

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001038-01

보안과제(), 일반과제(●) 과제번호 108006-3

잣빛 만가닥버섯의 품종육성과 실용적 재배기술 개발
(Studies on breed and suitable cultivating system of
Lyophyllum decastes)

잣빛 만가닥버섯의 품종육성과 실용적 재배기술 개발(실용적
재배기술 개발/잣빛 만가닥버섯 신품종 육성)
(A study on the suitable cultivating system/breed)

허니버섯영농조합법인

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “젯빛 만가닥버섯의 품종육성과 실용적 재배기술 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “실용적 재배기술에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : 허니버섯
영농조합

주관연구책임자 : 이 대 진

세부연구책임자 : 이 대 진

연 구 원 : 이 병 의

연 구 원 : 권 미 성

연 구 원 : 이 원 재

연 구 원 : 장 주 원

연 구 원 : 홍 윤 표

협동연구기관명 : 단국대학교

협동연구책임자 : 황 철 호

요 약 문

I. 제 목

갯빛 만가닥버섯의 품종육성과 실용적 재배기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

버섯은 삼국시대에도 식용된 근거가 있으며, 오랫동안 동서양에서 약용 및 식품소재로 사용되고 있는 주요한 자원이다. 송로버섯(*Rhizopogon rubescens* Tul.) 같이 일반인의 상상을 초월한 고가의 버섯이 최고급 음식재료로 사용되고 있는가 하면, 우리에게 친숙한 일반 식용버섯들은 저렴한 가격으로 우리의 식탁에 오르기도 한다. 이러한 버섯의 가장 큰 특징은 독특한 향과 뛰어난 식감을 가지고 있으며 영양학적으로는 칼로리는 거의 없어도 오히려 β -glucan 등 건강에도 매우 유의한 성분과 식이섬유도 풍부하여 영양과잉으로 각종 성인병이 문제가 되는 현대인에게는 특히 중요한 식품이다. 이러한 식품적 특성으로 볼 때 일반적으로는 소득수준이 높을수록 비례하여 버섯의 소비량도 증가한다. 그러나 한국은 이러한 현상에 대하여 상대적으로 버섯의 소비가 매우 적은 편이다.

또한 생산, 소비되는 버섯의 종류도 이웃의 일본이나 중국에 비하여도 적은 편이다. 현재 국내에서 식용으로 소비되는 버섯은 오랫동안 애용되어온 표고, 느타리, 양송이와 90년대 이후 주요 버섯으로 자리 잡은 팽이, 새송이버섯과 그 외 제철마다 자연산 송이, 능이, 싸리버섯 등이 있으며, 이들 버섯의 소비는 년 중 일정한 소비 형태를 보여주지 않고 계절별 특성이나 명절 전후에 따라 큰 차이를 보이고 있다. 최근에는 외국의 여행이 잦아지고 각종 언론에서도 건강에 대한 관심으로 버섯에 대한 국민의 관심이 높아지고 있어서 소비자층에 따른 다양한 요구에 따라 여러 가지 버섯의 재배가 이루어지고 있지만 아직까지는 기존의 버섯에 비하여 소

비도 매우 적고 따라서 생산도 미미한 현실이다. 하지만 생활수준의 향상 및 다양한 소비자 계층에 따른 기호에 부합하기 위해서는 지속적으로 신품목의 도입이 필요하다.

