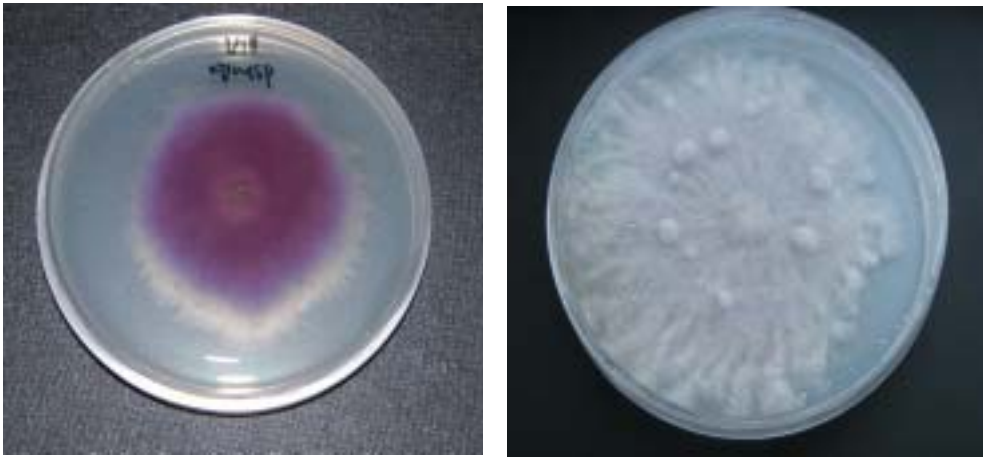


Fig. 8. Mycelia of *Lepista nuda*.

Table 11. Growth rate of *Lepista* in Korea

	KD2		KD3		KD1		KD4		KD5				KD6		KD7		KD8	
0day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0
3days	0.5	0.3	0.7	1	1	1	0.9	1	0.6	0.9			0.6	0.9	0.6	0.9	0.7	0.7
	0.5	0.3	0.7	1	1	1	0.9	1	0.6	0.9			0.6	0.9	0.6	0.9	0.7	0.7
7days	2.2	2.5	2	2	3	3	3.4	3	2.8	2.5			2.5	2.5	2.5	3	1.5	1.7
	1.7	2.2	1.3	1	2	2	2.5	2	2.2	1.6			1.9	1.6	1.9	2.1	0.8	1
10days	3	3.5	2.8	2.8	3.5	3.5	3.5	3.5	2.2	3			3.4	3	3	3.5	2.2	1.8
	0.8	1	0.8	0.8	0.5	0.5	0.1	0.5	0.6	0.5			0.9	0.5	0.5	0.5	0.7	0.1
14days	3.5	full	3.5	3.5	full	full	full	full	3.5	3.5			full	full	full	full	2.7	2.8
	0.5	1	0.7	0.7	1	1	1	1	1.3	0.5			1.1	1.5	1.5	1	0.5	1
20days	full																	
	1																	
25days			full	full					full	full							full	full
			1	1						1	1							1.8

Table 12. growth rate of *Lepista* in Japan

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
0day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3days	1.7	1.2	2	1.9	1.7	2.5	1.8	2	1.7	2
	1.7	1.2	2	1.9	1.7	2.5	1.8	2	1.7	2
7days	4	3.4	full	full	3.5	full	full	full	full	full
	2.3	2.2	2.5	2.6	1.8	2	2.7	2.5	2.8	2.5
10days	full	full	full	full	full					
	0.5	1.1	0	0	1					

Table 13. growth rate of *Lepista* single spore isolates in Korea

	K2		K8		K8		K8		K7		K7			K12		K11	
0day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0
3days	0.5	0.5	1	0.8	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.5		0.7	0.7	0.2	0.2
	0.5	0.5	1	0.8	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.5		0.7	0.7	0.2	0.2
7days	2	1.8	1.5	1.7	0.2	0.4	0.5	0.5	1.5	1.7	1.2	1		2.2	2	1.2	1.5
	1.5	1.3	0.5	0.9	0.1	0.3	0.3	0.2	1.3	1.5	0.8	0.5		1.5	1.3	1	1.3
10days	2.2	2	2.2	2	0.5	0.5	1.2	0.9	1.7	1.7	1.9	2		3	2.7	1.5	2
	0.2	0.2	0.7	0.3	0.3	0.1	0.7	0.4	0.2	0	0.7	1		0.8	0.7	0.3	0.5
14days	2.5	2.8	2.7	2.7	0.8	0.8	1.5	1.5	2	1.8	2.2	2.5		full	full	2	2.7
	0.3	0.8	0.5	0.7	0.3	0.3	0.3	0.6	0.3	0.1	0.3	0.5		1.5	1.8	0.5	0.7
20days																	
25days	3.5	3.5	full	full	1.4	1.5	2.5	2.7	2.5	2.5	3	3.2				full	full
	1	0.7	1.8	1.8	0.6	0.7	1	1.2	0.5	0.7	0.8	0.7				2.5	1.8

Table 14. growth rate of *Lepista* in Europe

	E1		E2		E3					
0day	0	0	0	0	0	0				
	0	0	0	0	0	0				
3days	0.7	0.7	0.3	0.3	0.6	0.7				
	0.7	0.7	0.3	0.3	0.6	0.7				
7days	1.5	1.5	1.1	1.1	1.5	1.5				
	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8				
10days	1.7	2.2	1.5	1.4	1.7	1.9				
	0.2	0.7	0.4	0.3	0.2	0.4				
14days	2.5	2.8	2	1.7	2.5	2.5				
	0.8	0.6	0.5	0.3	0.8	0.6				
20days										
25days	full	full	2.5	2.5	3.2	3.2				
	2	1.7	0.5	0.8	0.7	0.7				

③ 포자특징

채집된 *Lepista nuda*의 포자는 타원형이며 푸른색이나 붉은색을 띠었으며 *Lepista nuda* 간의 형태적 차이는 거의 없었으나 용인에서 채집된 *L. nuda*는 물방울형 이었다. *Lepista irina*는 *Lepista nuda*와 같이 타원형이었고 포자색은 노란색을 띠었다(Table 15).

Table 15. Spore characters of *L. nuda* and *L. irina*

Number	Species	shape	Color
1	<i>L. nuda</i>	oval shaped near to round	just red in the middle
2	<i>L. nuda</i>	oval shaped	violet
3	<i>L. nuda</i>	polka dots	violet
4	<i>L. nuda</i>	oval shaped	violet
5	<i>L. nuda</i>	oval shaped	violet
6	<i>L. irina</i>	oval shaped	Yellow

(2) 생태학적 특성 규명

① 토양의 수분, 유기물, 전질소 함량 및 산성도

민자주방망이버섯 서식지의 식생은 떡갈나무 (*Quercus dentata*), 신갈나무 (*Quercus mongolica*), 밤나무 (*Castanea crenata*), 참나무과의 낙엽관목 그리고 소나무 (*Pinus densiflora*) 관목이 우점하고 있고, 고도가 비교적 낮으며 낙엽이 쌓인 음지의 습한 장소에 군생하였다. 조사된 민자주방망이버섯 서식지의 10월과 11월의 30년간 최고기온은 13.4°C ~ 15.4°C 였으며, 최저기온은 6.1°C ~ 8.6°C, 강수량은 41.8 mm ~ 52.4 mm 이었다.

민자주방망이버섯 서식지는 대부분 낙엽 아래 부식토가 풍부한 토양으로 이루어져 있으므로 버섯의 자실체가 형성될 때에는 낙엽 이외에 토양도 균사의 성장에 필요하다는 것을 알 수 있다. 이러한 경향은 같은 송이과 (*Tricholomataceae*) 버섯인 양송이 (*Agaricus bisporus*) 의 재배에서도 알 수 있다. 그리고 경북 하양지역에서는 민자주방망이버섯 균사가 낙엽이 없는 토양 속에서도 발생하였는데 이는 균사가 나뭇잎과 토양 두 곳 모두에서 활착이 가능하다는 것을 나타낸다. 민자주방망이버섯이 서식하고 있는 토양의 수분, 유기물, 전질소의 함량 및 토양의 pH에 대한 분석 결과는 Table 16 에 나타내었다.

토양의 수분 함량은 18.8~43.1%의 범위로 평균 29.7%이었으며, 덕유산에서 채집된 토양의 수분 함량이 43.1%로 가장 높았고, 경기 김포 지역에서 가장 낮은 18.9%의 수분 함량을 나타내었다. 이것은 강원도 4개 지역의 낙엽활엽수림 토양의 평균 수분 함량이 42.4%라고 보고한 이 등(1999)의 결과와 비교할 때 민자주방망이버섯의 서식지가 비교적 수분 함량이 낮은 지역이라는 것을 알 수 있다. 그러나 심 등(1998)이 보고한 경남 충무와 강원도 중왕산 지역의 토양 수분 함량 13.3%와 경남 온산 지역과 서울 관악산 지역의 수분 함량 16.6%의 결과와 비교하여 보면

민자주방망이버섯 서식지의 토양이 2배 이상 높은 수분 함량을 나타내고 있음을 알 수 있다.

조사지역의 유기물 함량은 20.2~39.9%의 범위로서 평균 32.1%로 나타났다. 인천 강화 마니산이 39.9%로서 가장 높았고 경북 하양이 20.15%로 가장 낮았다. 이러한 결과는 이(1981)가 조사한 전국 산림 토양의 평균값인 3.2%보다 10배 이상 높게 분석되었으며, 이 등(1999)의 강원도 지역 낙엽활엽수림의 평균 유기물 함량 7.52%보다 4배 이상 많은 함량을 나타내었다. 또한 심 등(1998)이 보고한 충무와 정선(5.68%), 울산과 서울 관악산 지역(8.29%)의 유기물 함량과 비교해 볼 때 민자주방망이버섯 서식지의 토양이 약 4배 이상의 높은 유기물 함량을 보이는 것으로 분석되었다. 그리고 유기물 함량이 침엽수림에서 7.81%, 활엽수림에서 6.70%, 그리고 초지에서는 6.51%를 나타낸다고 보고한 심 등(1998)의 결과보다 민자주방망이버섯 서식지의 토양이 4배~5배 높은 유기물 함량을 나타내었다. 또한 오대산 일대의 산마늘 (*Allium victorialis*) 서식지 토양의 유기물 함량 11.6%~13.5% (Shu *et al.* 1996)와

여천 재석산 토양의 유기물 함량 19.2% (문 등 1998) 보다도 높은 것으로 분석되었다.

전질소의 함량은 0.39%~0.98%의 범위로서 경북 경산이 0.98%로 가장 높았고 인천 부평이 0.39%로 가장 낮았으며 평균은 0.74%로 나타났다. 이러한 결과는 문 등(1998)이 조사한 여천공단 주변지역의 토양 전질소 함량 0.47%에 비하여 매우 높은 함량을 나타내었다. 토양의 질소 함량 증가는 그 지역의 식물종 다양성은 감소시키는 반면, 생물량은 증가시키기 때문에 지역의 특정 종에 대한 우점도는 증가된다고 알려져 있다(Mun and Whitford 1989, Tilman 1987). 본 조사지역은 참나무과 낙엽관목과 소나무과 침엽관목이 혼재하는 지역의 특성상 광 차단효과가 있어서 다른 초본식물이 거의 성장하지 못하는 환경이다. 또한 민자주방망이버섯과 같은 균류나 미생물은 유기물 분해 속도가 느리므로 (Myrold 1990) 다른 식물이 우점하는 서식지의 토양에 비하여 상대적으로 유기물 함량이 높으며 또한 전질소의 함량도 높은 것으로 사료된다.

조사지역의 토양 산성도는 pH 3.60~5.60 범위로서, 경북 경산이 pH 5.60으로 가장 높았고, 인천 부평 지역의 토양이 pH 3.60으로 가장 낮았으며, 평균 pH는 4.57의 산성 토양인 것으로 분석되었다. 이러한 결과는 강원도 지역 낙엽활엽수림의 평균 pH 4.85(이 등 1999) 보다 낮은 값이며, 안과 이(1998)가 보고한 지리산 물박달나무림(*Betula davurica*)의 토양 pH 4.54~4.56의 결과와는 유사하였다. 또한 산마늘 서식지의 토양 pH가 5.3이라고 보고한 Shu 등(1996)의 결과와 심 등(1998)의 경남 충무의 토양 (pH 5.12), 강원도 중왕산 토양(pH 6.13)에 비해서도 민자주방망이버섯의 서식지 토양 pH가 더 낮았다. 그리고 오염이 비교적 심한 울산의 온산 지역 토양은 pH 3.50~6.40, 서울 관악지역은 pH 3.95~4.56의 범위로서 이들 지역의 평균 pH 4.41과 4.21(심 등 1998)보다는 조금 더 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 토양의 산성도가 높을수록 식물의 생장이 제한되는 것으로 알려져 있으나 (Marschner 1991) 민자주방망이버섯이 서식하기 위한 토양 pH는 4~5 정도의 산성조건이 적합하다는 것을 알 수 있다.

② 토양 무기물 함량 분석

민자주방망이버섯 서식지의 토양 무기물 함량을 분석한 결과는 Table 17과 같다.

토양의 완충능력을 평가하는 중요한 인자가 되는 무기물 함량은 지역 간에 차이가 많은 것으로 나타났다. 가장 농도가 높은 무기물은 평균 함량 1024 ppm의 Fe로서 768 ppm에서 1,281 ppm의 범위로 분석되었다. 그 다음은 K (183.25 ppm), Mn (21.88 ppm), Ca (2.02 ppm), Zn (1.46 ppm), Mg (0.51 ppm)의 순으로 나타났는데 0.39 ppm에서 0.59 ppm의 범위를 보인 Mg의 함량이 가장 낮았다. 그리고 지역 간에 함량의 차이가 가장 심한 것은 Ca로서 함량이 가장 낮은 경기 용인지역이 0.21 ppm이었고, 가장 높은 경북 경산이 4.31 ppm으로서 20.5배의 차이가 있는 것으로 나타났다. 지역 간의 차이가 가장 적은 무기물은 Zn으로서 가장 낮은 곳이 인천 부평의 1.29 ppm이었고 전북 덕유산이 1.57 ppm으로 가장 높았다.

이 등(1999)은 강원도 낙엽활엽수림 토양에 존재하는 치환성양이온을 분석한 결과 Ca가 가장 많이 함유되어 있었고, Mg와 K, Na 순으로 많이 함유되어 있음을 보고한 바 있다. 황과 정(1999)도 울릉도 산마늘 서식지 토양을 분석한 결과 Ca가 가장 많이 함유되어 있다고 하였으며, 다음으로는 Mg와 K의 순이라고 보고한 바 있다. 그러나 민자주방망이버섯 서식지의 토양에서는 가장 농도가 높은 무기물이 평균 1,024 ppm의 Fe로 나타났으며 K, Mn, Ca, Zn, Mg의 순으로 검출되어 위의 연구결과들과 다르게 나타났다. 한편 Ca의 함량이 높은 토양에서는 N의 함량도 높은 것으로 나타나 두 원소의 함량 간의 상관관계가 가장 높게

나타났으며 ($r=0.86$, $p=0.05$), 그 다음으로 Ca와 Mn ($r=0.76$, $p=0.05$), K와 Fe ($r=0.74$, $p=0.1$), Mn과 N ($r=0.73$, $p=0.1$), Mg와 N ($r=0.67$, $p=0.1$)의 순으로 두 원소의 함량 사이에 양의 상관관계가 있는 것으로 분석되었다. 한편, 흙 속에 균사가 퍼져 있었던 경북 하양 지역 토양의 K의 함량은 294 ppm으로 조사지역 중 가장 높았고 (Fig. 9), 경기 용인 지역에서도 257 ppm으로 높게 나타났으나, 이들 지역에서의 유기물 함량은 20.2%와 22.9%로서 오히려 가장 낮은 것으로 분석되어 민자주방망이버섯 서식지에서는 유기물의 함량이 높은 곳일수록 K의 함량은 낮아지는 경향을 보였다($r=-0.90$, $p=0.05$). 이러한 결과는 민자주방망이버섯의 재배를 위해서는 K의 함량을 특히 높여주는 환경 조성이 필요할 것으로 판단되며, 민자주방망이버섯의 균사 및 자실체 성장을 위한 대사에 있어서 유기물 함량과 K 함량 사이의 관계 및 서식환경 등에 대한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Table 16. The soil properties on the habitats of *Lepista nuda*

Sampling sites	Soil moisture (%)	Organic matter (%)	Total N (%)	pH
Inchon Mt. Mani	38.9 ± 0.92	39.85 ± 2.30	0.74 ± 0.02	4.09 ± 0.03
Inchon Bupeong	22.4 ± 0.39	34.60 ± 1.53	0.39 ± 0.03	3.60 ± 0.06
Gyeonggi Kimpo	18.84 ± 0.52	39.67 ± 2.77	0.81 ± 0.01	4.15 ± 0.07
Gyeonggi Yongin	25.90 ± 0.20	22.93 ± 0.36	0.55 ± 0.01	4.47 ± 0.13
Jeonbuk Mt. Deogyu	43.05 ± 0.17	32.30 ± 1.74	0.95 ± 0.03	4.99 ± 0.12
Gyeongbuk Gyeongsan	37.99 ± 0.04	35.47 ± 1.40	0.98 ± 0.04	5.60 ± 0.10
Gyeongbuk Hayang	20.46 ± 0.03	20.15 ± 1.75	0.74 ± 0.02	5.07 ± 0.03
Mean ± SD (N=7)	29.7 ± 10.02	34.14 ± 7.77	0.74 ± 0.02	4.48 ± 0.69

Table 17. The contents of inorganic ions of soil collected from *Lepista nuda* habitats

Sampling site	Soil inorganic matters(ppm)					
	Mg	Ca	K	Mn	Fe	Zn
Inchon Mt. Mani	0.59 ± 0.00	2.07 ± 0.00	109.64 ± 0.18	6.76 ± 0.03	767.70 ± 0.09	1.38 ± 0.01
Inchon Bupeong	0.39 ± 0.00	0.30 ± 0.00	180.13 ± 1.67	4.23 ± 0.00	1,099.73 ± 0.50	1.29 ± 0.01
Gyeonggi Kimpo	0.52 ± 0.00	3.03 ± 0.01	129.46 ± 0.16	12.53 ± 0.03	802.61 ± 0.16	1.38 ± 0.01
Gyeonggi Yongin	0.51 ± 0.00	0.21 ± 0.00	256.81 ± 0.12	4.78 ± 0.02	1,280.52 ± 0.16	1.56 ± 0.00
Jeonbuk Mt. Deogyu	0.56 ± 0.00	2.05 ± 0.01	157.88 ± 0.72	35.08 ± 0.04	1,211.61 ± 0.72	1.57 ± 0.00
Gyeongbuk Gyeongsan	0.51 ± 0.00	4.31 ± 0.00	154.80 ± 0.52	80.84 ± 0.33	910.69 ± 0.04	1.51 ± 0.00
Gyeongbuk Hayang	0.48 ± 0.02	2.20 ± 0.00	294.04 ± 0.20	8.95 ± 0.01	1,095.55 ± 0.28	1.56 ± 0.00
Mean ± SD (N=7)	0.51 ± 0.06	2.02 ± 1.45	183.25 ± 67.65	21.88 ± 28.10	1,024.06 ± 199.75	1.46 ± 0.11

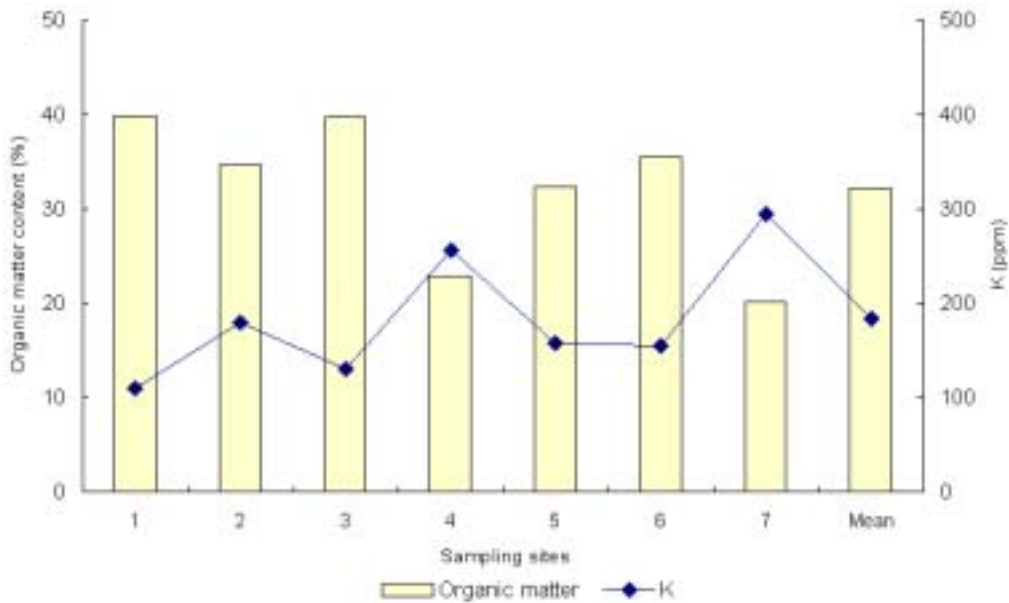


Fig. 9. Mean contents of soil organic matter and K collected from seven different *Lepista nuda* habitats.

1. Incheon Mt. Mani, 2. Incheon Bupyeong, 3. Gyeonggi Kimpo, 4. Gyeonggi Yongin, 5. Jeonbuk Mt. Deogyu, 6. Gyeongbuk Gyeongsan, 7. Gyeongbuk Hayang.

2) 유전적 특성 분석 및 육종

(1) RAPD 분석

Primer screening을 알아보기 위하여 국내 7개 지역에서 채집한 민자주방망이버섯과 광릉 자주방망이버섯 및 자주방망이아재비와 일본에서 채집한 민자주방망이버섯 2종류, 프랑스 민자주방망이버섯의 RAPD분석에 사용된 random primer는 총 40개 였으며 그 중 3번의 반복 실험을 통해 분류군 전체 반응이 일어난 primer는 5개였고 primer의 G+C content가 60-70%로 매우 높았다. 이러한 결과는 일반적으로 primer의 염기구성이 DNA 증폭 길이에

커다란 영향을 미치며(Williams et al., 1990; Klein-Lankhorst et al., 1991) random primer에 있어서 G+C content가 높을수록 DNA 증폭이 매우 잘 일어난다는 결과와 일치하였다.(Fritsch et al., 1993)

PCR 과정을 통하여 증폭된 RAPD fragment는 약 4000bp에서 150 bp사이의 구간에서 관찰되었으며, RAPD marker 수는 primer마다 17개에서 22개의 band가 나타났다. 종간에는 많은 차이를 나타내었으며, 종 내의 지역 개체군 간에 동일하거나 서로 다른 band 양상이 관찰되었다. 각 primer에 대한 분석결과는 다음과 같다(Fig. 10, 11, 12, 13, 14).

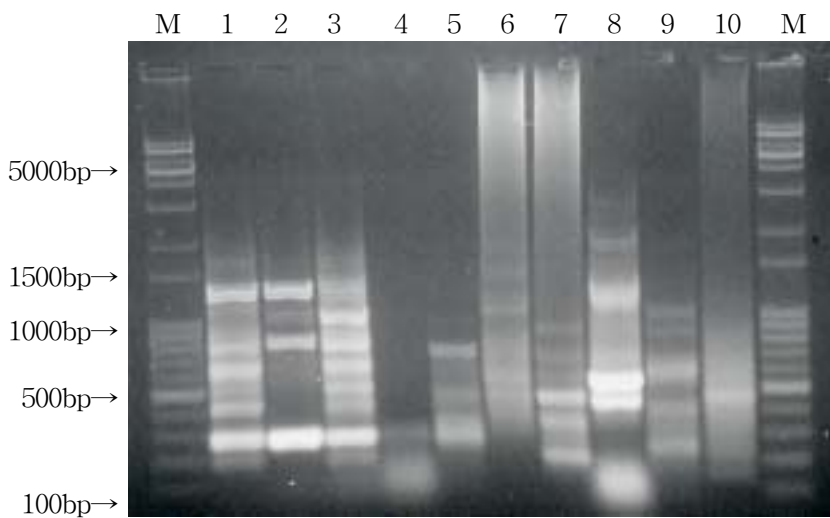


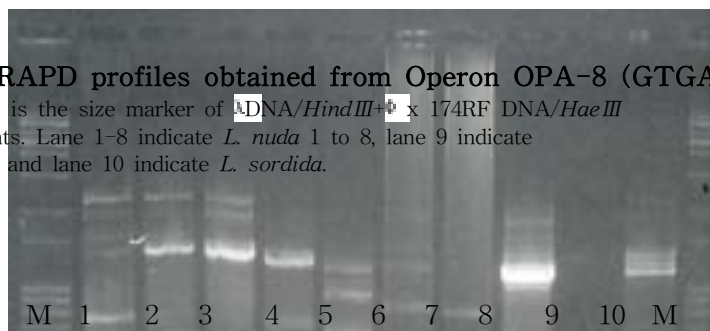
Fig. 10. RAPD profiles obtained from Operon OPA-3 (AGTCAGCCAC).

Lane M is the size marker of λ DNA/*Hind*III + Φ x 174RF DNA/*Hae*III fragments. Lane 1-8 indicate *L. nuda* 1 to 8, lane 9 indicate *L. irina* and lane 10 indicate *L. sordida*.



Fig. 11. RAPD profiles obtained from Operon OPA-8 (GTGACGTAGG).

Lane M is the size marker of λ DNA/*Hind*III+ Φ x 174RF DNA/*Hae*III fragments. Lane 1-8 indicate *L. nuda* 1 to 8, lane 9 indicate *L. irina* and lane 10 indicate *L. sordida*.



5000bp→

1000bp→

500bp→

200bp→

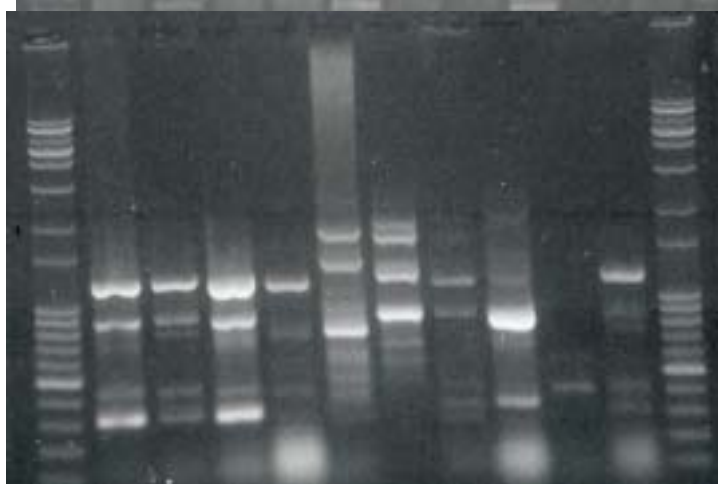


Fig. 12. RAPD profiles obtained from Operon OPA-12 (TCGGCGATAG).

Lane M is the size marker of λ DNA/*Hind*III+ Φ x 174RF DNA/*Hae*III fragments. Lane 1-8 indicate *L. nuda* 1 to 8, lane 9 indicate *L. irina* and lane 10 indicate *L. sordida*.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

5000bp→

1000bp→

200bp→

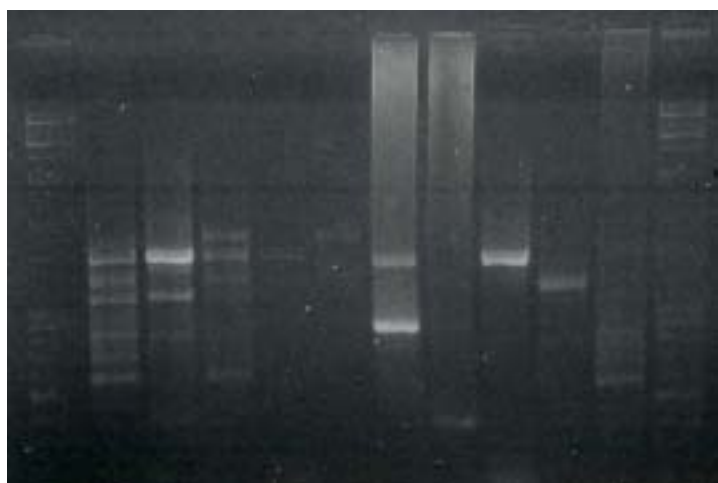


Fig. 13. RAPD profiles obtained from Operon OPA-13 (CAGCACCCAC).

Lane M is the size marker of λ DNA/*Hind*III+ Φ x 174RF DNA/*Hae*III fragments. Lane 1-8 indicate *L. nuda* 1 to 8, lane 9 indicate *L. irina* and lane 10 indicate *L. sordida*.

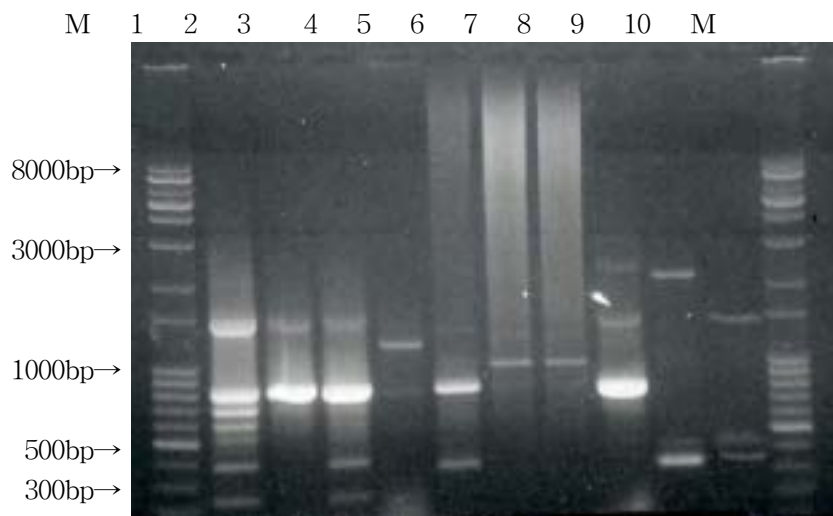


Fig. 14. RAPD profiles obtained from Operon OPB-6 (TGCTCTGCCC).

Lane M is the size marker of λ DNA/*Hind*III+ Φ x 174RF DNA/*Hae*III fragments. Lane 1-8 indicate *L. nuda* 1 to 8, lane 9 indicate *L. irina* and lane 10 indicate *L. sordida*.

Table 18. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei-Li's genetic distance coefficient based on RAPD analysis

	sample1	sample2	sample3	sample4	sample5	sample6	sample7	sample8	sample9	sample10
sample1		0.22472	0.26966	0.29213	0.44944	0.51685	0.42697	0.41573	0.4606	0.3483
sample2			0.22472	0.20225	0.31461	0.35955	0.29213	0.25843	0.3033	0.2809
sample3				0.29213	0.40449	0.44944	0.38202	0.34831	0.3707	0.3707
sample4					0.24719	0.31461	0.24719	0.28090	0.2809	0.2809
sample5						0.24719	0.31461	0.28090	0.3258	0.3707
sample6							0.29213	0.25843	0.3258	0.3483
sample7								0.28090	0.2584	0.2584
sample8									0.3146	0.3146
sample9										0.2696
sample10										

Above diagonal: Total character differences

1-KyungGi Kimpo *L. nuda*

6-Japan *L. nuda*(ACM)

2-Gumsan *L. nuda*

7-Japan *L. nuda*(NBRC)

3-Palgong Mt.

8-France *L. nuda*

4-Hayang *L. nuda*
5-Jeju island *L. nuda*

9-*L. irina*
10-*L. sordida*

5개의 random primer로부터 자료 분석을 위한 187개의 scabble RAPD marker가 최종 분석에 이용되었고, 이를 근거로 Nei-Li의 genetic distance를 이용하여(Nei, 1973) 비유사도 지수행렬을 계산하였다(Table 18).

비유전적 지수행렬에 의하면 민자주방망이버섯의 종내 변이가 0에서 0.51685사이로 나타났으며 광릉자주방망이버섯의 변이는 0.2584에서 0.4606사이고, 자주방망이아제비의 변이는 0.2696에서 0.3707사이로 나타났다. 국내 내륙에서 채집된 민자주방망이버섯의 변이가 0.0225에서 0.29213사이였고 일본민자주방망이버섯의 변이가 0.24719에서 0.51685사이로 가장 높은 변이를 나타냈으며 프랑스 민자주방망이버섯의 변이가 0.25843에서 0.41573사이로 나타났다. 제주도 민자주방망이버섯의 경우 0.44944의 변이를 나타내었다. 또한 제주도 민자주방망이버섯의 경우 내륙의 민자주방망이버섯과의 변이 차이가 0.15731이었으며 일본의 민자주방망이버섯과의 변이 차이가 0.06741이었고 광릉자주방망이버섯과의 변이차가 0.01116으로 국내 민자주방망이버섯보다 일본 민자주방망이버섯과의 변이차가 적었으며 다른 종인 광릉자주방망이버섯과 유전적으로 더 유사하게 나타났다.

비유사도 지수행렬을 근거로 전체 분류군을 PAUP(4.0b) program을 이용하여 UPGMA를 수행한 결과 phylogenetic tree를 얻을 수 있었다. Band의 변이를 기초로 하여 분석한 결과 모두4개의 cluster를 얻을 수 있었다. 국내 내륙의 민자주방망이버섯이 하나의 cluster를 이루었으며 제주도 민자주방망이버섯과 일본민자주방망이버섯(ACM) 그리고 프랑스 민자주방망이버섯이 하나의 cluster를 이루었다. 그리고 광릉자주방망이버섯과 일본민자주방망이버섯(NBRC)이 하나의 cluster를 이루었고 자주방망이아제비가 하나의 cluster를 이루었다.(Fig. 15, 16)

이 결과로 보아 지역별 특성은 서식지의 지리적 거리와 비교하여 유전적으로 많은 차이를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 제주도 민자주방망이버섯은 민자주방망이버섯이 지리적 변이에 의한 차이라고 판단하기 보다는 다른 종으로 사료된다.

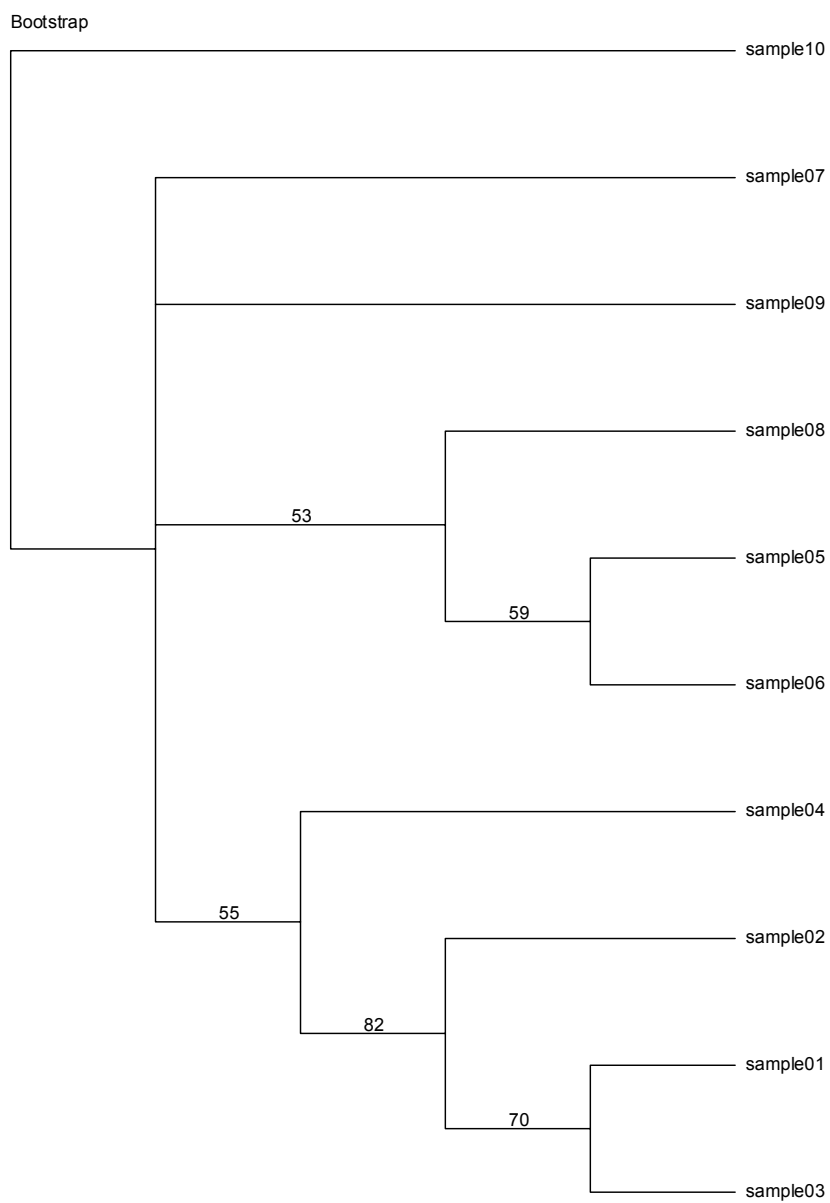


Fig. 15. Strict consensus tree of the bootstrap tree about *Lepista* RAPD result.

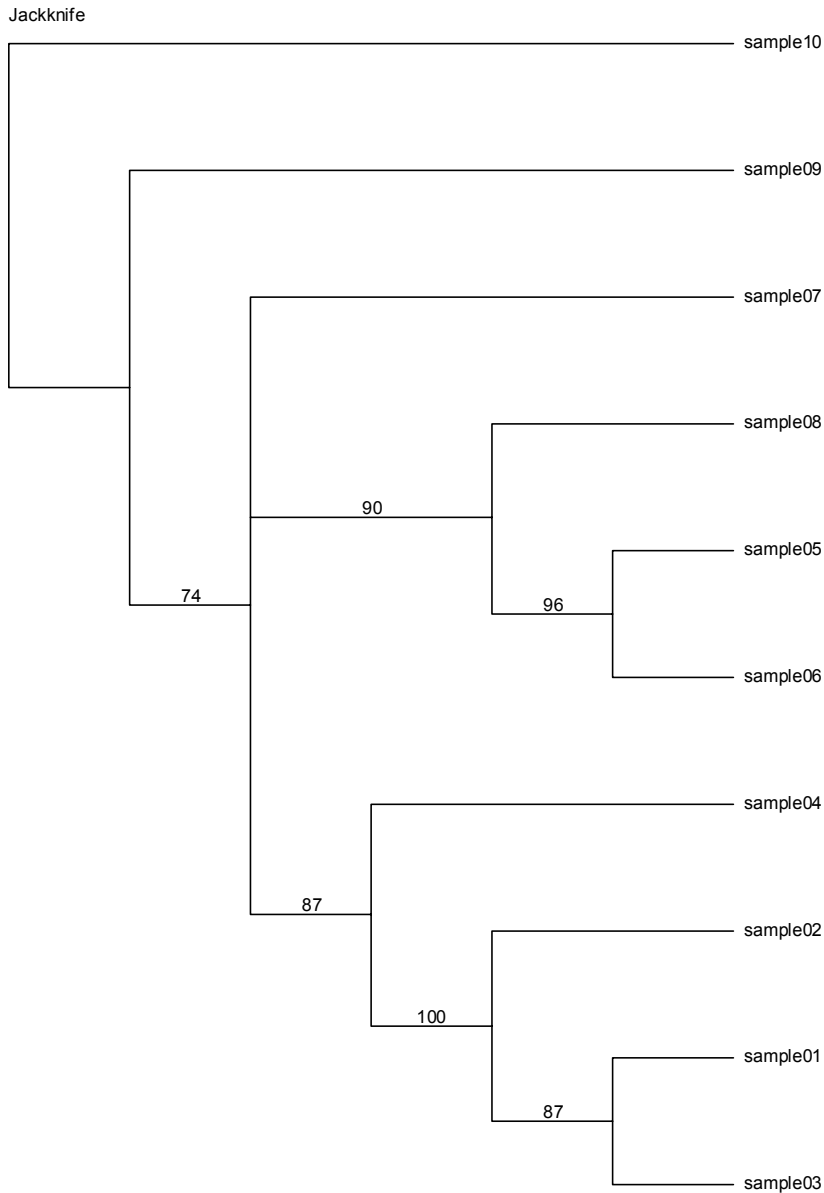


Fig. 16. Strict consensus tree of the jack-knife tree about *Lepista* RAPD result.

(2) ITS 분석

국내 5개 지역에서 채집된 민자주방망이버섯 균주와 프랑스, 스위스, 포르투갈에서 채집된 3종류의 민자주방망이버섯 균주, 일본에서 채집된 2종류의 민자주방망이버섯의 균주 및 자주방망이버섯속의 광릉자주방망이버섯, 자주방망이아제비에 대한 종내 및 종간의 유전관계를 밝히기 위해 ITS I 과 ITSII 그리고 5.8S 영역의 약 673개의 염기배열을 분석하였다. 또한 12개 균주에 대한 염기서열을 비교한 multiple alignment를 시행하여, 이 결과를 근거로 Nei-Li의 genetic distance를 이용한 비유사도 지수행렬을 계산하여 Table 19에 나타내었다

(Nei, 1973). 그리고 neighbor-joining method로 분석하여 phylogenetic tree를 작성하였다.(Fig.17)

유전적 비유사도 지수행렬에 의하면 민자주방망이버섯의 종내 변이는 0에서 0.04951사이로 나타났으며, 광릉자주방망이버섯과는 0.06683에서 0.29196사이의 변이를 나타내었다. 그리고 자주방망리아재비버섯과는 0.02225에서 0.29272사이의 변이를 나타내었다. 그리고 광릉자주방망이버섯과 자주방망리아재비와는 0.08030의 변이를 나타내었다.

정렬된 염기서열을 근간으로 전체 분류군을 PAUP(4.0b) program을 이용하여 UPGMA를 수행한 결과 phylogenetic tree를 얻을 수 있었다. 염기변이에 기초하여 neighbour-joining(NJ) 분석 결과, 제주도를 제외한 국내 민자주방망이버섯과 일본의 2 군주, 유럽의 프랑스, 스위스, 포르투갈이 각각 하나씩의 cluster를 형성하였으며, 제주도 군주와 자주방망리아재비버섯이 하나의 cluster를 이루어 4개의 cluster를 이루었다. 그리고 광릉자주방망이버섯이 outgroup으로 하나의 cluster를 이루었다.

위의 실험 결과로 제주도 민자주방망이버섯은 국내에서 채집된 내륙의 민자주방망이버섯과는 유전적으로 많은 차이를 보였으나, 오히려 민자주방망이버섯속의 자주방망리아재비버섯과는 같은 cluster를 이루어 유전적으로 민자주방망이버섯보다 유사한 것으로 분석되었다. 이러한 분석 결과로 보아 제주도에서 채집된 민자주방망이버섯은 지리적 격리에 의해 유전적 변이가 일어난 것으로 판단된다. 또한 약간의 차이는 있으나 RAPD 분석 결과에서도 ITS 분석결과와 유사한 것으로 분석되었으며, 형태적 분석 결과와도 일치하는 것으로 나타났다. 따라서 제주도의 민자주방망이버섯은 새로운 종이나 품종, 변종으로 분석하는 것이 가능하리라 사료된다.

Table 19. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei-Li's genetic distance coefficient based on ITS region sequencing analysis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	0.09893											
3	0.15422	0.07269										
4	0.13002	0.04771	0.08030									
5	0.09404	0.01582	0.06956	0.03980								
6	0.10227	0.01581	0.08399	0.05565	0.02374							
7	0.10523	0.02211	0.09036	0.06056	0.03161	0.02529						
8	0.13325	0.04951	0.08110	0.02225	0.04300	0.05746	0.06233					
9	0.28344	0.20618	0.21660	0.20181	0.20485	0.21176	0.22267	0.17875				
10	0.09944	0.01916	0.07500	0.03516	0.00954	0.02706	0.03190	0.03329	0.18742			
11	0.09121	0.01273	0.06683	0.03665	0.00319	0.02055	0.02853	0.03786	0.19030	0.00753		
12	0.34260	0.28072	0.29196	0.29272	0.27958	0.28612	0.29958	0.27625	0.31675	0.27383	0.26760	
1-	Deogyu Mt. <i>L. nuda</i> (<i>L.nuda</i> De)											
2-	Portugal <i>L. nuda</i> (<i>L.nuda</i> Por)											
3-	<i>L. irina</i> (<i>L.irina</i>)											
4-	<i>L. sordida</i> (<i>L.sordida</i>)											
5-	Gyeongsan <i>L. nuda</i> (<i>L.nuda</i> Gye)											
6-	France <i>L. nuda</i> (<i>L.nuda</i> Fra)											
7-	Swiss <i>L. nuda</i> (<i>L.nuda</i> Swi)											
8-	Jeju island <i>L. nuda</i> (L2)											
9-	Japan <i>L. nuda</i> (ACM) (L3)											
10-	Palgong Mt. <i>L. nuda</i> (L5)											
11-	Hayang <i>L. nuda</i> (L1)											
12-	Japan <i>L. nuda</i> (NBRC) L4)											

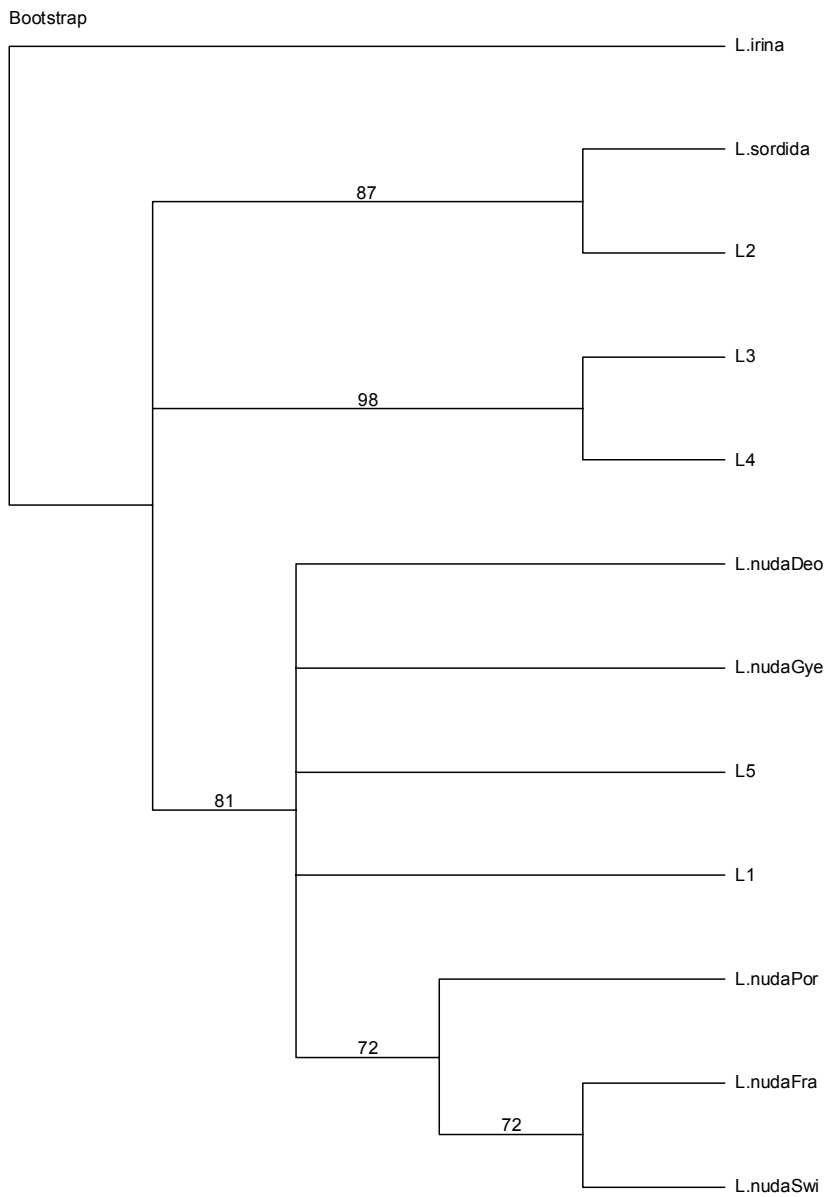


Fig. 17. The phylogenetic tree based on ITS I and II sequences of the *Lepista*.

(3) cDNA library 제작 및 cDNA 염기서열 분석

채집한 *L. nuda*의 자실체에서 Trizol Reagent 사용하여 Total RNA를 추출하였고, PolyATtract mRNA isolation System (Promega) 를 이용하여(전 등, 2003) mRNA 분리에 성공하였다. 분리한 mRNA를 이용하여 cDNA를 만드는 작업은 Stratagene사의 cDNA Synthesis Kit를 사용하였으며, 완성된 cDNA 의 plating efficiency는 2.5×10^6 pfu/1 μ g of vector DNA : (5.0×10^6 pfu/ml) 였다. 완성된 cDNA에서 cDNA insert의 평균 크기를 확

인하기 위해서 무작위적으로 20개의 plaque로부터 *in vitro* excision하여 excision된 plasmid에서 cDNA insert를 확인하여 Fig 18의 결과를 얻었고, cDNA 크기는 0.5~6kb 였다. 따라서 *L. nuda*의 cDNA library는 양호한 것으로 추정된다. 또, 무작위로 선발된 cDNA클론들의 DNA 크기가 500 bp이상 되는 클론을 확보하여 AccuPrep™ Plasmid extraction Kit (Amersham Pharmacia, Sweden) 을 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하여 이 클론들의 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열은 Dynamic ET- Terminator Cycle Sequencing Kit(Amersham Pharmacia, Sweden)를 사용하여 DNA를 증폭시킨 다음 RISA-384 automatic sequencer (Shimadzu, Japan)를 사용하여 총 52개의 염기서열을 결정하였다.

염기서열이 확인된 cDNA클론들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 Blastx 프로그램을 사용하여 유사성을 비교하였으며, 유사도가 60% 이상인 것을 유사한 것으로 간주하였다(이, 2001).

Blastx 프로그램을 사용한 Table 20, 21의 결과를 보면 *Nicotiana tabacum*의 glutamate/malate translocator에 관여하는 유전자와 88%의 높은 유사성을 보였고, 담자균류인 *Filobasidiella neoformans*의 ARF(ADP-ribosylation factor)에 관여하는 유전자와 95%의 유사성을 보였으며, *Schizosaccharomyces pombe* (Fission yeast)의 DNA replication licensing factor MCM6(MIS5 homolog)와 79%의 유사를 보였다. 또 같은 송이과 버섯으로 재배환경이 비슷한 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)의 serine proteinase에 관여하는 유전자와 61%의 유사도를 보였고, Histone H2B에 관여하는 유전자와 89%, mismatched base pair and cruciform DNA recognition protein에 관여하는 유전자와는 28%의 유사도를 보였다.

이 결과로 볼 때 같은 송이과 버섯인 *A. bisporus* 의 serine proteinase에 관여하는 유전자와 61%의 유사도를 보인 것은 serine proteinase가 호르몬 생산과 세포활성 펩티드 생산에 관련되어 있으며 단백질 소화 및 혈액 응고와 면역 보체활성 등의 여러 가지 세포적 기능(김과 박, 2002)이 있으므로, *L. nuda* 도 호르몬 및 세포활성 펩티드 생산과 단백질 소화 등의 세포학적기능을 가질 것으로 사료된다.

지구 생태계의 분해자로서 큰 비중을 차지하고 있는 버섯은 우리 생활에 약용, 식용으로 널리 보급되어 있고, 최근에 들어 대량생산에 의해 생산량이 증가되어 우리 식탁에 빼놓을 수 없는 식품이 되었다. 그러나 우리나라는 버섯에 대한 유전적 연구가 거의 이루어지지 않고 있는 실정이어서 본 실험의 민자주방망이버섯 cDNA library 제작 및 cDNA 염기서열 분석으로 다른 버섯의 연구에 응용될 수 있으며 생물자원으로써 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

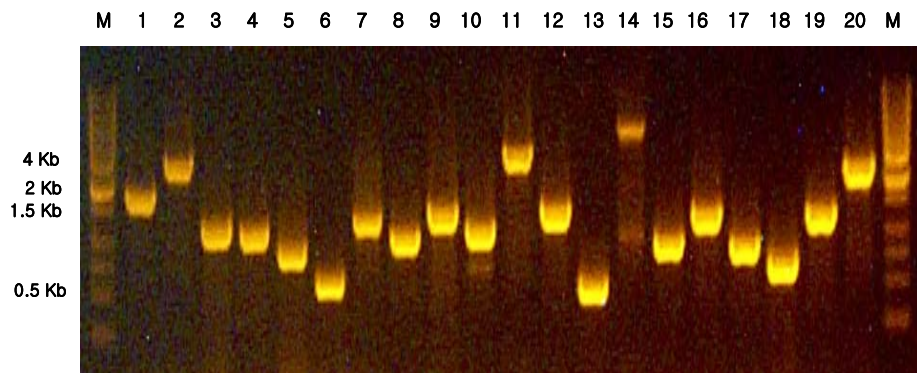


Fig. 18.
Insert
t

size determination. Twenty plaques are randomly picked and insert DNA are PCR amplified with T7 and T3 primer.

PCR products were electrophoresed on a 1% TAE agarose gel.

Lane M: 1kb plus DNA ladder (Stratagene), lane 1~20: PCR products.

Table 20. The list of putatively identified genes from the cDNA library of *L. nuda*

Clone No.	Description	Organism	Identities (%)	Positive (%)
MA02	glutamate/malate translocator	<i>Nicotiana tabacum</i>	88	94
MA03	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i>	45	58
MA05	unknown	<i>environmental sequence</i>	32	47
MA06	ADP-ribosylation factor	<i>Filobasidiella neoformans</i>	95	99
MA09	unknown	<i>environmental sequence</i>	46	64
MB01	translationally controlled tumor protein homolog	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	63	79
MB02	myosin heavy chain	<i>Paracirrhites forsteri</i>	23	42
MB04	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	45	57
MB06	hypothetical protein MG04940.4	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	43	72
MB08	MHC-class	<i>Homo sapiens</i>	40	54
MB10	hypothetical protein	<i>Methanococcus maripaludis</i>	35	53
MB11	ENSANGP00000010608	<i>Anopheles gambiae</i>	46	69
MB12	mis5 protein	<i>Schizosaccharomyces</i>	79	89

		<i>pombe</i>		
MC02	nucleoporin		32	46
MC04	serum opacity factor precursor	<i>Streptococcus pyogenes</i>	29	45
MC05	kinesin, putative	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	25	56
MC07	hypothetical protein FG07810.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	26	40
MC10	NADH dehydrogenase subunit 2	<i>Pisaster ochraceus</i>	44	58
MD01	putative 2-hydroxyacid dehydrogenase	<i>Schizosaccharomyces</i> <i>pombe</i>	42	63
MD03	LMP7-like protein	<i>Botryllus schlosseri</i>	72	84
MD06	hypothetical protein AN1142.2	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	48	58
MD07	asparaginyl-tRNA synthetase	<i>Pirellula</i> sp. 1	43	60
MD12	Delta-12 fatty acid desaturase	<i>Mortierella alpina</i>	49	61
ME02	hypothetical protein AN3375.2	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	34	56
ME03	hypothetical protein AN2299.2	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	31	51
ME04	AER049Wp	<i>Eremothecium gossypii</i>	27	47
ME05				
ME06	Hypothetical ORF; Yel023cp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23	53

It used the Blastx program which it provides from the NCBI

Table 21. The list of putatively identified genes from the cDNA library of *L. nuda*

Clone No.	Description	Organism	Identities (%)	Positive (%)
ME08	COG1611: Predicted Rossmann fold nucleotide-binding protein	<i>Ralstonia metallidurans</i>	43	60
ME10	serine proteinase	<i>Agaricus bisporus</i>	61	72
MF02	mesocentin	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	40	65
MF03	MEROZOITE SURFACE PROTEIN CMZ-8	<i>Eimeria acervulina</i>	43	51
MF05	beta (1-3) glucanosyltransferase Gel3p	<i>Aspergillus fumigatus</i>	42	62
MF07	Serpentine receptor, class w protein 123	<i>Caenorhabditis elegans</i>	23	52
MF09	similar to Homo sapiens (Human).	<i>Dictyostelium discoideum</i>	35	44
MF10	similar to Plasmodium falciparum. Hypothetical protein	<i>Dictyostelium discoideum</i>	29	51
MF11	KIAA1430 protein	<i>Homo sapiens</i>	22	54
MG02	endochitinase	<i>Amanita muscaria</i>	39	60
MG05	putative chitinase	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	38	50
MG07	mismatched base pair and cruciform DNA recognition protein	<i>Agaricus bisporus</i>	28	61
MG08	pol polyprotein		51	56
MG09	ENSANGP0000005373	<i>Anopheles gambiae</i>	34	44
MG11	extracellular lipase	<i>Gibberella zeae</i>	41	57
MG12	COG3239: Fatty acid desaturase	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	34	55
MH01	hypothetical protein AN4517.2	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	47	61
MH02	histidyl-trna synthetase, mitochondrial precursor	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	44	59
MH04	putative proteine disulfate isomerase	<i>Ustilago maydis</i>	49	73
MH06	DNA damage-responsive protein, expression is increased in response to heat-shock stress or treatments that produce DNA lesions; Ddr48p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43	60
MH07	unknown	<i>environmental sequence</i>	33	51
MH08	ATPA_NEUCR ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	87	94
MH09	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i>	67	81
MH11	Histone H2B	<i>Agaricus bisporus</i>	89	95

It used the Blastx program which it provides from the NCBI

(4) 민자주방망이버섯의 육종

민자주방망이버섯의 포자는 유전적 차이가 있는 것으로 판명된 국내지역에서 채집한 민자주방망이버섯 및 자주방망이버섯아재비와 광릉자주방망이버섯으로부터 포자를 분리하여 단핵균사를 얻었고, 2차배지상에서 이들을 대치배양 하였다. 대치배양 된 균사를 다시 새로운 PDA 배지에 계대하여 배양하였고 clamp connection (Fig. 19)과 DNA band pattern (Fig. 20) 을 통해 교배가 되었는지 확인하였다. 또한 교배된 균사의 성장속도를 측정 (Table 22) 하여 단핵균사의 성장속도와 특징을 비교 하였다.

이 결과 제주도와 동화사를 제외한 국내 민자주방망이버섯끼리는 교배가 가능하였으며 종간의 교배는 불가능 하였다. 또한 유럽과 일본의 균주와는 교배가 불가능하였다. 교배가 확인된 균주의 성장속도를 단핵균사의 성장속도와 비교한 결과 대부분 각각의 단핵균사보다 교배된 균사의 성장속도가 빨랐으며 균사성장 시 특징은 양쪽의 특징을 모두 나타내었다.(Fig. 21) 이러한 결과로 볼 때 교배된 품종이 성장속도 면에서 우수하므로 품종 개량 및 대량생산에 유용할 것으로 사료된다(Table 23).

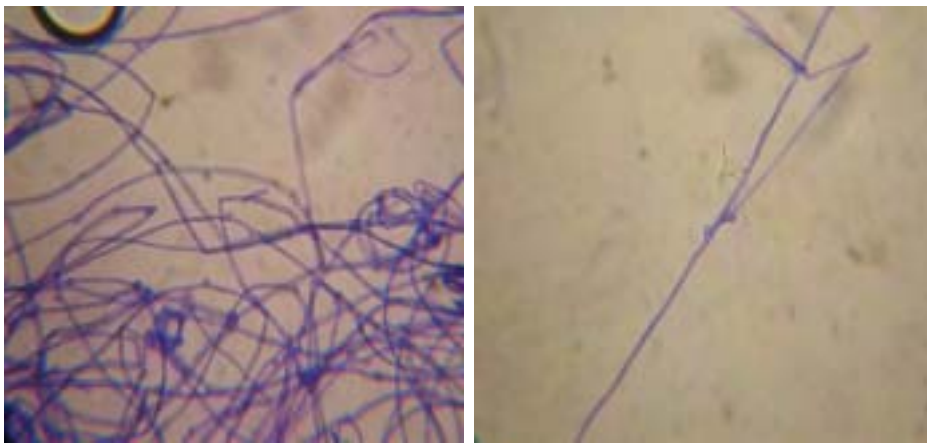


Fig. 19. Clamp connection of *L. nuda*.

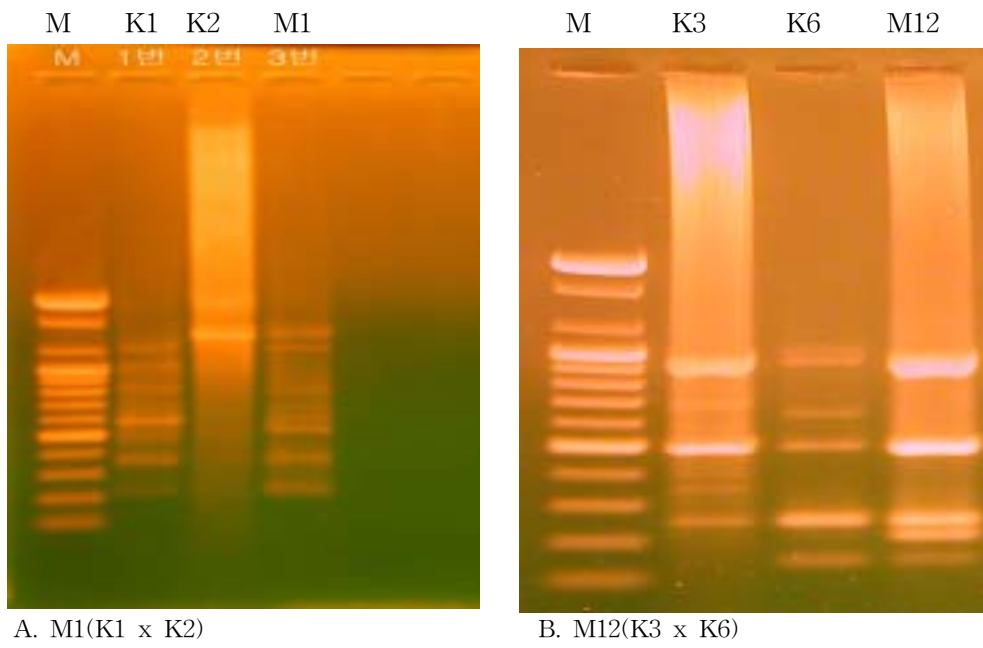


Fig. 20. DNA band patterns of cross mating.

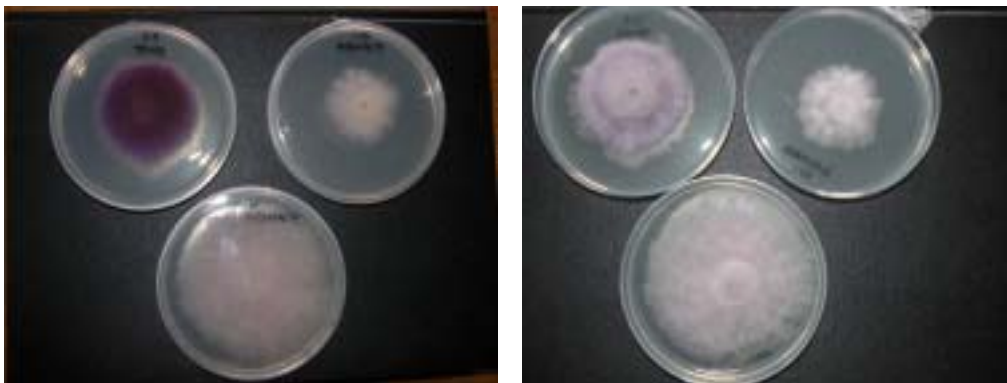


Fig. 21. single spore isolations mycellium and cross mated mycellium.

Table 22. Growth rate comparition of single isolations mycellium and cross mated mycellium

	K1		K2		M1		K1		K3		M2		K1		K4		M3	
0day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3days	0.9	1.0	0.7	0.8	1.2	1.0	0.9	1.0	0.7	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	0.5	0.7	1.0	0.9
	0.9	1.0	0.7	0.8	1.2	1.0	0.9	1.0	0.7	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	0.5	0.7	1.0	0.9
7days	1.6	1.6	1.3	1.5	1.8	2.1	1.6	1.6	1.5	1.8	2.1	2.0	1.6	1.6	1.2	1.2	2.0	1.9
	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	1.1	0.7	0.6	0.8	0.8	1.0	1.0	0.7	0.6	0.7	0.5	1.0	1.0
10days	2.2	2.1	2.1	2.2	3.5	3.6	2.2	2.1	3.5	3.1	3.3	3.2	2.2	2.1	2.2	2.1	3.3	3.4
	0.6	0.5	0.8	0.7	1.7	1.5	0.6	0.5	2.0	1.3	1.2	1.2	0.6	0.5	1.0	0.9	1.3	1.5
14days	3.0	3.1	2.7	2.7	full	3.8	3.0	3.1	3.8	3.7	4.0	3.7	3.0	3.1	3.0	3.1	3.7	3.8
	0.8	1.0	0.6	0.5	0.7	0.2	0.8	1.0	0.3	0.6	0.7	0.5	0.8	1.0	0.8	1.0	0.4	0.4
20days	3.2	3.2	2.9	2.9	.	4.0	3.2	3.2	3.9	3.8	4.0	3.8	3.2	3.2	3.6	3.6	3.8	3.9
	0.2	0.1	0.2	0.2	.	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.6	0.5	0.1	0.1
25days	3.8	3.4	3.2	3.3	.	full	3.8	3.4	4.0	full	full	4.0	3.8	3.4	full	full	full	full
	0.6	0.2	0.3	0.4	.	0.5	0.6	0.2	0.1	0.7	0.5	0.2	0.6	0.2	0.9	0.9	0.7	0.6
29days	3.9	3.7	3.8	4.0	.	.	3.9	3.7	full	.	.	full	3.9	3.7

	K1		K6		M4		K1		K5		M5		K2		K4		M6	
0day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3days	0.9	1.0	0.9	0.8	0.7	0.9	0.9	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.7	0.8	0.5	0.7	0.9	0.9
	0.9	1.0	0.9	0.8	0.7	0.9	0.9	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.7	0.8	0.5	0.7	0.9	0.9
7days	1.6	1.6	1.6	1.4	1.6	1.8	1.6	1.6	0.9	1.0	2.2	2.2	1.3	1.5	1.2	1.2	1.6	1.8
	0.7	0.6	0.7	0.6	0.9	0.9	0.7	0.6	0.4	0.5	1.2	1.2	0.6	0.7	0.7	0.5	0.7	0.9
10days	2.2	2.1	2.0	2.6	3.7	4.0	2.2	2.1	2.0	2.2	3.6	3.3	2.1	2.2	2.2	2.1	2.8	2.9
	0.6	0.5	0.4	1.2	1.1	2.2	0.6	0.5	1.1	1.2	1.4	1.1	0.8	0.7	1.0	0.9	0.8	1.1
14days	3.0	3.1	2.7	2.8	full	full	3.0	3.1	2.5	2.8	full	full	2.7	2.7	3.0	3.1	3.7	3.6
	0.8	1.0	0.7	0.2	0.8	0.5	0.8	1.0	0.5	0.6	0.9	1.2	0.6	0.5	0.8	1.0	0.9	0.7
20days	3.2	3.2	2.8	3.2			3.2	3.2	2.9	3.0			2.9	2.9	3.6	3.6	3.8	3.7
	0.2	0.1	0.1	0.4			0.2	0.1	0.4	0.2			0.2	0.2	0.6	0.5	0.1	0.1
25days	3.8	3.4	3.2	3.6			3.8	3.4	3.2	3.3			3.2	3.3	full	full	full	4.0
	0.6	0.2	0.4	0.4			0.6	0.2	0.3	0.3			0.3	0.4	0.9	0.9	0.7	0.3
29days	3.9	3.7	3.8	3.8			3.9	3.7	3.5	3.7			3.8	4.0	.	.	.	full

	K2		K3		M7		K2		K6		M8		K4		K3		M9	

0days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3days	0.7	0.8	0.7	1.0	1.1	1.1	0.7	0.8	0.9	0.8	1.1	1.1	0.5	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7
	0.7	0.8	0.7	1.0	1.1	1.1	0.7	0.8	0.9	0.8	1.1	1.1	0.5	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7
7days	1.3	1.5	1.5	1.8	1.8	2.0	1.3	1.5	1.6	1.4	1.6	2.0	1.2	1.2	1.5	1.8	1.6	1.6
	0.6	0.7	0.8	0.8	0.7	1.1	0.6	0.7	0.7	0.6	0.5	0.9	0.7	0.5	0.8	0.8	0.9	0.9
10days	2.1	2.2	3.5	3.1	2.7	2.8	2.1	2.2	2.0	2.6	3.3	3.2	2.2	2.1	3.5	3.1	2.7	2.9
	0.8	0.7	2.0	1.3	0.9	0.8	0.8	0.7	0.4	1.2	1.7	1.2	1.0	0.9	2.0	1.3	1.1	1.3
14days	2.7	2.7	3.8	3.7	3.8	3.6	2.7	2.7	2.7	2.8	3.6	3.8	3.0	3.1	3.8	3.7	3.5	3.5
	0.6	0.5	0.3	0.6	0.9	0.8	0.6	0.5	0.7	0.2	0.3	0.6	0.8	1.0	0.3	0.6	0.8	0.6
20days	2.9	2.9	3.9	3.8	4.0	3.8	2.9	2.9	2.8	3.2	3.8	4.0	3.6	3.6	3.9	3.8	3.7	3.6
	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.4	0.2	0.2	0.6	0.5	0.1	0.1	0.2	0.1
25days	3.2	3.3	4.0	full	full	4.0	3.2	3.3	3.2	3.6	4.0	full	full	full	4.0	full	4.0	3.9
	0.3	0.4	0.1	0.7	0.5	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4	0.2	0.5	0.9	0.9	0.1	0.7	0.3	0.3
29days	3.8	4.0	full	.	.	full	3.8	4.0	3.8	3.8	full	.	.	.	full	.	.	full

	K4		K6		M10		K4		K5		M11							
						
0day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
3days	0.5	0.7	0.9	0.8	0.9	1.1	0.5	0.7	0.5	0.5	1.2	1.1						
	0.5	0.7	0.9	0.8	0.9	1.1	0.5	0.7	0.5	0.5	1.2	1.1						
7days	1.2	1.2	1.6	1.4	2.0	1.9	1.2	1.2	0.9	1.0	2.3	2.1						
	0.7	0.5	0.7	0.6	1.1	0.8	0.7	0.5	0.4	0.5	1.1	1.0						
10days	2.2	2.1	2.0	2.6	3.3	3.3	2.2	2.1	2.0	2.2	3.3	3.5						
	1.0	0.9	0.4	1.2	1.3	1.4	1.0	0.9	1.1	1.2	1.0	1.4						
14days	3.0	3.1	2.7	2.8	4.0	4.0	3.0	3.1	2.5	2.8	full	full						
	0.8	1.0	0.7	0.2	0.7	0.7	0.8	1.0	0.5	0.6	1.2	1.0						
20days	3.6	3.6	2.8	3.2	4.1	4.1	3.6	3.6	2.9	3.0								
	0.6	0.5	0.1	0.4	0.1	0.1	0.6	0.5	0.4	0.2								
25days	full	full	3.2	3.6	full	full	full	full	3.2	3.3								
	0.9	0.9	0.4	0.4	0.4	0.4	0.9	0.9	0.3	0.3								
29days	.	.	3.8	3.8			.	.	3.5	3.7								

Table 23. Phenotypes and crosses in *L.nuda*

14 days after inoculation	
Color	Growth

KLN1	deep violet	3.0±0.1
KLN2	violet	2.7±0.1
KLND3	violet	3.5±0.1
KLN1XKLN2	violet	4.4±0.1
KLN1	deep violet	3.0±0.1
KLN6	violet	2.7±0.1
KLND8	deep violet	2.8±0.1
KLN1XKLN6	violet	4.4±0.1
KLN1	deep violet	3.0±0.1
KLN5	violet	2.5±0.1
KLND7	violet	4.4±0.1
KLN1XKLN5	violet	4.4±0.1
KLN2	violet	2.7±0.1
KLN6	violet	2.7±0.1
KLND3	violet	3.5±0.1
KLN2XKLN6	violet	3.8±0.1
KLN4	deep violet	3.0±0.1
KLN5	violet	2.5±0.1
KLND7	violet	4.4±0.1
KLN4XKLN5	violet	4.4±0.1

*길이는 petri-dish상에서 자라는 균사의 반지름을 cm로 측정한 것 임.

3) 민자주방망이버섯의 배양학적 특성

(1) 민자주방망이버섯의 최적 배양

① 최적 배양 온도 및 pH

균사 생장의 최적온도 규명을 위하여 15, 24, 30, 37, 40℃에서 균사를 배양한 결과, 24℃에서 41 mm로 균사생장이 가장 양호하였고, 30℃부터는 균사생육을 관찰 할 수 없었다(Fig. 22). 이는 민자주방망이버섯이 이 등(1996)의 보고와는 달리 30℃에서 자라는 것과 차이를 볼 수 있다.

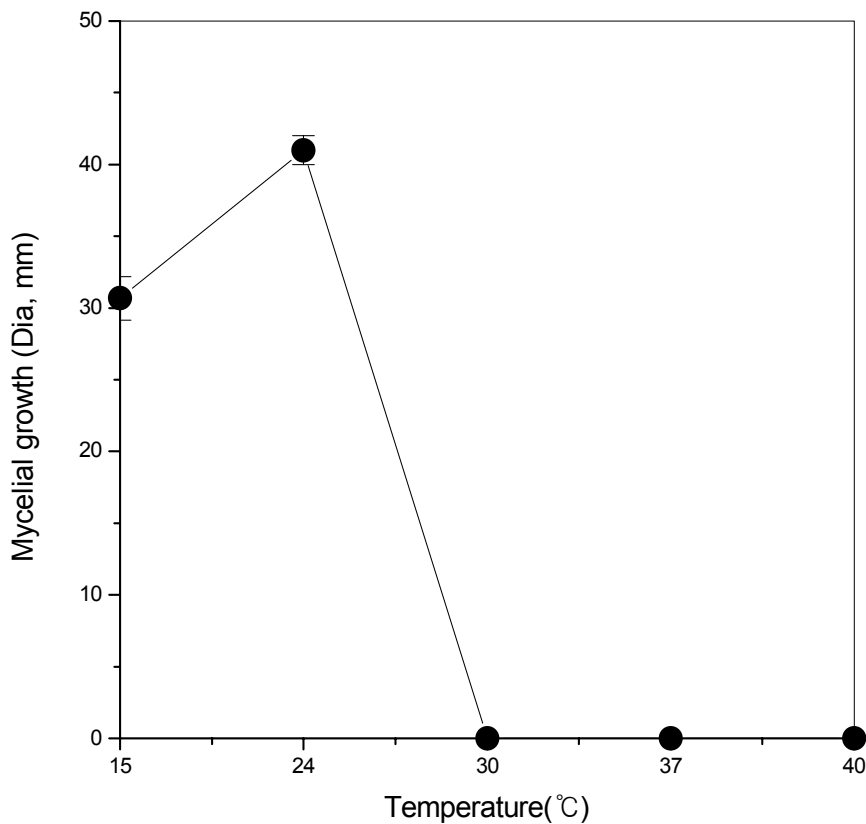


Fig. 22. Effect of temperature on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501.
The mycelia were cultivated at 24℃ for 10 days in ACM agar plate.

배지의 최적 초기 pH는 7.0~8.0에서 균사의 생육 및 밀도 등에서 가장 우수하였다(Fig. 23). pH 4.0 및 10.0의 범위에서도 어느 정도의 생육이 관찰되었으나 버섯의 생육에 좋은 pH가 약 산성이라는 보고보다는 중성의 경우에서 더 우수하였다. 균사 생육에 관한 pH의 범위는 버섯에 따라 차이에 관한 많은 정보가 있었다. 뽕나무 버섯의 최적 pH는 6.0(Lee et al., 1983), 개암버섯은 5.0~6.0(강 등, 1994), 느타리버섯은 6.2~6.5(Hasgimoto and Takahashi, 1974), 표고버섯은 4.0~4.5(Leathman, 1983 ; Song and Cho, 1987), 복령은 4.0(홍과 이, 1990)으로 버섯의

최적 pH는 일반적으로 약산성인 경우가 많다. 이는 보고된 것과 다르게 민자주방망이버섯은 중성인 pH 7.0~8.0에서 균사의 생육이 가장 좋은 것으로 나타났다.

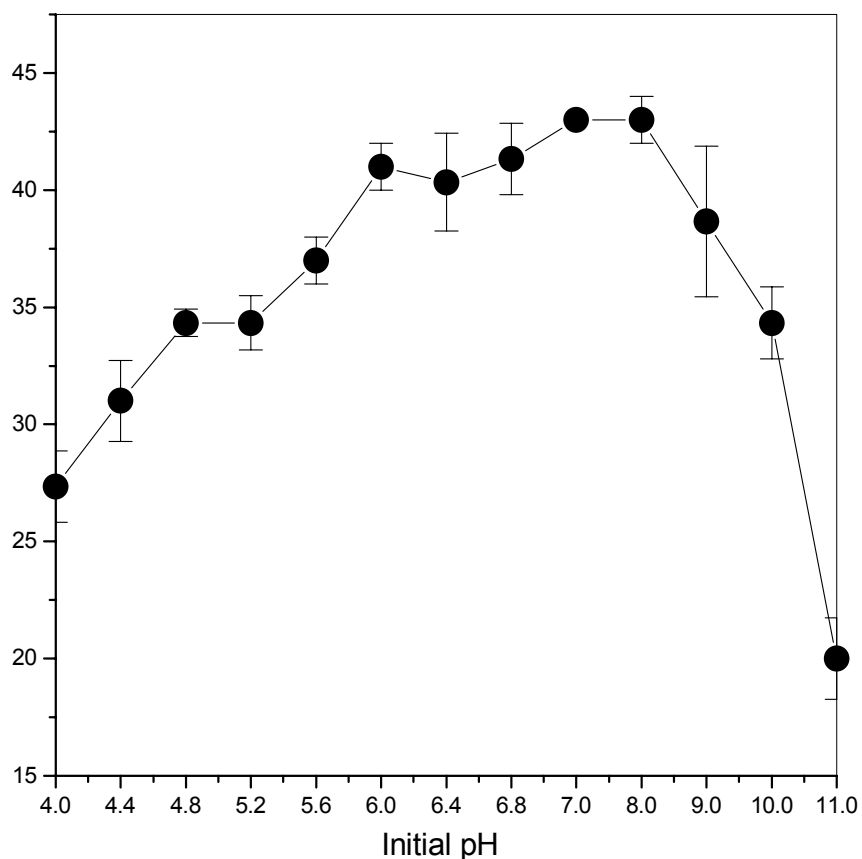


Fig. 23. Effect of pH on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501.

The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in ACM agar plate.

② 복합배지의 영향

실험에 사용된 복합배지 중 ACM에서 균사의 밀도나 생육면에서 가장 우수한 균사 생육을 보였으며, YM, DTM, MEM, PDM, MYGM, MCM에서는 비교적 우수한 균사 생육을 보였다 (Table 24). 반면에 LEM, PIM, CDM에서 가장 낮은 균사 생육 정도를 보였다.

Table 24. Utilization of complex media on mycelia growth of *L. nuda* DGUM 26501

Complex Mycelia growth ^a medium	(Dia., mm)	Mycelial compactness ^b	Complex Mycelia growth ^a medium	(Dia., mm)	Mycelial compactness
CDM	38.7±4.2	+	DTM	56.0±3.6	+++
MCM	53.0±2.6	+++	PIM	40.0±2.0	+
MYGM	53.0±1.7	+++	LEM	49.5±0.7	+++
PDM	54.7±0.6	++	MEM	53.7±3.5	++
ACM	64.5±2.1	++	YM	57.7±0.6	+++

^a The mycelia were grown at 24°C for 10 days in complex media.

^b +; thin, ++; moderate, +++; compact.

③ 탄소원의 영향

Czapek-Dox를 최소배지로 각 탄소원을 3% 첨가하여 실험한 결과 단당류에서는 mannitol, xylitol 이당류에서는 maltose, 다당류에서는 CMC를 사용하였을 때 가장 우수한 생육도를 나타내었다(Table 25).

Sucrose에서는 mannitol, xylitol보다는 낮았지만 비교적 우수한 균사 생육을 보였다. Maltose도 mannitol, xylitol만큼 우수한 균사 생육을 나타내었으며, Galactose, xylose, lactose는 상대적으로 낮은 균사 생육을 나타내었다. Organic acid를 첨가 했을 때 gluconate에서 가장 우수한 균사 생육을 보였고, lactate는 상대적으로 낮은 균사 생육을 보였다. Gluconate와 lactate를 제외한 organic acid에서 control보다 저조한 생육을 나타내었다. 당류를 제외한 organic acid에서도 sucrose 3%를 첨가한 control보다 gluconate가 우수한 생육을 나타내었다. 당류에 organic acid를 첨가한 것과 organic acid를 만을 첨가한 실험에서 비슷한 결과를 볼 수 있었다.

Table 25. Utilization of carbon sources on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501

^a The mycelia were grown at 24°C for 10 days in Czapek-Dox medium supplemented with 3.0% of each carbon source.

^b In Czapek-Dox agar plate(pH 7.0) supplemented with 0.1% each organic acid.

^c In Czapek-Dox agar plate(pH 7.0) supplemented with 0.1% each organic acid with 3.0% sucrose.

④ 질소원의 영향

질소원 중 유기질소원에서 CSL, soytone, malt extract에서 우수한 균사 생육을 보였으며 CSL이 가장 우수한 균사 생육을 나타내었다(Table 26). Peptone, protease peptone에서도 비교적 우수한 균사 생육을 내었고, yeast extract는 상대적으로 낮은 균사 생육을 나타내었다.

Carbon source	Mycelia growth ^a (Dia., mm)	Mycelial compactness	Carbon source	Mycelia growth (Dia., mm)	Mycelial compactness
Carbohydrate ^a					
Lactose	24.0±0.0	+	Cellulose	43.3±12.6	+
Starch	42.7±7.2	++	Trehalose	38.3±0.6	+
Glycerol	40.0±1.0	++	Maltose	57.0±3.6	++
Xylitol	58.0±1.0	+++	Fructose	31.0±0.0	+
Mannitol	58.0±2.6	+++	Galactose	16.3±1.5	+
CMC	43.7±1.2	++	Xylose	20.0±0.0	+
Eryhretol	30.0±2.0	+	Sucrose	54.0±1.7	+++
Glucose	37.3±1.2	++			

Organic acid sources	Mycelial growth ^b (Dia, mm)	Mycelial compactness	Organic acid sources	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Organic acid source					
Formate	11.0±0.0	+	Oxalate	9.0±0.0	+
Lactate	25.3±0.6	+	Fumarate	27.3±0.6	+
Acetate	9.0±1.0	+	Citrate	17.0±0.0	++
Succinate	23.7±0.6	++	Gluconate	37.0±2.0	++
Control	35.7±0.6				

Organic acid sources	Mycelial growth ^c (Dia, mm)	Mycelial compactness	Organic acid sources	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Organic acid source					
Formate	7.7±0.6	+	Oxalate	10.3±0.6	+
Lactate	35.7±0.6	++	Fumarate	27.0±1.0	++
Acetate	8.3±1.5	+	Citrate	18.0±1.0	++
Succinate	26.7±0.6	++	Gluconate	39.0±2.6	++
Control	35.3±0.6	++			

무기질소원에서는 전반적으로 균사 밀도가 저조하게 관찰되었으며, 그 중 NH₄H₂PO₄에서 가장 우수한 균사 생육을 관찰할 수 있었다. 그 다음으로 (NH₄)₂SO₄에서 우수한 균사 생육을 관찰하였으며, NaNO₂, NaNO₃에서는 상대적으로 저조한 균사 생육을 보였으나 밀도면에서는 NaNO₂가 NaNO₃보다는 상대적으로 높은 균사 밀도를 보였으나 균사 생육은 저조하게 나타내었다. MH₄Cl와 NaNO₃는 비슷한 생육을 관찰할 수 있었다. Urea, NH₄-molybdate는 낮은 균사 생육과 균사 밀도를 보였다. (NH₄)₂CO₃에서는 가장 저조한 균사 생육을 나타내었으며 균사밀도는 아주 낮게 관찰되었다. 무기질소원인 NH₄H₂PO₄에 유기 질소원을 첨가한 실험결과에서는 CSL이 가장 우수한 생육을 나타내었으며, 유기 질소원만을 실험한 결과와 다르게 tryptone에서도 우수한 균사 생육을 관찰하였고, soytone은 무기질소원 첨가한 실험에서와 동일하게 우수한 균사 생육을 관찰할 수 있었다.

아미노산원은 control(아미노산을 첨가하지 않은 것)보다 우수한 균사 생육을 나타낸 것이 없었다. 따라서 균사 생육에서는 아미노산원이 균사 생육에 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. Tyrosine의 경우 균사 생육 시 한천배지가 검게 변함이 관찰되었다. 이는 tyrosine을 기질로 하여 멜라닌을 형성하는 것으로 사료된다.

⑤ 인산원의 영향

(NH₄)₂HPO₄에서 가장 우수한 균사 생육을 나타내었다(Table 27). NH₄H₂PO₄에서도 우수한 균사생육을 나타내었지만, (NH₄)₂HPO₄보다는 저조한 균사 생육을 나타내었고 균사 밀도는 비교적 우수하였다. K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ CaH₂PO₄은 control보다 낮은 균사 생육을 나타내었다

⑥ 비타민의 영향

비타민원에서는 균사 생육의 차이가 크게 나지 않았다(Table 28). Nicotinic acid, riboflavin, pyridoxine, thiamine에서 가장 우수한 균사 생육을 보였으며, 특히 nicotinic acid에서 균사의 밀도면에서 우수함을 나타내었다. p-aminobenz, folic acid는 control보다 낮은 균사 생육을 보였다.

⑦ Sucrose의 농도

Sucrose 0.5~1.0%에서 가장 높은 균사 생육을 나타내었으며, 농도가 짙어 질수록 균사 생육을 억제하는 것이 관찰되었다(Table 29).

Table 26. Utilization of nitrogen sources on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501^a

Source of nitrogen ^b	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Source of nitrogen	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Organic nitrogen source					
CSL	43.0±1.0	++	Peptone	41.0±2.6	++
Tryptone	36.3±0.6	++	Protease peptone	38.3±0.6	++
Yeast extract	33.7±1.5	++	Malt extract	42.3±1.2	++
Soytone	42.3±2.1	++			
Inorganic nitrogen source					
Source of nitrogen ^c	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Source of nitrogen	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Urea	22.7±0.6	+	NH ₄ -molybdate	22.3±1.2	+
NaNO ₂	28.3±0.6	+	NH ₄ Cl	37.7±1.5	++
NaNO ₃	36.0±1.0	+	(NH ₄) ₂ SO ₄	39.7±2.1	++
NH ₄ -Phosphate	43.5±0.7	++	Ca(NO ₃) ₂	29.7±0.6	+
(NH ₄) ₂ CO ₃	14.3±3.2	+			

Source of nitrogen ^d	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Source of nitrogen	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Organic nitrogen source					
CSL	53.0±0.0	+++	Peptone	45.3±1.5	++
Tryptone	51.0±2.6	+++	Proteose peptone	50.0±0.0	+++
Yeast extract	35.0±1.4	++	Malt extract	45.3±2.9	++
Soytone	53.3±0.6	+++	Control	35.0±1.7	+
Amino acid source					
Lysine	31.3±0.6	++	Asparagine	45.0±1.0	+++
Threonine	43.7±0.6	+++	Glycine	45.3±0.6	+++
Tryptophan	26.0±1.0	++	Cysteine	13.7±0.6	++
Phenylalanine	38.0±0.0	++	Alamine	44.3±0.6	+++
Serine	44.0±2.0	+++	Tyrosine	42.3±0.6	++
Arginine	45.3±1.6	+++	Leucine	41.0±1.0	+++
Histidine	45.3±0.6	+++	Aspartic acid	44.0±1.0	+++
Proline	43.0±1.0	+++	Control	46.3±0.6	+++

^a The mycelia were grown at 30°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

^b Supplemented with 0.3% each organic nitrogen sources.