잣빛 만가닥버섯은 식감이 좋고, 버섯 특유의 밀가루 냄새를 가지고 있어 요즘 젊은 층에게도 거부감이 없는 식용버섯으로 그동안 인공재배에 대한 연구가 이루어졌지만 재배과정상 복토를 해야하는 번거로움이 있어서 대량재배에 어려움이 많고, 버섯 배지로서 수피(bark)를 사용해야 하는데 수피 가격은 일반 톱밥보다도 4~5 정도 고가이기 때문에 다른 버섯에 비하여 생산원가는 높고 소비시장은 형성되지 않아서 아직 한국에서는 경제적으로 인공재배 하지 않고 있는 품목이다. 그러나 최근 들어서 잣빛 만가닥버섯은 식용버섯 임에도 불구하고 뛰어난 기능성을 가지고 있어서 일본에서는 매우 주목을 받고 있으며, 제품으로도 개발되어 백화점에서 판매가 되고 있다. 특히 잣빛 만가닥버섯의 기능성은 일반적인 항암 활성뿐만 아니라 2형 당뇨병과 아토피에도 효과가 있는 연구결과가 보고되어 있어서 대표적인 성인병인 2형 당뇨병과 요즘 어린이의 30 ~ 40%가 겪고 있는 아토피로 남녀노소 누구에게나 유익하고 필요한 식품이다.

따라서 본 연구의 목적은, 재배과정에서 번거로운 복토를 하지 않고 고가의 수피(bark) 사용 없이 현실적으로 잣빛 만가닥버섯을 재배하는 재배법과 이를 위해 재배가 용이한 품종을 개량하여 최종적으로 재배농가에는 신규 고소득 품종을 도입하고, 소비자는 보다 우수한 기능성을 갖춘 버섯을 섭취함으로써 건강에도 기여 할 것으로 기대되며, 이러한 버섯의 기능성은 다른 버섯의 소비를 촉진시키며, 현재 집중된 소품종 재배에서 안정화된 재배 환경을 이룰 수 있을 것으로 기대한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

기능성이 뛰어나고 맛이 좋은 잣빛 만가닥버섯의 재배조건을 개선하여 현실적으로 손쉽게 재배하는 재배법과 이를 위한 적합한 품종을 개발하고자 하였다. 국내에서 재배조건을 안정화시키기 위한 새로운 잣빛 만가닥버섯 재배법을 개발하고자 하였다. 이를 위해 동시에 손쉽게 재배할 수 있는 버섯 품종 개량도 동시에 진행하였다. 버섯 품종은 국내외에서 수집한 5종(국내 4종, 일본 현지 1종)의 버섯의 활성을 검정하여 최종 국내수집 1종, 국외(일본) 1종을 선정하였다.

본 연구에서는 선발한 국내외 품종을 변이체 유도 법으로 변이체 17종을 만들고 재배과정을

거쳐 재배가 용이한 2종(충북대 변이종 C9, 일본 나가노 변이종 J4)의 품종을 선별하였다. 선별된 품종을 다시 재배과정을 거쳐 주배지(톱밥)을 선정하여, 2차 영양원의 종류 및 함량을 결정하여 최종적으로 복토와 수피(bark) 사용이 없이 재배가 가능한 잣빛 만가닥버섯 배지조성을 완료하였다.

IV. 연구개발결과

국내에서 아직 대량 인공재배가 이루어지지 않고 있는 잣빛 만가닥버섯의 인공재배를 위하여 복토와 수피(bark) 사용이 없이 현실적으로 인공재배를 할 수 있는 재배법에 대한 연구를 하였다.

수집된 균주의 활성을 검정하여 활성이 좋은 품종을 선정하였으며, 선정된 품종은 변이체 유도 법으로 17종의 변이체(충북대 변이종 9종, 일본 변이종 8종)를 개발하였다.

변이체는 반복적인 재배시험을 통하여 우수한 품종 2종(충북대 변이종 C9, 일본 변이종 J4)을 최종 선정하였다.