^c Supplemented with 0.3% each inorganic nitrogen sources.

^d Supplemented with 0.3% each organic nitrogen sources with NH₄-Phosphate.

Table 27. Utilization of phosphorus sources on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501a

Source of phosphate ^b	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Source of phosphate	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
CaH ₃ PO ₄	42.0±1.7	++	Na ₂ HPO ₄	39.5±2.1	++
K ₂ HPO ₄	42.3±2.1	++	NH ₄ H ₂ PO ₄	48.0±4.6	+++
KH ₂ PO ₄	40.0±0.0	++	(NH ₄) ₂ HPO ₄	48.3±0.6	+++
NaH ₂ PO ₄	41.0±3.0	++	Control	47.3±1.5	++

^a The mycelia were grown at 30°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

^b Supplemented with 0.1% each phosphorus source.

Table 28. Utilization of vitamin sources on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501a

Source of vitamin ^b	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Source of vitamin	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Folic acid	44.0±2.6	+++	Riboflavin	48.0±1.7	+++
p-aminobenzic	41.0±1.0	++	Pyridoxine	48.0±1.0	+++
Nicotinc acid	48.0±1.0	++++	Thiamine	47.3±2.1	+++
Control	44.3±2.1	+++			

^a The mycelia were grown at 30°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

^b Supplemented with 0.5mg/ℓ each vitamin source.

Table 29. Utilization of sucrose on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501

Conc. of sucrose	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Conc. of sucrose	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
0.5	58.0±3.7	+++	5.0	49.0±3.6	+++
1.0	58.0±2.9	+++	7.0	46.5±0.7	++
2.0	55.3±2.1	+++	10.0	34.0±4.6	++
3.0	53.0±3.0	+++	15.0	30.3±2.1	++

⑧ CSL의 농도

CSL 0.2~0.8%에서 가장 높은 균사 생육을 나타내었으며, 농도가 짙어 질수록 균사 생육을 억제하는 것이 관찰되었다(Table 30).

Table 30. Utilization of CSL on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501

Conc. of CSL ^a	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Conc. of CLS	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
0.2	31.0±1.0	+++	1.8	39.3±1.2	+++
0.4	45.0±1.0	+++	2.0	38.0±1.7	+++
0.6	42.7±1.2	+++	2.3	34.7±0.6	++
0.8	44.3±1.5	+++	2.6	34.0±1.0	++
1.0	41.7±2.3	+++	2.9	31.0±1.0	++
1.2	41.0±2.0	+++	3.5	24.7±0.6	++
1.4	41.3±0.6	+++	5.0	22.0±2.0	++
1.6	36.0±1.7	+++	10.0	15.0±0.0	++

^a CSL : Corn steep liquor

⑨ C/N ratio

균사 생육을 위한 탄소원과 질소원의 최적 농도를 검정하기 위해 탄소원과 질소원으로 각각 sucrose 1%, gluconate 0.1%, CSL 0.4%, (NH₄)₂HPO₄ 0.3%를 조합한 것이 가장 빠른 균사 생육속도와 우수한 균사밀도를 나타내었다(Table 31).

Table 31. Utilization of C/N ratio on mycelial growth in *L. nuda* DGUM 26501

C/N ratio	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	C/N ratio	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
0.11	15.0±0.0	++	0.56	36.0±1.7	+++
0.21	22.0±2.0	++	0.65	41.3±0.6	+++
0.29	24.7±0.6	++	0.73	41.0±2.0	+++
0.34	31.0±1.0	++	0.85	41.7±2.3	+++
0.38	34.0±1.0	++	1.00	44.3±1.5	+++
0.42	34.7±0.6	++	1.22	42.7±1.2	+++
0.48	38.0±1.7	+++	1.57	45.0±1.0	+++
0.52	39.3±1.2	+++	2.20	31.0±1.0	+++

(3) 항진균제 및 생육에 미치는 영향

항진균제 panmasi를 0에서 2 mg/ℓ의 농도로 조절하여 민자주방망이버섯 *L. nuda* DGUM 26501의 균사 생장을 조사하였다. 2 mg/ℓ의 농도에서 균사생장에 영향을 보여주지 못하였다 (Fig. 24).

항진균제 thiabendazole 및 benomyl을 각각 0~2.0 mg/ℓ 및 0~0.20 mg/ℓ의 농도범위에서 민자주방망이버섯은 평균 46.3 mm, 44.5 mm로 최저 38 mm, 40.7 mm로 생장의 저해를 나타내지 못하였다 (Fig. 25, 26).

항진균제 cycloheximide는 0에서 10 mg/ℓ의 농도 중 1 mg/ℓ까지는 균사 생장에 큰 영향을 주지 않았으나 그 이상의 농도에서는 균사 생장에 영향을 나타내어 사용이 불가능하다고 판단되었다 (Fig. 27).

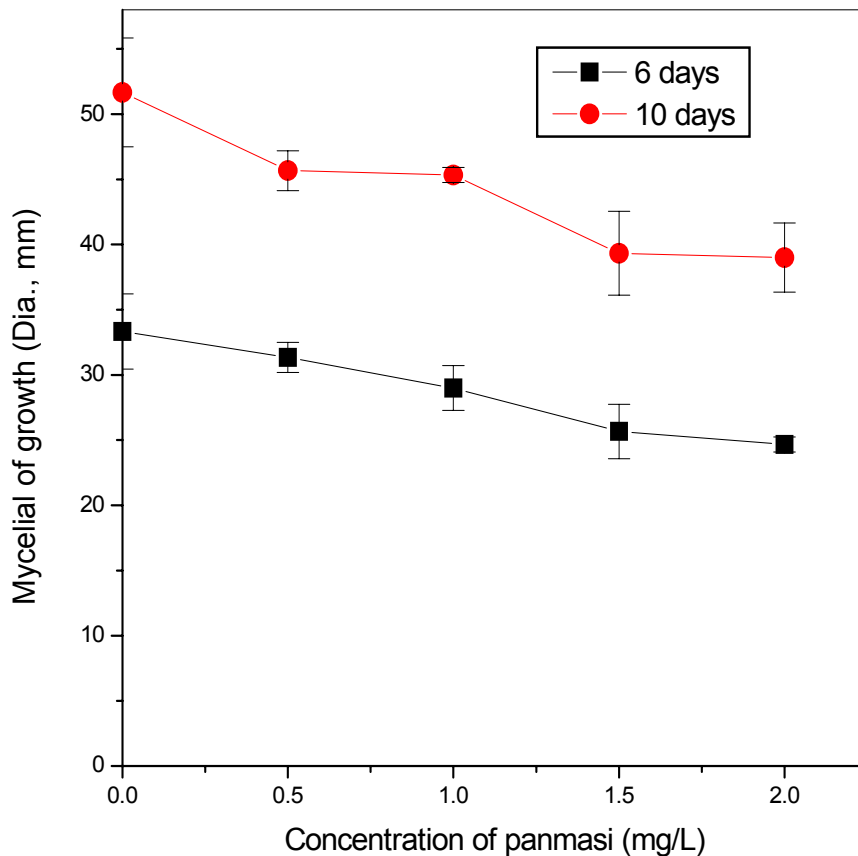


Fig. 24. Effect of antifungal agent on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501. The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

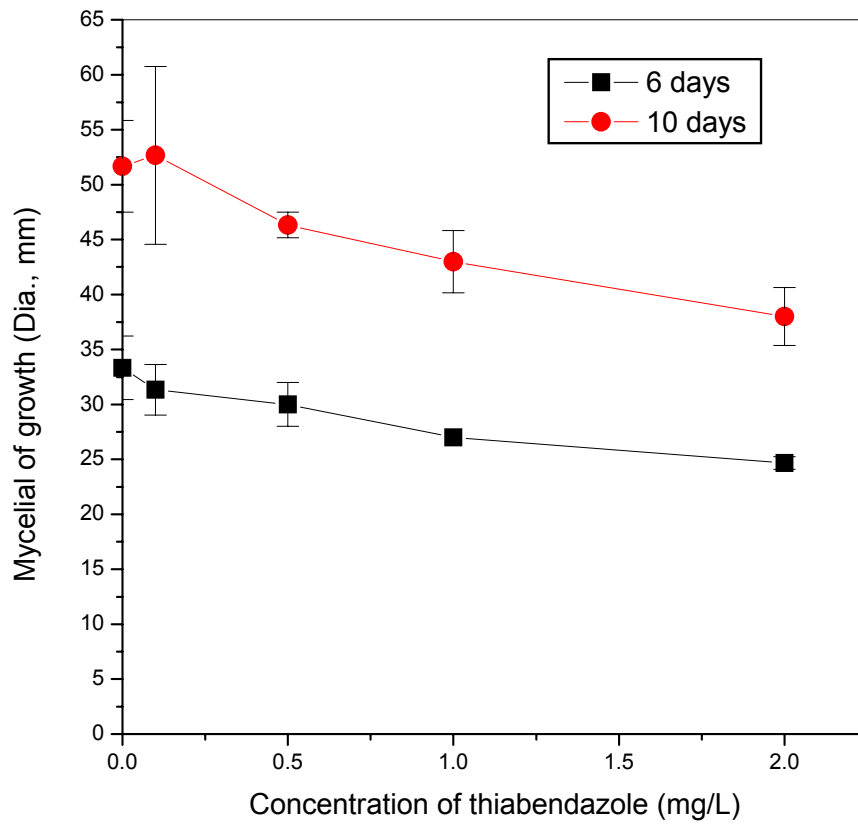


Fig. 25. Effect of antifungal agent on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501. The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

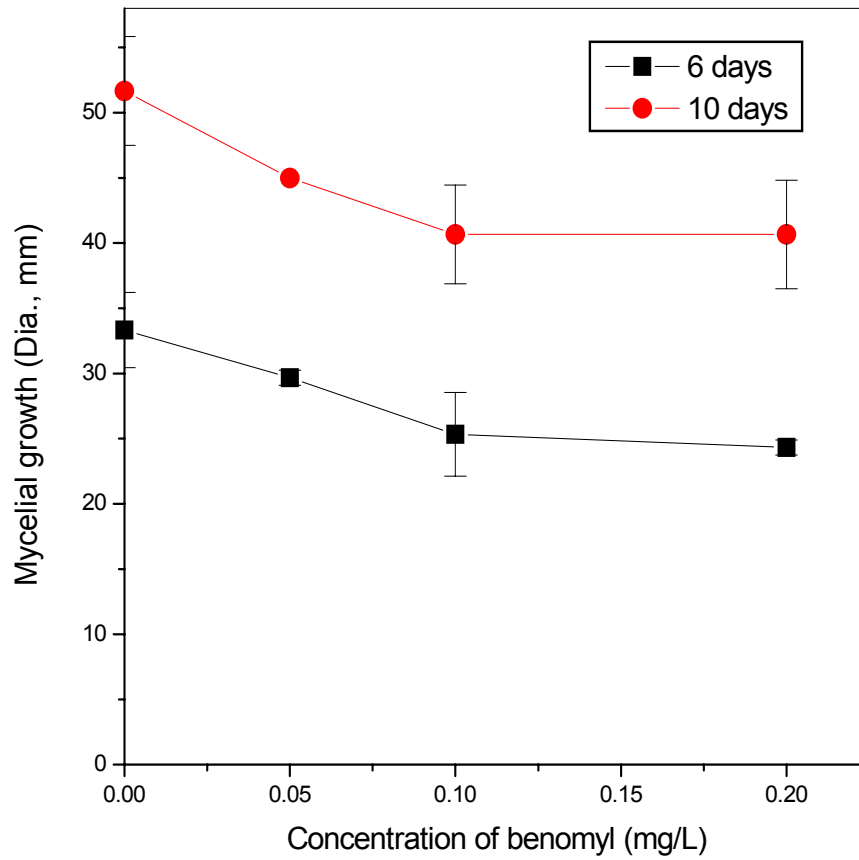


Fig. 26. Effect of antifungal agent on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501. The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

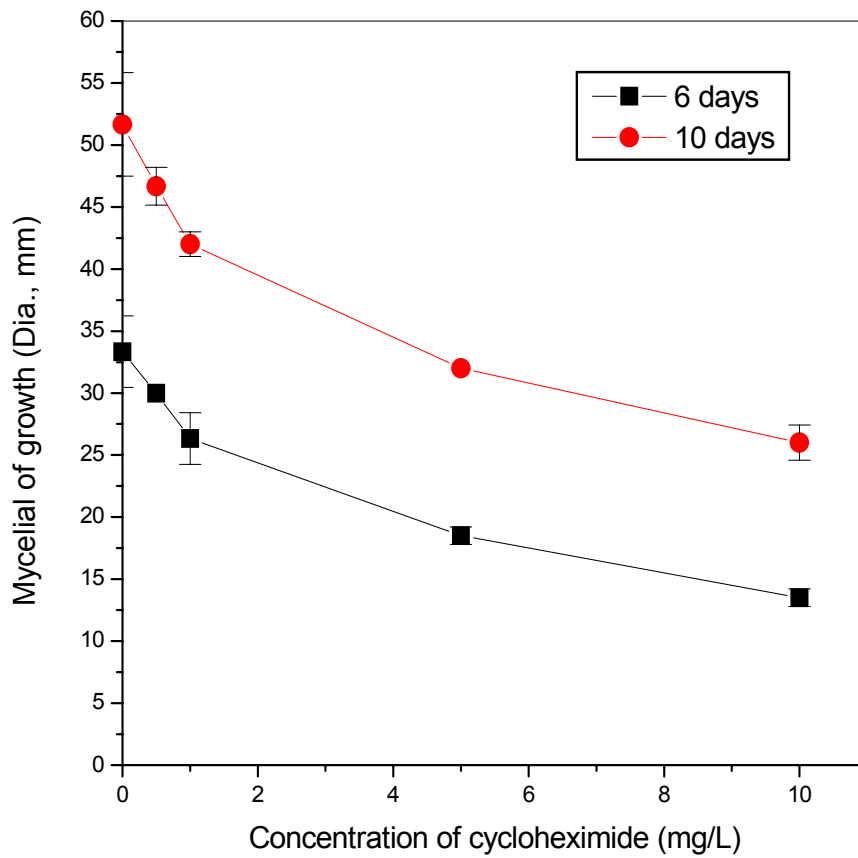


Fig. 27. Effect of antifungal agent on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501. The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

(4) 산소의 영향

산소의 농도를 0에서 21%의 농도로 조절하여 균사 생장을 관찰한 결과, 10%이상에서 균사 생육이 우수한 것을 관찰 할 수 있었으며, 21%보다는 15%에서 생육이 더욱더 우수한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 28).

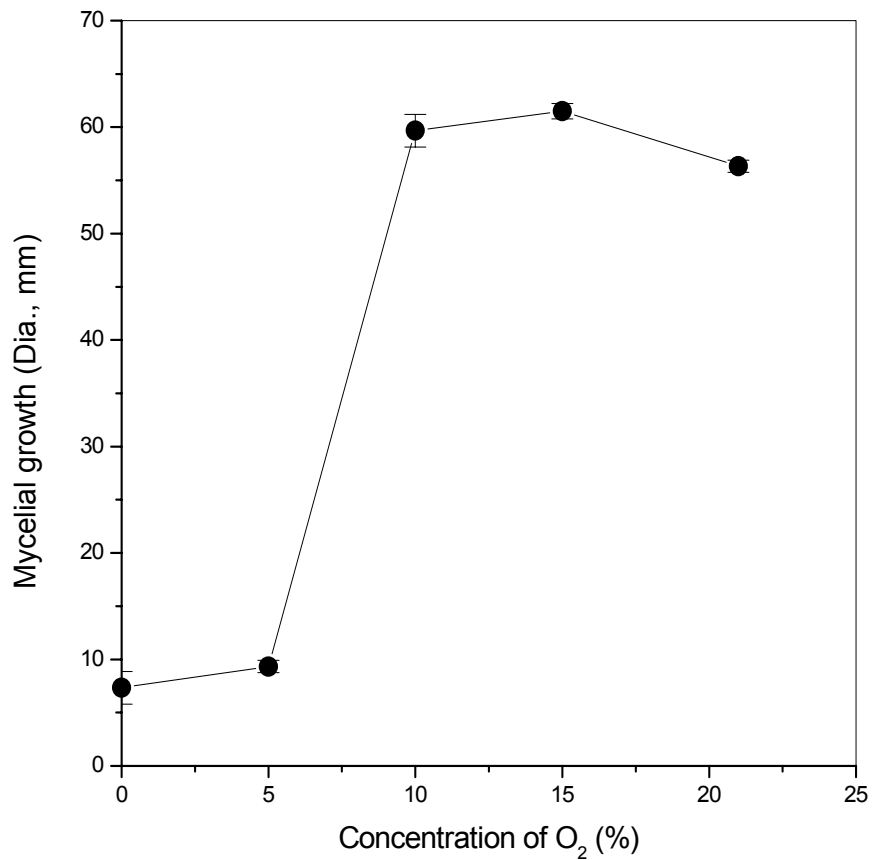


Fig. 28. Effect of oxygen on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501.
 The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in Czapek-Dox agar plate.

(5) 복합비료의 영향

복합비료의 농도를 0에서 10%의 농도로 조절하여 균사 생육을 측정된 결과, 0.5~1.5%에서 우수한 균사 생육을 관찰할 수 있었으며, 7%이상에서 균사 생육을 억제함을 나타내었다(Fig. 29, 30).



Fig. 29. Effect of compound fertilizer on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501. The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in sawdust.

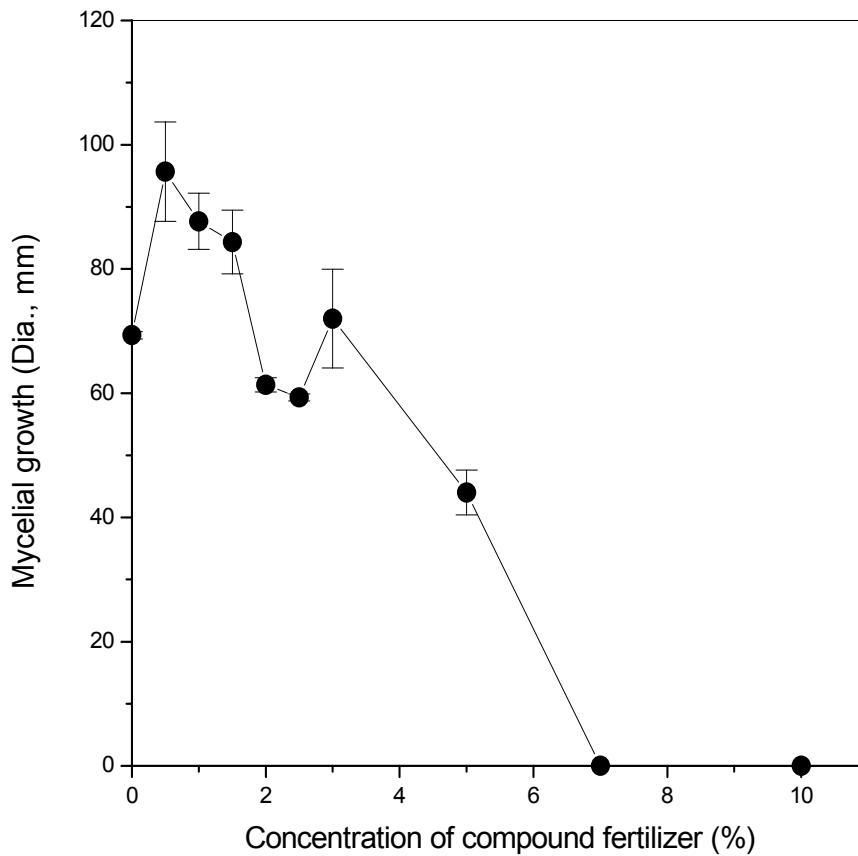


Fig. 30. Effect of compound fertilizer on mycelial growth of *L. nuda* DGUM 26501. The mycelia were cultivated at 24°C for 10 days in sawdust.

(6)세포의 효소 활성

최적 균사 성장 복합 배지인 LNM 및 ACM 액체 배지를 이용하여 배양된 *L. nuda* DGUM 26501의 세포의 분비 효소의 활성도를 측정된 결과, LNM 배지에서는 8.17 ± 1.79 U/mg · protein으로 α -amylase의 효소 활성도가 가장 우수하였고, β -glucosidase, CMCase, laccase는 상대적으로 낮았으며, lipase는 거의 활성이 없는 것으로 나타났으며, ACM에서도 11.7 ± 0.15 U/mg · protein으로 α -amylase의 효소 활성도가 가장 우수하였으며 laccase에서는 ACM과 LNM을 비교하였을때, 0.35 ± 0.05 U/mg · protein보다 0.48 ± 0.03 U/mg · protein으로 LNM이 효소 활성도 더 좋은 것으로 나타내었다(Fig. 31).

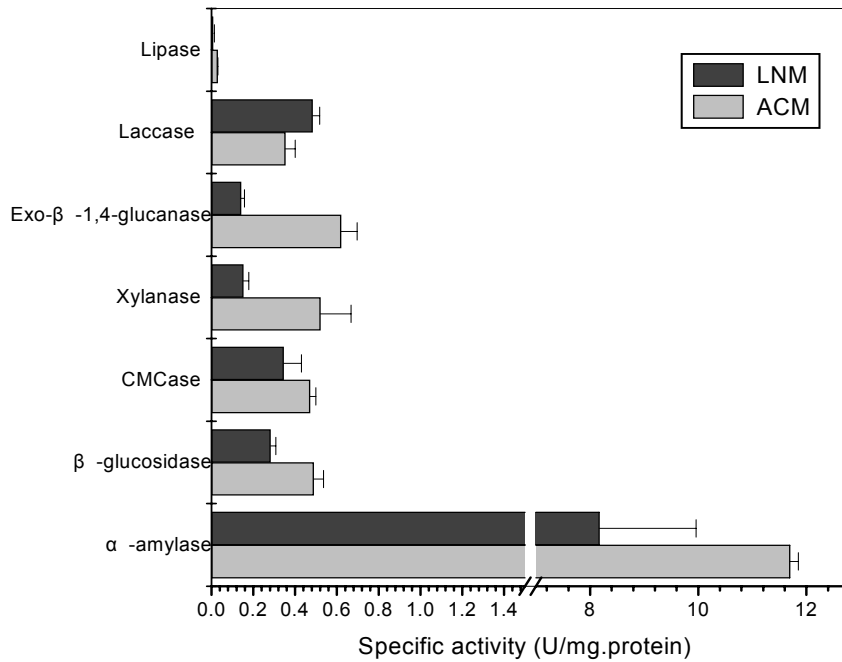


Fig. 31. The specific activities of exomycelial enzyme of *L. nuda* DGUM 26501.

(7) 대량 액체배양시 조건별 균사체량 변화 측정

LNM과 ACM에 민자주 방망이 버섯의 균사체량을 배양시간대 별로 측정하였을 때, LNM에서 ACM보다 균사의 생육이 높게 나타났다. LNM은 3일 이후에 균사체량이 급격히 증가하였으며, 6일 이후는 조금씩 증가하였다. ACM은 전체적으로 크게 증가하지는 않았지만, 배양시간이 지남에 따라 조금씩 균사체량이 증가하였다(Fig. 32).

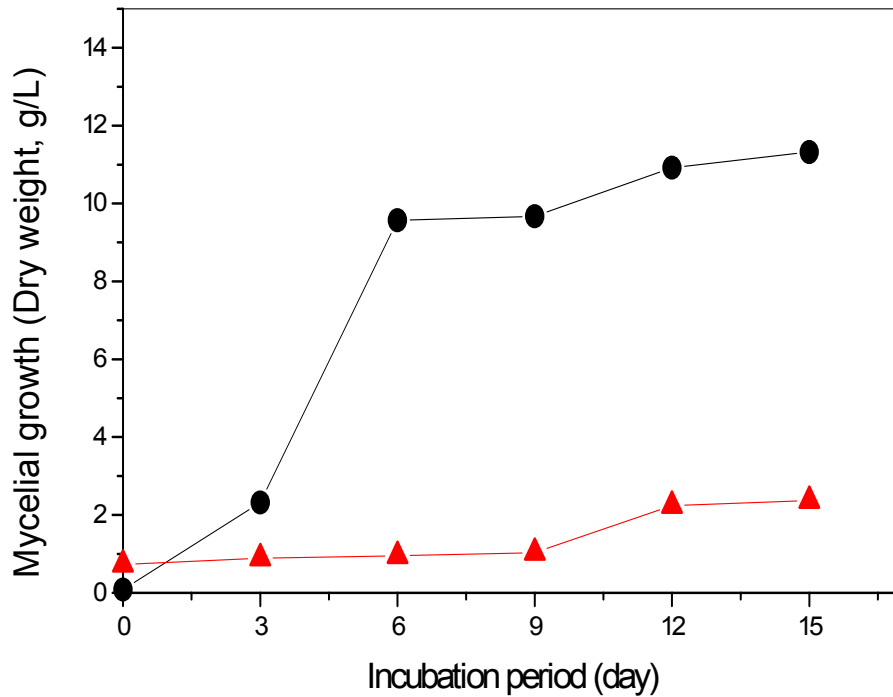


Fig. 32. The variation of mycelia weight on incubation period of *L. nuda* DGUM 26501.

(●) LNM, (▲)ACM. The mycelia cultivated at 24°C for 10 days.

(8) 대량 액체배양시 조건별 pH 변화 측정

최적배지와 복합배지 그리고 복합배지의 당농도별로 액체중균을 대량으로 배양하였을 때, LNM에서는 초기 pH보다 조금씩 감소하는 경향을 보였으며, ACM에서는 초기 pH보다 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 33).

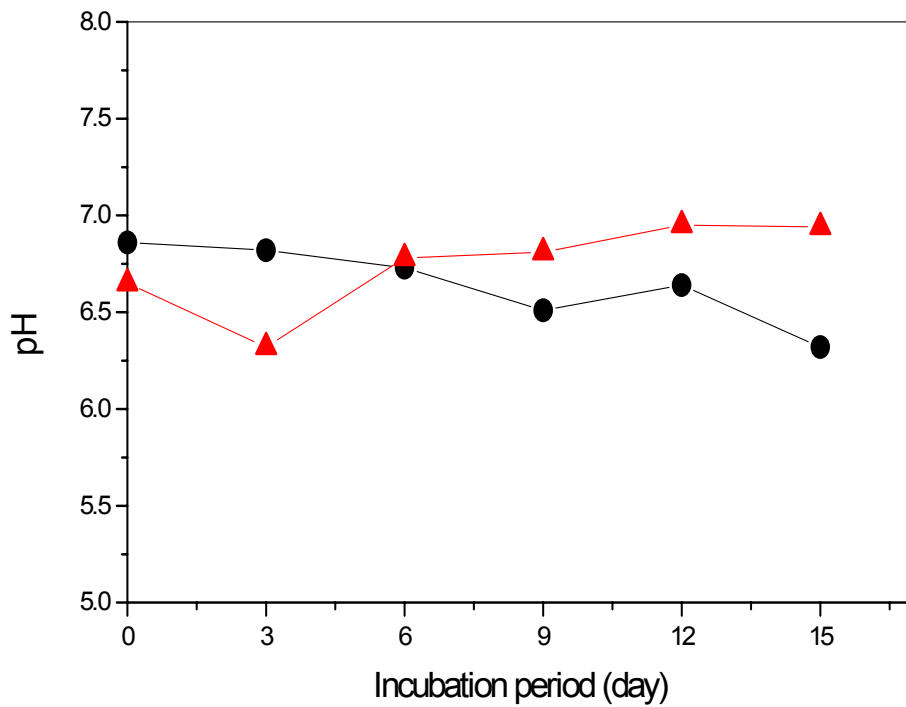


Fig. 33. The variation of pH on incubation period of *L. nuda* DGUM 26501. (●) LNM, (▲)ACM. The mycelia cultivated at 24°C for 10 days.

(9) 대량 액체배양시 조건별 세포내·외 효소활성 변화 측정

① 환원당 측정

LNM과 ACM의 각 배지에 민자주 방망이 버섯을 배양하였을 때, LNM에서는 초기 환원당의 양이 많이 존재하였다가 점차 그 양이 감소하는 경향을 나타내었다. ACM에서는 초기 환원당의 양이 LNM보다는 적은 양을 나타내었으나 배양기간이 경과함에 따라 점차 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 34).

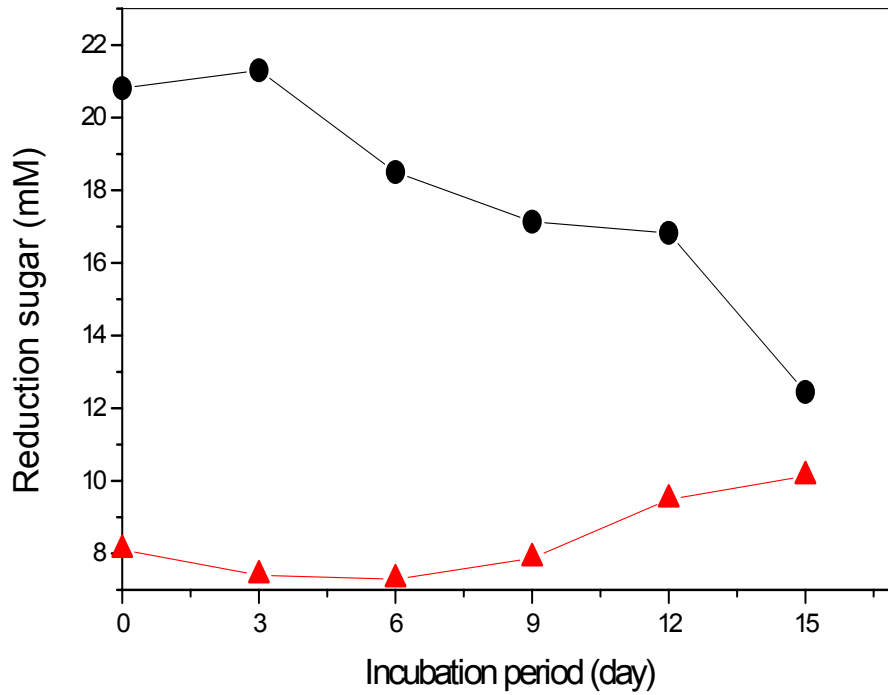


Fig. 34. The variation of Reduction sugar on incubation period of *L. nuda* DGUM 26501.

(●) LNM, (▲)ACM. The mycelia cultivated at 24°C for 10 days.

② α -amylase 효소활성 측정

LNM과 ACM의 각 배지에서는 3일째 배양시 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 12일까지는 효소활성이 감소하다가 15일째 다시 효소활성이 증가하였다(Fig. 35).

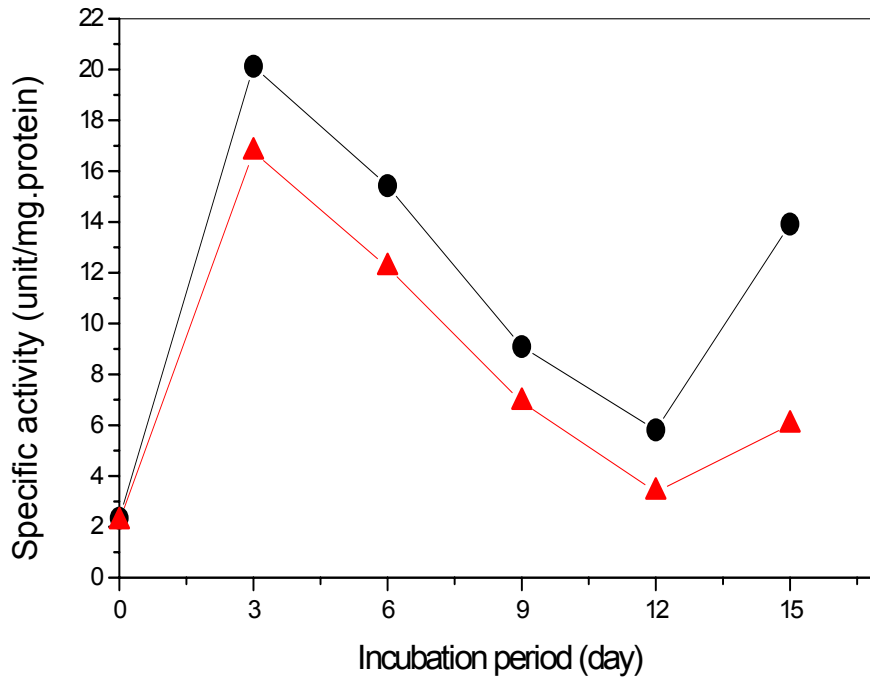


Fig. 35. The variation of α -amylase activity on incubation period of *L. nuda* DGUM 26501.

(●) LNM, (▲)ACM. The mycelia cultivated at 24°C for 10 days.

③ β -glucosidase

LNM배지에서 배양시 3일째 가장 높은 효소활성을 나타내었다가, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었으며, ACM배지에서는 12일째까지는 비슷한 효소활성을 보이다가 15일째 약간 낮은 효소 활성을 나타내었다. LNM에서 ACM보다 좀 더 높은 β -glucosidase 효소활성을 나타내었다(Fig. 36).

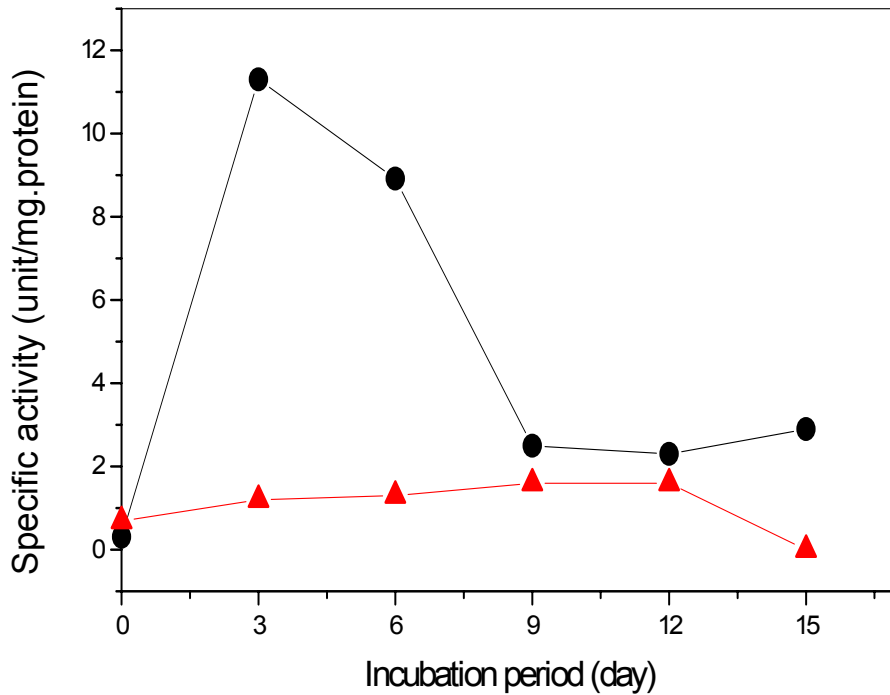


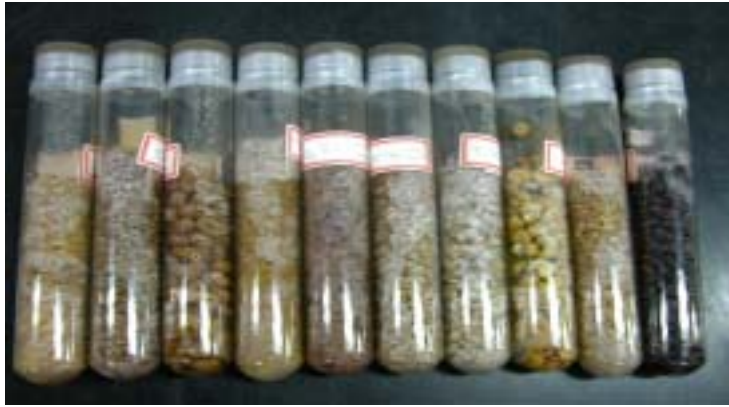
Fig. 36. The variation of β -glucosidase activity on incubation period of *L. nuda* DGUM 26501.

(●) LNM, (▲)ACM. The mycelia cultivated at 24°C for 10 days.

(10) 민자주방망이버섯 자실체 생산

중균

민자주방망이버섯의 접종원으로 적당한 곡물중균을 찾기 위하여 실험한 결과 찹쌀, 통밀, 수수, 보리쌀, 울무에서 높은 밀도의 균사와 자주색깔을 관찰할 수 있었고 대두와 조에는 부분적인 균사만이 관찰되었다. 또한 20일에서 25일 사이에 균사가 가장 활력이 좋았다. 찹쌀, 통밀, 수수, 보리쌀, 울무가 우수한 균사 생육을 나타내었지만 경제적 우위인 통밀을 접종원으로 선택하였다(Fig. 37).



A: 10 days



B: 20 days



C: 30 days

Fig. 37. Column test for the mycelial growth of *Lepista nuda* DGUM 26501.

(왼쪽부터; 찹쌀, 통밀, 대두, 조, 수수, 보리쌀, 울무, 옥수수, 현미, 팥)

접종

민자주방망이버섯 종균을 퇴비배지 무게의 3%가 되게 접종하였을 때 균사의 활착이 가장 빠르고 고르게 되었다. 또한 퇴비배지 내부보다 퇴비배지 표면에 더 많은 종균을 접종함으로써 균사가 표면에 더 빠르게 성장하게 되고 이로 인해 곰팡이나 세균의 오염을 막을 수 있었다(Fig. 38).

곡물 종균 접종



Fig. 38. Inoculation of *L. nuda*

실험실 배양과 재배사 배양

A-실험실
B-재배사



Fig. 39. Incubation of *L. nuda*

균사의 배양

균사 배양시 온도는 24℃가 가장 적당하였으며 20℃ 이하와 26℃ 이상에서는 균사의 생장이 급격히 감소하였다. 습도는 80-85%가 가장 적당하였다. 80%이하의 습도에서는 균사가 건조되어 생장이 감소하거나 죽었으며 90% 이상에서는 응결수가 생겨 생장이 억제되었다. 또한 균사 성장 시에는 이산화탄소 농도가 중요하기 때문에 환기를 적게 하여 이산화탄소의 농도를 1500ppm 이상으로 유지시킴으로써 균사의 성장을 촉진할 수 있었다. 접종 후 3일부터 균사활착이 일어났으며 20일 경과 후 자주색의 균사가 퇴비배지 전체를 덮었다(Fig. 40).

균사 배양 (온도 24℃, 습도 80%이상, CO₂ 1500 rpm)



Fig. 40. Incubation of *L. nuda*.

복토

황토와 토탄을 1 : 1로 혼합한 것을 얇게 복토한 것이 가장 효과적이었다. 황토만 복토 하였을 때(Fig. 41)는 균사의 생장이 느려졌으며 토탄만 복토하였을 때는 곰팡이의 오염이 잘 되었다. 또한 복토층은 얇고 균일한 것이 효과적이었다. 두꺼운 복토층은 균사의 성장을 억제시켰으며 또한 환기가 되지 않아 원기형성이 어려웠다.

복토층 위로 균사가 충분히 자랐을 때 온도를 10℃-12℃사이로 내려 저온충격을 가하였

다.

복토 (온도 10℃, CO₂ 1000 rpm)



Fig. 41. Casing.

재배

온도는 15℃로 저온충격 후에는 급격한 온도변화를 줄이고 저온충격시의 온도와 크게 차이가 나지 않는 범위 내에서 배양하는 것이 효과적이었다. 습도 90%이상 유지하고 8일간 형광등을 켜 놓았다. 빛이 없어도 원기형성이 가능하지만 빛을 주었을 때 원기형성 까지 걸리는 시간을 줄일 수 있었다. 또 환기를 시켜 이산화탄소 농도를 1000ppm 이하로 유지함으로써 균사의 원기 형성을 유도하였다. 발이 조건 중 이산화탄소의 농도가 가장 중요한 요인으로 이산화탄소의 농도가 높을수록 원기형성이 늦어지거나 형성이 되지 않았다. 또한 원기형성 후에도 이산화탄소량이 높아지면 자실체 모양이 기형이 되거나 자라지 않았다. 그러므로 자실체 형성시에는 강력한 환기가 이루어 져야 한다.

채취

초 발이는 복토 20일 후부터 시작되었으며 복토 후 25일에서 30일 사이에 성숙한 자실체를 채취할 수 있었다. 이 후 한 차례 더 채취 하였다. 생산량은 일정하지 않았으나 실험실재배의 경우 배지 100kg당 자실체 6-10kg이었다. 그러나 대량 재배시 일반 재배사를 이용하는 경우 온도, 환기 습도를 정확하고 균일한 재배환경조건의 조절과 유지가 어려워 자실체 생산량이 감소하였고 일정치 않아 이에 대한 보완 연구와 대책이 필요하다. 이상을 요약하면 Table 32, Fig 42와 같다.

주의점

원기로부터 자실체 형성시의 환경조건 즉, 온도, 산소농도, 습도 등의 요인에 상당히 민감하다. 대량생산 시 이러한 요인들에 대한 균일한 상태를 유지하기 위하여 강력한 환기 시설이 필요하다.



액체배양균사



곡물종균



접종



배양



원기형성



자실체생산

Fig. 42. Artificially cultivated mycelial growth of *Lepista nuda* DGUM 25601 in compost.

spawn preparation	grain type temperature period	wholemeal 24°C 20 days
compost preparation	composition	

	rice straw(kg) poultry manure(%) rice flour(%) urea(%) gypsum(%)	100 10-15 5 1.2-2.0 1-3
	fermentation temperature humidity period	40-60℃ 70% 10 days
inoculation	spawn rate incubation temperature humidity CO ₂ days after inoculation	3% (spawn : compost=3 : 100) 24℃ 80-85% above 1500ppm 20 days
casing	soil rate yellow soil peat peat : yellow soil = 1 : 1	++ ++ +++
cultivation	temperature humidity CO ₂ days after casing	24℃ 80-85% above 1500ppm 20 days
low temperature shock	temperature	10-12℃
incubation	temperature humidity CO ₂ light days after casing	15℃ above 90% below 1000ppm fluorescent light 8 days 25 days
picking		

제 2 절 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 기능성 물질의 검색

1. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에 사용한 민자주방망이버섯은 경북 경산에서 자생하는 것을 채취한 후, 품종을 동정하고, -75 °C의 deep freezer에 보관하면서 실험 시료로 사용하였고, 비교 분석을 위해 능이버섯(*Sarcodon aspratus*)은 경북 예천에서 자생하는 자연산을 채취하여 품종을 검증받아 사용하였다.

2) 일반성분 분석

일반성분은 AOAC의 표준분석법(37)에 따라서 분석하였다. 수분은 105°C 상압 가열 건조법으로 측정하였으며, 조단백질은 Kjeldahl 법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 그리고 조회분은 550°C에서 직접회화법으로 분석하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였고 mean ± S.D.로 나타내었다.