선정된 2종의 품종은 복토와 수피(bark) 사용 없는 배지실험과 영양원 시험 등을 거치며 최종적으로 복토와 수피(bark) 사용 없이 가능한 재배방법을 확립하며 동시에 재배에 용이한 품종개량 2종을 선별하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

국내외에서 수집한 잣빛 만가닥버섯의 활성을 검정하며, 복토와 수피(bark)의 사용 없이 재배가 용이한 변이체 유도를 통한 품종개량에 대한 자료를 확보하였다. 버섯 균사체의 pH 조건을 검토하고, 시중에서 손쉽게 이용할 수 있는 톱밥에 대한 배양조건을 시험하고, 적절한 톱밥에 유효한 영양원의 종류 및 비율에 대한 시험을 실시하였다. 이들에 대한 시험 결과 최종적으로 복토와 수피(bark)의 사용이 없이 잣빛 만가닥버섯의 대량 재배가 가능하고, 이에 적합한 균주를 개발하는 연구 성과를 얻었다. 이를 통해 앞으로 일선 재배농가에서 손쉽게 잣빛 만가닥버섯의 재배가 가능하다고 기대된다.

1. 국내 4종, 일본 1종 등 5종의 균주 수집하여 균주별 균사배양 및 재배시험을 통해 활성이 좋은 국내 1종(충북대 1종), 일본 1종(나가노 1종) 등 총 2개 균주를 선발하였다.

2. 선발된 2개 균주(충북대 1종, 일본 1종)는 품종을 개발하기 위한 변이체 형성 및 선발을 위해 국내 및 일본으로부터 동정한 잣빛 만가닥버섯의 원형질체를 생산 및 mutagens(4NQO) 처리하여 돌연변이 유도 균주 17계통을 분리하였다. 이러한 균주는 현장에서 재배시험을 통하여 최종 2종을 선정하였다.

3. 품종 선발을 위한 재배조건 다양화시험을 위해 변이육종에 의해 개발된 균주에 대한 적정 pH 시험, 광원조건, 재배사 조건시험을 실시하였다. 적정 pH는 5.0에서 가장 활력있는 성장을 보여 주었으며, 광원과 습도 등 재배사 조건은 만가닥버섯과 유사한 환경이 적합한 것으로 확인되었다.

4. 기존 주배지 재료인 복토재배와 수피(bark) 퇴비의 문제점을 확인하고, 주재료 선발 및 복토공정을 생략한 실용적 재배 가능성 확보를 위한 시험을 수행하고 개선방향을 설정하였다.

5. 기존 품종과 육성 품종의 유전적 차별성을 검증하기 위해 변이체 RAPD 분석 시험으로 기존 품종과 다른 유전적 차별성을 검증하였다. wild type에는 있지만 변이체에는 없는 밴드, wild type에는 없지만 변이체에는 있는 밴드, wild type에도 있으나 변이체에서는 증폭되는 밴드를 비교한 RAPD 분석결과로 기존 품종과의 차별성을 확인하였다.

6. 적정 영양원 종류와 배합비율 시험을 위해 밀강, 밀기울, 면실박의 종류 및 함량에 대한 현장 재배시험을 실시하였다. 시험 결과 톱밥은 발효미송톱밥이 가장 우수하였으며, 영양원으로는 밀기울이 적절하였다. 비율로는 발효미송톱밥 71%, 밀기울은 29% 이었다.

7. 새송이버섯 돌연변이 유도방법을 적용하여 생존 원형질체를 획득하여 최적의 원형질체 생산을 위한 잣빛 만가닥버섯의 균사체 양과 배양시기 등을 조건을 변경하여 선행연구에서 획득한 변이체 연구 기술에 대한 안정성을 확보하였다. 변이체 유도 시험법은 2주 배양된 균사

체를 분쇄하여 원형질체를 분리하고 4NQO(4-nitroquinoline 1-oxide) 처리하고 재생된 균사를 PDA 사면배지로 옮기고 colony에 번호를 부여하는 방식으로 진행하였다.

8. Data base로서 활용이 가능하도록 연구초기 단계에서부터 원형질체 분리 효율 및 NQO 처리 농도 등에 따른 돌연변이 유도율 등의 상관관계를 데이터화하였다. NQO 처리농도는 0.5 ug/ml와 1.0 ug/ml이었으며, 처리시간은 각각 20분과 40분으로 농도별, 처리시간별로 시험하였다.