3) 환원당 분석

시료 20 g에 증류수를 가하고 마쇄한 다음 상층액만을 여과한 뒤 100 mL로 정용하여 환원당 분석을 위한 시료액으로 사용하였다. Lunschinger와 Cormesky가 제시한 Somogyi-Nelson의 방법(38)에 따라 시료액 1 mL에 혼합시약(A : B=25 : 1, A; d₃H₂O 1 L in anhydrous Na₂HPO₄ 25 g, C₄H₄O₆KNa · 4H₂O 25 g, Na₂HCO₃ 20 g, anhydrous Na₂SO₄ 200 g, B; d₃H₂O 200 mL in CuSO₄ · 5H₂O 30 g, Concentrate H₂SO₄ 4 drop)을 0.5 mL 첨가하여 20분간 가열한 후 냉각하여 C액(total 500 mL store at 37°C/1 day-(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 25 g in d₃H₂O 450 mL including, concentrate H₂SO₄ 21 mL + Na₂HAsO₄ · 7H₂O 3 g in d₃H₂O 25 mL)을 1 mL 첨가하여 실온에서 반응시킨 다음, d₃H₂O 5 mL를 혼합하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 glucose로 검량선을 작성하여 시료의 환원당 함량을 산출하여 mean ± S.D.로 나타내었다.

4) 유리당 분석

유리당은 Shim 등(39)이 행한 방법에 따라 일정량의 시료를 물로 추출한 다음 hexane으로 유지성분을 제거하고 0.45 µm membrane filter로 여과하였다. 그리고 Sep-pak cartridge C₁₈로 색소 및 단백질 성분을 제거한 후 high performance liquid chromatography(HPLC, Waters 600E controller, USA)를 이용하여 분석하였다. Detector는 RI(Waters 2410), carbohydrate column(4.6×250 mm)을 사용하였으며 mobile phase는 acetonitrile 75 : H₂O 25, column temperature는 35°C, flow rate는 1.0 mL/min의 조건으로 분석하였다.

5) 무기질 분석

무기질 함량은 습식 분해법(40)에 따랐으며, 시료 1 g에 65%의 HNO₃ 6 mL와 30% H₂O₂

1 mL를 가한 다음 microwave digestion system(Ethos-1600, USA)을 사용하여 시료를 전처리하였다. 이를 0.45 μm filter로 여과한 후 atomic absorption spectrophotometer(Shimadzu AA-6701, Japan)를 이용하여 acetylene flow rate 2.0 L/min, air flow rate 13.5 L/min의 조건으로 K(766.5 nm), Mg(285.2 nm), Ca(422.7 nm), Na(589.0 nm), Mn(279.5 nm), Fe(248.3 nm), Cu(324.8 nm), Zn(213.9 nm), Ni(232.0 nm), Cd(228.8 nm) 그리고 Pb(283.3 nm) 등을 분석 정량하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였고 mean \pm S.D.로 나타내었다.

6) 아미노산 및 아미노산 유도체 분석

구성아미노산의 분석은 Yun 등(41)의 방법에 따랐으며, 시료 50 mg과 6 N HCl 10 mL를 가수분해관에 주입한 후 탈기, 밀봉 한 뒤 105°C에서 24시간 동안 가수분해하였다. 그 후 0.45 μm filter로 여과, 농축하고 citrate buffer로 다시 용해하여 아미노산 분석 시료로 사용하였다. 유리아미노산 및 아미노산 유도체는 일정량의 시료에 증류수를 가하여 추출한 후 0.45 μm filter로 여과하여 분석 시료로 사용하였다. 추출된 시료는 분석용 column(Lithium High Resolution Peek)이 부착된 아미노산 자동분석기(Pharmacia Chrom 20, Sweden)를 사용하여 분석하였다.

7) 추출물 제조

(1) 환류 추출(Rotary heating extraction)

환류 물추출물(RWE; Rotary heating Water Extract)은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에 시료의 중량비 10배에 해당하는 증류수를 넣고, 80°C의 수욕 상에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 환류 에탄올추출물(REE; Rotary heating 70% Ethanol Extract)은 시료 중량비 10배에 해당하는 70% 에탄올을 넣고, 60°C의 수욕 상에서 3시간 동안 3회 반복 추출하였다. 각 추출액은 filter paper(Whatman No. 2)로 거른 다음, 감압농축(Eyela 400 series, Japan) 후, 동결건조(FD 5510 SPT, Ilshin Korea)하여 일정량의 농축액으로 만들어 실험에 사용하였다.

(2) 마이크로웨이브 추출

마이크로웨이브 물추출물(MWE; Microwave-assisted Water Extract)은 마이크로웨이브 추출장치(CEM matthews NC Marsx unit, USA)를 이용하여 시료의 중량비 10배에 해당하는 증류수를 넣고 80°C에서 3시간 동안 추출하였으며, 마이크로웨이브 에탄올추출물(MEE; Microwave-assisted 70% Ethanol Extract)은 앞의 장치에 시료의 중량비 10배에 해당하는 70% 에탄올을 넣고 60°C에서 3시간 동안 3회 반복 추출하였다. 모아진 추출액은 환류 추출물과 동일한 방법으로 농축하여 실험에 사용하였다.

8) 항산화성 측정

(1) 전자공여능(Electron donating ability: EDA) 측정

민자주방망이버섯의 전자공여능 측정은 Blois의 방법(42)을 변형하여 각 추출물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 수소공여 효과를 측정하여 전자공여능을 평가하였다. 즉, 일정 농도의 시료 2 mL에 2×10^{-4} M DPPH용액(dissolved in 99% Ethanol)을 1 mL 넣고 혼합한 후, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 spectrophotometer를 사용

하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전·후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

(2) SOD(Superoxide dismutase) 유사활성 측정

각 추출물의 SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund(43)의 방법에 따라 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 산화된 양을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 일정 농도의 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl] amino-methane+10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응 후, 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

(3) 아질산염 소거능(Nitrite-scavenging ability) 측정

아질산염 소거 작용은 Kato 등(44)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mM의 아질산염 용액 2 mL에 소정 농도의 추출물 1 mL를 첨가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.2 M citrate buffer를 완충용액으로 하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 다음, 반응용액의 부피를 10 mL로 하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각각 1 mL씩 취하여 2% acetic acid 5 mL를 첨가하였다. 그리고 Griess 시약(A:B=1:1, A; 1% sulfanilic acid in 30% acetic acid, B; 1% naphthylamine in 30% acetic acid)을 0.4 mL 첨가하여 혼합한 다음, 실온에서 15분간 반응시킨 후 spectrophotometer의 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 산출하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 첨가한 후, 상기와 동일한 방법으로 측정하여 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

9) 항균성 측정

추출물의 항균성을 조사하기 위하여 생육저해환실험(clear zone test)을 실시하였다. 사면배지에 배양한 보존균주(Table 33)를 1백금이량 취해서 TSB(tryptic soy broth)배지 10mL에 접종하여 18~24시간씩 2회 계대배양하여 활성화시킨 배양액 0.1 mL를 TSB배지에 접종하여 각 세균의 대수증식기에 도달할 때까지(3~6hr) 본배양 하였다. 미리 만들어 둔 TSA(tryptic soy agar) 평판배지 1개당 본 배양액을 약 10⁷ cells 되게 접종하여 멸균면봉으로 균일하게 도말하였다. TSA 평판배지 표면에 8mm 멸균 paper disc(Whatman)를 올려놓은 다음 추출물을 각각 TSB에 0, 1, 3, 5% 농도가 되도록 조제한 후 0.45µm membrane filter로 여과하여 50µl씩 흡수시켜 37°C의 항온기에서 48시간 배양시킨 후 paper disc 주위의 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

Table 33. List of pathogenic bacteria used for experiment

	Bacterial strain	Symbol
Gram(+)	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	LM
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565	SA

Gram(-)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	EC
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 7988	ST

10) 암 세포주 배양 및 저해 효과 측정

본 실험에 사용된 암세포주는 사람의 간암 세포 HepG2 (hepatocarcinoma, human)와 사람의 위암세포인 KATOIII(gastric carcinoma, human), AGS(gastric carcinoma, human)를 Korea Cell (K)Line Bank(KCLB)로부터 분양 받아 RPMI medium 1640 복합배지 및 MEM 배지에 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotic-antimycotic을 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 37 °C로 2~3일에 한번씩 계대 배양하였다. 시료의 세포 성장 저해정도는 Green 등(49)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 먼저 배양한 세포를 96-well microtiter plate의 각 well에 1×10⁵ cells/well의 농도로 200μL씩 분주하고, 24시간동안 배양하였다. 그리고 시료를 각 농도별로 20 μL씩 첨가하여 48시간 배양한 다음, 각 well에 MTT(5 mg/mL) 용액 10 μL를 가하여 4시간 동안 배양한 후, 상등액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시켜 microplate reader(Molecular Device, Emax)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11) 당단백질과 다당류의 추출 및 분획

추출물 제조는 Fig. 50에 나타난 바와 같이 Ohino 등(45)의 고압 열수 추출방법에 따라 생체 250g에 증류수 500 mL를 가하여 121°C에서 2시간 동안 추출하였다. 또한 마이크로웨이브(CEM matthews NC Mars-X Unit, USA)를 이용하여 생체 250g에 증류수 500 mL를 넣고 121°C, 150 psi의 압력으로 2시간 동안 추출하였다(46-48). 고압 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물을 각각 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 여액과 잔사를 회수하였다. 회수된 여액은 감압농축(Eyela 400 series, Japan) 한 후, 동결 건조하여 그 추출물을 fraction I으로 하였다. 잔사는 5%의 urea를 함유한 10%의 NaOH 용액 500 mL를 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 교반한 뒤, 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 여액과 잔사를 회수하고, 여액은 dialysis tube(Sigma Co.)를 이용하여 72시간 동안 투석하여 감압 농축한 후, 동결 건조하여 fraction II로 하였다. 그리고 남은 잔사에는 다시 5%의 urea가 함유된 10% NaOH 용액 500 mL를 첨가하여 65°C에서 1시간 동안 추출한 뒤, 위와 동일한 방법으로 투석하고 동결 건조하여 fraction III으로 하였으며, 잔사는 위와 동일한 방법으로 투석하고 동결 건조하여 fraction IV로 구분하였다. 각 분획물은 사람의 암세포 성장 저해작용 실험에 사용하였다.

12) Chromatography에 의한 당단백질 및 다당류의 분리

분획된 당단백질 및 다당류의 chromatography 방법에 의한 분리는 Sepharose 6B를 column(2.5×70cm)에 주입하여 24시간 안정화시킨 후 일정량의 시료를 주입하여 분리하였다. 즉, 시료액은 분획된 당단백질 100mg을 10ml의 인산나트륨 완충액(pH 7.5)에 녹인 다음 membrane filter로 여과하여 제조하였다. 준비된 column에 시료를 주입하고 인산나트륨 완충용을 이동상으로서 하여 분당 0.3ml로 20분씩 분리하였다. 이때 chromatogram의 작성은 단백질은 280nm의 자동측정기로, 다당류는 Somogy-Nelson 방법으로 각 분리액의 다당류의 함량을 측정하여 작성하였다.

13) 분리된 당단백질과 다당류의 함량측정

분리된 당단백질과 다당류의 함량 측정은 앞에서 추출물의 암세포저해효과 측정방법과 동일하게 행하였다.

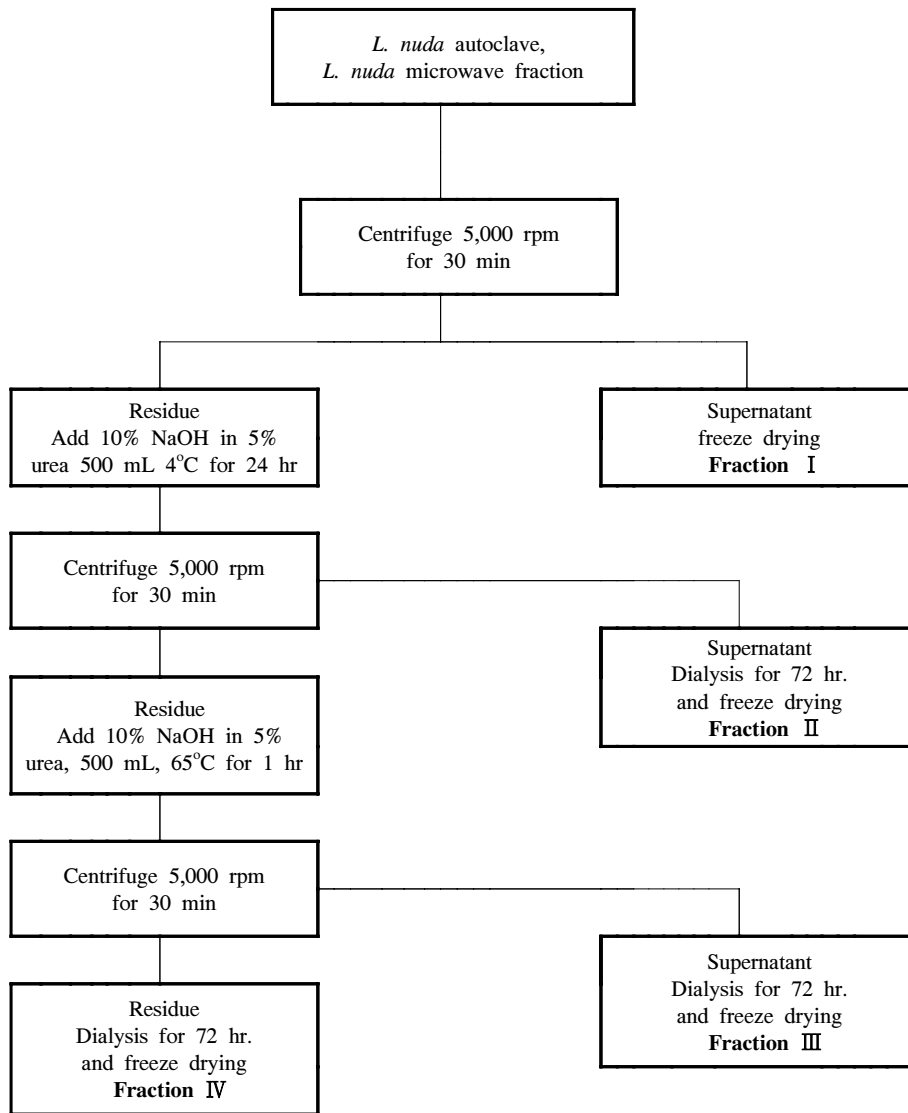


Fig. 43. Flow chart for fractionation of extracts from *Lepista nuda*.

2. 결과 및 고찰

1) 일반성분

민자주방망이버섯 자실체의 일반성분을 분석한 결과, 수분이 $90.90 \pm 0.09\%$ 로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 탄수화물 $4.38 \pm 0.07\%$, 조단백질 $3.70 \pm 0.03\%$ 그리고 조회분과 조지방이 각각 $0.55 \pm 0.04\%$ 와 $0.47 \pm 0.01\%$ 함유된 것으로 분석되었다(Table 34). 그리고 자생하는 민자주방망이버섯으로 분리한 액체 배양한 균사체의 일반 성분 함량을 분석한 결과, 건조한 균사체의 수분함량은 13.70%으로 비교적 함량이 높았다. 그리고 지방과 회분은 각각 4.47, 0.59%이었다.

능이버섯의 일반성분을 분석한 결과는 Table 34와 같이 수분함량은 89.93%, 탄수화물은 4.26%, 조단백질함량과 조지방은 각각 3.67%, 0.96%, 회분량은 1.18%로 나타났다.

Hong 등(50)의 아위버섯과 느타리버섯 그리고 새송이버섯의 수분함량이 각각 83.2%, 91.3%, 87.8%이었다는 결과와, Lee 등(51)의 능이버섯의 수분함량이 89.93%이었다는 보고에 본 연구의 결과를 비교하면 민자주방망이버섯의 수분함량은 느타리버섯보다는 낮았고, 아위버섯과 새송이버섯 그리고 능이버섯보다는 높았다. 탄수화물의 함량은 능이버섯(4.26%)과 유사한 함량을 나타내었으나, 아위버섯(10.6%), 느타리버섯(6.0%), 새송이버섯(9.0%) 보다는 함량이 낮았다. 민자주방망이버섯의 조단백질 함량은 아위버섯(2.5%)이나 느타리버섯(1.2%), 새송이버섯(1.5%)에 비하여 높았으며, 능이버섯(3.67%)과는 유사한 함량을 보였다. 민자주방망이버섯의 조회분은 능이버섯(1.18%)과 느타리버섯(0.6%)에 비하여 함량이 낮았으나, 아위버섯(0.3%), 새송이버섯(0.1%) 보다는 함량이 높은 것으로 분석되었다. 조지방의 함량은 능이버섯(0.96%)보다는 낮았으나 아위버섯(0.4%), 느타리버섯(0.2%), 새송이버섯(0.1%) 보다 높았으며, 특히 새송이버섯 보다는 4배 이상 함량이 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 분석 결과로 민자주방망이버섯은 유용한 생물자원임을 알 수 있다.

2) 환원당과 유리당

민자주방망이버섯의 환원당과 유리당 함량은 Table 35에 나타내었다. 민자주방망이버섯 자실체의 환원당의 함량은 636.17mg이었고, 액체배양한 균사체의 환원당 함량은 897.17이었다. 환원당에 대한 버섯류에서의 보고가 미흡하여 타종과 비교하면, Cha 등(52)이 보고한 매실의 970 ± 51 mg보다는 낮았으나, Jeong 등(6)이 보고한 뽕나무 줄기(513 mg) 보다는 더 높은 것으로 나타났다.

HPLC를 이용하여 유리당을 분석한 결과, 민자주방망이버섯 자실체의 총 함량은 97.42 mg로서 arabinose, mannose, galactose 등의 단당류와 이당류인 maltose, 삼당

Table 34. Proximate components of *Lepista nuda* and *Sarcodon aspratus*

(%)

<i>Lepista nuda</i>	Moisture	Carbohydrate	Crude protein	Crude ash	Crude fat
Fruiting Body (fresh weight)	90.90 ± 0.09	4.38 ± 0.07	3.70 ± 0.03	0.55 ± 0.04	0.47 ± 0.01
Mycelium (Dry weight)	16.90 ± 0.25	64.34 ± 0.51	13.70 ± 0.17	4.47 ± 0.23	0.59 ± 0.09
<i>Sarcodon aspratus</i>	89.93 ± 0.51	4.26 ± 0.15	3.67 ± 0.57	0.96 ± 0.24	1.18 ± 0.27

류인 trehalose 등이 분리 동정되었다. 유리당 중에서는 galactose의 함량이 51.98 mg으로 가장 높았으며, trehalose가 22.48 mg 함유되어 있었다. 이외에 maltose, mannose, arabinose가 각각 8.48, 7.96, 6.52 mg 함유되어 있는 것으로 분석되었다. 또한 균사체의 유리당 함량은 galactose, mannose, trehalose, arabinose 등의 순의 함량이 높았고, 특히 galactose의 함량이 131.98mg/100g으로 많이 함유하고 있는 것이 특징이었다. 총 유리당의 함량은 254.42 mg/100g이었다. 능이버섯의 유리당 함량은 Table 35와 같이 glucose, sucrose, trehalose, xylose 4종이 검출되었고, 그 함량은 각각 8.20, 0.89, 10.96, 0.20 mg/100g이었고, trehalose의 함량이 10.96 mg/100g으로 가장 높았고 유리당의 함량은 20.25 mg이었다는 결과와 비교하여, 민자주방망이버섯의 유리당 총 함량은 능이버섯보다 4.8배 이상 높은 것으로 나타났다.

또한 Lee 등(4)은 털주름버섯에서는 glucose와 fructose의 함량이 각각 51.64%와 19.12%로 보고하였으며, Hong 등(50)은 아위버섯에서 glucose가 22.3%, fructose가 0.92% 함유되어 있다고 보고한 바 있다. 이러한 결과들과 비교하면 민자주방망이버섯에서는 털주름버섯과 아위버섯에 다량 함유된 glucose와 fructose는 분리 동정되지 않았으나, 앞의 버섯들에 함유되어 있지 않은 galactose가 51.98 mg으로 매우 높게 함유되어 있었으며, trehalose의 함량도 능이버섯에 비해 2배 이상 높았다.

이러한 결과는 버섯 종에 따라서 유리당의 함량 및 종류에 큰 차이가 있다는 이전의 연구(13)와, 버섯의 발육과정과 크기에 따라서도 유리당의 함량이 다르다는 보고(53)와 관련이 있을 것으로 생각된다. 그리고 민자주방망이버섯의 환원당과 유리당 조성 및 함량이 다른 버섯과 차이가 있으므로, 조성 성분에서 다른 생리 기능상의 차이가 있을 것으로 예상되며 이에 대한 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

Table 35. Contents of reducing sugar and free sugar in the *Lepista nuda* and *Sarcodon aspratus* (mg/100 g)

<i>Lepista nuda</i>	Reducing sugar	Free sugar					Total
		Arabinose	Galactose	Mannose	Maltose	Trehalose	
Fruiting Body (fresh weight)	636.17	6.52	51.98	7.96	8.48	22.48	97.42
Mycelium (Dry weight)	897.17	26.52	131.98	34.96	28.48	32.48	254.42

<i>Lepista nuda</i>	Reducing sugar	Free sugar				Total
		Glucose	Sucrose	Xylose	Trehalose	
Fruiting Body (fresh weight)	550.18	8.20	0.89	0.20	10.96	20.25

3) 무기질 분석

민자주방망이버섯에 들어있는 Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni, Cd, Pb 등의 무기질에 대한 함량을 측정된 결과는 Table 36에 나타내었다. 자실체에는 무기질 중 K이 103.10 ± 0.18 mg으로 가장 많이 함유되어 있었으며, Mg은 56.01 ± 0.20 mg, Ca와 Na는 각각 10.17 ± 0.09 mg과 6.19 ± 0.02 mg이었다. 능이버섯의 무기질 함량은 Table 36와 같이 칼륨, 나트륨이 매우 풍부할 뿐만 아니라 마그네슘, 칼슘 등 각종 무기질 함량이 높은 것으로 나타났다. 이들 함량은 각각 375.73, 61.82, 23.84, 16.53 mg/100g으로 나타났으며 배양된 균사체의 무기질 함량은 K, Mg, Ca, Fe의 함량이 높고 미량원소인 아연과 구리가 비교적 많이 함유하고 있었다.

K의 함량을 Hur와 Kim(54)이 보고한 표고버섯(2.53 mg), 영지버섯(1.48 mg), 느타리버섯(22.14 mg) 그리고 송이버섯(79.00 mg)의 결과와 비교하면, 민자주방망이버섯의 K 함량이 다른 버섯에 비해 월등히 높은 것으로 나타났으며, 양송이버섯(106.66 mg)과는 유사하였으나, 능이버섯의 375.73 mg(51)보다는 낮은 함량을 나타냈다. 민자주방망이버섯의 Mg(56.01 mg)은 표고버섯(144.42 mg), 영지버섯(128.88 mg) 보다는 낮은 함량을 나타내었으나, 송이버섯(6.80 mg)과 양송이버섯(4.67 mg) 보다는 높았고, 23.84 mg의 함량을 나타낸 능이버섯의 결과와 비교하면 민자주방망이버섯이 2배 정도 많이 함유하였다. 또한 민자주방망이버섯의 Ca 함량(10.17 mg)은 앞에서 언급된 양송이버섯(18.26 mg), 느타리버섯(17.04 mg), 능이버섯(16.53 mg) 보다는 낮았으나 표고버섯(0.32 mg), 송이버섯(1.00 mg), 영지버섯(7.72 mg) 보다는 다소 높았다. 민자주방망이버섯의 Na 함량은 6.19 mg으로 능이버섯(61.82 mg), 표고버섯(39.22 mg), 영지버섯(20.06 mg), 양송이버섯(9.83 mg) 그리고 송이버섯(9.67 mg)의 결과(53)와 비교하면 다른 버섯들보다 낮은 것으로 분석되었다. 또한 유해한 활성산소의 생성 저해와 관련이 있는 것으로 알려진 아연, 망간, 구리, 철(51) 등도 미량 존재하는 것으로 분석되었다. 그러나 K의 함량은 영지, 표고와 비교하여 약 70배와 40배 이상 높은 함량을 나타내었고, 표고와 느타리 송이에 비해서도 높았다. Mg의 함량도 양송이와 송이에 비해 약 11배와 8배 이상 높은 함량을 나타내었고 이노작용을 촉진시키는 K와(55) 체내의 저항력 강화, 골격유지 등과 관련 있는 Mg 등이 다량 함유하였다. 따라서 85.5%의 간암세포 성장 저해와 90.7%의 위암세포 성장저해효과를 나타낸다는 Lee 등(32)의 보고와 전자공여능이

87.73%, SOD 유사활성능 42.03%로 높은 항산화성을 나타낸다는 연구결과(36)를 근거로 할 때 민자주방망이버섯은 매우 우수한 생물자원인 것으로 생각된다.

Table 36. Mineral contents of *Lepista nuda* and *Sarcodon aspratus* (mg/100 g-fr.wt)

Minerals	<i>Lepista nuda</i>		<i>Sarcodon aspratus</i>
	Fruiting Body	Mycelium	
K	103.10 ± 0.18	128.89 ± 0.37	375.73 ± 187
Mg	56.01 ± 0.20	97.95 ± 0.19	23.84 ± 0.29
Ca	10.17 ± 0.09	64.19 ± 0.24	16.53 ± 0.87
Na	6.19 ± 0.02	81.82 ± 0.47	61.82 ± 0.74
Mn	tr	0.23 ± 0.05	0.07 ± 0.09
Fe	tr	2.15 ± 0.11	0.11 ± 0.12
Cu	tr	0.27 ± 0.09	0.57 ± 0.14
Zn	tr	0.99 ± 0.18	0.71 ± 0.21
Ni	tr	nd	nd
Cd	nd	nd	nd
Pb	nd	nd	nd

tr : trace, nd : not detected

4) 구성아미노산과 유리아미노산 및 아미노산 유도체 분석

민자주방망이버섯의 아미노산 분석은 Table 37과 같이 총 17종의 아미노산이 분리 동정되었다. 민자주방망이버섯 자실체의 구성아미노산 총 함량은 310.39 mg이었다. 필수아미노산으로는 valine(25.40 mg), leucine(22.52 mg), lysine(21.34 mg) 등의 순으로 함량이 높았으며, 그 외 threonine(16.05 mg), phenylalanine(13.59 mg), isoleucine(12.60 mg) 그리고 미량의 methionine이 검출되어 총 111.50 mg의 아미노산이 분리 동정되었다. 비필수아미노산은 198.89 mg으로서 glutamic acid가 60.72 mg으로 가장 많았고, aspartic acid(30.17 mg)와 alanine(29.76 mg)의 함량도 비교적 높게 나타났다. 그 외에 arginine(17.05 mg), glycine(16.96 mg), serine(16.03 mg), histidine(8.42 mg), tyrosine(7.86 mg), proline(7.33 mg), cystine(4.59 mg) 등의 순으로 검출되었다. 민자주방망이버섯의 유리아미노산 함량은 총 220.86 mg이었으며, 필수아미노산은 36.21 mg으로서 isoleucine(21.57 mg), threonine(11.20 mg) 등의 함량이 높았고 그 외에 methionine(3.17 mg)을 비롯한 4종은 미량 함유되어 있었다. 비필수아미노산은 184.65 mg으로 glutamic acid가 42.78 mg으로 가장 많았으며, aspartic acid(32.44 mg), alanine(27.46 mg), glycine(25.86 mg), tyrosine(22.28 mg) 등이 동정되었으며 이외에 serine(17.14 mg), proline(13.39 mg), cystine(3.30 mg), histidine, arginine 등이 소량 함유하였다. 또한 민자주방망이버섯의 균사체의 구성 아미노산

의 총 함량은 796.85 mg/100g-fr.wt.으로 나타났으며, 필수아미노산의 전체함량은 300.77mg/100g -fr.wt.으로 valine, leucine, threonine, lysine의 함량이 비교적 높았고, 비필수아미노산은 486.08mg/100g-fr.wt.으로 alanine, glycine, aspartic acid, glutamic acid 등의 함량이 비교적 높았다. 총 유리 아미노산의 함량은 263.47mg/ 100g으로 나타났으며, 총 필수아미노산의 함량은 124.95 mg/100g-fr.wt.으로 methionine, lysine, valine의 함량이 비교적 높았고, 비필수아미노산은 138.52mg /100g-fr.wt.으로 arginine, Aspartic acid, tyrosine 등의 함량이 높았다.

능이버섯에 함유된 구성 총아미노산은 Table 38와 같이 구성 아미노산의 전체함량은 840.07 mg/100g으로 나타났으며, 필수아미노산의 전체함량은 300.77 mg/100g으로 valine, Leucine의 함량이 비교적 높았고, 비필수아미노산은 539.32 mg/100g으로 Alanine, Glycine, Aspartic acid 등의 함량비가 높았다.

본 실험결과를 Lee 등(51)이 보고한 능이버섯의 아미노산 분석 실험과 비교하면, 민자주방망이버섯의 구성아미노산 총 함량은 능이버섯의 총 함량 840.07 mg 보다 약 2.5배 낮았으나, 유리아미노산의 함량은 능이버섯(263.47 mg)과 비슷한 것으로 나타났다. Hong 등(2)이 발표한 양송이버섯과 표고버섯의 결과를 비롯하여, Hong 등(50)의 아위버섯, 느타리버섯, 새송이버섯에 대한 아미노산 분석 결과에서도 비필수아미노산이 glutamic acid, aspartic acid, alanine의 순으로 함유되어 있는 것으로 보고 된 바 있으며 민자주방망이버섯의 아미노산 분석 결과는 이들의 보고와 유사하였

Table 37. Contents of hydrolyzed amino acids and free amino acids in the *Lepista nuda* (mg/100 g)

<i>Lepista nuda</i>					
Amino acids		Fruiting Body (fresh weight)		Mycelium (Dry weight)	
		Hydrolyzed	Free	Hydrolyzed	Free
Essential amino acid	Threonine	16.05	11.20	53.65	tr
	Valine	25.40	0.27	67.85	32.75
	Methionine	tr	3.17	1.32	46.12
	Isoleucine	12.60	21.57	31.71	tr
	Leucine	22.52	tr	54.70	tr
	Phenylalanine	13.59	tr	25.87	0.61
	Lysine	21.34	tr	65.67	45.47
Total essential amino acid		111.50	36.21	300.77	124.95
Non-essential amino acid	Aspartic acid	30.17	32.44	83.45	16.28
	Serine	16.03	17.14	50.55	6.63
	Glutamic acid	60.72	42.78	77.25	14.62
	Glycine	16.96	25.86	100.85	tr
	Alanine	29.76	27.46	117.36	tr
	Cystine	4.59	3.30	2.34	tr
	Tyrosine	7.86	22.28	4.96	18.18
	Histidine	8.42	tr	13.32	9.01
	Arginine	17.05	tr	22.43	68.54
Proline	7.33	13.39	23.57	5.26	
Total non-essential amino acid		198.89	184.65	496.08	138.52
Total amino acids		310.39	220.86	796.85	263.47

tr : trace

Table 38. Contents of hydrolyzed amino acids and free amino acids in the *Sarcodon aspratus* (mg/100 g)

Amino acids		<i>Sarcodon aspratus</i>	
		Fruiting Body (fresh weight)	
		Hydrolyzed	Free
Essential amino acid	Threonine	53.65	-
	Valine	67.85	32.75
	Methionine	1.32	46.12
	Isoleucine	31.71	tr
	Leucine	54.70	tr
	Phenylalanine	25.87	0.61
	Lysine	65.67	45.47
Total essential amino acid		300.77	124.95
Non-essential amino acid	Aspartic acid	83.45	16.28
	Serine	50.55	-
	Glutamic acid	77.25	-
	Glycine	100.85	tr
	Alanine	117.36	tr
	Cystine	2.34	tr
	Tyrosine	4.96	18.18
	Histidine	13.32	9.01
	Arginine	65.67	68.54
Proline	23.57	-	
Total non-essential amino acid		539.32	112.01
Total amino acids		840.09	236.96

tr : trace

Table 39. Composition of amino acid derivatives in the *Lepista nuda* and *Sarcodon aspratus*. (mg/100 g-fr.wt)

Amino acid derivatives	<i>Lepista nuda</i>		<i>Sarcodon aspratus</i>
	Fruiting Body (fresh weight)	Mycelium (Dry weight)	
Phosphoserine	1.30	2.37	2.14
Taurine	2.10	3.74	1.08
Phosphoethanolamine	1.33	2.01	0.61
Hydroxyproline	121.50	159.28	-
α-Aminoadipic acid	2.20	3.47	1.31
α-Aminoisobutyric acid	11.23	50.24	-
Citrulline	15.58	11.98	-
Cystathionine	7.18	21.13	-
Ornithine	15.41	25.99	26.87
3-Methylhistidine	10.02	14.53	0.65
Sarcosine	-	-	8.78
β-Alanine			2.26
β-Aminoisobutyric acid			0.02
γ-Aminoisobutyric acid			2.14
Hyls			0.77
1-Methylhistidine			0.09
Carnosine			0.09
Total	177.83	294.74	46.81

다. 그리고 송이과와 주름버섯과에 속하는 버섯의 유리아미노산 함유율이 다른과의 버섯들보다 더 높다는 數野 등(56)의 결과와도 일치하였다. 左藤 등(57)은 각종 버섯류에 함유된 아미노산의 함량은 종류에 따라 차이가 심하고 동일종인 경우에도 발육단계, 발생환경, 발생시기 등에 따라서도 달라지며, 유리아미노산의 함량이 높은 버섯일수록 맛이 좋은 경향을 나타낸다고 하였다. Choi(58)는 수용성인 유리아미노산은 음료형태의 식품에 잔존하여 맛을

형성하는 중요한 성분이므로 적은 양이라도 식품의 맛을 내는데 매우 중요한 요소가 된다고 보고하였다.

본 연구에서 민자주방망이버섯에는 여러 종류의 아미노산이 함유되어 있으며, 단맛을 나타내는 것으로 알려진 glycine, tyrosine 및 alanine(59)이 민자주방망이버섯에 함유된 전체 유리아미노산 중에서 34%를 차지하는 것으로 분석되어 좋은 식품재료로 사용될 수 있을 것이다. 또한 다른 아미노산의 맛을 변화시키거나 강화시켜 주는 glutamic acid가 다량 함유되어 있어 민자주방망이버섯의 특유한 맛을 증가시키는 것으로 생각된다. 민자주방망이버섯은 Table 39와 같이 10종의 아미노산 유도체가 분리 동정되었다. 아미노산 유도체의 총 함량은 187.85 mg이었으며, hydroxyproline의 함량이 121.50 mg으로 가장 높았다. 그리고 citrulline(15.58 mg), ornithine(15.41 mg), β -amino- isobutyric acid(11.23 mg), L-3 methylhistidine(10.02 mg)의 함량 또한 비교적 높게 나타났으며, cystathionine을 비롯한 4종은 미량 함유되었다. 능이버섯에서의 아미노산 유도체 함량은 46.81 mg으로서 모두 13종이 검출되었으며, ornithine (26.87 mg), sarcosine(8.78 mg), phosphoserine(2.14 mg), β -aminoisobutyric acid(2.14 mg) 등이 함유되어 있다는 Lee 등(51)의 보고와 본 실험결과를 비교하면 민자주방망이버섯의 아미노산 유도체의 함량이 4배 이상 높은 것으로 나타났다. 또한 민자주방망이버섯의 ornitine 함량(15.41 mg)은 능이버섯(26.87 mg)보다 낮았으나 능이버섯에서는 분리 동정되지 않은 citrulline이 다량 함유되어 있었다.

본 실험의 분석 결과 민자주방망이버섯에는 다양한 아미노산 및 아미노산 유도체가 함유되어 있으며, 특히 맛을 향상시키는 유리아미노산의 함량이 매우 높았다. 피로회복에 효과가 있는 것으로 알려진 tyrosine과 taurine(60)을 함유하며, 이노작용에 효과적인 ornitine과 citrulline이 함유되어 있으므로 이러한 특성과 관련된 기능성 식품 개발에 대한 좋은 재료로 사용될 수 있을 것이라 판단되며 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

5) 향산화 효과

(1) 추출물의 전자공여능

민자주방망이버섯의 환류 추출물과 마이크로웨이브 추출물을 대상으로 용매와 농도(300 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm)에 따른 DPPH에 대한 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 51, 52와 같다. 측정한 3가지 농도에서 RWE의 전자공여능은 20.14~60.47%, REE는 26.91~60.13%였다. MWE는 24.31%~87.73%의 범위로 나타났으며 MEE는 22.11%~84.84%의 전자공여능을 나타내었다. 네 가지 추출물 중에서 MWE가 1,000 ppm 농도에서 가장 높은 전자공여능을 보였으며, 시료의 농도가 높아질수록 DPPH에 대한 전자공여능이 증가하였다. 균사체의 전자공여능을 조사한 결과, 용매와 추출방법에 관계없이 모든 추출물의 전자공여능은 유사하였고, 추출물의 농도가 증가함에 따른 전자공여능은 증가하였으며, 1000ppm에서는 80~90%정도의 전자공여능이 있었다. 이는 페놀화합물의 농도가 증가할수록 전자공여능이 증가한다는 Kang 등(18)과 Kim 등(61)의 보고와도 일치함을 알 수 있었다. 300 ppm과 500 ppm에서는 환류 추출방법의 REE에서 가장 높은 전자공여능을 나타낸 반면, 1,000 ppm 농도에서는 MWE가 87.84%, MEE는 84.84%의 높은 전자공여능을 나타내었으며, REE는 60.13%의 가장 낮은 전자공여능을 나타내었다. 마이크로웨이브 추출물은 모든 농도에서 물 추출물이 에탄올추출물보다 높은 전자공여능을 나타내었으며, 이는 팽이버섯과 느티만가닥버섯의 전자공여능이 마이크로웨이브 에탄올추출물보다 마이크로웨이브 물추출물에서 더 높게 나타났다는 Kim 등(61)의 보고와 일치하였다. 능이버섯의 추출용매별, 농도별에 따른 전자공여능을 측정한 결과, Fig. 46에서 보는 바와 같이 능이버섯 열수추출물에서는 100 ppm에서 71.43%, 1,000 ppm에서 76.94%, 에탄올추출물에서는 100 ppm에서 65.81%, 1,000 ppm 73.06%로 나타났다. 능이버섯 열수추출물이 에탄올추출물보다 전체적으로 전자공여능이 높았으며, 추출물과 농도가 낮을수록 그 차이가 커졌다.

술잎과 녹차 물추출물의 전자공여능이 1,000 ppm 농도에서 각각 55.2%와 53.2%로 보고한 Kim 등(62)의 결과는 본 실험의 RWE의 60.47%와는 비슷하였으나, MWE의 87.73%보다는 낮은 전자공여능을 보였다. 그리고 환류 추출방법을 이용한 민자주방망이버섯의 에탄올추출물 전자공여능은 60.13%로서 술잎의 에탄올추출물(84.4%)보다 낮았으나, 마이크로웨이브 추출법에 의한 에탄올추출물(84.84%)은 Kim 등(62)의 술잎 에탄올추출물과 비슷한 결과를 보였으며, 녹차(74.9%)보다 높은 전자공여능을 나타내었다. Moon 등(63)이 보고한 약용식물을 대상으로 한 메탄올추출물 1,000 ppm 농도에서의 전자공여능을 측정한 결과와 비교하면, 녹차(94.07%), 모과(92.61%), 정향(94.72%)보다는 낮았으나, 계피(86.77%), 상황버섯(81.32%)과는 유사한 전자공여능을 나타내었다. 그러나 감초(39.26%), 박하(26.27%), 당귀(13.71 %) 보다는 훨씬 높은 전

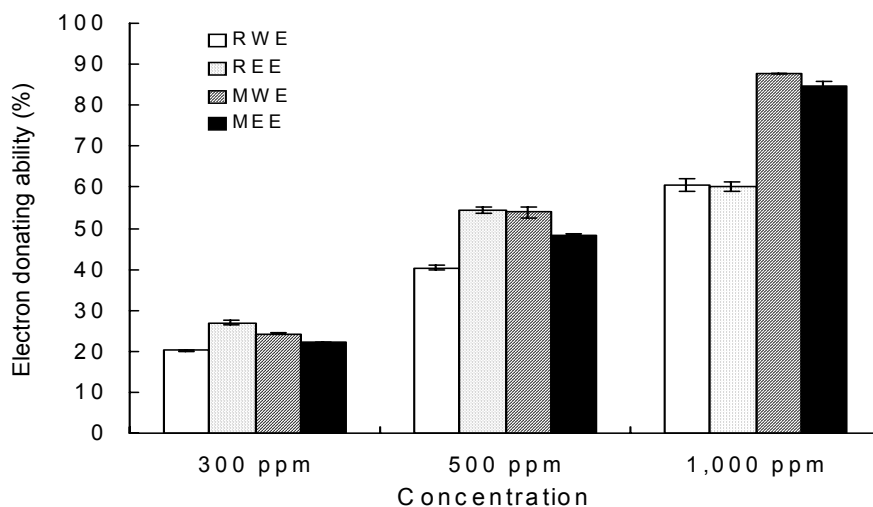


Fig. 44. Electron donating ability (EDA) of the extract from fruiting body of *Lepista nuda*.

RWE: Rotary heating Water extract, REE: Rotary heating Ethanol extract, MWE: Microwave-assisted Water extract, MEE: Microwave-assisted Ethanol extract. All values are expressed as Mean \pm SD of triplicate determinations.

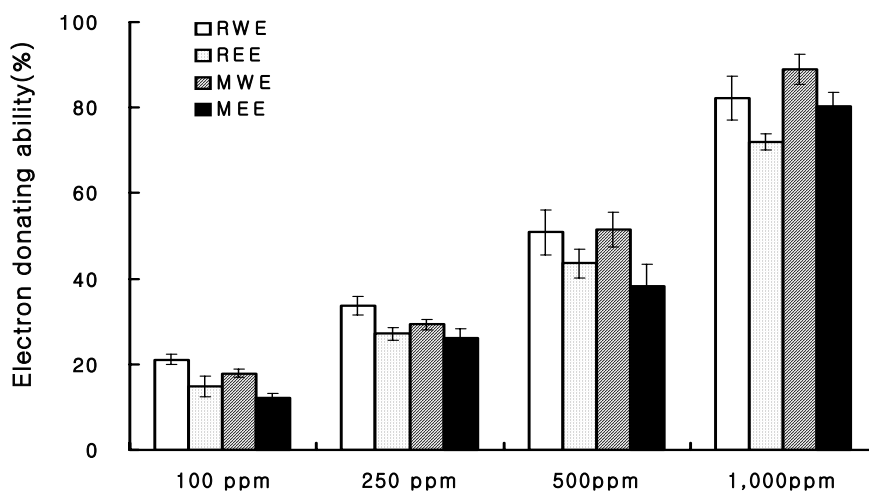


Fig. 45. Electron donating ability (EDA) of the extract from mycelium of *Lepista nuda*.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

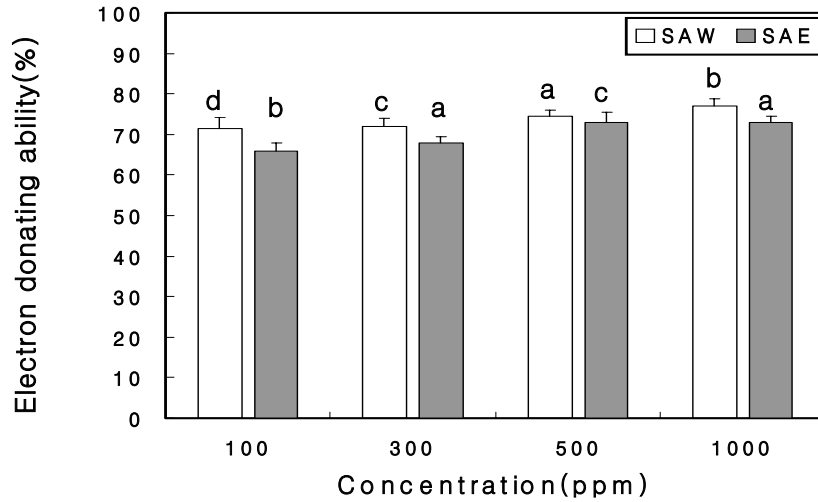


Fig. 46. Electron donating ability (EDA) of the extract from fruiting body of *Sarcodon aspratus*.

SAW: Rotary heating Water extract, SAE: Rotary heating Ethanol extract

자공여능을 나타내었다. 그리고 Lee 등(64)이 보고한 영지(95.1%)보다는 조금 낮았으나, 송이(33.8%), 표고(38.4%)보다는 높은 전자공여능을 나타내었다. Kang 등(4)은 phenolic acid와 flavonoids 및 기타 phenol성 물질이 전자공여효과를 높인다고 하였으며, Lee 등(64)은 영지, 표고, 양송이 등의 버섯 자실체에 함유된 phenol성 물질이 산화성 생물활성 free radical에 전자를 공여하여 항산화 효과를 높인다고 보고한 바 있다. 이러한 보고에 근거하여 볼 때 민자주방망이버섯의 MWE 추출물이 천연 항산화제로서의 이용가치가 높은 것으로 판단된다.

(2) 추출물의 SOD 유사활성

민자주방망이버섯의 자실체를 환류 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 추출용매와 농도(300 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm)에 따른 SOD 유사활성을 측정된 결과는 Fig. 53, 54와 같다. 측정된 3가지 농도에서 RWE의 SOD 유사활성은 18.94%~38.21%, REE는 8.80%~42.03%, MWE는 6.48%~29.24%, 그리고 MEE는 8.64%~24.58%의 범위로 측정되었으며, 모든 추출물에서 농도가 높아짐에 따라 SOD 유사활성도가 증가하였다. 그리고 환류 추출물의 유사활성도가 마이크로웨이브 추출물보다 높은 것으로 나타났으며 1,000 ppm 농도의 환류 에탄올 추출물에서 42.03%의 가장 높은 SOD 유사활성을 보였다. 민자주방망이버섯에서 분리한 액체배양 한 균사체의 SOD 유사활성은 추출물의 저농도에서는 용매의 종류와 추출방법에 따라 SOD 유사활성은 큰 차이가 없었으나, 1000ppm에서는 열수추출물이 마이크로웨이브 추출물에 비해 SOD 유사활성이 30-40%정도 높은 것으로 나타났다. 또한 능이버섯의 SOD 유사활성능을 측정된 결과 Fig. 54-1에서 보는 바와 같이 능이버섯 열수추출물에서는 100 ppm에서 26.57%, 1000 ppm에서 45.31%, 에탄올추출물에서는 100 ppm에서 38.72%, 1000 ppm에서 68.67%로 나타났다. 능이버섯 에탄올추출물이 열수추출물보다 높게 나타났다. 한국산 약용식물을 대상으로 한 Lim 등(65)의 SOD 유사활성에 대한 결과와 비교하면, 1,000 ppm 농도의 REE(42.03 %)와 RWE(38.21%)의 SOD 유사활성이 백편두(47.87%)보다

는 낮았으나, 대황(41.53%), 감초(35.63%)와는 유사한 SOD 유사활성을 나타내었다. 그리고 마이크로웨이브 추출방법을 이용한 MWE(29.24%)과 MEE (24.58%)는 황기(23.13%), 박하(15.00%), 오가피(13.50%), 홍화(13.43%)보다 높은 활성을 나타내었으며, 특히 소엽(3.67%)에 비하여 각각 6.7배에서 11.4배 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. 그리고 24.1% ~27.6%의 SOD 유사활성을 나타낸 사과, 케일, 키위, 무즙(66)과는 약간 높거나 유사한 결과를 보였다. 이러한 측정결과는 SOD 유사활성이 높을수록 phenol성 물질이 많이 함유되어 있다는 Lim 등(65)의 보고에 근거하여 보면, 민자주방망이버섯에도 phenol성 화합물이 많이 함유되어 있을 것으로 판단할 수 있다. 그리고 전자공여능 측정 결과와는 달리 환류 추출물의 SOD 유사활성이 마이크로웨이브 추출물에서 보다 더 높은 것으로 나타났으므로, 환류 추출방법을 이용하는 것이 SOD 유사활성을 더 높일 수 있을 것으로 사료된다.

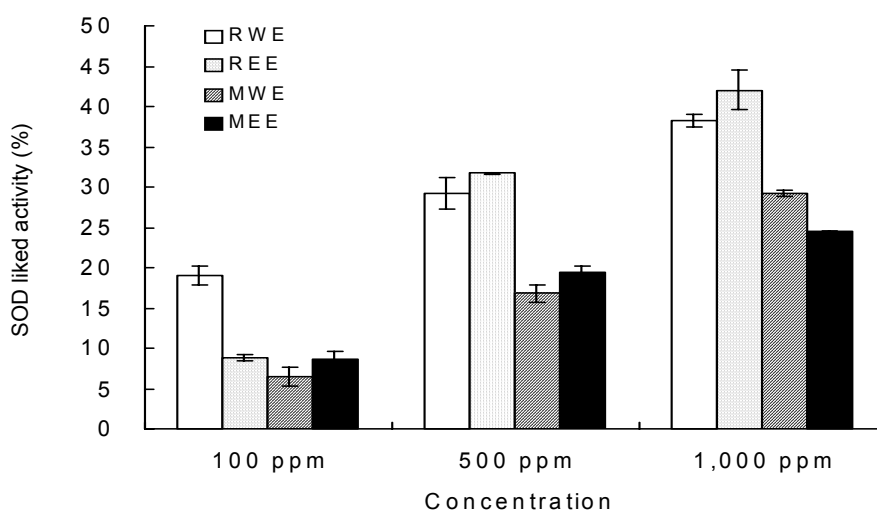


Fig. 47. Superoxide dismutase(SOD) liked activity of the extract from fruiting body of *Lepista nuda* on the autoxidation of pyrogallol. The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

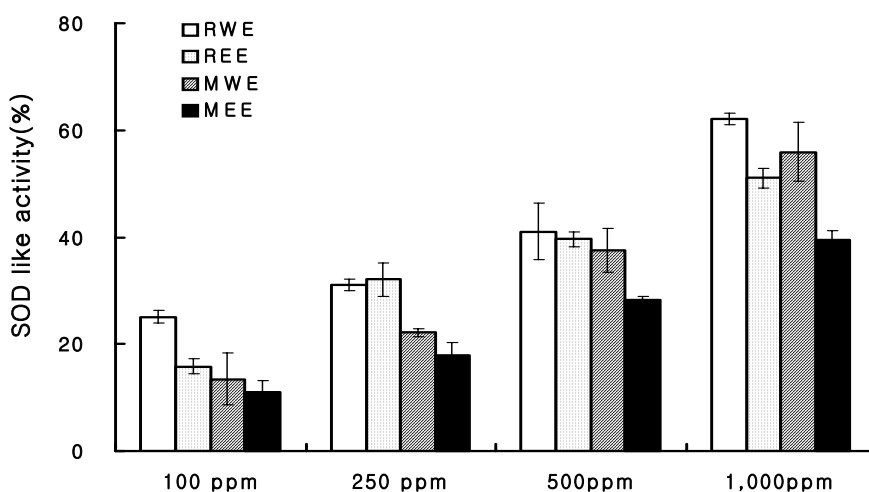


Fig. 48. Superoxide dismutase(SOD) liked activity of the extract from mycelium of *Lepista nuda* on the autoxidation of pyrogallol.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

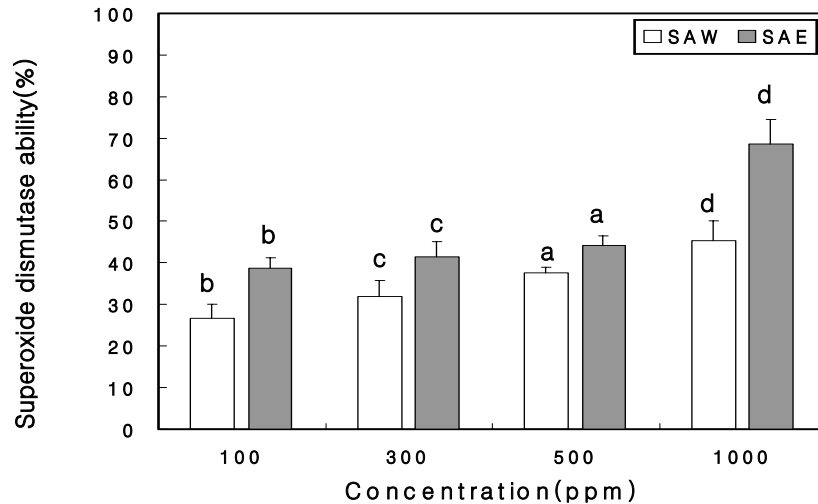


Fig. 49. Superoxide dismutase(SOD) liked activity of the extract from mycelium of *Sarcodon aspratus* on the autoxidation of pyrogallol.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 52-1.

(3) 추출물의 아질산염 소거능

물과 에탄올을 용매로 민자주방망이버섯의 환류 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 농도와 pH에 따른 아질산염 소거능을 측정하였다. pH 1.2에서 각 추출물의 아질산염 소거능을 측정한 결과, 환류 추출방법을 이용한 RWE는 14.42%~25.12%, REE 14.27 %~22.94%로 분석되었다. 마이크로웨이브 추출방법을 이용한 MWE는 14.00%~29.77%, MEE는 13.62%~25.47%로 분석되었으며, 1,000 ppm 농도에서 MWE의 효과(29.77%)가 가장 높은 것으로 나타났다. 모든 추출물에서 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능도 높아지는 것으로 분석되었다. 그리고 마이크로웨이브 추출물이 환류 추출물보다 다소 높은 아질산염 소거능을 보였으며, 두 가지 추출방법 모두에서 물 추출물이 에탄올 추출물보다 높은 아질산염 소거능이 나타나는 것으로 분석되었다.

pH 3.0에서 측정한 각 추출물의 농도에 따른 아질산염 소거능은 환류 추출물인 RWE는 4.52%~8.25%, REE는 5.33% ~7.85%의 범위로 나타났으며, 마이크로웨이브 추출물인 MWE는 9.27%~15.06%, MEE는 6.63%~9.39%의 아질산염 소거능을 나타내었다. pH 1.2에서의 결과와 같이 마이크로웨이브 추출법에서 더 높은 소거능을 보였으며, 물추출물이 에탄올추출물보다 높은 아질산염 소거능을 나타나는 것으로 분석되었다. 1,000 ppm 농도에서 MWE가 15.06%의 아질산염 소거능을 나타내어 환류 추출물의 RWE와 REE보다 각각 3.33배와 1.92배 높은 아질산염 소거능을 나타내었다.

pH 6.0에서는 다른 pH에서 보다 아질산염 소거능이 현저히 낮은 것으로 분석 되었다. RWE는 1.01%~3.75%, REE는 0.22%~1.61%, MWE는 0.75%~7.50%, MEE는 0%~3.97%의 범위로 분석되었으며, 농도 500 ppm의 MWE에서 7.5%의 가장 높은 효과를 보여 농도와는

일정한 상관 관계를 보이지 않았다. 마이크로웨이브 추출법을 이용한 MWE는 1000 ppm에서 4.65%로서 환류추출물보다 높은 아질산염 소거능을 나타내었으나, MEE에서는 아질산염 소거반응이 전혀 나타나지 않았다.

액체배양한 균사체의 아질산소거능력을 조사한 결과는 인간의 위의 환경인 pH 1.2에서는 추출물의 농도가 저농도일때는 용매와 추출방법에 따라 차이가 없었으나, 고농도일때는 SOD 유사활성과 같이 열수추출물에서 높았다. pH 3과에서는 열수 추출물이 마이크로웨이브 추출물에 비해 아질산 소거능력이 높았으며, pH 6.0에서는 100ppm에서 마이크로웨이브에 의한 ethanol 추출물이 다른 추출물에 비해 아질산 소거능력이 높았으나 다른 영역에서 유사하였다. 또한 능이버섯추출물의 pH변화에 따른 아질산염 분해작용을 나타낸 Fig 60-1,2에서 보는 바와 같이 1000 ppm, pH 1.2에서는 능이버섯 열수추출물이 72.61%, 에탄올추출물이 62.69%, pH 3.0에서는 능이버섯 열수추출물이 65.55%, 에탄올추출물이 55.93%, pH 4.2에서는 능이버섯 열수추출물이 51.52%, 에탄올추출물이 51.67%, pH 6.0에서는 능이버섯 열수추출물이

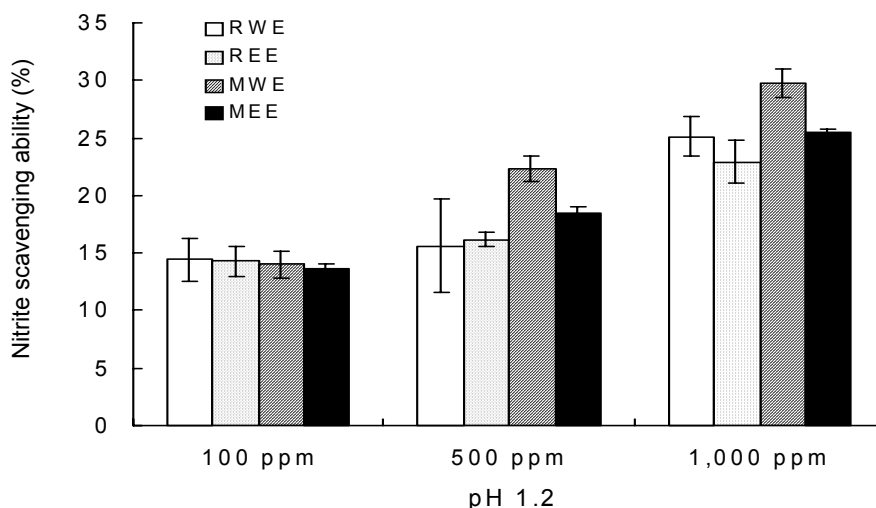


Fig. 50. Nitrite scavenging ability of the extract from fruiting body of *Lepista nuda* at pH 1.2.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

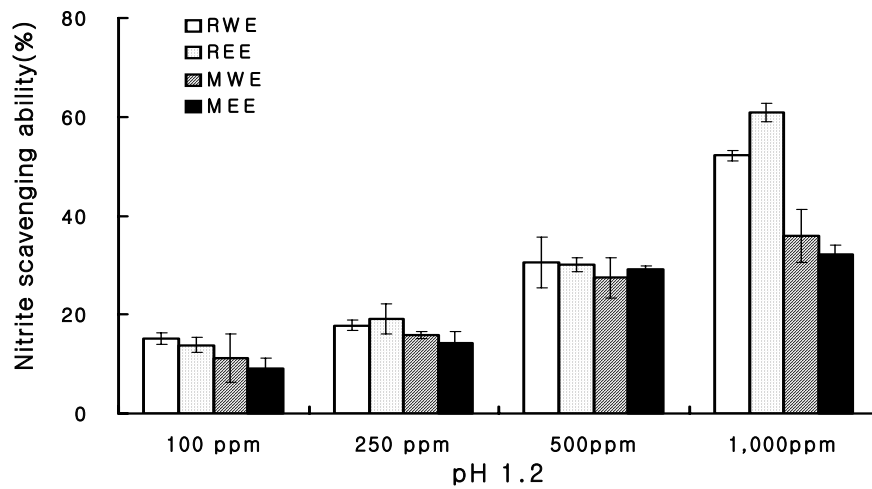


Fig. 51. Nitrite scavenging ability of the extract from mycelium of *Lepista nuda* at pH 1.2.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

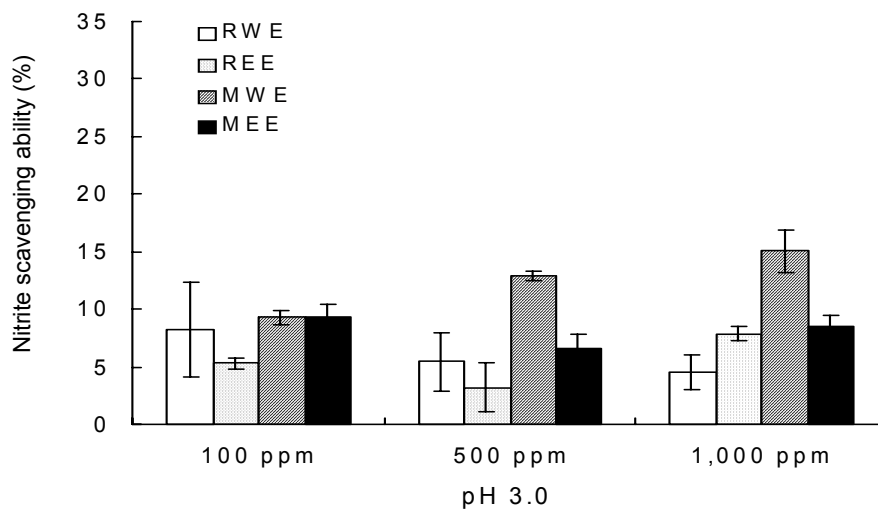


Fig. 52. Nitrite scavenging ability of the extract from fruiting body of *Lepista nuda* at pH 3.0.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

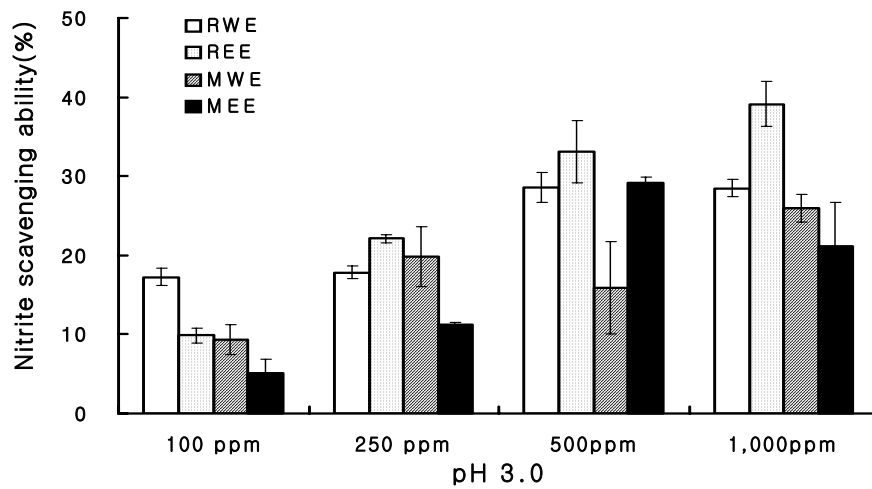


Fig. 53. Nitrite scavenging ability of the extract from mycelium of *Lepista nuda* at pH 3.0.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

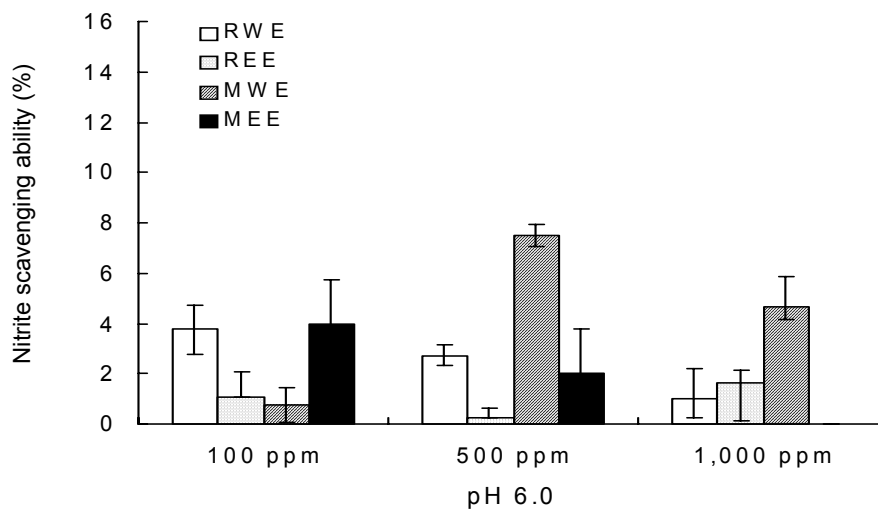


Fig. 54. Nitrite scavenging ability of the extract from fruiting body of *Lepista nuda* at pH 6.0.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

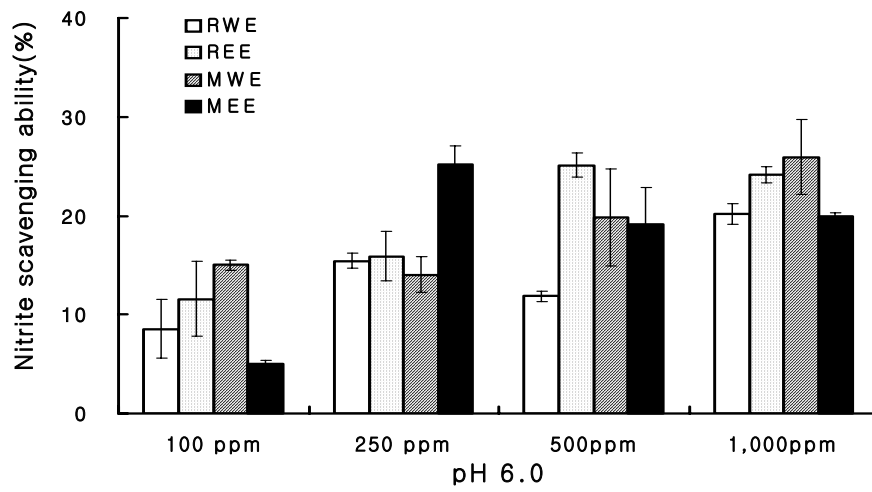


Fig. 55. Nitrite scavenging ability of the extract from mycelium of *Lepista nuda* at pH 6.0.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 51.

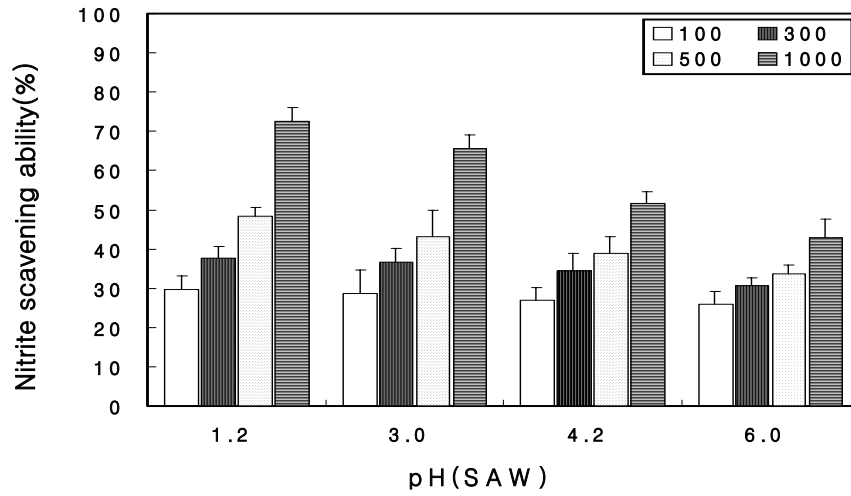


Fig. 56. Nitrite scavenging ability of *Sarcodon aspratus* water extracts at various pH.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 52-1.

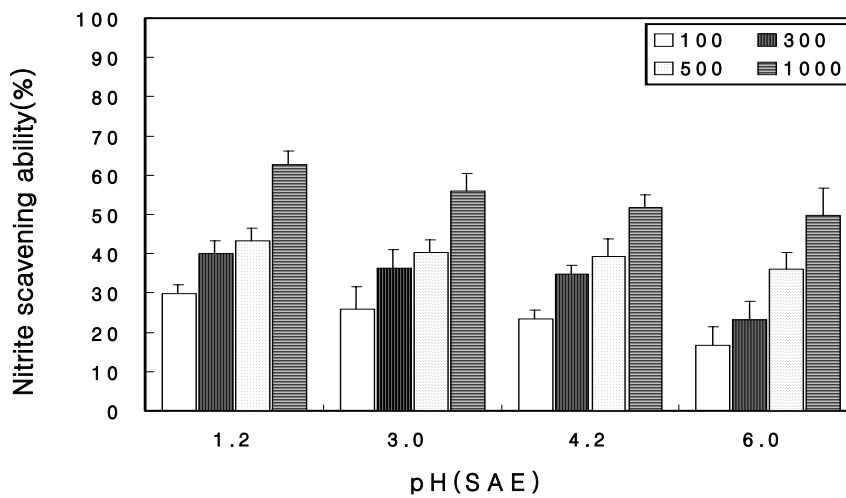


Fig. 57. Nitrite scavenging ability of *Sarcodon aspratus* ethanol extracts at various pH.

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 52-1.

42.98%, 에탄올추출물이 49.85% 나타나 전반적으로 열수추출물이 에탄올추출물보다 분해작용이 좀더 높게 나타났다.

영지와 양송이, 표고의 diethylether 추출물의 아질산염 소거능이 각각 68.34%와 4.76%, 3.45%라고 보고한 Lee 등(64)의 결과와 비교하면, 민자주방망이버섯 추출물의 아질산염 소거능이 영지보다는 낮았으나 양송이와 표고에 비하여서는 훨씬 높은 효과를 나타내었다.

민자주방망이버섯 추출물은 모든 pH 범위에서 마이크로웨이브 추출물이 환류 추출물보다 높은 아질산염 소거능을 보였으며, 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 더 높은 소거능을 나타내었다. 이는 팽이버섯의 마이크로웨이브 물추출물의 아질산염 소거능이 모든 pH 범위에서 에탄올추출물보다 높다고 보고한 Kim 등(61)의 연구 결과와도 일치하였다. 특히 pH 1.2의 1,000 ppm에서 마이크로웨이브 물추출물은 29.77%로 다른 pH 조건에 비해 매우 높은 값을 나타내었으며, pH가 높아짐에 따라 아질산염 소거능은 감소하였다. 이러한 결과는 pH의 감소에 따라 아질산염 분해 작용이 높아진다는 Kang 등(18)과 Kim 등(62)의 보고와 일치하였으며, pH 1.2에서 효과가 가장 높게 분석된 본 실험의 결과는 팽이버섯, 표고, 마늘, 쪽, 그리고 솔잎 등에서 보고된 아질산염 분해 작용의 결과와 일치하는 것으로 생각된다(67,68). 이는 nitrosamine 생성의 최적 pH가 2.5~3.0으로서, pH에 매우 의존적이며 아질산염 소거능 역시 강산성에서는 높고 pH가 높아질수록 감소하는 것으로 보고한 Kytopoulos(69)의 결과와도 일치하였다.

또한 nitrosamine의 전구물질인 아질산염과 아민이 식품 내에 상재성분으로 널리 존재하고 있으므로, 이들을 함유하고 있는 음식을 동시에 섭취했을 때 pH가 낮은 강산 상태의 위장 내에서 nitrosamine이 쉽게 생성될 가능성이 매우 높아지게 된다. 그러므로 아질산염 소거작용이 우수한 민자주방망이버섯을 아질산염 및 아민이 함유되어 있는 식품과 함께 섭취하면 nitrosamine의 생성을 효과적으로 억제함과 동시에 높은 산화방지 효과도 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

6) 추출물의 항균활성

물과 에탄올을 용매로 민자주방망이버섯의 환류 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 농도에 따른 항균활성을 측정하여 결과를 Table 40.에 나타내었다. 실험에 사용한 4가지 균주 모두에 대하여 항균활성을 나타내지 않았다. 이에 대한 연구는 구체적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

7) *L. nuda*의 암세포 성장 저해 효과

(1) HepG2 성장저해

민자주방망이버섯의 열수 추출물(AWE)과 마이크로웨이브 추출물(MAE)이 간암 세포 HepG2 (hepatocarcinoma, human)와 사람의 위암세포인 KATOIII(gastric carcinoma, human), AGS(gastric carcinoma, human)의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 민자주방망이버섯의 추출물과 분획물의 농도에 따른 사람 간암 세포주 HepG2에 대한 성장 저해효과는 Fig. 61, 62와 같았다. 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 분획물인 fraction I을 1 mg/mL 첨가하였을 때 추출 방법간에 큰 차이가 없이 간암세포주 HepG2에 대하여 높은 성장 저해효과를 나타내었으나 다른

Table 40. Antibacterial effect of extracts

Extracts of <i>Lepista nuda</i> (%)		Pathogenic bacteria ¹⁾				
		LM	SA	EC	ST	
Rotary heating extraction	Water extract	0	- ²⁾	-	-	-
		1	-	-	-	-
		3	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
	Ethanol extract	0	-	-	-	-
		1	-	-	-	-
		3	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
Microwave assisted extraction	Water extract	0	-	-	-	-
		1	-	-	-	-
		3	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
	Ethanol extract	0	-	-	-	-
		1	-	-	-	-
		3	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		5	-	-	-	-

¹⁾ Refer to the legend in Table 1.

²⁾ No inhibition

fraction은 성장 저해효과가 낮았다. 열수 추출물의 fraction I은 0.5 mg/ mL와 1 mg/mL 농도에서 각각 71.4%와 85.5%의 암세포저해를 나타내었으며, 마이크로웨이브 추출물의 fraction I도 각각 79.8%와 85.2%의 저해효과를 보였다. 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 fraction II는 42.4%~82.3%의 암세포 성장 저해를 보였으며, 마

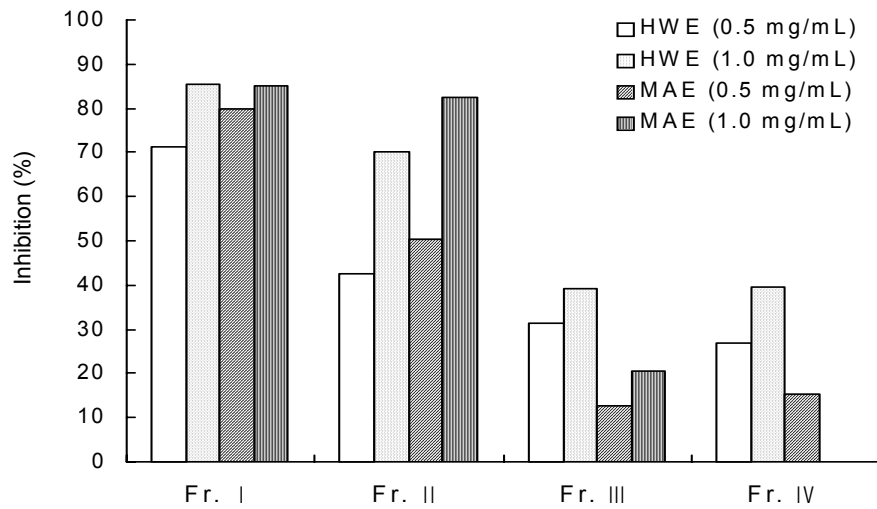


Fig. 58. Inhibition of cancer cell HepG2 growth by fractions of hot water extracts (HWE) and microwave assisted extracts (MAE) from fruiting body of *Lepista nuda*.

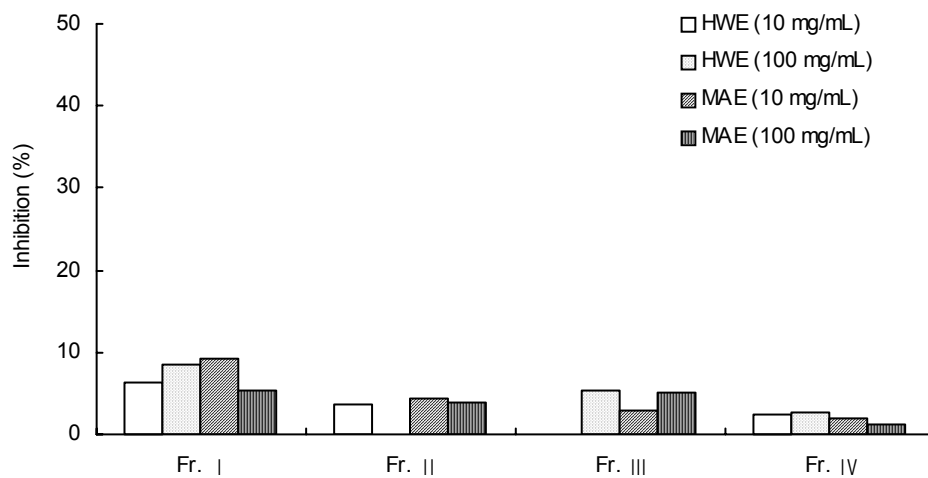


Fig. 59. Inhibition of cancer cell HepG2 growth by fractions of hot water extracts (HWE) and microwave assisted extracts (MAE) from mycelium of *Lepista nuda*.

이 마이크로웨이브 추출물의 분획물이 열수 추출물의 분획물에 비해 성장 저해율이 높았다.

열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 fraction III는 12.8 %~39.1%, fraction IV에서는 15.4%~39.5%의 HepG2 세포 성장 저해효과를 나타내었다. 그러나 마이크로웨이브 추출물에서 fraction IV는 0.5 mg/mL 농도에서는 fraction III 보다 저해효과가 높은 것으로 나타났으나 1 mg/mL 농도에서는 암세포 성장 저해효과가 전혀 없었다. 그리고 마이크로웨이브 추출물의 fraction I 과 fraction II가 열수 추출물의 fraction I 과 fraction II 보다 저해효과가 더 높은 경향을 보였는데, 특히 마이크로웨이브 추출물 1 mg/mL 농도에서는 fraction

I 과 fraction II의 효과가 거의 비슷하게 높아서 fraction 단계에 따른 차이가 나타나지 않았다. 그리고 fraction III와 fraction IV에서는 오히려 열수추출물의 저해효과가 마이크로웨이브 추출물보다 더 높았다. 그러나 모든 균사체 추출물의 Hep G2 암세포에 대한 저해작용은 고농도에서도 그 활성 정도 매우 낮았다. 락토버섯(*Datronia dickinsii*)의 열수 추출물에 대한 HepG2 암세포 저해효과가 40 %~42%인 것으로 보고한 Yang 등(70)의 결과와 함께 까치버섯(*Polyozellus multiplex*)의 열수 추출물은 43.3~57.1%, 메탄올 추출물은 43.3%~48.2 %, 장수버섯(*Formitella fraxinea*)의 메탄올 추출물은 59% ~66%의 암세포 성장저해를 나타내었다는 결과와 비교할 때(71,72), 민자주방망이버섯에서 추출된 단백질당체가 훨씬 높은 암세포 성장저해 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.

(2) KATOIII 세포 성장저해 효과

Fig. 63, 64는 민자주방망이버섯의 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 분획물이 위암 세포 KATOIII의 성장 저해에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 위암 세포 배양액에 열수 추출물의 각 분획물을 각각 0.5 mg/mL를 첨가하였을 때 위암세포의 성장 저해정도는 47.4%~55.8%로 뚜렷한 차이가 없었으나 1.0 mg/mL를 첨가하였을 때에는 47.9%~86.6%로 fraction I 과 II에서 높은 반면, fraction III와 IV에서는 낮았다. 마이크로웨이브 추출물의 경우에는 fraction I의 저해율이 농도별로 각각 78.6%, 88.9%로서 열수 추출물의 분획물보다 높은 암세포 성장 저해효과를 나타내었으며, fraction II을 제외하고는 모든 조건에서 열수 추출물 분획물의 저해효과가 더 높았다. 마이크로웨이브 추출물의 분획물 fraction III의 KATOIII 세포에 대한 성장 저해효과는 48.7%~51.8%로서 농도에 따른 큰 차이는 없었다.

Fraction IV의 경우에는 열수 추출물이 각각 47.4%와 47.9%정도 KATOIII 세포에 대한 성장 저해효과가 있었으며, 농도에 따른 저해효과의 차이는 없었고, 마이크로웨이브 추출물은 0.5 mg/mL의 농도에서 18.1%, 1.0mg/mL에서는 15.6%로서 열수 추출물에 비해 암세포 성장 저해효과가 훨씬 낮았다. 따라서 KATOIII 세포에 대한 성장저해 효과는 마이크로웨이브 추출물이 열수 추출물에 비해 높았고, 용해성이 큰 fraction I에서 그 효과가 매우 높았고, 용해성이 낮은 fraction에서는 낮았다. 또한

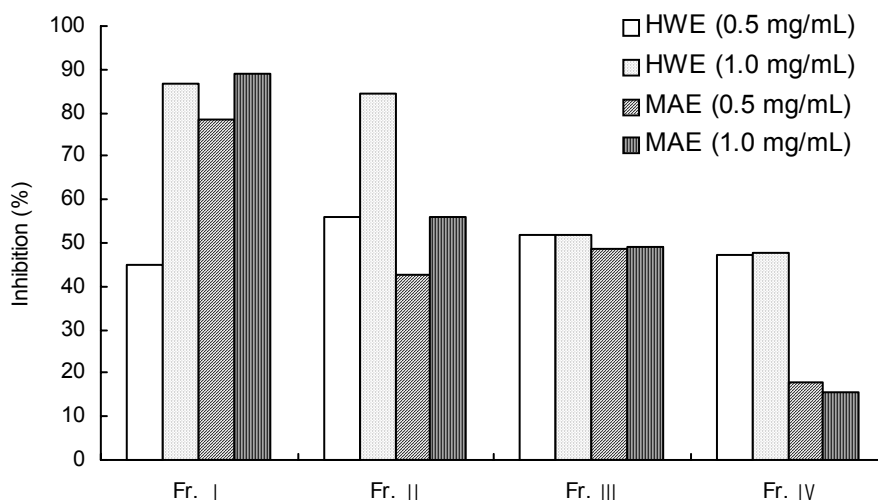


Fig. 60. Inhibition of cancer cell KATOIII growth by fractions of hot water extracts (HWE) and microwave assisted extracts (MAE) from fruiting

body of *Lepista nuda*.

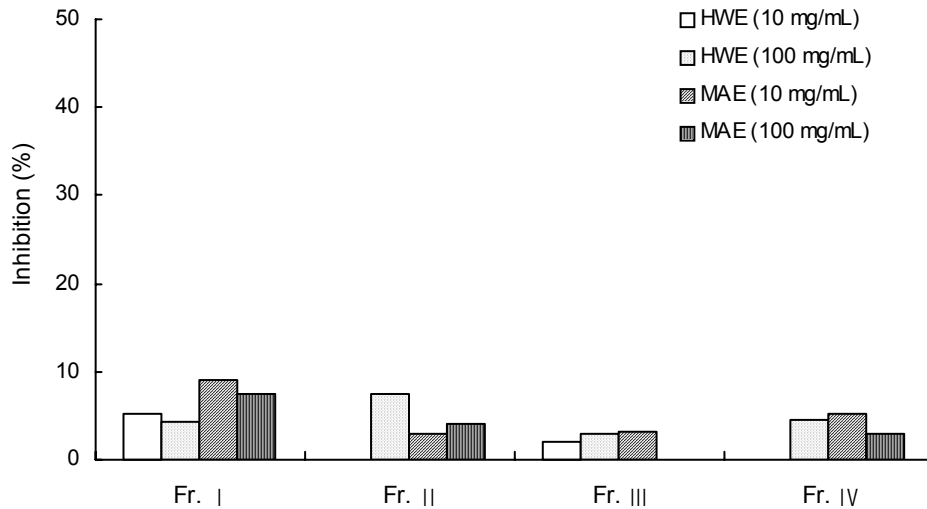


Fig. 61. Inhibition of cancer cell KATOIII growth by fractions of hot water extracts (HWE) and microwave assisted extracts (MAE) from mycelium of *Lepista nuda*.

아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei*) 추출물의 세포 독성 효과에 대해 보고한 Ji 등(73)의 결과에 따르면 1 mg/ mL 농도의 매탄올 추출물은 위암 세포주인 KATOIII에 대하여 88.7%의 성장 억제효과를 나타낸다고 한다. 이 결과는 민자주방망이버섯의 고압 열수 추출물의 KATOIII에 대한 억제율 86.6% 보다는 다소 높았으나, 마이크로웨이브 추출물의 88.9%와는 비슷한 결과를 보였다. 그러나 모든 균사체 추출물의 KATOIII 암세포에 대한 저해작용은 고농도에서도 그 활성 정도 매우 낮았다.

(3) AGS 성장저해

추출방법에 따른 민자주방망이버섯의 추출물을 용해별 분획한 분획물의 위암 세포주 AGS에 대한 성장저해 효과는 Fig. 65, 66과 같았다. 마이크로웨이브 추출물 fraction I의 1 mg/ mL 농도에서 91.8%의 가장 높은 성장 저해효과가 나타났으며, fraction III의 저해효과가 가장 낮았다. Fraction I의 0.5 mg/mL와 1 mg/mL 농도에서 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물은 71.6%~91.8%의 높은 성장 저해효과를 나타내었는데, 각 농도에서 모두 마이크로웨이브 추출물의 저해효과가 더 높았다. 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물의 fraction II의 위암 세포 AGS의 성장 저해율은 각각 73.6%, 89.6%, 47.7%와 89.6%로 나타났다. 열수 추출물의 fraction III는 3.79%~7.27%로 암세포 저해효과가 거의 없는 것으로 나타났으며, 마이크로웨이브 추출물의 경우에도 0.5 mg/mL의 첨가에서는 반응이 나타나지 않았고, 1 mg/ mL의 농도에서는 15.2%로 항암성이 거의 없는 것으로 나타났다. 열수 추출물의 fraction IV에서는 추출물의 농도가 0.5와 1.0 mg/mL를 첨가하였을 때 위암세포 성장 저해율은 각각 40.3%와 45.5%이었고, 마이크로웨이브 추출물의 경우에는 각각 23.4%와 20.0%이었다.

세포의 종류에 관계없이 민자주방망이버섯의 마이크로웨이브 추출물 fraction I의 1 mg/mL의 농도에서 대부분 가장 높은 암세포 성장 저해율(85.2%~91.8%)을 나타내었고, 열수 추출물 fraction I의 고농도 처리 결과도 85.5%~90.7%로서 마이크로웨이브 추출물의 효과와 거의 비슷하게 높은 억제율을 보였으며, 저농도 보다 고농도에서 효과가 더욱 큰 것을 확인할 수 있다. 그리고 민자주방망이버섯의 열수 추출법과 마이크로웨이브 추출법에서 모두 사람의 위암 세포주 AGS에 대하여 각각 90.7%와 91.8%의 가장 높은 성장 저해효과를 나타내었는데, 특히 고농도에서는 fraction I과 fraction II의 암세포 성장 저해효과가 89.6%에서 91.8% 범위로써 추출단계에 따른 차이가 거의 없이 아주 높게 나타났다. 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물과의 용해성이 낮은 분획물이 암세포에 대한 성장 저해효과가 감소하는 경향이였다. 각 추출물의 fraction II에서도 여전히 42.4%에서 89.6% 범위의 높은 저해효과를 보인다는 것과 AGS 세포주에 대한 fraction III와 fraction IV의 저해율이 다른 조건에서의 저해율과는 대조를 보이는 점이 특징적이다. 그러나 모든 균사체

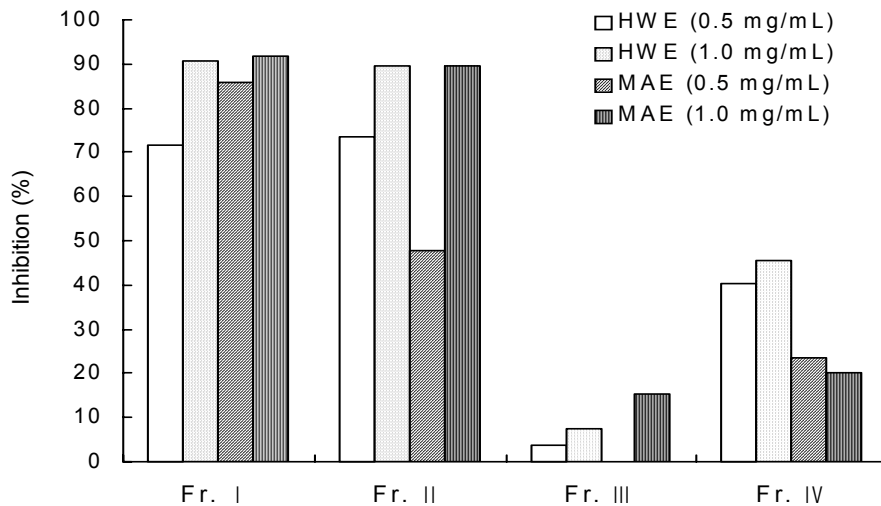


Fig. 62. Inhibition of cancer cell AGS growth by fractions of hot water extracts (HWE) and microwave assisted extracts (MAE) from fruiting body of *Lepista nuda*.