9. 2개 품종(충북대 변이종 C9, 일본 나가노 변이종 J4)에 대해서는 품종등록을 위한 안정성 확보로서 대량 재배시험을 통한 반복재배가 진행 중이다. 대량재배 시에는 영양원으로 미강과 면실피를 각 2.5%, 총 영양제의 비율을 5% 추가하는 것이 배양에 좋은 결과를 가져왔으며, 1차 배양 후 후숙을 충분히 시켜 줌으로서 자실체의 형성에 도움이 되었다. 후숙 기간을 포함한 적정 배양온도 24℃에서 배양기간은 60일 이었으며, 균 굵기 후 발이까지는 10일이 소요되었으며 자실체 수확까지의 최종 재배기간이 평균 77일 이었다.

이상의 결과를 바탕으로 안정적인 재배 방식 및 품종에 대한 자료로 기존 버섯재배 농가에 대해 시범적으로 기술이전을 실시하고, 기술의 보급이 확대되면 현실적으로 재배가 가능한 잣빛 만가닥버섯의 보급이 가능해져 신규 시장의 형성이 가능해지고, 버섯 농가의 소득증대와 다양한 소비계층에 대한 좋은 버섯을 공급함으로써 국민 건강 및 장기적으로 종자 독립에도 기여할 것으로 기대한다. 특히 잣빛 만가닥버섯의 기능성은 2형 당뇨와 아토피에도 효과가 보고되어 현대인의 남녀노소 어느 계층에도 필요한 버섯으로 버섯의 새로운 소비촉진은 잣빛 만가닥버섯이 매우 효과적일 것으로 기대된다.

SUMMARY

The mushroom of Agaricales is biologically classified species of *Lyophyllum decastes*(Fr.:Fr.)Sing in the Trichlomataceae family. It is cultivated in the northern hemisphere including Korea, China, and Japan. The mushroom's cup is approximately 4 to 9cm and its stem is 5 to 10cm long. It is very delicious due to its unique wheat flour taste and has functional effects against cancer, atopic dermatitis, hypertension, and type II diabetes. Even though there are currently three kind breeds of the mushroom in Japan, they are not easy to cultivate because they require expensive bark of a tree and soil covering. Many mushroom producers have studied the artificial cultivation of Agricales; however, it is more complicated to cultivate compared to other mushroom species. Therefore, cultivation of Agaricales requires lots of time and money. Because of these issues, few Korean farmers cultivate *Lyophyllum decastes*.

Objectives:

There are four objectives in this study:

1. To determine what is the best strain and optimized environmental conditions for growing *Lyophyllum decastes*;
2. To develop artificial cultivation of *Lyophyllum decastes* using fermented pine sawdust and wheat bran;
3. To develop a simpler and more efficient cultivation process (or method) by crushed and separated protoplast;
4. To improve the cultivation method of obtaining spores from reproduced fungi on mutant mycelium by treatment of 4NQO.

Results and applications:

We searched and reviewed articles for activities of *Lyophyllum decastes* from domestic and international journals to relate the cultivation of the mushroom using a developed species through mutated fungi without the bark of a tree and soil-covering. Based on the references, we modified and studied pH ranges and incubation conditions of mutant fungi using regular sawdust with the proper ratio of effective ingredients for the cultivation of the mushroom. Finally, we obtained good results for the cultivation of *Lyophyllum decastes* by utilizing the developed mutant fungi. The result shows that it is possible to cultivate large quantities of the mushroom without the bark of a tree and/or soil-covering. The main advantages of the developed cultivation method for *Lyophyllum decastes* are simpler cultivation and a reduction of time and cost.

1. For incubation test of strains, we tested 4 different domestic species of strain and 1 species of strain from Japan for incubation and cultivation of *Lyophyllum decastes* in order to determine the best activities of strain. We selected each species of strain from Korea and Japan after testing.