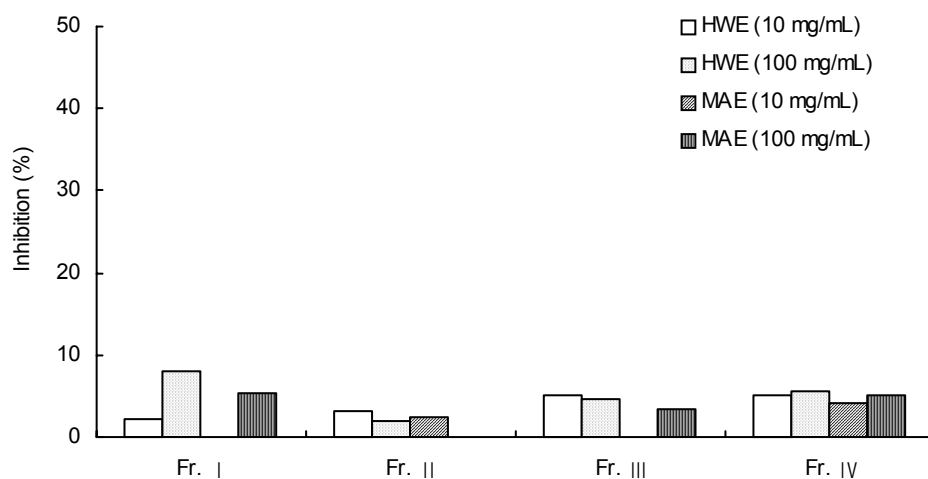


Fig. 63. Inhibition of cancer cell AGS growth by fractions of hot water extracts (HWE) and microwave assisted extracts (MAE) from mycelium of *Lepista nuda*.

추출물의 AGS 암세포에 대한 저해작용은 고농도에서도 그 활성 정도 매우 낮았다.

까치버섯의 열수 추출물에서 사람 위암 세포주인 SNU668은 0.5 mg/mL 농도에서 72.1%, 1 mg/mL 농도에서 83.6%의 암세포 저해효과를 나타낸다고 보고한 Kim 등(72)의 결과와 장수버섯의 메탄올 추출물에 대한 사람 위암 세포주인 Snu-1에 대하여 86.0% 저해를 나타낸다는 결과(71)와 비교하여 볼 때, 민자주방망이버섯의 열수 추출물과 마이크로웨이브 추출물은 각각 90.7%와 91.8%로 actinomycin D, adriamycin, bleomycin 보다는 매우 낮으나 분리 방법의 용이성이 상대적으로 높은 수율과 저독성을 감안해 보면 암세포 성장 저해효과가 매우 높은 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 민자주방망이버섯 자실체의 수용성 PBP는 항암 효과가 아주 높은 것으로 분석되었으므로 식용 및 약용으로서 유용성이 입증되어, 유용성분에 대한 연구와 제품 개발의 필요성이 더욱 증대될 것으로 기대된다.

균사체의 암세포의 저해 작용이 없는 것을 자연에서 채취한 자실체와 달리 실험실 영양배지로 배양한 것 결과인 것으로 생각되며, 자연산과 인공배양에 의한 것에 대한 구체적인 연구가 요망된다.

8) *L. nuda*의 당단백질과 다당류의 분리 및 항암효과

(1) 당단백질 및 다당류의 분리

민자주방망이 버섯 자실체의 분획물질인 열수추출물과 마이크로웨이브 추출물과 각 분획물의 항암성 측정한 결과, 항암성이 있는 분획물이며 당단백질 및 다당류의 분획에 해당하는 Fraction II를 인산완충용액으로 안정된 Sepharose column($\varnothing 2.5 \times 70\text{cm}$)에 주입하여 분획시간 20분으로 하여 분리한 결과는 Fig. 67, 68와 같았다. 민자주방망이 버섯 자실체의 열수추출물의 Fraction II분획을 분리한 결과는 Fig. 67에서 보는 것 같이 fraction No 35~50과 fraction No 65~72사이의 두개의 fraction으로 분리되었다. 각 분획의 단백질의 함량과 다당류의 함량을 측정한 결과, HPS-1 분획은 단백질과 당류가 모두가 검출되는 것으로 보아 당단백질이며, HPS-2는 단백질은 검출되지 않고 당류만 검출되어 다당류인 것으로 확인할 수 있었다. 마이크로웨이브 추출물의 Fraction II를 앞에서와 같은 방법으로 분리한 결과는 3개의 fraction으로 분리되었다. 마이크로웨이브 추출물의 분자량이 큰 두 개의 fraction은 열수추출물의 분획물과 같이 당단백질(MPS-1)과 다당류(MPS-2)인 것으로 확인되었고, 분자량이 작은 fraction (MPS-3)을 확인할 수 있었다. 윤 등(71)이 아카시아나무에서 자생하는 장수버섯의 다당체를 분리한 결과는 3종의 다당체를 분리하였으며, 이중 1종의 약리적인 유효한 항보체 활성이 있으며, 9종의 인체 암세포에 각 다당체의 저해효과를 검정에서 1 종류의 인체 위암(Smu-1), 또 다른 한종은 후두암(Hep-2)과 구피암(KB)에 암세포의 생존율을 억제한 것으로 나타난 것으로 보고하였다.

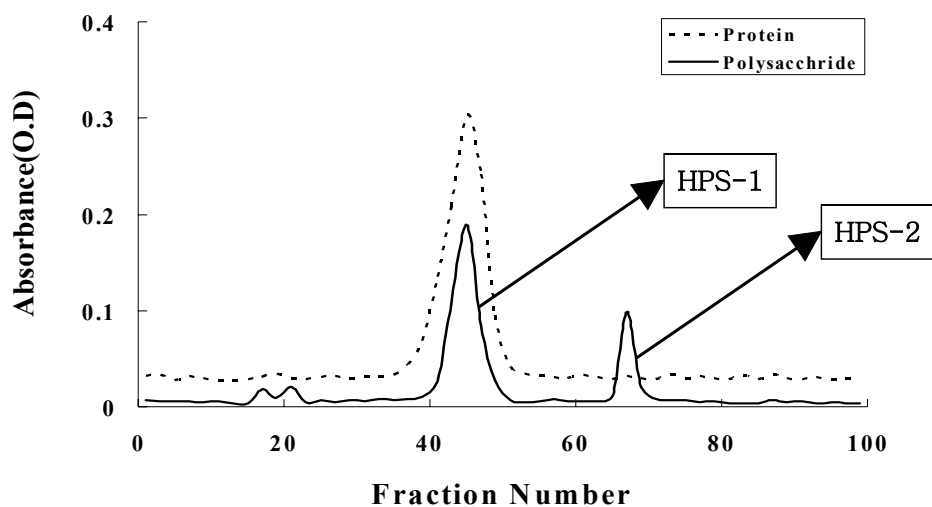


Fig. 64. Chromatograms of Fraction II extracted hot water extracts(HWE) from *L. nude*.

The column($\varnothing 2.5 \times 70$ cm) was equilibrated with 0.15M phosphate buffer and 100mg of Fraction II was applied on the Sepharose 6B column. Instrument was Foxy Jr(ISCO Co.) fraction collector and fraction time were collected of 20 minutes.

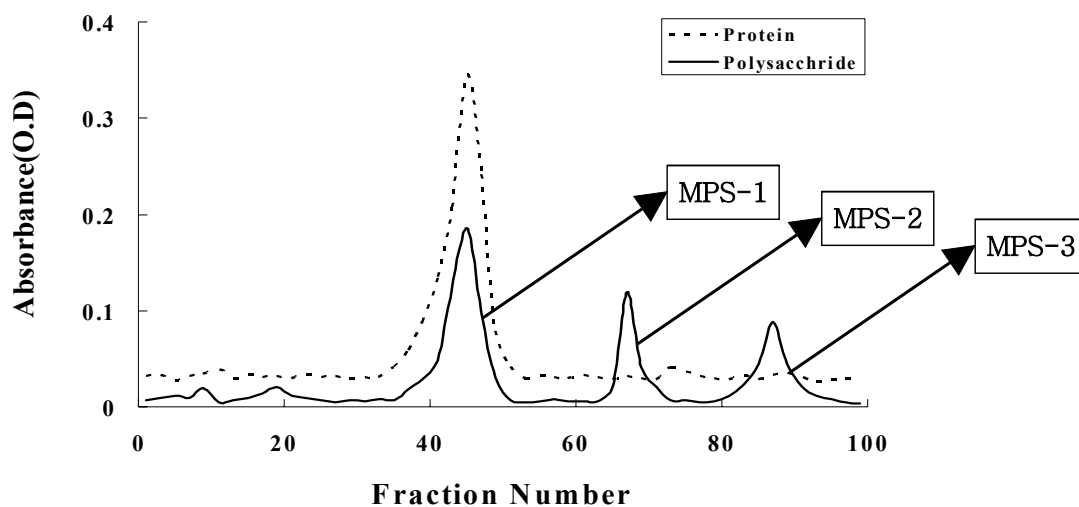


Fig. 65. Chromatograms of Fraction II extracted microwave assisted extracts(MAE) from *L. nude*.

The method of chromatography was the same of Fig. 18

Table 41. Results of clonogenic assays for inhibition cancer cell lines of Fraction II form hot water extracts(HWE)

Cancer cell		HepG2	KATOIII	AGS
HPS-1(mg/mL)	0.25	33	30	45
	0.5	48	55	73
	1.0	75	74	87
HPS-2(mg/mL)	0.25	21	42	39
	0.5	34	36	59
	1.0	40	52	79

Table 42. Results of clonogenic assays for inhibition cancer cell lines of Fraction II form microwave assisted extracts(MAE)

Cancer cell		HepG2	KATOIII	AGS
MPS-1(mg/mL)	0.25	29	31	53
	0.5	49	48	70
	1.0	76	60	85
MPS-2(mg/mL)	0.25	19	22	32
	0.5	24	35	48
	1.0	34	39	37
MPS-3(mg/mL)	0.25	35	19	33
	0.5	55	30	53
	1.0	79	34	89

(2) 분리된 다당류 및 단백당류 특성과 함암 효과

민자주방망이버섯 자실체를 추출용액 및 chromatography방법으로 분리한 각 fraction의 인체 암세포의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 34, 35와 같다. 분리된 fraction의 물질의 특징은 HPS-1과 MPS-1은 단백질과 당류 모두가 검출되는 것으로 보아 결합된 단백당류이며, HPS-2, MPS-2 및 MPS-3는 단백질이 검출되지 않고 당류만 검출되는 것으로 보아 다당류인 것으로 판단된다. 이들의 아미노산의 구성과 다당류의 구성은 지속적인 연구 수행을 통하여 규명될 것이다.

각 fraction의 인체 암세포에 증식에 미치는 영향은 추출물방법에 따른 추출물의 암세포증식 효과를 측정하는 방법과 동일하게 행하였다. 열수추출물에서 분획한 fraction의 분리물질이 간암 세포 HepG2 (hepatocarcinoma, human)와 위암세포인 KATOIII(gastric carcinoma, human), AGS(gastric carcinoma, human)의 증식에 미치는 영향을 살펴보면, HPS-1 fraction은 0.25mg/ml 이하의 농도에서 간암 세포 HepG2 (hepatocarcinoma, human)와 위암세포인 KATOIII(gastric carcinoma, human), AGS(gastric carcinoma, human)의 증식을 30~45%를 저해하였으나, 1.0mg/ml의 농도에서는 74~87% 정도 저해하는 것으로 나타난다. HPS-2 fraction은 위암 세포인 AGS의 증식을 1 mg/ml 농도에서 79%의 저해율을 나타냈으나 다른 암세포의 증식에 뚜렷한 효과가 없는 것으로 나타난다. 또한 마이크로웨이브에 의한 추출물의 분획물의 암세포증식의 억제효과를 살펴보면, MPS-1 fraction은 1 mg/ml의 농도에서 HepG2, KATOIII 및 AGS 의 세포의 증식을 60~85% 정도 억제하는 것으로 나타난다. MPS-3 fraction은 1 mg/ml의 농도에서 HepG2와 AGS의 증식을 각각 79, 89%정도 억제하였다. 그러나 MPS-2는 모든 암세포의 증식억제효과가 나타나지 않았다.

민자주방망이 버섯의 추출물의 분획물은 위암세포인 AGS의 증식을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 이에 구체적인 연구가 앞으로 더욱 수행되어 암세포의 증식억제 기전과 급성 및 만성 독성실험을 충분히 수행된다면 민자주방망이의 추출물을 효과적으로 이용할 수 있는 방안을 마련될 것으로 생각된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제는 우리나라에서 자생하고 있고 식·의학적 가치가 매우 높으며 유럽, 북미 등에서 식용으로 널리 이용되고 있는 민자주방망이버섯의 육종, 성분분석 및 인공재배기술의 개선을 통하여 민자주방망이버섯을 대량생산하고, 이의 국내소비 및 수출, 민자주방망이버섯 이용분야 확대 등의 기반을 마련하고자 하며 그 목표는 우리나라 민자주방망이버섯의 특성 규명에 의한 계통선발과 단포자 균사 융합에 의한 품종개량, 자실체 인공재배 생산기술 개발, 균사체 및 접종원 생산의 최적조건 규명 및 자실체 인공재배의 생산성 향상 및 생리학적 특성의 규명, cDNA분석에 의한 유전자 검색 및 유용유전자 발굴, 영양성분, 가공적성, 기호성 물질의 분석 및 식품영양학적 특성 조사, 향암, 항균, 항산화 등 기능성 물질의 탐색과 분석, 이용방법의 개발, 자실체와 균사체의 기능성 성분검색 등 충실히 수행하여 다음과 같은 성과를 얻었다.

인재양성 (박사 1, 석사 3)

- 민자주방망이버섯의 유전적 특성과 성분에 관한 연구
대구가톨릭대학교 생물학과 박사학위논문/이양숙/2004
- 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 균사배양 및 유전적 특성에 관한 연구
대구가톨릭대학교 생물학과 석사학위논문/황성구/2001
- RAPD에 의한 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 계통유전학적관계
대구가톨릭대학교 생물교육전공 석사학위논문/ 김승희/2003
- 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 생태학적 특성과 cDNA에 관한 연구
대구가톨릭대학교 생물학과 석사학위논문/이지선/2005

논문게재(7)

- 민자주방망이버섯 (*Lepista nuda*) 서식지의 토양인자 분석. 이양숙, 주은영, 김종봉, 김남우, 한국생태학회지, 28(1) 25-29
- 민자주방망이버섯 추출물의 향암 효과에 대한 연구 : 이양숙, 한주영 (, 주은영, 신승렬, 김남우, 한국식품영양과학회지, 34(3) 317-322
- 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 항산화성에 관한 연구 :이양숙, 박동철, 주은영, 신승렬, 김남우, 한국식품영양과학회지 pp. 942~947 (6 pages)
- 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 균사배양 및 유전적 특성에 관한 연구 : 김종봉, 황성구, 한국생명과학회지 pp. 496~501 (6 pages)
- 한국산 민자주방망이버섯의 유전적 변이 : 김종봉, 김성희, 한국생명과학회지, 14(1);115-120/2004
- 민자주방망이버섯의 영양성분 분석 : 이양숙, 김종봉, 신승렬, 김남우, 한국식품저장유통학회지 13(3), 375-381/2006
- 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*) 균사체 배양조건 및 효소활성 : 김상대, 김지혜, 김종봉, 한영환, 한국미생물학회지 41(3), 164-167/2005

학술발표(6건)

- 민자주방망이버섯의 대량생산과 기능성 물질 발굴 : 김종봉/ 한국버섯학회 심포지움/ 2004

- Genetic variation of *Lepista nuda* based on ITS sequence and RAPD : 이양숙, 김남우, 김종봉, 박선주/한국유전학회 학술발표회/2004
- 제주 민자주방망이버섯의 계통유전학적 분석: 정원순, 김종봉, 이양숙, 김남우/ 한국버섯학회 포스터 발표/2006
- 민자주방망이버섯의 영양성분에 관한 연구 : 이양숙, 남학식, 김남우, 신승렬, 한국저장유통학회 학술심포지움(2004)
- 민자주방망이버섯의 항암효과에 관한 연구 :이양숙, 남학식, 김남우, 신승렬, 한국저장유통학회 학술심포지움(2004)
- Analysis of Nutritional components of *Lepista nuda* : 이양숙, 김남우, 신승렬 2005 international symposium and annual meeting(2005)

이상과 같은 연구 성과를 얻었으며, 앞으로 다수 논문을 학술 대회 및 학술지에 발표 및 게재할 계획이며, 앞으로 계속적으로 연구를 수행하여 논문발표와 더불어 배양 및 재배 기술을 보급함으로써 민자주방망이버섯의 식품학적인 우수성과 경제적 가치가 증가 된다면 재배농가 및 소득창출이 이루어질 것으로 기대된다. 또한 본 연구과제는 민자주방망이버섯의 생태학적, 유전적 특성 및 단포자 분리 배양 등, 균사배양 최적조건 등에 관한 기본조사 결과를 도출함으로써 버섯의 인공배양과 품종개량에 직접적으로 활용할 수 있다. 인공재배의 방법으로 액체배양에 이은 곡물배지 배양에 이은 퇴비 배양을 통하여 민자주방망이버섯은 노지접종, 재배에 이용, 활용되고 있고 퇴비 배양한 것을 자실체 생산에 성공함으로써 이들 민자주방망이버섯 대량생산에 활용할 수 있다. 또한 유전적 변이와 단포자, 분리 배양 및 균사교배에 성공함으로써 육종기반이 마련되었고 특히, 광릉자주방망이 버섯과 민자주방망이버섯의 선발 육종 가능성이 제기되어 대형 민자주방망이버섯 생산에 활용 할 수 있다. 또한 민자주방망이버섯의 영양성분과 기능성 성분을 분석함으로써 식품영양학적 평가와 더불어 가공식품의 개발과 품질평가가 이루어진다면 민자주방망이버섯의 대량 생산 및 소비가 확대됨에 따라 농가소득은 물론 식품산업의 발전에 기여할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

활용방안

본 연구과제는 우리나라에서 자생하고 있고 식·의학적 가치가 매우 높으며 유럽, 북미 등에서 식용으로 널리 이용되고 있는 민자주방망이버섯의 육종, 성분분석 및 인공재배기술의 개선을 통하여 민자주방망이버섯을 대량생산하고, 이의 국내소비 및 수출, 민자주방망이버섯 이용분야 확대 등의 기반을 마련하고자 한다.

본연구과제는 민자주방망이버섯의 생태학적, 유전적 특성 및 단포자 분리 배양 등, 균사배양 최적조건 등에 관한 기본조사 결과는 버섯의 인공배양과 품종개량에 직접적으로 활용할 수 있다. 인공재배의 방법으로 액체배양에 이은 곡물배지 배양에 이은 퇴비 배양을 통하여 민자주방망이버섯은 노지집중, 재배에 이용, 활용되고 있고 퇴비 배양한 것을 자실체 생산에 성공함으로써 이들 민자주방망이버섯 대량생산에 활용할 수 있다. 또한 유전적 변이와 단포자, 분리 배양 및 균사교배에 성공함으로써 육종기반이 마련되었고 특히, 광릉자주방망이버섯과 민자주방망이버섯의 선발 육종 가능성이 제기되어 대형 민자주방망이버섯 생산에 활용할 수 있다. 또한 민자주방망이버섯의 영양성분과 기능성 성분을 분석함으로써 식품영양학적 평가와 더불어 가공식품의 개발과 품질평가가 이루어진다면 민자주방망이버섯의 대량 생산 및 소비가 확대됨에 따라 농가소득은 물론 식품산업의 발전에 기여할 것으로 기대된다.

또한 앞으로 계속적으로 연구를 수행하여 민자주방망이버섯의 식품영양학적이 우수성과 향산화 및 항암효과를 구체적인 연구와 더불어 종균 배양 및 재배기술이 확립하게 하여 버섯의 재배농가에 기술 이양하여 소득 증대와 소비를 촉진할 수 있는 방안을 마련할 계획이다.

농가소득에 기여하는 방안

● 소비 기반 마련

민자주방망이버섯의 식, 의학적 가치 홍보를 통해 민자주방망이버섯의 대량소비를 유도하여야 한다. 이를 위하여 민자주방망이버섯 자체 및 민자주방망이버섯의 이용한 식품 등의 시식회를 가진다. 특히, 대형 마트의 식품코너 등을 통한 시식회 및 TV매체를 이용한 민자주방망이버섯 소개 등이 필요하다. 특히, 민자주방망이버섯이 구미에서 미식가들의 선호도가 매우 높은 점을 이용하면 효과적인 것을 생각된다.

● 민자주방망이버섯을 이용한 요리 및 식품

1) 민자주방망이버섯을 이용한 식품의 실례(미국, 유럽)

○ 민자주방망이버섯 요리

민자주방망이버섯의 갓을 떼어 튀긴 후 신맛의 소스나 크림으로 절이거나 마요네이트에 담근다. 민자주방망이버섯을 요리를 해도 색이 변하지 않기 때문에 요리에 색을 내는데도 좋은 재료가 된다.

○ 민자주방망이버섯 젤리

닭고기 국물 등에 민자주방망이버섯을 30분정도 담궜다가 이를 망에 넣고 짠다. 걸러낸 것에 백포도주, 소금, 후두 등을 넣어 맛을 내고 젤라틴을 첨가하여 저온 처리한다.

○ 민자주방망이버섯 두부

버터를 넣은 후 민자주방망이버섯과 saut를 넣어 부드럽게 만든다. 여기에 생강, 간장, 두부 등을 첨가한 후, 몇 분 동안 짓는다.

● 민자주방망이버섯을 이용한 건강보조식품 개발

○ 드링크제 개발

드링크제 내용물 및 제조 (1ℓ 기준 : 10인분)

- (1) L. nuda (민자주방망이버섯 열수 추출물)
 - ① Ginko biloba 800mg + DW 400ml
 - ② filtration (0.45 μ m 또는 1 μ m)
 - ③ 500ml 첨가
- (2) 축사 (공사인: Amomum xanthoids wall)
 - ① 축사 100g + DW 1ℓ 100도 이상에서 boiling (90min)
 - ② filtration (0.45 μ m 또는 1 μ m)
 - ⑤ 최종량 약 600ml에서 50ml 첨가
- (3) 모려 (Ostrea gigas)
 - ① 모려 100g + DW 1ℓ boiling (90min)
 - ② filtration (0.45 μ m 또는 1 μ m)
 - ③ 끓인 후 최종량 약 800ml에서 150ml 첨가
- (4) Black Sugar (흑설탕)
 - ① sugar 1000g + DW 500ml melting
 - ② 최종의 양은 약 1200ml에서 175ml 첨가
- (5) 향 : Pineapple, Peach 각 250 μ l 첨가
Lemon, Orange 각 300 μ l 첨가
- (6) Sodium Benzoate (안식향 나트륨)
: 500ppm (0.05g) 첨가
- (7) Citric acid (구연산)
: pH를 3.7로 맞춤 (약 0.1g)
- (8) 타우린 (Taurine)
: 2 g 첨가

제조 방법

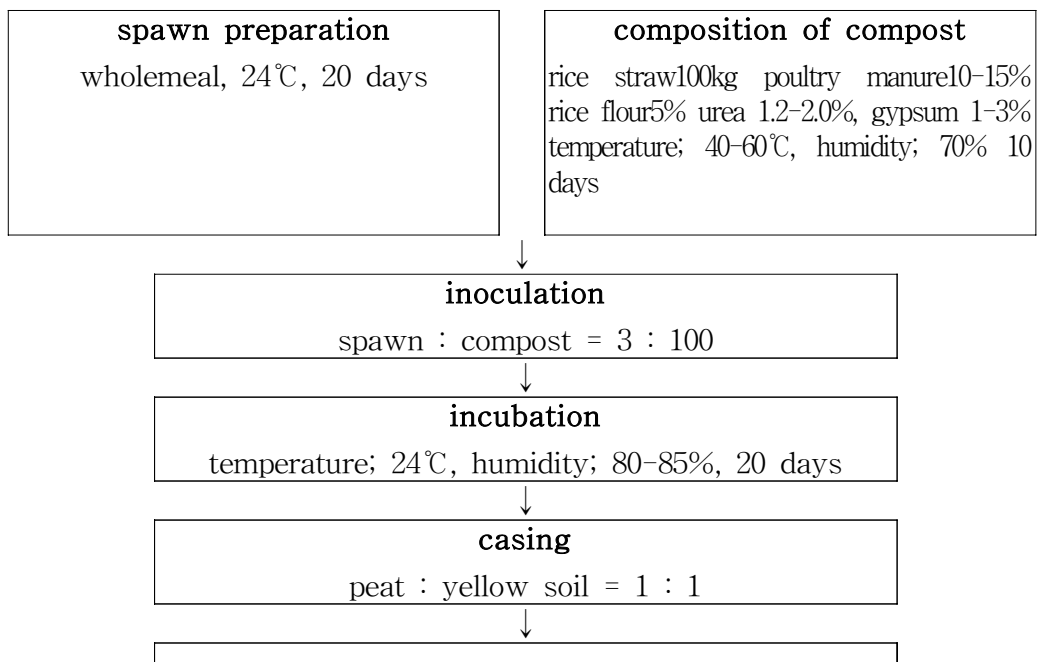
- (1) boiling은 1 - 2시간
- (2) 물에 잘 용해 될 수 있도록 충분히 stiring (1시간 이상 필요)
- (3) 10인용 1리터 기준으로 해서 부피가 많이 차지하는 것은 Ginkgo biloba (500 ml), 축사 (50 ml), 모려 (150 ml) 와 설탕물 (175 ml) 로서 1리터 중 875 ml를 차지한다.
나머지 타우린 등은 125 ml의 물을 이용하여 1리터로 맞춘다.

● 민자주방망이버섯 두부 개발

- (1) 두유제조
- (2) 민자주방망이버섯 분말(동결건조)
- (3) 민자주방망이 1%를 첨가
- (4) 응고제 처리

● 민자주방망이버섯 재배방법 및 종균분양

; 궁극적으로 농가에서 민자주방망이버섯을 재배 생산하여 소득과 연결되어야 하기 때문에 재배 경험과 능력이 있는 버섯재배 농가를 선별적으로 지정하여 종균을 분양해주고 이를 재배토록하며 이때 분양을 위한 종균 생산은 대구가톨릭대학교에서 실시한다.



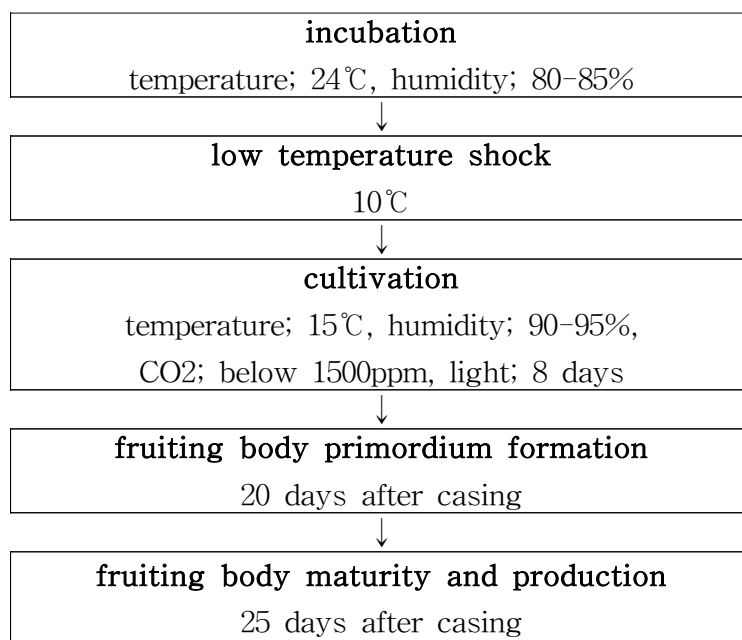


Fig. 66. The culture condition of *L. nuda*

제 6 장 참고문헌

1. Adachi, Y., N. Ohno, M. Ohsawa, S. Oikawa and T. Yadomae, 1990. Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked(1→3)- β -D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.*, 38: 988.
2. Adachi, Y., N. Ohno, M. Ohsawa, S. Oikawa and T. Yadomae. 1990. Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked(1→3)- β -D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 988.
3. Adams, M.D., A.R. Kerlavage, C. Fields and J.C. Venter. 1993. 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of tRNAs scripts in human brain. *Nature Genet.* 4: 256- 267
4. Brower, J. E. and H. Zar. Jerrold, 1977. Field and laboratory methods for general ecology. Wm. C. Brown Co. Publisher. pp 40-41
5. Brower, J.E. and H. Zar. Jerrold. 1977. Field and laboratory methods for general ecology. W & C. Brown Co. Publisher pp. 40-41.
6. Chen, M.H., J.T. Peng and J.T. Chen. 2001. Study on the culture improvement of *Lepista nuda*. *J. Agr. Res. China* 50: 12-21.
7. Courtney, S.P., T.T. Kibota and T.A. Singleton. 1990. Ecology of mushroom- feeding Drosophilidae. In M. Begon, A.H. Fitter and A. Macfadyen. (eds) *Advances in Ecological Research*. Vol. 20. Academic Press, New York. pp. 225-274.
8. Cromack, Jr.K., P. Sollins, R.L. Todd, D.A. Crossley Jr., W.M. Fenmder, R. Fodel and A.W. Todd. 1977. Soil microorganism-arthropod interactions: fungi as major calcium and sodium sources. In W. J. Mattson(ed). *The role of Arthropods in forest Ecosystems*. Springer-Verlag, New York. pp. 78-84.
9. Eger, G. 1962. Untersuchungen zur frucktkorperbildung des kulturchampignons. *Mushroom science* 5: 314-320
10. Falange, H. 1962. Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vinasse. *J. Appl. Microbiol.* 10: 572-576.
11. Falange, H. 1962. Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vintages. *J. Appl. Microbiol.* 10: 572-576.
12. George, W. Cox. 1976. Laboratory manual of general ecology, Exercise 39.
13. George, W.C. 1976. Laboratory manual of general ecology. Exercise 39 p.
14. Harley, J.L. 1972. Fungi in ecosystems. *J. Appl. Ecol.* 8: 627-642.
15. Kurata, N., Y. Nagamura, K. Yamamoto, Y. Harushima, N. Sue, J. Wu, B.A. Antonio, A. Shomura, T. Shimizu, S.- Y. Inoue, A. Fukuda, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Toyama, Y. Miyamoto, T. Kirihara, K. Hayasaka, A. Miyao, L. Monna, H.S. Zhong, Y. Tamura, Z.- X, Wang, T. Momma, Y. Umehara, M. Yano, T. Sasaki and Y. Minobe. 1994. A300 kilobase interval genetic map of rice including 833 expressed sequences. *Nature Genet.* 8: 365- 372
16. Lee, S. Y. and H. M. Rhee, 1990. Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum* : inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its

- hypotensive action. *Chem. Pharm. Bull.*, 38: 1359.
17. Marschner, H. 1991. Mechanism of adaption of plants to acid soil. *Plant Soil* 134: 1-20.
 18. Mun, H.T. 2000. Mass loss and mineral nutrients during the decomposition of mushroom, *Russula alboareolate* and *Lactarius violascens*. *Korea J. Biol. Sci.* 4: 51-55.
 19. Mun, H.T. and W.G. Whitford. 1989. Effects of nitrogen amendment on annual plants in the Chihuahuan Desert. *Plant and Soil* 120: 225-231.
 20. Murasugi, A., S. Tanaka, N. Komiyama, N. Iwata, K. Kino, H. Tsunoo and S. Sakuma, 1982. Molecular cloning of a cDNA and a gene encoding an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from a gungus, *Ganoderma lucidum*. *J. Biol. Chem.*, 266: 2486.
 21. Murasugi, A., S. Tanaka, N. Komiyama, N. Iwata, K. Kino, H. Tsunoo and S. Sakuma. 1982. Molecular cloning of a cDNA and a gene encoding an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from a gungus, *Ganoderma lucidum*. *J. Biol. Chem.* 266: 2486.
 22. Myrold, D.D. 1990. Effects of acidic precipitation on soil organism. In A.A. Lucier and S. G. Hain(eds.). *Mechanisms of forest response to acidic precipitation*. Springer-Verlag. 245 p.
 23. Page, A. L., d. E. Barke and R. Ellis Jr., 1982. *Methods of soil analysis; Chemical and microbiological properties*, Madison, Wisconsin, U.S.A. pp 539-639.
 24. Page, A.L., D.E. Barke and R. Ellis Jr. 1982. *Methods of soil analysis; Chemical and microbiological properties*. Madison Wisconsin U.S.A. pp. 539-639.
 25. Passecker, F. 1959. Kulturversuche mit wildformen des champignons und anderen Agaricaceen. *Mushroom Sci.* 4: 477-483.
 26. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, pp. 545.
 27. Savoie, J. M., K. Stott and J. Guinberteau, 1999. Extracellular enzymes produced by the mushroom *Lepista nuda* during cultivation compost. pp. 245-253. *Proceeding of 3th international conference on mushroom biology and mushroom products and AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference*. Sydney, Australia, Edited by Broderic, A. and Nair, T. 3: 238-258.
 28. Shu, K.T., W.B. Kim, W.T. Lee, B.H. Kim, J.K. Kim, W.K. Paik and K.O. Yoo. 1996. Native environments and ecological characteristics of *Allum victorialis* var. *platyphyllum*. *RDA Hour. Agri. Sci.* 38: 654-659.
 29. Sposito, G., 1989. *The chemistry of soils*. Oxford Univ. Press. New York. p277.
 30. Stevenson, F. J. 1994. *Humans chemistry genes, composition, reaction*, 2nd ed, John Willy & Sons, New York.
 31. Stott, K., A. Broderick and T. Nair, 1996. Investigation into cultivation parameters for australian species of *Lepista*. *Mushroom Biol. Mushroom Products*. *Royse(ed) Peau State Univ.*, 285-289.

32. Wright, S. H. and W. A. Hayes, 1978. nutrition and fruitbody formation of *Lepista nuda*(Bull. Ex. Fr.) Cooker. *Mushroom Science*, 10: 873-884.
33. Yun, S. I., W. J. Choi, Y. D. Choi, S. H. Lee, S. H. Yoo, e. H. Lee and H. M. Ro, 2003. Distribution of heavy metals in soils of shihwa tidal freshwater marshes. *Korean J. Ecology* 26(2); 65-70.
34. 김세권, 박표잠 2002. Purification and Characterization of a serine proteinase from the mackerel, *scomber japonicus*. *한국수산학회지*, p175
35. 김종갑, 오기철. 2001. 침엽수와 활엽수 산림에서 산불 후 토양화학적 및 토양미생물학적 특성 변화. *한국생태학회지* 24: 1-7.
36. 문형태, 남궁정, 이윤영, 이종영, 김정희. 2000. 민자주방망이버섯의 분해와 분해과정에 따른 영양염류의 변화. *한국생태학회지* 23: 33-37.
37. 문형태, 표재훈, 김준호. 1998. 여천공단 주변지역 토양의 화학적 성질. *한국생태학회지* 21: 1-6.
38. 박완희, 이호득, 1999. 한국약용버섯도감. 교학사. p 186-187
39. 심재욱 이민순, 이상선, 이태수, 이민웅, 1998. 오염지역과 비오염지역의 토양의 특성과 토양 미생물의 분포. *한국토양환경학회지*. 3(2): 31-39.
40. 안현철, 이정환. 1998. 지리산 물박달나무림의 식생구조와 동태. *한국임학회지* 87: 445-458.
41. 이광웅, 2001. 감자 괴경 cDNA Library에서 분리한 저온스트레스 관련 유전자의 특성 분석. 서울대학교 大學院.
42. 이민순, 이윤원, 윤상욱, 1999. 강원도지역 낙엽활엽수림의 토양특성. *중부대학교 자연과학연구논문집* 8: 101-109.
43. 이상선, 최경진, 1995. *Lepista nuda*의 고체배양. *한국균학회지*. 23: 105-113.
44. 이상선, 최경진, 오창호. 1996. 민자주방망이버섯의 톱밥 배양. *한국균학회지* 24: 274-279.
45. 이수욱. 1981. 산림토양에 관한 연구(II). *한국임학회지* 54: 25-35.
46. 전정민, 송영환, 2003. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 멜라민 농축 호르몬 cDNA 유전자의 클로닝, *Kor. Fish. Soc.* 36(5) 442-448
47. 조덕현, 2003. 원색 한국의 버섯. *아카데미서적*. p 21-23.
48. 한윤수, 정재훈, 2000. EST를 이용한 유전자 발굴 및 발현 분석. *한국 유전학회지*,
49. 황재문, 정정학. 1999. 울릉도에 자생하는 산마늘의 생육 환경 특성. *안동대학교 농업과학기술연구소 논문집* 6: 41-51.
50. Sposito, G. 1989. *The Chemistry of Soils*. Oxford Univ. Press, New York. 277 p.
51. Stark, N. 1972. Nutrient cycling pathways and litter fungi. *Bioscience* 22: 355-360.
52. Stott, K., A. Broderick and T. Nair. 1996. Investigation into cultivation parameters for australian species of *Lepista*. *Mushroom Biol. Mushroom Products*. Royse(ed) Peau State Univ. pp. 285-289.
53. Tilman, D. 1987. Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecol. Monogr.* 57: 189-214.
54. Wright, S.H. and W.A. Hayes. 1978. Nutrition and fruitbody formation of *Lepista nuda*(Bull. Ex. Fr.) Cooker. *Mushroom Sci.* 10: 873-884.

55. Yun, S.I., W.J. Choi, Y.D. Choi, S.H. Lee, S.H. Yoo, E.H. Lee and H.M. Ro. 2003. Distribution of heavy metals in soils of Shihwa tidal freshwater marshes. *Korean J. Ecol.* 26: 65-70.
56. Adachi Y, Ohno N, Ohsawa M, Oikawa S and Yadomae T (1990) Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked (1→3)- β -D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 988.
57. Appels R and Honeycutt RL (1986) rDNA : Evolution over a billion years. pp81-135. In Dutta SK. Eds. *DNA systematics*. CRS Press. Boca Raton FL.
58. Asemota HN, Ramser J, Lopez-Peralta C, Weising K and Kahl G (1996) Genetic variation and cultivate identification in *Jamaican yam germplasm* by random amplified polymorphic DNA analysis. *Euphytica* 92: 341-351.
59. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
60. Foisset N, Delourme R, Hubert PN, Ladnry BS and Renard M (1996) Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLD markers in a double-haploid progeny. *Theor. appl. Genet.* 93: 101-1025.
61. Garber RC, Turgeon BG, Selker EU and Yoder OC (1988) Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr. Genet.* 14: 573-582.
62. Garmean D, Kimsey LS and Berbee ML (1992) 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 270-278.
63. Gibson T, Higgins D and Thompson J (1994) Clustal X program. EMBL, Heidelberg, Germany.
64. Hiraishi A (1992) Direct automated sequencing of 16S rDNA by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 210-213.
65. Hirata T and Takamatsu S (1996) Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powderymildew fungi. *Mycoscience* 37: 265-270.
66. Jorgense RA and Cluster PD (1988) Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 75: 1238-1247.
67. Kerrigan RW, Royer JC, Baller CM, Kohli Y, Horgen PA and Anderson JB (1993) Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothalic fungus *Agaricus bioporus*. *Genetics* 133: 225-236.
68. Kong WS, Kim DH, Yoo CH, Cha DY and Kim KH (1997) Genetic variability *Flammulina velutipes* isolated based on ribosomal DNA and RAPD analysis RDA. *J. Indus. Crop. Sci.* 39: 28-40.
69. Kwon HK (2002) A study on the cultural characteristics and genetic variations in Tricholomataceae, Catholic Univ. Daegu. Ph. M. Thesis.
70. Lee SB, Milgroom MG and Taylor JW (1988) A rapid, high yield mini-prep method

- for isolation of total genomic DNA from fungi. Fungal Genetics Newsletter 35: 23-24.
71. Lee SS and Choi KJ (1995) Solid-culture of *Lepista nuda*. Korea. J. Mycol. 23(2): 105-113.
 72. Murasugi A, Tanaka S, Komiyama N, Iwata N, Kino K, Tsunoo H and Sakuma S (1982) Molecular cloning of a cDNA and a gene encoding an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from a gungus. *Ganoderma lucidum*. J. Biol. Chem. 266: 2486.
 73. Nei M (1973) Genetic distance between populations. *America Naturre* 106: 283-292.
 74. Noelsuberville C, Crua C, Guinberteau J and Montury M (1996) Correlation between fatty acid content and aromatic compound release in fresh Blewit (*Lepista nuda*). J. Agric. Food Chem. 44: 1180-1183.
 75. Paranjpe MS, Chen PK and Jong SC (1979) Morphogenesis of *Agaricus bioporus*: Changes in proteins and enzyme activity. *Mycologia* 71: 469-478.
 76. Park WH and Lee HD (1999) Illustrated book of korean medicinal mushrooms. Published by Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Seoul, Korea.
 77. Park YH, Kim YS and Cha DY (1978) Investigation on artificial culture for new edible wild mushrooms. Korean. J. Mycol. 6(2): 25-28.
 78. Russell PJ, Wagner S, Rodland KD, Feinbaum RL, Russell JP, Bret-Harte MS, Free SJ and Metznerberg RL (1984) Organization of the ribosomal ribonucleic acid genes in various wild type strains and wild collected strains of *Neurospora*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 275-282.
 79. Shim SM (2003) Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from korean wild medicinal mushrooms. Incheon University Ph. M. Thesis.
 80. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughers P, Dodd C, Conner CR, Heiner C, Kent SBH and Hood LE (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674-679.
 81. Stott K and Broderick A (1996) Response of Australian strains of the mushroom *L. nuda* to temperature and substrate. J. Janic, Progress in new crops pp 476-479. In ASHS press Arlington. VA.
 82. Sung JM, Lee HK, Choi YS, Kim YY, Kim SH and Sung GH (1997) Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Korea Journal Mycol.* 25: 239-252.
 83. Swofford DL (2001) PAUP-Phylogenetic analysis using parsimony(and other methods) Ver. 4.0b2. Academic Press Sunderland MA.
 84. White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols-A guide to methods and application. Eds., Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. Academic Press Inc., San diego, California pp 315-322.
 85. Williams JGK, Kubeik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic*

- Acids Res. 18: 6531-3535.
86. Wright SH and Hayes WA (1978) nutrition and fruitbody formation of *Lepista nuda*(Bull. Ex. Fr.) Cooker. Mushroom Science 10: 873-884.
 87. Zervakis G and Labarere J (1992) Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectronic focusing analysis of enzyme patterns. J. Gen. Microbiology 138: 635-645.
 88. 강안석, 차동열, 홍인표, 장현유, 유승현. 1994. 개암버섯(*Naematolma sublateritium*)의 균사생장에 영향을 미치는 배양 조건에 관한 연구. Kor. J. Mycol. 22: 153-159
 89. 박완희, 이호득. 1999. 원색한국약용버섯 도감. (주)교학사.
 90. 이상선, 최경진, 오창호. 1996. 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 톱밥배양. Kor. J. Mycol. 25: 274-279
 91. 이상선, 최경진. 1995. *Lepista nuda*의 고체배양. Kor. J. Mycol. 23: 105-113
 92. 정광교, 한영환. 1997. 잣버섯(*Lentinus lepideus* DGUM 25050)의 균사생육을 위한 배지 조성의 최적화. Dongguk Journal : Natural Sciences. 16: 143-160
 93. 홍인표, 이민용. 1990. 북령의 배양학적 특성에 관한 연구. Kor. J. Mycol. 18: 2-49
 94. Hashimoto K. and Takahashi Z. 1974. Studies on the growth on *Pleurotus ostreatus* Sing. Mush. Sci. IX : 585-593
 95. Leathman G. F. 1983. A chemically defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*. Mycologia 75 : 905-908
 96. Lee, J. Y. and Choi, M. J. 1983. Physiological and ecological studies on mycelia of *Armillariella mellea*. Kor. J. Mycol. 11 : 79-84
 97. Yoo, K. H. and Chang, H. S. 2002. Purification and Characterization of Carboxyl Cellulase from *Stropharia rugosoannulata*. Kor. Soc. Mycology. 30(2): 113~118.
 98. Chang, H. Y., Kim, G. P. and Cha, D. Y. 1996. Changes in activities of protease, phenoloxidase and cellulase during mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* in sawdust cultures. Kor. soc. Mycology. 24(2): 149~154.
 99. Chang, H. Y., Kim, G. P., Hong, I. P., Kim, H. K., Chung, J. C. and Sung, J. M. 1997. Enzymatic Characteristics for Xylanase Activity of *Tremella fuciformis* and its Symbiotic Fungi. Kor. soc. Mycology. 25(4): 297~304.
 100. Min, E. G. and Han, Y. H. 2000. Characteristics of extracellular β -glucosidase in *Tricholoma matsutake*. Kor. J. Biotechnol., 15, 9-13.
 101. Lee, S.K., Yoo, Y.J. and Kim, C.S. (1989) Studies on the chemical components in *Ganoderma lucidum*. Korean. J. Food Sci. Technol., 21, 890-894.
 102. Hong, J.S., Kim, Y.H., Kim, M.K., Kim, Y.S. and Sohn, H.S. (1989) Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. J. Food Sci., 21, 58-62.
 103. Kwon, Y.J. and Uhm, T.B. (1984) A study on the lipid components in oyster mushroom *Pleurotus florida*. J. Korean Soc. Food Nutr., 13, 175-180.
 104. Lee, N.H., Lee, H.J. and Cho, I.S. (1998) Chemical compositions of *Agaricus blazei* Murill fruiting bodies cultivated in a Korean local farm. J. FD. Hyg. Safety, 13, 94-98

105. Zakia-Bano, S. (1988) *Rajarithnam, Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, postharvest physiology, preservation, and role as human food. *CRC Reviews in Food Sci. Nutr.*, 27, 87-158
106. Jeong, C.H., Joo, O.S. and Shin, K.H. (2002) Chemical components and physiological activities of young Mulberry(*Morus alba*) stem. *Korean J. Food Preserv.*, 9, 228-233
107. Chang ST, Miles PG. 1989. Edible mushroom and their cultivation. *CRC press. New York*.
108. Jeong OJ, Yoon HS, Min YK. 2001. Aroma Characteristics of Neungee. *J Food Sci* 33: 307-312.
109. Lee, B.W., Lee, M.S., Park, K.M., Kim, C.H., Ahn, P.U. and Choi, C.U. (1992) Anticancer activities of the extract from the mycellia of *Coriolus versicolor*. *Korean. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 311-315
110. Hur, Y.H. (1989) Studies on free-sugar, sugar alcohols, amino acids and mineral contents in edible mushrooms. *Korean. J. Sanitation*, 4, 27-32
111. 吉田博, 管原龍幸, 林淳三. (1982) 食用キノコ類の遊離糖, 遊離糖 ろルユール および有機酸. *日本食品工業學會誌*, 29, 451-455
112. Chung, S.Y., Kim, S.H., Kim, H.S., Kang, J.S., Cheong, H.S., Kim, G.J. and Kim, H.J. (1990) Effects of water soluble extract of *Ganoderma lucidum*, kale juice and sodium dextrothyroxine on hormone and lipid metabolism in hypercholesterolemic Rats 1. Concentrations of triiodothyronine, thyroxine, blood sugar and lipid composition in serum. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 19, 381-386
113. Kabir, Y. and Kimura, S. (1989) Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 91-94
114. Ma, S.J. (1983) Effects of the substances extracted from dried mushroom by several organic solvents on the stability of Fat. *J. Food Sci.*, 15, 150-154
115. Woo, M.J. (1983) Studies on antitumor components of *Flammulina velutipes* of Korea(II). *Korea J. Mycol.*, 11, 147-150
116. Ames BN, Cahcart R, Schwiars E, Hochstein P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6858-6862.
117. Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Choi SW, Kawakishi S, Osawa T. 1994. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin. *J Agric Food Chem* 42: 2407-2410.
118. Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenol compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239.
119. Brannen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butyrate hydroxy toluene and butyrate hydroxy anisole. *J Amer Oil Chem Soc* 52: 59-63.
120. Halliwell B, Hoult RJ, Blake DR. 1988. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 2: 2867- 2870.
121. Hammond B, Kontos A, Hess ML. 1985. Oxygen radicals in the adult respiratory

- distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 173-187.
122. Mizuno T, Ohsawa K, Hagiware N, Kuboyama R. 1986. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agriculture Biol Chem* 50: 1679-1688.
 123. Lee JW, Chung CH, Jeoung HJ, Lee KH. 1990. Anticomplementary and antitumor activities of the ikal. extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY-105. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 18: 571-577.
 124. Zhang J, Wang G, Li H, Zhuang C, Mizuno T, Ito H, Suzuki C, Okamoto H, Li J. 1994. Antitumor polysaccharides from a chinese mushroom "Yuhuangmo", the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Bioci Biotech Biochem* 58: 1195- 1201.
 125. Park SS, Lee KD, Min TJ. 1995. Study on the screening and development of antibiotics in the mushrooms. *Korean J Mycol* 23: 28-36.
 126. Yoshikumi C, Nomoto K, Matsunaga K, Fujii T, Takeya K. 1975. Mouse strain difference in the expression of antitumor activity of PS-K. *Gann* 66: 649-654.
 127. Park DW, Shim MHJ, Kim, BK. 1979. Studies on constituents of higher fungi of Korea(XVII). Production of antitoplastic components by the submerged culture of *Lentinus edodes*. *Seoul Univ J Pharm Sci* 4: 19-26.
 128. Sung JM, Yoo YB, Cha DY. 1998. Mushroom Science. *Kor-Hak Publ Korea*.
 129. 水野 卓, 川合正允. 1992. きこの化学, 生物学, 学会出版セイタ. 東京. 日本.
 130. Woo MJ. 1983. Studies on antitumor Components of *Flammulina velutipes* of Korea(II). *Korean J Mycol* 11: 147-150.
 131. Kabir Y, Kimura S. 1989. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 35: 1-94.
 132. Lee, Y.S., Han, J.Y., Joo, E.Y., Shin, S.R. and Kim, N.W. (2004) Study on the anti-tumor effects of extracts from *Lepista nuda* mushroom. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34, 317-322
 133. Kim, J.H., Yoo, K.H., Kim, Y.S., Seok, S.J. and Kim, Y.S. (1998) The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt. Chiak. *Korea J. Mucol.*, 26, 589-593
 134. Park, W.H. and Lee, H.D. (1999) Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Seoul, Korea. p 186-187
 135. Lee, Y.S., Joo, E.Y., Kim, J.B. and Kim, N.W. (2005) Soil properties of the habitat of *Lepista nuda*. *Korean J. Ecol.*, 28, 25-29
 136. Lee, Y.S., Park, D.C., Joo, E.Y., Shin, S.R. and Kim, N.W. (2005) Study on the antioxidant activity of the extracts from the *Lepista nuda*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34, 942-917
 137. AOAC. (1995) Official method of analysis of AOAC Intl. 16th ed. Association of official analytical communities. Arlington. VA. USA.
 138. Luchsinger, W.W. and Cornesky, R.A. (1982) Reducing sugar by the dinitrosalicylic and method. *Anal. Biochem.*, 4, 346-351

139. Shim, K.H., Sung, N.K., Choi, J.S. and Kang, K.S. (1989) Changes in major components of Japanese apricot during ripening. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 18, 101-108
140. Yun, S.I., Choi, W.J., Choi, Y.D., Lee, S.H., Yoo, S.H., Lee, E.H. and Ro, H.M. (2003) Distribution of heavy metals in soils of Shihwa tidal freshwater marshes. *Korean J. Ecol.*, 26, 65-70
141. Yun, S.J., Kim, N.Y. and Jang, M.S. (1994) Free sugars, amino acids, organic acids and minerals of the fruits of paper mulberry(*Broussonetia kazinoki* Siebold). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 950-953
142. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
143. Marklund S, Marklund G. 1975. Involvement of superoxide amino radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 468-474.
144. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
145. Ohino N, Miura NN, Nakajima N, Yadomae T. 2000. Antitumor 1, 3-Glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Bio Pharm bull* 23: 866-872.
146. Pare JRJ, Belanger JMR, Stafford MR. 1994. Microwave- assisted process; a new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry* 13: 176-184.
147. Kim HK, Kwon YJ, Kwak HJ, Kwon JH. 1999. Oleoresin content and functional characteristic of fresh garlic. *Korean J Food Sci Technol* 31: 329-335.
148. Lee SB, Lee GD, Kwon JH. 1999. Optimization of extraction conditions for soluble ginseng compounds using microwave extraction system under pressure. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 409-416.
149. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Meth* 70: 257-268.
150. Hong, K.H., Kim, B.Y. and Kim, H.K. (2004) Analysis of nutritional components in *Pleurotus ferulea*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36, 563-567
151. Lee, S.H., Kim, N.W. and Shin, S.R. (2003) Studies on the nutritional components of mushroom(*Sarcodon aspratus*). *Korean J. Food Preserv.*, 10, 65-69
152. Cha, H.W., Park, J.S., Park, Y.K. and Jo, J.S. (1999) Changes in chemical composition of Mume(*Prunus mune* Sieb. et Zucc) fruits during maturation. *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.*, 6, 481-487
153. Hong, J.S. and Kim, T.Y. (1988) Contents of free-sugars and free-sugar alcohols in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20, 459-462
154. Hur, Y.H. and Kim, O.K. (1991) Studies on the mineral content of edible mushrooms. *Kor. J. Env. Halth. Soc.*, 17, 129-135
155. Hwang, J.B., Yang, M.O. and Shin, H.K. (1997) Survey for approximate composition

- and mineral content of medicinal herbs. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 671-679
156. 數野千恵子, 三浦洋. (1984) 食用キノコ化学成分. *日本食品工業學會誌*, 31, 208-214
157. 左藤恵理, 清柳康夫, 菅原龍幸. (1985) キノコ類の遊離アミノ酸組成について, *日本食品工業學會誌*, 32, 509-514
158. Choi, Y.W. (2002) Development of labor saving and environment friendly cultivation method for the production of high quality perilla leaf in Muryang area. The ministry of agriculture and forestry. The final research paper. p 322-339
159. Solms, J. (1969) The taste of amino acids, peptides and proteins. *J. Agr. Food Chem.*, 17, 686-688
160. Han, H.S., Park, J.H., Choi, H.J. and Son, J.H. (2004) Biochemical analysis and physiological activity of perilla leaves. *Korean J. Food Culture*, 19, 94-105
161. Kim HK, Choi YJ, Jeong SW, Kim KH. 2002. Functional activities of microwave-assisted extracts from *Lyophy ulmarium*. *Korean J Food Preservation* 9: 385-390.
162. Kim SM, Cho YS, Sung SK, Lee IG, Lee SH, Kim DG. 2002. Antioxidative and nitrite scavenging activity of pine needle and green tea extracts. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 13-19.
163. Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, Kim EH, Park JW, Park IB, Kim SW, Kang SG, Park UK, Jung ST. 2004. Activities of antioxidation and alcohol dehydrogenase inhibition of methanol extracts from some medicinal herbs. *Korean J Food Preservation* 11: 201-206.
164. Lee GD, Chang HG, Kim HK. 1997. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J Food Sci Technol* 29: 432-436.
165. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 191-202.
166. Hong HD, Kang NK, Kim SS. 1998. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1484-1487.
167. Chung SY, Kim MK, Yoon S. 1999. Nitrite scavenging effect of method fraction obtained from green yellow vegetable juices. *Korean J Food Sci Technol* 28: 342-347.
168. Park SS, Lee KD, Min TJ. 1995. Study on the screening and development of antibiotics in the mushrooms. *Korean J Mycol* 23: 28-36.
169. Kytopoulos SA. 1987. Ascorbic acid and formation of N-nitroso compounds; possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 45: 1344-1350.
170. Yang KH, Yang JH, Ryu BH. 1997. Antitumor effects of extracts obtained from *Daedalea dickinsii*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 178-182.
171. Yoon SH, Lim JH, Kim YS, Kim CH, Jo JH, Hwang YS. 1998. Pharmacological effects of proteoglycans extracted from fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*. *Korea J Mycol* 26: 511-518.

172. Kim HJ, Han J, Yang EJ., Lee KR, Lee IS. 2000. Chemoprevention effect of *Polyozellus multiplex*, a wild and edible mushroom. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 161-167.
173. Ji JH, Kim MN, Choi KP, Chung CK, Ham SS. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Agaricus blazei* Murill extracts. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1371-1378.

(부록)

MA02	base	sequence
		CCATATGGTCACTGCAGCGGCGGAATCACTAGTGATTAGCGTGGTCGCGGC CGAGGTACCATGGTTCTTGCAGTTTCTTTGTGGGTATTTGGAGATGCTCTT GGAATACCAAGTGTAGTTGCTGCAATGATTGGCTTATCAATACTTCTTCTG TTGGGAGTTCTTGATTGGGATGACTGCTTAATTGAAAAATCAGCATGGGAT ACTCTGGTTTGGTTTGTCTTAGTGGGAATGGCAGGCCAGTTGACAAAC CTTGGTGTGTAACTGGATGTCTAGCTGTGTAGCCAAGGTCCTTCAATCT GTCTCTTTGAGCTGGCCGGCTGCATTCCGGGATTCCTCAGGCATCTTATTTCC TGATCCACTACCTATTCGCCAGTCAAACCTGGTCATGTTGGTGTCTTGTACCT GCCCCGGCGGCCGCTCGAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGA GCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAC TGCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACT TAATCGCCTTGCNAGCAATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGA CGCGCCCTGTAG

MA03	base	sequence
		TGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGTGGACATGCCGAGTCATGC TCCAGGTCCTATGGGAATGTAACCTTCCGCTGGGTTCGCATGACTCCTTTGCGT CTGACGCGGACCCATTGGACATCCCTCGTGATCAGGCAGTGGATATTCCCAC CCAGCTAAACCTCGGGATCCGTCTCATGCACGGCCAAGCGCACGACAATGAT GGCGAGCTTCACTTCTGTACACTAGTTGCCTCCTGTACGATGGGGGGAAAG CGGTCGACTATTTAAAGCTCGTCAAACATCCCTCGATAGCAATCCGAATGA AC

MA05 base sequence

CGGGTGGGGCGTCTAGAAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACG
 AGGGTCTCCTCCCCTCGTGTGTTTTACTTCCGACCACTACATGCCCCAC
 CATTCCCTTCCTCGCCGCTGTGTCCATCCCAATCGGACGCATCCCTCCTGCA
 CCGTTTTCGCCGCGGACTCCTCATTTTTATACGTAATCTATTACAGTCC
 CATCCGCTGCATTCCGTTATAATCTGCGCCAGGGGCTGCTTGTTTTTTCTTG
 CCCGGAATGAAGGGTGCCTTGTAGATTAAAGCCCCTGCGTTCCTGTTGTTG
 CTTATCGTTGTTATGCTCTCCCTCCCTATATGTCTCTCACCTCGTCTTTTTT
 GGTACAGTTGTACTTAGAGTTGGTATTGTTGGGGTGATAATAGATTTGGGT
 GTTTGATTACTTAAA
 AA

MA06 base sequence

TGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGTCGTTCTATACTCTTGCAACAA
 TGGGTCTTTCAGTTTCTCGCCTACTTTCTGGGCTTTTTGGCAAGAAGGAAATGCGG
 AACTGATGGTCCGTCTCGATGCCGCTGGTAAGACCACCATTCTGTACAAGTTGAA
 GCTTGGCGAAATTGTCACCACTATCCCGACAATTGGTTTCAACGTCGAGACTGTCG
 AATATAAGAATATCTCTTTTACCGTGTGGGACGTCGGAGGTCAGGACAAGATCCGC
 CCTCTCTGGAGGCATTACTTCCAAAATACTCAAGGAATTATCTTCGTTGTTGATTC
 CAATGATCGGGAACGTGTGTGTCAGAGGCACGAGAGGAACTTCAACGAATGCTCAATG
 AAGACGAACTCCGTGATGCCCTTCTCCTCGTTTTCGCCAACAAGCAGGACTTGCCG
 AATGCGATGAATGCTGCTGAGATCACAGATAAGCTTGGGCTCCATGGGCTCAGACA
 ACGAACTTGGTACATTCAGGCCGCATGTGCAACGTCTGGTGATGGTTTGTATGAGG
 GTCTGGAGTGGTTGAGCGCAAATATCAAGCGTCGGGTGTAATAGTTTTTTGGTCTT
 TGCCGTACTTTATTGGTATCACCTGCACGACTTTTTTCATGATGTC

MB01 base sequence

ACGCGGTGGCGGCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACG
AGGGTCACCACCACATTCCACATATTCATACTCTCTTTTCCTGCCATGTTGTTGTAC
CAAGATATATTAATCGGTGATGAGATGTTTTCCGATGCTTTTCCTGTAAAAACCAT
AGACGATATTGTCTTTGAAGTTGACTGCCAATTGATTACTGTAAAAGCTGGCGCAG
ACGTTGATATTGGTAAATCACCTCTACCCTTTGTATTCCCTATCTATACTGTTATA
AATAGGCGCCAACCCATCCGCGGAAGAGGGGGGTGACGAAGCTCTGGAGGAGGGAA
CCTCGCAAGTGAACAATGTTGTAACTCTTTCCGTCTTCAAGCGACAACATTTGAT
AAGAAATCTTATCTTACTTACCTAAAAAGCTATATGAAAGCCGTTAAAACGGA
CTCTAAAACGAACCCTGGCCGCGTGGATGCGTTTCGAAAAGGGCGCTGCCGCATACGC
AAAAAAAAATTGTTGCAAATTTCAAAGACTATGAATTTTACATCGGAGAATCTATGA
ATCCTGATGGAATGGTCGCTCTCCTAAACTATCGTGATGATGGCGTGACACCATTT
TTCACCTTCTGGAAAGATGGCCCTAAAGAGGTTAAGCTTTAATTTCCCTCCCGTAG
TATTTTCATGGGTAATAACCGAGGATCTGTGAGGATTCATCATTGATATGACCCC

MB04 base sequence

GGGCGCTCTAAATAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGGCGAG
AATATCGACTCAGTAACAGTTGAGAACGCCCTCTATACAGAGCCCGCCGTGT
TTGAGGCAGCTGCAGTTGGGATACCAGACATCCGGCTCGGAGAACTTGTCGC
GGCTGTAGTGACACTCAACCCTGCAGTACGTAGTAAAATGTCTGAGAAAGAA
CTCATCGCTACAGCCAGCAAGAGCCTCCCGAGATTTGCGGTCCCTGTGATGG
TCCTGGTGCAAGATAAGCCTTTCGACCGTACGCCTTCCGCAAAAATCATCAA
GGTACGGCTCCGTAAGGTTGTTGCCGAGGAGTGGGCGAAGAGAGTGCCGCCG
TCCAAACTGTAGGGCCCAGAAGAACTGGCACCATTCTCGTGTCGCAGGATG
TTATA

MB02	base	sequence
	GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGAAATA	
	GATCAAATGAGAGGCCCGCCTCTGCAATCGCCGCAACCAGAACTAGAACTAC	
	CAATTGAATCACGAATGCGTGATCCAGGGCGGCAAAAAGAAAGATATAGG	
	GGAAAACATGGGCACGGTATCAAAGCAGAGACCAGTTTCAACAGTGGGCAAT	
	AAGACTCCGGTGCAACAAAAGGCACAATCAGGTGAAAAATCATATGCGTCGA	
	TGATCGCAGCCCCGGTCTCCAAACGGCAGGGGGAGGATTCAGTGGTCATCCT	
	TGGAGAGACCAACAATGAGCGCACCAGCTTTCGGCGAATGATAGTTGGGGGG	
	CTGATTCACTCTGATGCTAGGCCTCGGGGGTCTGCACAGGGATATAGTGGGG	
	GAGATCGACGCCTACCTCGCCTGAACCGGAACCCAACTGAGCTTGTTGAGCT	
	TCGGAAGAAGCTGGCATCTTGCGTGCAGGAAAAAGATGCTATGACGAAGGAC	
	AAGGATAGCATACAAAGGAACTAGCTGATGCCGAGAGAAGAAATAGAGATC	
	TTGAAGAACAGAATAAACGACAATCAGAACAGGTGCGGACAATAACCAGCAA	
	CCTTCGTCAAGCGGAGGATCTCCACCGACAAACCCTCGACTTGCTTGAATG	
	AGAACTTCGGAACTGAAGGGCGCACAGGCCTTCCTCTCAAAGGAGGA	

MB06	base	sequence
	TAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCCGACGTCCA	
	TCTCGACCACTCTCTTTTCTTTTCTTTTCCGACCACCCCTCGCAATATTCGA	
	CTATGGCATCAGGAGGGACGGCGTCTCAGACTGAGCTCAAACAGAATAAGGT	
	GCCAATCGCTTGGAGAGATCAATGTTCTGCTCTCCTCCTGCCGCTCAACGTT	
	TGCCGAAAGACAAATTCTACATGCCTTGGGAATGTGACCATGAACGCCATA	
	CCTATGAAAAGTGCCAATACGACGACTATATCCGACGGATGAAGGAGTTGTC	
	AAAGCGGAAGCTTGCGGCAGCAGAATAGACACAAATCCAATAGAACGCCCGT	
	TTCTCGCTTCTGCACGGTGTTTCATGTGGCCTCTCAACATCGCACAACACCC	
	TAACTCTACAAACACTATAACACCCGAACCTGATTGTGGGCGATACGTCCTA	
	ATTGCCACTTCCACCCCGAACATCCAGGCTGTTTTTGTACTATTACAATCA	
	GGCACGTCTCCTTTTTGAATCCCAAAGCCTAATTTTCTAGCATCAACATCC	
	GAGGATACCATGGCAAGAATATCCCTGACGTGAGAGGGAAAAAACATTGGTT	
	CTGAGTCTTAGTTTTATTGGTGAACCCTGTCCTGGCCTTGTGACAAGCGGTT	
	ACGATGCAA	

MB08 base sequence

GTCTACAAC TAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATCCGGCACGACGAATGGAT
GGCGGGAGAACGAAAATTCGCTGGCGTCGTGCTTGAACGAGGGGAGGTCCTA
CCACGGGACGAAGCGGCCCGCGGACGCAGTCGATATTGTGGTCTTGTAATC
TGAATAGCGGACCCCCAAAAC TCCGGCACATAGTGGCTAAAAATTGACGTGA
TTTCGATAGTTTTGCCCTACACCGACGATTCACAGCAAGAGATTAGATGACG
CGATCAGCACACTCATTTTGGCATACTCTGAAACTGATGCATACTTACAAAA
CCCAAATGAAGTGATTATTTAAACGTACGTGACTCTGCCAACGACTACCATGT
CAGAAGAATTCAAGTTGACCCTTACTCCACCAAAGCCAAAGGCGGTTCCGCC
CGAGACTACCATCATTGCAGCTGCACAGAATCTCATTGAATCAACCTCCAAC
ATGGACACGAGGCACAATGTACTATAA

MB10 base sequence

TACAAC TAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATCCGGCACGAGGGTTAAAGTC
AGTATGGCCATTGAGTATTACACTATTTCTTATGACGGCCTCCTCTGATGT
AAGAATATCGTATGTCATGTACTCCAAACGCTTGGAAGCAAAGGTTAGAGT
ATCGAGTGAGAAGGATGAGATTAAATTACATCGTCTCCAGTTTTCCCCAATC
CCCCCTCGTGTAGTCGNCAAAGATAGCCTTCTTCCTATCCTGGAACCTTCATC
GATGAGTGTCAAAATTCGCCTAATACCCAATGTCGTGTTGATTTTATATAA
TCTTGTATCTCTTCAATTTGTACTTGGAGTGCGAGGGGGTGCCCTCCCGACCG
AAGCGTTACTTTTTAAACGAATAACTCTAGATAAGCTACGATGTCAGAGAACC
CCAACAGGTTTCGTGCCTGTTCTAGTAGAAATTGTAATGTTTCGATCCTGTCCC
CCTGACGCTGTCCTTAACCCCTCCAATGATTTTTGAGCTTTAAATTAGCCACG
TTGAGGTTTTCCGTAATACCCGAAAAATTAGAGTTTAGGTCACCTTTGTACC
CCATAAGAAATCCTCTTTCTACGATGGGAGCGCAATGTTTCTCTTCCCCTTC
CGCACGCACATTATCAAAACCGACCTGTCCCCT

MB11 base sequence

CGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCAGG
TCTCTTGGTTTTTTGCAATGGCCCCAAATCAGCTCAAAGCCCTCTATGAGGAC
TTATTACGCTCTTTCAATGCCCCGTCCCTCTGATTTGAAGAGATGTGGGGTT
CTTCTGAATCAACTGAAGATGGGATTGATTCAAGCGGGTCTGCTTGTTCCT
CAGGGAGAAAATAACCTAGAAGATCTTGTTATTTCCCGCGATATCCTCGAAA
TTGGCGCGTTCTGGAGTATCCGGACACAAGACGTGCCTTCGTTTGATAGATA
CTTTTCACAATTGCAGACATTCTACACAGATTACAGCTCTGTCCCTACCACCA
TCGAAGCGCGAATACCCCATCCGCGGCCTCAATCTCATCCGCCTTCTCACAC
AAAACCGCATAGCAGACTTCCACACTACACTCGAGAGTCTCCCCCTACGTGC
TGATGCTATCAGGGACAACCCATATATCACCCATCCCGTTAATCTAGAGAGA
TGGCTTATGGAAGGTACTTACAGCAAAGTCTGCAATGCACCCGAAGAAGCAC
CAGCAGAAGAGTATAAATTCCTCGTGAATAGTTTAATGGGGACG

MC02 base sequence

TACAAC TAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCTGACACTC
ACTTAGTTGAAGTTGCTGATGGAGGAGCGCCGGTTGAGGGCAATATAAGCA
AAGAATTAGCCTATACAGATGTCATCCATGTCGATTGTGGAGACAAAGTTA
CATGTGATCAATCCATGTGGGACTATATAGTTGACGCTTTACCTGGTGTAG
GGAGAGTTAATCTTAAAGGTCTTACCTGTGTTGCTGGAACAGCTGCCACTG
GAAATACTATGTATGTCGGAACCTCCGCAATGGGCTCTGCCGCTACCGCCCA
CACTTTGTCAAAAACCAAGACTGGCTTCCGACTTCCTGCAAATGCAATGAAT
GCGGGTCAAACCGTGAACGCTGAATTGCTCCCATATTCGAATGTGTCTCGTC
AATTGTTTCCAACCTCTTCCACGTCACCTGCTACCCGCCTGGTTCTCCCAA
CAGTCCCGCTTCTGAGCTTGTA CT TCTATTTGAGGTTGAA

MB12 base sequence

GGCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGAG
GAACAGGTGTCACCGGATTGAAGAGTTTGGGTGTTTCGCGACTTGCAATATA
AGACCGCTTTCCTTGCATGTATGGTTCATGATGCTGACGGAAGGGGAGGAAC
AAATATTAGAGGCGAAGAAGACATGGGAGAAGATACGGGGCAAGCATTTCATC
CAATCTCTCACAGAACCAGAATTCGATGAACTTAAAACCATGATCGAGTCTG
ACCATATCTATTCCCGACTCGTGGAAAGCATTGCACCCACTGTATATGGTCA
CGAAATTGTGAAGAAGGGCCTTCTGCTTCAACTCATGGGTGGAGTTCATAA
ACAAACACCCGAAGGGATGCACCTCCGTGGAGACATCAATATATGTATCGTC
GGAGATCCGTCAACTTCTAAATCTCAGTTTTTAAAATACGTTTGCTCATT
TTACCGCGCGCAGTCTATACCTCAGGAAAAGCCTCCTCGGNAGCGGGTCTAA
CGGCGGGCGGTGGTCAAGGATGAGGAGACAGGGGACTTTACAATCGAAGCTGG
AGCGCTAATGCTCGCAGATAACGGCATCTGTGCGATTGATGAATTTGACAAA
ATGGATATTTCCGACCAACTTGCAATTCATGAGGCGATGGAACAGCAGACAA
TCTCTATCGCCAAAGCTGGGATTCACGCCACTCTAAATGCTCGTACCTCAAT
TCTCGCTGCTGCCAATCCCATTGGGGGAAGGTAC

MC04 base sequence

AGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGAGTATCACCTTTGAGC
CAACAAGCTTTTAATGGAGGTCTCCGTCTCCACTGGGACAACAGCACATAA
TCAACGTGGCCCCTCCTTCTCCTTTAGCTCACCAAACCTTTTACGAATGACGG
CAGTACCGTCGCCGATGAGCCCCTTCTGATCCTCCTAGTCGACGAACTCTG
GGAATGTCAACTGCCTCACAGTTCTCCACTGCGTCTTCGGGCTTAGGCTCTT
TCCCCTTCCAGATTGATTCTGGGACTAGTACAGAAAAGTGGAGCGGCTCCGCC
GAGTGCCTTCAATGGTCGCCAACGAGCCAGCTTGGATACACTTGCCTCACC
AGCGACTTGTCTTCCATCCGCTTGGATTTCGATAACGATGGTGTTCAGGTTC
CACAAATCCACACAAAAGTTAGGTGTACATCACTTGGGAATACTGATCTTG
ACTTTTGTTCGTTTCGGGAAAAACCCGCGGGATATGTAACGTTGTACATT
ACATTGCTTGTACCGCCTTTTTTACCCCTTGTGTGTTTTATTCTATTCCCA
GATGACTTTACCAACATATATCACTTGCTTGCAGTACTTTCTCCTTTTTA
TATCTTTAGGTTTTGTTGAGGGTAGTCAGCAAATTATCAGTTATTTATATG
GTCCAAA

MA09 base sequence

AGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGGTATGCCTGCACTTGTA
CACACTCCCCTTGAAGAAATCGACAAGATTTACGCCGAGCTTCGTGCTGGTT
TTCAGTCTGGGAAGCTTAAATCTATCGCATATCGCAAATACCAAATCCTCCA
GTTGGGCTACCTGATCAAAGATAATGCGGAACAAATTTTCGGAGGCGTTGACC
TCGGATTTGGGCAGACCTGCCTTCGAAAATCAATTTCTTGAAATTGGCCCCT
GCTTGACTGATGTCAAGAATGCCTATTCAAGTGTTGAGAAATGGGCGAAGC
CGGAGAAACCACCGTTTTTCGATCAACTTTACACCCATGCGAGCAATTATCTA
CAAAGAGGCTAAAGGAGTTGTCTTGTGATCAGCCCCTTTAATTATCCACTC
TGTTAACTATAGGACCGTTGGTGGGAGCGCTAGCAGCTGGGAATGCCATA
GTTATCAAGCCATCAGAATTGACTCCGGCGCTTGATATGCTTCTCGCCGAGC
TCATACCAAAATATCTAGACTCGAACTTAGTCCGCGTCGTAAACGGCAGTGT
CCCTGAGAGCACCAAACCTTCTTTCTCTTCAATGGGATCATATCCTTTACT
GGTGGTGCACGAGTTGGCCAAATAGTGGCTATGGCTGCTGCCAAATTCTTG
ACTCCAGTGACACTTGAGCTTGGAGGGAAATCGCCTGTCTTTATTGACCCAA
ATTGCGACCTTCAGATGGCCGCCCGCCGTATACTCTGGGGGAAGACTGTAAA
CGCGGGTC

MC05 base sequence

AGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGTATGGTCCTCGCTCTC
TTAAACTCCTTATCATGCTGCTGCCACCATAGACAGCAAGATGACGACGACA
TATATAATGATCATAACGTTGAAAACCTCACGACTTATACCTGACGACTTGA
GCCTTCCATGTACTCAAATCAAGCTTTCATCGATCATCAGAACATTC AACGA
CGCCTAGACACCATTGTACGCGCGAAAGAAGGGAAAATGGTGAACGTTAATT
CGCAAATCCCATTCAACCTCCACAATCAAGTAATACCTCCCGAAAACCCACA
CANAATATCACGTTCAACATCCGGGTCCTTCGATTTCTACAACCATTCCAGT
AACGACTTTAGTCGTCCAGTACAGTACCACCTACCCGACCCGTCCAACCTCCT
ATGCCCGATTCTCGGTATC

MC07 base sequence

ATAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGAAAAAAAAATAATAAA
TTTGTCCATTACTGGGAATAAAATCCAAGAACAAACTATGTTATAAAAAAA
TGTCTGGATGGTAAATAAGAATGTCCATAAGTCAAGAGTAAACATTAGTCA
TGGGTCGTCAAAGAACAAACGTCTAATGGAAACGAATTTGGTGTTCAAAA
TCACCTGATGGCATGCTGGTCCATTGAGGGTTGAAAAGTACTTGTA AATTG
TACGTGCCAACAGGGAGGCTAATGATCAAAAACCTCAAACCGGGATTTTCTT
GATCTGGGATGGGGGGTGT TAAATTCGAAGGGATTCTCACTGGATCCGATG
AAATAAAAGTAACACCAGTGGGTGGATTTAGCATTGTAACCAA AATGGTCT
TATCAACAATAGTCAGTTTAGCAAAAATAACACCCCCAGTAGTGCAAATTC
CATCGTGGCATTGGTGTGCATTCGGCATTGAAAAGAGTTCTGGGAATTTAT
TTCATCCTGAATGAAAACCTGTCTGAAGAGCATTG

MC10 base sequence

CTAAAAC TAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCGAACTT
TGTCAAAACCAAGACTGGCTTCCGACTTCGTGCAAATGCAATGAATGCGGG
TCAAACCGTGAAGGCTGAATTGATTCCATATCCGAATGTGTCTCGTCAATGG
TTTCCAAC TTCTTCCATGTTACCTGCTACCCGTTGGGTTTTCTCAAAGAGTT
CCGCTTCTGAGCTTGTA CTTATATTTGAGGTTGAAGTTTGGGGTGTCCGTG
TAAGATATGTGGATTTAAACTAGGAGATGATGATTCAGCTGCTTCTAGCGC
TGAAGATCAAAGAAATGAGGAAGAT

MD01 base sequence

AGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGTATCAGCAGAAAGCAT
GACACCTCAAATTTTCATATGTGAACAGATAATGTGGGCCCAAGATGATGTA
AAAAACCTCTGTGGTGATATCGGGGACATAATCTATATGGACTCACGCGACA
GATCCGAATNTTAAAAAGAAGTGCTCACCAGGGGGTAAATATTTTCGATATC
CGTGGGGATATATAAAGAGAAGGGATCATCAAATAAAATGGGTGTCTTCGA
TAGGGAACCTTATCAACGGCCTCCCCCGTTCGGTAAAATGGATCGCCACAAC
GGGGCGGGTTAGGACCCAGTCGATGTGCACGCATGTATACCCAGAGGAATCT
ATCTTTCTAATACTCCAGGAGCTGTTGACGATGCTACCGCAACTACCGCTTT
GTATCTCCTTATCTCCACGCTCCGCCAGTATTCAGTCGCCGAACGGTCCCTT
CGGGCTCTCAGATGGAAACCAAGTGGTCTTTCAACAAAGACCCATGACCTGA
CAGGTGCGACGGTCCGCAATTCTCGGTCTTGGGGGCATCGGATTGCGATTTGC
CGAACTTATACAGCCATTCCCAATGCGTGTCTACTACCTCGAGACGGAAA
GTCATCAATGCTCCGGCTTATTGCGAATATTTTGAAAATGTTGAGGAGATG
CTCGCGCAAGCAGACGTCCTGAGTATTC

MD03 base sequence

GGGCGGCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGTTTTGAAACAACA
AACGAATTTTATTGATACATCCGAAATGATTCAAGCTAAGCAGCAGCAGTGA
CTGGAGGCGGGTTCGCAGAATTAAGACCCTCTACACGAACATCATAACCATA
ACCACCCCGGGTGGCCCCAGGAACATCTCCAGGCCCGTCGTAGTGCATTTTC
GCGATATCGTAGTTACCAATGAACTTCCACCCGTCTTCTTTAACATGGTAAA
GATTACACGAGTTCCCGGAGAAAGCGTCACGATGACCAGCGGCATAGATGCT
TCGTCTCCCTAACTCTTGAGCCTCTTCGTCTGTAAGATCCCATCGGTAACCT
TGGTCGAGAACGCCGTATGCGAATGTGCTTCCGGAACCAACTGAGAAAAGGT
CACCTTAAGGCGAGTGCCATCAGAGTCGACGTAGAATACAGCGGGACCAGT
CTTATCCCAACCACAAATCATGGTTCCCATGCTCAAGCCCATAACCCTTATAT
CCATACTAGATTGCTCAAATATTTACTGGCAGCAGATACAGAAATCCGCT
CGGGTTTTCTAAGTTCGTGGAGCCGGCAATGTATACCAAGGTATGTTTCCCA
GTATTGACAATCAGCAGCGCCACCAGCCATAGTTCCGAGAAGATAAGGATTG
ATTTCAATGACCTTCTTCACAGTCCAGATGCGACATAGCTCCAGCTGT

MD06 base sequence

GGAATTCGGCACGAGGGTTACCTCGATACGACATTAGGTGTGCCGTGTAACC
AAGGGAGTGTCCCCGTCATTGGAGTCGACGCGCGCTCTGTGAGCGATGTGCA
GGCGACCCTTAAATTTGTTACCAAGAATAACCTTCGTCTCGTCGTCAAAAAC
ACTGGCCATGATTTCCCTCGGACGTAGCACAGCTCGTAATGCTTTCCTCCTAT
GGAATCACAACCTTAAAGAATATTACATATAACGAATCGTTTGTTCCTGAGG
GCGCTTCCTCTCAGACAAGGTACAAAGCCATGACAGTCGGTGCTGGAGTACA
ATGGTACGAGGCCTATGATGCCGCCGAGGCAAATGGACGTTTCATTCTGGGC
GGTCTCTCTGCTGGTGCATCACTTGGAGCAGCAGGGGGCTGGGTTCTAGGAG
GTGGCCATAGTGCTTTTTCTGCTAGACATGGGTGGGTAAGGCGTCATAACC
TTGAATAACTTCGAATACTTAATCTACCGAATTAGGAGTCGATAATGTTC
TTCAGTTCAGTGTGTGACCGCCGACGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAACAAAAAAAAAACA

MD07 base sequence

ATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCGTACCGACACTATTGCATCC
ATGATTCGCCTCCGAAACGGACTGCGAAAAAATATTGGGGCATTTTTCGATA
AACAGGGCTTCGTTTATGCACACACACTATAATAACCGGAAATGACGCAGA
AGGTGCTGGCGAGGCCTTTGAAATTGCTAAAATCGNAAGGGAGCACCCCGCC
TGGCAGGCCGATCCGTCTTCAACCAAGGACTCCCACTCCATTGCCCTACGA
ATTTCTTTTCGCGTCCAGCATACCTGACGGTATCTCACCAACTTCACTTGA
GGC

MF11 base sequence

GGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGGTCACTTATTCCGAGACAT
TGCAATGTCGACGCCACAGCTCTGGTCATCAATTGCATCGACGTTGCATATA
GATCGCCTTGCCGAGGAACTGGGAAGACTCAACGTGTGGATCACGCGCTCAA
GGGATTGCCTCCTTCGCATTCGGTTGCGATGTTTCGTCAGACTCTTTTGCTAG
CCACGATGCGTGGGTTGATAACCCCCCATTCTCACCGATCGAGGCCGTCTCG
CGCCATTGCCAGCGATGGG

MD12 base sequence

GTGGCGGCGCTCTAAATAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAG
GCTGAATCCAAGACTGTCAATAACATTGTTGGGTGGATCCTTCACTCGGGGC
TCGGTGTACCGTACCACTCCTGGCGCATCACGCACGCGAAGCACCATGCTTC
TACTGGGCATATGACGCAAGATCAAGTTTTTCGTTCCATCAACACGATCTGAA
CTGGGTTTGCCTCCCTTCAATCCTGAAGGAGAGGATCGTCTTGGCTCACGAG
TCTCTGCGGAAATTAAGAAAGAGCTATGGGAGGCTCTTGGTGATTCGCCTA
TCGGTGCTGTCCTTGGTGCTGCCTCTTATCTCCTTGGAGGCTGGCCCGCCTA
CATCATACAAAATGCCTCTGGTCAACGTAGATATCCTAAAGGCACCAGTCAC
TTTGTGCCAAGCTCCCCTATGTTCTCCCCCATCACTATGGTCAGATTATCA
TATCTGTTGTTGGTATCATAATTTGGCTAGGTGTTGTTGGCGCTTGCAATTT
ACCAATACGGTTTCCTTAATGTCTTCCGCTTGTATGGTGTTCCTACCTTTG
GGTCAACCACTGGCTGGTTTTGATTACTTTCCTTCAACATACTGATCCTCTC
CTTCCTCATTACCGTGCTCCTGAATTCACTTTTCCACGTGGCGCTCTTGCAA
CTTTGGATCGTAATCTTCTTGGAGATCTCGGTGGTATCATGGGCTGGATTG
GAGCGCACGCTACCAATGGTATCTCTGAAACCCATGTCCTACA

ME02 base sequence

GGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGTT
AACATTGGAAATGCTCTGTATATTAAGCAAGTCATCGACAAGCTTCGTATT
ACTGATTAGTAGAGCCGGAGCGCGTTGTGTTACATTATGTGATTGGTTCCA
AAGAAAGTGGAAAGAAAAGTATAGATGTCAGTGACTCAATGGATACAGATA
ATCCCATTTGTAGACCTAGTGCTTGTCTCTCGCCCTACTATTCTTCGTCTCA
ACCTTAACATATTCGCTATCCTCCTGGTGCGCTTGGTTCGTCTTTCTTCACAG
ACATAAATGCTTCTCCCAAATCTGCAGGGCTACCGCCCTAAGATGTGACTT
TTCGCGTGAGATTGATGGGTCAGCGAGGACCCTTTCGCAAGTCTCTCGTAGA
ACCGATTCAACTTCTAATTTTCGTCCCCTTGAATAAAGCTTGAAGGGCTTCT
CCGCAGCCTGTTCCCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGA
GTCGTATTACAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC
CTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGC
GTAATAGCGAAGAGGGCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
GAATGGCGAATGGCAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTT
AAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGGCGAAATCGGC

ME05 base sequence

GGTAATATCTCAGCAACTCATGCCCCCTATCATATACATTGGCAGATACCTA
CGATCTATTAGATTTTACAACACACATTGCTTGACGTAGTTGACAGTCATCC
CCCATCCCTATGAATCTCGCTTCCGTCCGGAATGATAATTATTATTATATCC
CAA
AAAGCCGGG
GGGGG

ME03 base sequence

TGGACCCACGCGGTGGCGGCCGATCTAAAACCAGTGGATCCCCGGGCTGCA
GGAATTCGGCACGAGGCAGTAACGTTGCGGGTGGTGGTCAAACCAATCGTGT
CTTGGGAGGATACAAAGCAACTCCTAAAAATCCCCATGTATCTGATGGTGCA
AAGAAGCATGGTGAACAGGTGTTGAAAGACAGTGATGCTATTTAAACAATA
TCGTCTCTCACAGAGTCACTTTTTATTCTAAAGATTATACGATGTAACCTTA
ACATGGTGACAAAATCTTCTGTATTTGTATCACTCCTTTTAAAAACACAACGT
TATACATTCTGTTACTGGCTCAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTT
CTCGTGTTTCGGCGGACTTAACCAGCTTTTGACGGGAATCGTGGTTTATACG
GGTGGCTGTCGCGAGAATTATGTAAATGGATGTTTGGCTCACTTAATCAAG
GGTGCTATATTCTGGTCTTATGGTCTTCTTTC

ME04 base sequence

GGGGGGCGCTCTAAATAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGG
ATACGAACCTAGACTCCCTAGCTCTTCTACAACACCACGCACAATAACGCTA
TTTATGGAGGCATATTCTAGCACGGTATCCCTTTCACCAACATTTTTGGGGC
GTACTTATTACATGTAGGGACGGATTTTTACTGAAAACGTCGATGCTAG
TTTCCGAAAGGACCTTAGTGACACCATGCCAGCATTAACTCTCTCTTAGAG
TCTCTTCAGCGAATAGAGGGGGAGGCTCATTCCCTTCGTGGGGTGCCTAGTC
CCTTTATTTCGGATTGCAGGAATGCTAATGCCGGATAACCGCGAGCTTCCCCA
GCCAGTAATGAACTGGCTTGATAAACATCTTGAATCACCTGGTACAGCAGAG
ACATTAGCATTGAAGACCAGTGCTCTAACAGACACTGACCCACGAATTCGAG
AATACACTCTCCAGGAAAGGGAAACAAACCTCGAATGGATGAAACTGGGGGC
CGAGATATCGTCTCTGAACATGATAGTTGAGACAATGTCATCTGCAACCAAA
GGCGCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
CAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGT

ME08 base sequence

GGGCGGCGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAG
GGTTCATTCCATTACCGGCAAAGAACGCGTTCTATTCAATCAAAAGCCCTTT
AATATTCCGTGCTTATCATCCATGGCTAATAGCATCGATTTGTCTTATTCG
AAAGGGGGGATCGCAGTGTACTGTGGATCCTCCATAGGTGCTCAAAAAGCGT
ACGCGAATGCAGCCCAGTCTGTTGGTCGTGCCTTAGCACAAGCGAAACGTCC
CTTGATTTATGGAGGGGGGGCTCAAGGGCTCATGGGTATCGTCTCAGGATC
TACATTGGCTAGCGGAGGAGATGCCATTGGTATAGTCCCATATGCTATTCA
TGTTGGCGGAGGAGAACGTGAAAAATCGGTTGCTAACGGTTCTCTCCATGT
TGAATCTATCCTTGGAGCATCAGTGCAGCAAAACACGAGAAGATGAAAACG
ATTGTGGTAGATTCGATGCATGAACGTAAAGTTCAAATGGCAAAGCGCTCA
GTGGGCTTCATCGGTCTTCCGGGGGGGTTTGGAAGCTTCGAAGAGGTCATG
GAGGTCGCGACTTGGACACAATCGGGAATCCATGATAAACCTGTTGTGATGT
TGAATGTTCTTGGTTTCTATGACCCCTTGCGCCAGCTCATTCAAAACGGCAT
CACAGAAGGATTCATCAATGGCGCAAACCTACCGCCTTGTCATATTCGTTGAC

ME06 base sequence

TAAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCTCACTTGCT
CGAATATCGCTTCGCTGGATGGTACGGGAATGCTTCAGGAAAAACTCGGGAA
TTATGTTCCATGCCATCGTTGGAGAGATATGGGCCTTGATCCTACGACCCT
CTACCCTTTCGTTACCCACGTCCACCTCCCCTCCCAGTCGGTTCCTGACA
GTAGAGAAGATAAGCCTGCCATCGAGAATCAAAGGTATGTTCTCCCACTTCA
GAAGGCACCCCCCTCCGGACATCTCCTCAAGCTCCGCGAGTACCTCATCTAC
AGAAAAGAAAAGTGATATCGATGCCGTAATCAGGACCGAGGAAGAAGAGGA
TCTGTACGATTCCATGTCCCCAATATATGATCAGCTGTGCCTACAACGCATA
TGTTGGTTATTGGAAATCATACCACTCAATCTAAGATACCAAAAAGGGGAT
AACCAATGGGTTGACTCGGTTACAATTAACATGGCAGCCCCAAGATTCATAC
CAAAACAGAAAGATCGTGGTTTCAAGGTCCATCGCACAGTCAAGCAACGTAT
GGATGCCGCATATCCTGCCTCGAGGAAGAAAAAATATATGCCGAAGCCCGAG
TTTAAAGTTGATCCTACTTGGGTTGATTAGCTGATCTTGTTATAAGTGTTT
AATGATTNACTACCTACTTTACGATATTTAATGTCCCCGCAATGTTTCATCA
ATGATATAATTTTAAATACTCTCATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

ME10 base sequence

TAAAAC TAATGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAAGGTATGGGGA
AAGACCCTTGGTGGTTACATGGACGCCGATGGTAAAGGACACGGTACCCATG
TCCCAGGTACAGTTGCGGGAGCCCAATACGGGGTTGGAAAGAAAGCCAGGAT
CGTCGCTGTGAAAGTCTTAAATGAAAATGGGTCTGGGTAAGTCTCGGACAT
TGTGTCGGGTCTCCAGTGGGTTCGGGANCTCTGCAAAAATCCTCTGGGGGCCCT
TCCATCGCTTCCATGTCTCTCGGGGGAGGGGGCTCCCCAGCCTTGGAAGATG
CATCTTCTGGGCTTGTA AAAAATGCTATCCATGTTACCGTCGCTGCTGAAAA
TTCCAATATTGATGCAGGAAATAACTCCCCTGGACGCGCTGCTGGGGTATGC
ACTGTNGCTGGAAGTACCATCTCGGATAGCAGGGGCTCGTTCTCAAACCTCG
GCCGTGTGGTCGATATCTTTGGTCCGGGCCAGAACATCATCAGCGCGTGGAG
GGGTGGGCCAAATGCTACTAATAATATATCTGGAACATCGATGGCGACTCCC
C

MF02 base sequence

GCGGCCGTTACAAC TAGTGGATCCCCCGGGCTGAAGGAATCCGGCACGAGGGT
TTATTTCTCCATCTTGGCTAGTCCTTGAAAAATTCTCTGCCATATCTCACAG
TTGTCCAGCCCGGGAACCACTTCTGTTCTCCTTGGTTCGAGGTCCATAAGAC
GAATAATCCACATAAGCCTCGAGGCTCCCAACGGTCCAGGGGGACCATTGAT
TAAAAGCTTGCAAATTACACTCATGACCCAAAAAAGTCCCTGATTCCATG
ACATGGAAGCGTACATGATGCTCACGCTCAGGGTTCGTCGGNAACACCACGC
TCTTCGAGTCATATGTCCGGCCTGTATTTCAACGAAANTGGGTCATTACAA
GTTTCCAAGACTTCTCGGGACTATGTTTCGATAATTCTGGCTCACGACTCCAA
TTTATCTGAAGTCCGATTCTTCCGCAAATGCCGTA CTGGT GATGCCCCAGGT
TACCATTGTCCATCTCTTCTTCTGACCATACGACCTGTACATTATTGAGCG
CTGCACATGGAGG

MF03 base sequence

CGCTCTAGA ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCTAGT
AGTCACCTCATCGCGTCTCGATATGGGCCGATTTCAACGCCAGGGGCTGAGG
GAAACAGTAATCAAGAAAGGTCCCCAGCAGCTGACGACTTGCAAGAAAGCGG
CCTGCAAGATGTTCTCTGCGGCATTCCCATCGTAGGACCACTAATTGGAGTC

CTTTTGCCACCTGTCTGTGGTGATTCTCTGGTGCAGAGTCAGTCAACGACC
CGCAGGCCTTGAAGGAAGCGGCTATCTCTTTGTCAAGCATGATGTCATCTCA
AATGGCCAATTCGTCCGCCAGTAGTGCAGCTCCTATTCCAGAGCAAAGCACC
GTTCCAAGAGCTGAACCGGCGGCTGACTCCTCTCCTTCCACACTGACCGATA
CGTCCAAACCAGTTGTGCCGCCAATACACCATCCCTTCCCGTTGCTGTGCC
ATCCCTCCCTGGTGTCTGCCATCCCTTCCCGTTGCTGTGCCATCCCTTCCCT
GGTGGTCCGCCATCCCTTCCCGGTGTTCTGCCACCCCTACCTGGTGTCTAC
CATCCCTTCCCTGGTGGTCCGCCATCCCTTCCCGGTGTTCTGCCATCCCTCC
CGTTGATCCCCCAGGAGAAACGCTCCAAATTGATTTTTTTCCTCGAGGCTAG
TTGTATTGGTGACCTGGGCGTTATTGAAAAATATCATATTTGTTGATTGAA
TAT

MF05 base sequence

CGAGGCGAATATCTTGGACCAATATATCAAGACCGTCGATGCATTCACTAAA
TACGACAATGTATTGGCTTTCAATGTCGGCAACGAAGTCGTTACCCGGGAGG
TCACCGGTGTTGCCACCCTACGTTCAAGCAGCAGCTCGTGATATCAAAGCAT
ACTTGAAATCAAATCATCTTCCGTTCTCGTCGGTTACGCTGCCATCAACGG
TGCTGGAAATTCCCGACAACCATTTGGCAAATTATCTTCCCTTGTGATCCTACA
GATTCAAACCTCTGAAGCAACATCTATCGACCTTTATGGACTCACTGATTATG
AGTGGTGCCGGTGATT

MF07 base sequence

GGGGGCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCCGGCACGAGG
CCGCTCTCGAGTCTCGAGTTTCGAGTTTCGAGTCTCGGTAATTTGGTATAT
AGAACGGAAAAATACAAGCGACGTGGCCAAGATCTGGGGCCAGACTCAGCTA
ATCCAATACAACCAGAGCCTCTCAATTCCTTTCTTCAAACCCGATCACGAGT
CGGACATCCGAGAATGCTCGTTGAAGAATATGACATCACCGAACATCAAAC
GCAGAACACACCTTTTGAGGAATGAAAAGGCATTGTATGGTGGATGACGCA
GGACGGATGACGATGACGCGTCCATTGCCGCCGGACTCAGGATCACAACCAC
AACCAATGACGACAGACAACAGACAACAGCACAGCCCCCTCTCCGAGTTCTA

TTATTAGTGATAGCTAGTAATCGGACCGACATGATGGTTTACGTTCAAGTT
CGAGTCTGGTTCGGTATTTGTTTCGTTGTGACCTCTCGAAGTTTGCGTCCTT
TGATATGAACTATAAACCACGATTCGCATTAATCAGCCCCCTCGAATAGGAAT
CGAGC

MF09 base sequence

GCTCTAAAAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATCCGGCACGAGGATTAA
ATTCAAATAATATTACACACAAGTATACATGTGGATTCCCTCCGGTGGATCCT
TCCTTCAGTACTCTGCTAAGGGAATGACTTCCCCAACATCAAAGTGC GGAGT
TTTTCTCCGCCGACCCAGGAGCTCCACATCACCGCTGTCGAAAAACGAGTAA
CCCGGCATAGCAATGCCTTCTTCGTCCGATCCTTCCTCGGAACGAATACCCA
TTAAGGGGTCTTCCGGTCTGGGAATCTCTCAGGATACCAAGATGATCAA

MF10 base sequence

TGGCGGCCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGA
GGGAGAGTTAATCTTAAAGGTCTTACCTGTGTTGCTGGAACAGCTGCCAC
TGAAATACTGTGTATGTTGGAACCTCCGCAATGGGCTCTGGCGCTAGCGCC
GAACTTTGTCAAAAACCAAGACTGGCTTCCGACTTCGTGCAAATGCAATGA
ATGCGGGTCAAACCGTGAAGGCTGAATTGATTCCATATTCGAATGTGTCTC
GTCAATTGTTTCCAACCTTCTTCCATGTTACCTGCTACCCGTTTGGTTTTCTC
AAAGAGTTCCGCTTCTGAGCTTGTACTTATATTTGAGGTTGAAGTTTTGGG
TGTTTCGTGTAAGATACGTTGATTTAAACTAGGAGATGATGATTCAGCTGCT
TCTAGCGCTGAAGATCAAAGAAATGAGGAAGATGAGGATAACGCACTTTTA
GCTTCTTTCGATTTGCATCAAGAGATTGTTGTTCCCTGAATTTATTGAGGGT
AATTCTAGTGGTTCTAGTGAGGAAAGTTCTCCAGCGGCAGCTGAAGAAAAA
TTCCGGTTATGATTGTTGCTGGGCGCGATCCCGAAATTAAGCGTATTATT
AAAGGAGAGGTGTTACAATTTTCACCTGTCAAATGGGGTAACTATATCTTT
TCACATTCAAGTGAGGGTAAAGTTATGCTTAACGATGCTAGGAATAATAAA
GGT

MG02 base sequence

GGTGGCGGCGCTCTAGAATACTGGATCCCCCGGGCTGCAGGGTTTAGCCGGG
CCACAAGCAATGCAACCAACAGAACCAAACCTACTAATGCACTTGTCGGCGC
AGTACATTCATTTGGACTTGATGGTGTGATATTGACTGGGAGTACCCCAA
CTCCCCCGGTGCGGGAAACCCATTTTCCTCAGCAGATTCAGCCAACCTTCTT
GCATTATTTAAATCATTACGTACATCCTTAGGCCCATCGAAGATTATATCCT
CGGCAGTTGCACACATGCCTTGGAACGGCCCTAATGGCACTCCTCTTNACGA
CGTTAGAGCTTTTGGCGGCACAAATGACGTATGTCAACATAATGAACTACGAC
GTCAACGGGGCATCGTCTAAACCTGGNACCAACGCCCTCTCGGCAATCTGT
GTGGGAGCTCTTCCCAGCCGGGTGCTCCTGCGCCAGCTGGTCTTCCCAATG
GACCACAGCTGGAATGCCAGCCTCTAAGCTCCTTCTACGTCTTGCTCTGTAC
GGCTATGTCAGCAAGAGCCCTGGGAAGAAGCTTCCGGAAGCTTAATGCCTG
ACCCGAGTATTCATCCCGTACC

MG05 base sequence

TAAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGGTAACATCC
TATTCCCCTACTCTCTGATTTTAAACACTTTCCATTCAACAGGGCCGGTCTC
CCAGTAAAGTACCTCCCAATGTGCGGTGGCTCAGGTCCAACCTGGTCTATGCT
ACAATGACAATGTCGTCGGTCCGGGTGACCGCTACAACGATGCATTTTTCGA
GATTAAATACGTTAGGGCATAACACGACCGGCGGCATCGTCCCCACACCACC
GCTGCCGCCATCGCCGTGCCAGACCGTCCTCAACGTCATCAAGCACAATCA
CATCCAGGCCCGTAGGGACCGCACTGACCCCCAGTCCACTGTTTTTCCCCGG
AAACGCAGGCACGCGCACAAGCACCAGTGAAGCTGCGTGGTGCCTTTGGTTA
TTTGTACCCCTTGGGGCAATATTTGGGTATCTGTGGTGATGGTTTCCCTGG
ACTATGGGTTGTGAATAAAATATAGATGCACAATTTACCCATGACTTTTTA
TACGCGTATATGATACGGACTTTGACTCTGACCTTAACGATGGACATAGAT
TTTATTTACGTGGGCATAGAATAATCCTATATTATGTTTTTGTATCAGGCA
AAGGGGG
GGGCCCGG

MG07 base sequence

CGGGTGGGGCGCTCTAGAATACTGGATCCCCCGGGTGAAGAATTCGGGAAG
AAGGTTGGGAAAAAAGAACAAGGCTAAAGGAAACAAAATAAAAACTTGC
CAAGCTTAAAGGTAACCTTAAAGGAATTTCCAATCTTTTGTGGGTA AAAA

GAATTCGTTGTTGCGAACCAATAATTGTTAAAAATTCAAAAAATTTTGA
AACTTCAAAAAGGAAAAGGGCAAGGTCAAAAAAATTTAAAAAACTTAT
TTAATTATTTTAAAATTATTTAAAGGTTATTGGGGGAATTTGGAACAAAC
TTAAATTATTAATAAAAAAGGAAAGAATCTTGTTTCAGGTTGTTTCAA
AA
AA

MG08 base sequence

GCGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCCTC
ATACCAAGTCGAGAGAACAATAGAGAGGAATCCCTCTCACGCGCATCTCTCC
GAACATTCCTGTCACTCGGCATATTGTTCAACAAGCCTATTATCTCAAGCGCC
GTCTATATAGTTAGGCTCCACGGCATTACGATCCCCATTCCTGGCGGATAG
TTTTTTCACCTCCCATTTTTTTTAATTTCTCTCTCCATAATATTCTCTTCA
NCTTGTTTCATATTTAATCGCAATTCTACCAAATCATACCACCTAATTAGG
ATCGCTCACCCGACCAAAAATAACATCGAAATGTCTTCTACTCATATACT
ACCCCTCCTCGCCNACTTACGGATTCTTCCCTACTGGCGCTACATCACCCA
ATGCATTCATCATTCATCAGTCGCGCGGACACTCATGCCATGTATGC
TGCATTCGCTCATCCACCTCCAACCTCCAGCAACAACCCGGAGGTCAGCAG
CAGAACATCCAGAGTGGATTGAAGAAGTTTGTAACACGGAAGTGATCTAC

MG09 base sequence

GTGGCGGCGCTCTAGAATAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAG
GCATGATTACCTACACCTACAAGTAGAGTAAGGATTGCTCGCTAAAGTACC
CAGGTCACATCGACCTCTCCCTCCTTACAAAAGGTTTGTC AAGTCCGACCA
CAACACTCTCACACAAGGGGCAGCTGCTAGCCAACAAATCCTCGAGTTCTAC
CCTCAACTTTTCGATTTTCTTCTCGTCTATATTAATCCCTTGCCTTTTCTGA
GCCCCACACTTGGTATCCACGCAGGAGCAGAAACAACAGCAGCCAACGCAT
CTGGTATTATTAATCCCGTAACCGATCCCCGGCCGAGATAATATTCCGACC
AAGGAGATTTGCTGCACGGGCACCATTTCTGCAGTGGGTTGCCAATGGTGCCG
AAGTTCGCCGAAAGAAGGGGTCGAGAAACGACTACCTGTTGTGATTGAGTA
GTGGAAGCGGGCAAAGACCTTCCCATGTCGGCGCCATTTAGGGGCCGACCC
CTACACCCTTGGCAGGCGTGCCTTGCATCAATTCGTTCTGAAGGGCGACTAT
TTTACGGAGAGCATGAGGAGGGAGATACTCTTTGGCCAGTCCAATCAGGCAG
TCCGCATGGAAGGAATGGCGACACGGGAAGAAATAGAACTGTCTTGTCATGA
GCAAATGAGAACAGACAGAGCATGGCTCTGCTGAGTCAAGAGTAACGAAACG
GG

MG12 base sequence

CGGGGGGGCGTCTAGAATAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGA
GGCCAAGCCCCCTCTTGT TTTCTAAACCAAACGAAACCATTTCNNCCATCGAC

CCAGGTCCTAAAAATGGTTAGCTTATACCTCCCGAGGGGTTTGTCTTTTCT
TTCACAAATTAATTTTAAGCCCGGCCGCTTGCCCGCATTATCTTGGGGAAGT
GGGTGTATAACCGTAATTAACCAACGAATAAAGGGGAAACACCACATTTTCGT
TCAGCTGTCTATGGATTAACGTGTTACGTTTACGAACTCTCCAAACGGGAGG
AACGACCTTAATGAGCTATGGCTCGTGAGTGAGGTTTATCGGGCCCCAGGCA
TTTATACCCTCCAAAACCTCGCCCATCAAGCTCTTGCGTCGGTAAATAACGA
TAGCTTGGTAACGCTCTACTCTAACACTCGGGGTGCATTTGCCATTGGTGAC
CTCGGTGATGGCAGTTATTCAATCAAAGCGGGTTCCAAGGCGTGGGCTGCC
AACCACCCTGATTCAGGGGTCTGTTAAACTGGCTGACTTCAATACGAAAGA
TGCATCTCAGAAATGGCGGTTTAAATCCGCCCTCTGCAAATAACAATGTCA
ATCTCCCTGACGTTACTCAGGATTCCACGGTGATGCTCGGCCACCCAGATGC
TCATCCAATACTTGTTTCTTGTCTCTTTACCAATCCATGTCCCATTCTTGGC
TTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGGGGCCCCGGTACCCAATTCGC
CCTATAGT

MH02 base sequence

CGCGTCTAAATAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCTCCT
TCGTTTCGTACAAAGTTTTGGACAGGATTTCTTTTCGACCTCTCACTTGCACGT
GGTCTAGACTATTACACTGGTATCATTATGAAGCTATTGTAGAGGCATCT
GCACCCCGGGCTTCCATGCCGCGAATGCATTTGCCTCCTCATCGACCCCTA
CAGACGCTGCGACAACCTCCTGCTCCGCCGCCAAAGAAGAAAGCTGCGAAGAA
AGGCAAGACAGAAGATGGGGAGGACGAGGAGATTGATGAATNTCAAGTTGG
AGTAGGATCCATTGCTGCAGGTGGCCGTTATGATGGTCTTGTTGGACTGTC
CACCGCTGCCGCTGCCGCAGAGGGAAAAAACCCACCTGGACTACCTTGTGTC
GGTGTCAAGTTTGGGCTCGGATCGGGTATCTGCCCTCGTCTGGCCTAC

MH04 base sequence

AGGGGACTATCCCTATCCTGTCTCTCGGCAACTACCAAAGACCTTGAAGAT
TGGCTTCACGAGCTCGCTATCCCCATTATCGACGAAGTCAATGGTGACAACT
ATGCCATTTATGCTCAAAGCCCTAAGCCCCTTGCCATCTCTTTATCGATCC
CACCACCGAGCAGAAGGATGCACAAATCGCATCTATCAAGAGTGTTGATCAG
AAATTCAAATCCAAGATGAACTCCGTCTGGATTGACGCAGTGAAATTTGCTG

ATCATGCCAAAGCTTTGAATCTCCAGGAAGCCAA

MH06 base sequence

AGTGGATCACCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGAGCTCTTCCACTAATGA
TTCATATGGATCGTCCAACGATAATAGTAACCGCGCCTCCAACAATGATACA
TATGGGTCTTCCAACGATCGCTCATCTAACGACAACACATACGGGTCTATCTG
ATACATATGGTCTATCCAACAACGACAATTCTCCAAGAATACATATGGATC
ATCCAACAACAACAGTGATTCGTATGGATCGTCCAGAAACACTGACGACAAC
AACTCCTCTTCCAACACATACGGGTCCAGTAACAATGAATCTTCCAATAACA
CTTCAAGCTCCGGAANTCTGGTGATTGGGTTGACAAAGGGGTTTCATTTCG
CAGCTCAAAGGCGGGTCTTAACCTTGATGAATCTACAGCCGATAAGATTGG
TGATGGTTTGAGAGAGGGTCTCCAGAAGTCCGGAGGAGGCCGTTTCGGCAAC
TAACACGTTCGGTCGTAACACTACTTGTATTACTATTTCAAATCGGAGGCTCGC
AATATGTAACGCATTGTAAATTTGGGTAACCTTGTA

MH07 base sequence

GCGTCTAGAACTATGGATCCCCGGGCTGCAGGCTCGTGCGTTGGCGCGGGG
CATCGACGATCACGCCGTCCACATGGCTATCGCAGACTAAATCACGTTCCGC
ACCCTGTCTTGTCGATCAGGGCTATTTTCATTGACCCCACTTGACAATACAAA
CGTTTCTTCCGCCATTTTGGCATTTCCTTATCTTACAATTTATTCTTTTT
GGAACTAGGGGAGAAAGACCCACTTGATTGAGCAAAACACACGTTCACTTG
CTTACTTTTCCACACTTTCAGAATGTAGCTCACTCTCGCATGCCATAGACGT
ATCAGCAGTTTTTTTCTGCCTTACTTTACGATTCTGATAGTTTGACACGTC
TGTACCATACATCACACATACGAATAGCCACAAAATTGTACAACCTGAATATA
CCAAATATATGTACAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AAAAAAAAAGGGGGGGGCCCGGTCCCATTCGGCCC

MH08 base sequence

GGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGATTGGGCAAAAACGTTCTA
CTGTTGCTCAGCTCGTCAAACTCTTGAGGAGAATGACGCCATGAAGTACAC
AATCATTGTTGCTGCTACCGCTTCCGAGGCTGCTCCTCTACAATACCTTGCG
CCTTTCTCTGGCTGTGCCATGGGTGAATGGTTCCTGATAACGGCAAGCACG
CCCTTATTGTTTATGATGATCTGTCCAAGCAGGCCGTTGCTTATCGTCAAA
TGTCTCTCCTTCTTCGTCTGTCGCCCCCGGTCGTGAGGCGTATCCTGGTGATGT
CTTCTATCTCCACTCTCGTCTCCTCGAGCGTGCCGCCAAGATGAGCGAGAAG
TTTGAGGAGGATCCCTTACTGCTTTGCCTATCATCGAGACCCAAGGTGGTG
ATGTGTCCGCTTACATCCCGACCAATGTCATTTCTATTACCGATGGTCAAAT
ATTCTTGAGGCTGAGCTATTCTTCCGCGGTGTTTCGACCTGCCATCAATGTC
GGTCTCTCAGTGTCCCGTGTCCGTTCCGCTGCTCAGACTAAAATCATGAAGA
AGTTTGCCGGTTCACTCAAACCTTACTTGGCACAATACCGTGAGGTCGCAGC
ATTTCGCTCAATTCGGTTCAGATCTCGACGCTTCCACCCGGTTCTTGCTCTCT
CGTGGTGCTCGTCTTACTGAGCTCCTGAAACAAGGCCAATATCAGCCCATGG
CCACTGAAGTTCAAGTCCCCATCATTTACGCTGG

MH09 base sequence

GGCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGGG
AGAATCTACTTTATCGCCAGAGAAAGCGGCAGCGCAAGCCCAGCGTCGGTAT
ATCGCAAGTCGTGCCGCCAAAGAAATCAAAGATGGCTTCTACGTCAATCTTG
GAATCGGAATGCCTACTCTCGTACCCGAATATCTTGAACCTGGCGTCAGAGT
CTGGTTGCAGAGTGAGAACGGTATCCTGGGAATGGGACCCTACCCAACGGAG
AAGGAACTCGATGCCGATCTCATCAATGCTGGTAAAGAGACGGTAACTCTCC
TTCCTGGAGCCTCTATTTTCGACTCTAGTGAATCCTTTGCCATGATTTCGTGG
CGGACATATCGATGTCGCCATCCTGGGTGCTATGGAGGTTTCGCAAGCTGGC
GACATCGCCAACTTTATGATCCCAGGAAAGATGTTGAAAGGTATTGGTGGT
GCCATGGACCTCGTCTCCAATCCCGATCAAACCAAAGTTATTGCAGTAATGG
AACACACGGCTAAAGGCGGCAAACCAAAGATCCTCCAACAATGTGCACTTCC
TTTACTGGTGCCCGTACTGTCAGCACTATCATCACAGAACTAGCTGTGTTC
GACGTAGATAGAGTCGCTGGCGGGCTCGAACTCGTAGATCTGGCAAAAGGCG
TGA CTGTGGAGGAGGTCCGCGCAAAGACTGGTCTGACTTCAAGGTCCGGAG
CCAATTA

RAPD data

sample01

0110001001000010001001110110000001001011000001010000001000100101001001101000000111100
10

sample02

0110101000000000001000100010000000100001000001010100001000100110001001000000000100000
00

sample03

0000101001010010001010110010000000000001000000101010001000110101001001010000000100000
11

sample04

00000000000000000001000000011000001010011000001000100001000000101000000000000010100000
00

sample05

00000001000010000010000000001010001000100001100001001101000010000000000000000000100000
10

sample06

0001000100101000100000000000100100000000011111001001000000000010000010000000001100000
00

sample07

00000100100001000100100000000000010000000000001010000001010000000100000000010001100000
00

sample08

10100000000100100000000001000110000100000000001001000000001000010000000000001000100000
00

sample09

0000110000100001000100011
00

sample10

00000000100001000000000000001110000000100010000101001000100010000000000011101000000000011
00

ITS data

L.nudaDeo-----ATTTAC-GGTGGGGGG-GGGA--AGAG-CCTG--TTTC
CGGAAGGCATGTGCACACCTAGG

L.nudaPor-----ATTGAC-AAACTTGGTTGGGT--TGTT-GCTGGCTTTT
CGGA--GCATGTGCACACCTAG-

L.irina-----ATTGAATAAACTTGGTTGGGT--TGAT-GCTGGCCTCTCG
GG--GCATGTGCACGCCTAC-

L.sordida-----ATTGAATAAACTTGGTTGGGT--TGT--GCTGGCTTTT
TGGA--GCATGTGCACGCCTAG-

L.nudaGye-----ATTGAATAAACTTGGTTGGGT--TGTT-GCTGGCTTTT

TCGGA--GCATGTGCACACCTAG-
L.nudaFra-----ATGCAATAAACTTGGTTTGGTGTGTT-GCTGCCTTT
TCGGA--GCATGTGCACACCTAG-
L.nudaSwi-----ATTGAATAAACTTGGTTGGGT--TGTT-GCTGGCTTT
TCGGA--GCATGTGCACACCTAG-
L2--TGCGGAAGGATCATTATTGAATAAACTTGGTTGGGT--TGT--GCTGGCTTTT
TGGA--GCATGTGCACACCTAG-
L3CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGT---TTTGAACGGGT--TGTCTGCTGGCTCGC-
-AAGGGCATGTGCACGCCTGT-
L5--TGCGGAAGGATCATTATTGAATAAACTTGGTTGGGT--TGT-TGCTGGCTTTT
CGGA--GCATGTGCACACCTAG-
L1---TCGGAAGGATCATTATTGAATAAACTTGGTTGGGT--TGTT-GCTGGCTTTT
CGGA--GCATGTGCACACCTAG-
L4-----TGCGGA-GGGATCA
TTAC--CGAGT

L.nudaDeo-CAC---CATTTTTTACCACCTGTGCTCATTCTGTAGATTTGAAACACC
TCTTGAGGAACTCAGTTTGAGGAATGC
L.nudaPor-CAC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACATT-TTGTAGATTTGAAACACCT
CTTGGGGAACTCAGTTTGAGGAATGC
L.irina-CGC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACCTT-TTGTAGACCTGGAT-ATCTCTC
GAGGAACTCGGTTTGAGGACTGC
L.sordida-CGC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACCTT-TTGTAGATTTGAAACAACCTC
TCGAGGAACTCGGTTTGAGGAATGC
L.nudaGye-CAC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACATT-TTGTAGATTTGAAACACCT
CTTGAGGAACTCAGTTTGAGGAATGC
L.nudaFra-CAC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACATT-TTGTAGATTTGAAACACCT
CTTGGGGAACTCAGTTTGAGGAATGC
L.nudaSwi-CAC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACATT-TTGTAGATTTGAAACACCT
CTTGGGGAACTCAGTTTGAGGAATGC
L2CGC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACCTT-TTGTAGATTTGGAACAACCTCTCGAG
GAACTCGGTTTGAGGAATGC
L3-CTCATCCACTCTC-AACTTCTGTGCACTTT-TCATAG-----
GCCGGCTTGTGGGTGCG
L5-CAC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACATT-TTGTAGATTTGAAACACCTCTTGA
GGAACTCAGTTTGAGGAATGC
L1-CAC---CATTTTT-ACCACCTGTGCACATT-TTGTAGATTTGAAACACCTCTTGA

GGAAACTCAGTTTGAGGAATGC

L4TTAC---AACTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACG-TTG---C--CTCG-GCG
GA---TCAGCCCGCGCCCG-

L.nudaDeoTTATGGGCGCAAGC-TTTTAGGCTTTCCTTGCGTTTCAAGTCTATGTTTT
TAT-ATACCCCATCCGAATGTAATAGAA

L.nudaPorTTATGGGCGCAAGCCTTTTAGGCTTTCCTTGCGTTTCAAGTCTATGTTTT
TAT-ATACCCACATGAATGTAATAGAA

L.irinaT---GCGCGCAAGCCA-----GCTTTCCTTACATTTCCGGTCTATGTTTTCAT-
ATACCCCATTAGAATGTTATAGAA

L.sordidaT---GTGTGCAAACAT----GGCTTTCCTTGTTTCAAGTCTATGTTTTTA
TTATACCCATAAGAATGTAATAGAA

L.nudaGyeTTATGGGCGCAAGC-TTTTAGGCTTTCCTTGCGTTTCAAGTCTATGTTTT
TAT-ATACCCATAAGAATGTAATAGAA

L.nudaFraTTATGGGCGCAAGCCTTTTAGGCTTTCCTTGCGTTTCAAGTCTATGTTTT
TAT-ATACCCACATGAATGTAATAGAA

L.nudaSwiTTATGGGCGCAAGCCTTTTAGGCTTTCCTTGCGTTTCAAGTCTATGTTT
TTAT-ATACCCACATGAATGTAATAGAA

L2T---GTGTGCAAGC---TTA-GCTTTCCTTGTTTCAAGTCTATGTTTTTACTAT
ACCCATAAGAATGTAATAGAA

L3T---TCGCGCACTTG---TA-G-----GTGT--CGGGCTTATGCTTT-ACTACAAA
CGATT---CAGTTTTAGAA

L5TTATGGGCGCAAGC-TTTTAGGCTTTCCTTGCGTTTCAAGTCTATGTTTTTA-TA
TACCCATAAGAATGTAATAGAA

L1TTATGGGCGCAAGC-TTTTAGGCTTTCCTTGCGTTTCAAGTCTATGTTTTTA-TA
TACCCATAAGAATGTAATAGAA

L4TAAAACGGGACGGCCC-----GC---CCGAG-GACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGA
ACTTCTGA----GTAAAACAA

L.nudaDeoTGTCATTAATGGGCTT-AT-GCCTTTAAA-TTAATACAAGTTTCAACAAC
GGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAG

L.nudaPorTGTCATTAATGGGCTT-AT-GCCTTTAAA-TTAATACAAGTTTCAACAAC

GGATCTCTTGGCTCTTGCATCGATGAAG
L.irinaTGTCATTAATGGGCTTCATTGCCTTTAAAATTAATACAACCTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
L.sordidaTATTATTAATGGGCTTTAT-GCCTTTAAA-TTAATACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
L.nudaGyeGTCATTAATGGGCTT-AT-GCCTTTAAA-TTAATACAACCTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
L.nudaFraTGTCATTAATGGGCTT-AT-GCCTTTAAA-TTAATACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGCTCT-GCATCGATGAAG
L.nudaSwiTGTCATTAATGGGCTT-AT-GCCTTTAAA-TTAATACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGCTCT-GCATCGATGAAG
L2TGTTATTAATTGGCTCTAT-GCCTTTAAA-TTAATACAACCTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
L3TGTCAT-ACTTTGCTATA-----ATGCAAT-TATATACAACCTTTCAGCAACGGATC
TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
L5TGTCATTAATGGGCT-TAT-GCCTTTAAA-TTAATACAACCTTTCAACAACGGATC
TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
L1TGTCATTAATGGGCTT-AT-GCCTTTAAA-TTAATACAACCTTTCAACAACGGATC
TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
L4--ACA--AAT-----AAA-TCAA---AACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAA

L.nudaDeoAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGTTCC
ATCGAGAGGTGAATCTGGGAGGGCGGGAG
L.nudaPorAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATC-----GAATCTTTGAACGCA----
L.irinaAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
C-----GAATCTTTGAACGCA----
L.sordidaAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TC-----GAATCTTTGAACGCA----
L.nudaGyeAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATC-----GAATCTTTGAACGCA----
L.nudaFraAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATC-----GAATCTTTGAACGCA----

L.nudaSwiAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGTTTC
ATC-----GAATCTTTGAACGCA----
L2AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC--
-----GAATCTTTGAACGCA----
L3AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC--
-----GAATCTTTGAACGCA----
L5AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC--
-----GAATCTTTGAACGCA----
L1AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC--
-----GAATCTTTGAACGCA----
L4AACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC--
-----GAATCTTTGAACGCA----

L.nudaDeoCGCCTCGGCTCGTGTTATTCCGACGAGCACGCCTGTTTGAGTGTCCCC-CC
CTTCTCAACCTTTTCAGCTTTTACAAG
L.nudaPorCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-A
AATTCTCAACCTTTTCAGCTTTTACAAG
L.irinaCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-AAA
TTCTCAACCTTTCCAGTTTGTAATGA
L.sordidaCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTATTTGAGTGTCATT-AA
ATTCTCAACCTTTTCAGCTTTTGCAAG
L.nudaGyeCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-A
AATTCTCAACCTTTTCGGCTTTTACAAG
L.nudaFraCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-A
AATTCTCAACCTTTTCAGCTTTTACAAG
L.nudaSwiCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-A
AATTCTCAACCTTTTCAGCTTTTACAAG
L2CCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-AAATTC
TCAACCTTTTCAGCTTTTGCAAG
L3CCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTCTCATG-GAATTC
TCAACCT--TCAGCTTTATTGA-
L5CCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-AAATTC
TCAACCTTTTCAGCTTTTRCAAG
L1CCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATT-AAATTC
TCAACCTTTTCAGCTTTTACAAG
L4CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC

TCAAGCT---CAGCTTG-----

L.nudaDeoTTGGATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTTTGCAGGCTTCTC-AGAAGTCAG
CTCCTCTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L.nudaPorTTGAATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTTTGCAGGCTTCTC-AGAAGTCAG
CTCCTCTTAAATACATTAGCGGAACCTT

L.irinaACGGGTCAGGCTTGGATGTGGGGGTT---GCAGGCTTCTC-AGAAGTCAGCTC
CTCTTAAATACATTAGCAGTACCTT

L.sordidaTTGGATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTATTGCAGGCTTCTCTAGAAGTCGG
CTCCTCTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L.nudaGyeTTGGATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTTTGCAGGCTTCTC-AGAAGTCAG
CTCCTCTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L.nudaFraTTGAATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTTTGCAGGCTTCTC-AGAAGTCAG
CTCCTCTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L.nudaSwiTTGAATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTTTGCAGGCTTCTC-AGAAGTCAG
CTCCTCTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L2TTGGATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTATGCGGGCTTCTCTAGAAGTCGGCTCCT
CTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L3-TGAA---GGCTTGGACTTGGAGGTCG-TGCCGGCT-CTC--GTAGTCGGCTCCTCT
GAAATGCATTAGTGCGAACGT

L5TTGGATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTTTGCAGGCTTCTC-AGAAGTCAGCTCCT
CTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L1TTGGATT-GGCTTGGATGTGGAGGTTTTTGCAGGCTTCTC-AGAAGTCAGCTCCT
CTTAAATGCATTAGCGGAACCTT

L4----GTG----TTGGGACTCGCGGTA-----ACCCGCGTTCCCC--AAA
TCGATTGGCGGTCACGT

L.nudaDeoTGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAG
CAGCTATTATATGGGGTTCA-GCTTAAT

L.nudaPorTGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAG
CAGCTATTACATGGGGTTCA-GCTTC-T

L.irinaTGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAGCAGCT-
TTACATGGGGTTCA-GCTTC-T
L.sordidaTGTGGACCAGCT--TTTGGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAGCAGCTTTAACATGGGGTTCA-GCTTC-T
L.nudaGyeTGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAGCAGCTATTATATGGGGTTCA-GCTTC-T
L.nudaFraTGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAGCAGCTATTACATGGGGTTCA-GCTTC-T
L.nudaSwiTGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAGCAGCTATTACATGGGGTTCA-GCTTC-T
L2TGTGGACCAGCT--TTTGGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGGAAAGCAGCTTTTACATGGGGTTCA-GCTTC-T
L3T----ACCAGCCGCTTCAGCGTGATAATTATCTGCGCTGCTGT-GGAGGGTA--TTCTA----GTGTTACGCTTC-T
L5TGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAGCAGCTATTATATGGGGTTCA-GCTTC-T
L1TGTGGACCAGCT--TT-GGTGTGATAATTATCTACGCCATGGTTGTGAAGCAGCTATTATATGGGGTTCA-GCTTC-T
L4CG---A---GCTTCCATAGCGTAGTAATAATACACCTCGTTACTGGTAATCG-----
----TCGCGGCCACGC--CGT

L.nudaDeoAACAGTCCCATTGGACTTGGAACAATTCCTTGACATTTTGTACCCTCCAAATACCAGTGGTA-AGGGGAGC-----
L.nudaPorAACAGTCC-ATTG-ACTTGGA-CAATTC--TGACATTTTG-ACCT---CAAAAT-CAGGTAGGA-CTACCCGC-----
L.irinaAACAGTCC-ATTG-ACTTGGA-CAATTC--TGACATTTTG-ACCT---CAAAT-CAGGTAGGA-CTACCCGC-----
L.sordidaAACAGTCC-ATTG-ACTTGGA-CAAATTC--TGACATTTTGACCT---CAAAT-CAGGTAGGA-CTACCCGC-----
L.nudaGyeAACAGTCC-ATTG-ACTTGGA-CAAATTC-TTGACATTTTG-ACCT---CAAAT-CAGGTAGGA-CTACCCGC-----
L.nudaFraAACAGTCC-ATTG-ACTTGGA-CAATTC-T-GACATCTTG-ACCT---CAAAT-CAGGTAGGA-CTACGGGC-----
L.nudaSwiAACAGTCC-ATTG-ACTTGGA-CAATTC-CTGACAGGTTG-ACCT---CAAAT-CAGGTAGGAGCTAGCGGT-----
L2AACAGTCC-ATTG-ACTTGGA-CAAATTC--TGACATTTTGACCT---CAAAT-C

AGGTAGGA-CTACCCGCTGAAC
 L3AACCGTCT---T-----CGGACAAATTTTC--TGAACTCT--GAGCT---CAAAT-CAG
 GTAGGA-CTACCCGCTGAAC
 L5AACAGTCC-ATTG-ACTTGGACAATTTCT--TGACATTTT-GACCT---CAAAT-C
 AGGTAGGA-CTACCCGCTGAAC
 L1AACAGTCC-ATTG-ACTTGGGA-CAATTTTC-TTGACATTTTG-ACCT---CAAAT-C
 AGGTAGGA-CTACCCGCTGAAC
 L4AAAACCCC-----AACTTC--TGA-ATGTTG-ACCT---CGGAT-CAGGT
 AGGA-ATACCCGCTGAAC

L.nudaDeo -----
 L.nudaPor -----
 L.irina -----
 L.sordida -----
 L.nudaGye -----
 L.nudaFra -----
 L.nudaSwi -----
 L2 TTAAGCATATCA-TA-
 L3 TTAAGCATATCAATAA
 L5 TTAAGCATATCAATA-
 L1 TTAAGCATATCAATA-
 L4 TTAAGCATATC- ---