2. For selection of strains, in order to develop or improve quality of the mushroom using two species of strain from step #1, we tested mutant fungi to *Lyophyllum decastes* and identified protoplasm of *Lyophyllum decastes* in Korea and Japan. After we separated 17 different mutant induced fungi by treatment of mutagens (4NQO), we selected efficient two species of fungi by cultivation test.

3. In order to select the best fungus, we tested various experiments of pH, conditions of light source, and cultivation of the mushroom. The best activity for the selected fungi of *Lyophyllum decastes* was shown at pH 5.0. Also the best conditions of light and cultivation were similar to traditional conditions for the *Lyophyllum ulmarium*(Bull.:Fr.)Kuhn.

4. After determining the problems of traditional cultivation method of mushroom with the bark of a tree and soil covering, we established to improve cultivation process of the mushroom without the bark of a tree and soil covering in a field.

5. We conducted a mutant RAPD analysis to verify of genetic differences between traditional and developed plant breeds. The results from the RAPD analysis were shown to determine genetic differences between samples. For examples, 1. A band detected from wild type, but it did not detect from mutant, 2. A band detected from mutant, but it did not detect from wild type, 3. A band detected both samples, but it was detected bigger band area at mutant than wild type.

6. For tests of proper nutritional ingredients and mixing ratio, we tested cultivation of mushroom with various kinds and weights of rice bran, wheat bran, and cotton-seed meal. From the results, fermented Oregon pine sawdust and wheat bran are the best materials for cultivation of the mushroom. The ratio of mixture is 71% fermented Oregon pine sawdust and 29% wheat bran.

7. Applying the mutant induced method of pine mushroom to our experiment, we obtained the best existing protoplast for *Lyophyllum decastes* according to pervious steps #1 through #6. Also we obtained stability of mutant technology by experimenting with different amounts of fungus, different cultivating time, and other conditions for growing *Lyophyllum decastes*. The procedure of mutant induced method was: 1. Crush mycelium that was incubated for 2 weeks; 2. Separate protoplast from the mycelium; 3. Reproduce mycelium after treating 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide); 4. Place the reproduced mycelium to PDA slant medium and number on colony.

8. We entered all of the data into the database. The concentrations and treatment times of 4NQO for testing were 0.5 µg/ml (ppm) and 1.0 µg/mL (ppm) and 20 min and 40 min, respectively.

9. In order to register our new cultivation method using selected best two species,

we are still investigating and cultivating for stability and large quantity of cultivation for the species in a field. For large quantity of cultivation, when we used 2.5% of each rice bran and cotton-seed meal for ingredients, respectively, we obtained better cultivation results of the mushroom. Also it required enough time of after-ripening of the species for helping development of spores. Usually cultivating period is 60 days including after-ripening time and took 10 more days for germination after scraping the fungus. The total cultivation time is required around 77 days from incubation of strains to harvest of the mushroom.

Overall conclusions:

From the results, we first will demonstrate and transfer our new cultivation method of *Lyopyllum decastes* by a mutant fungus that is better stabilized for growing the mushroom to some of volunteer mushroom farmers. If it is successful in producing better quality mushrooms in short time periods, we will extend our new method to most mushroom farms. Eventually it will allow bigger market of *Lyopyllum decastes*, and will increase incomes of mushroom farmers. In addition, it will be improved and established national health promotion to provide good quality mushroom to consumers. It also will provide our unique seed of *Lyopyllum decastes* in the future. Finally, it was reported that the functional effects of *Lyopyllum decastes* are very efficient for atopic dermatitis, and type II diabetes mellitus. Therefore, we expect that most people will like to eat mushroom (*Lyopyllum decastes*) in the future because of its high qualities of taste and high functional effects for health.

CONTENTS

Chapter 1	Synopsis of research and development subject	13
Chapter 2	Domestic and foreign technical development present condition.	15
Chapter 3	Research and development accomplishment contents and result.	17
Chapter 4	Coherence in attainment of objective and relation field.	40
Chapter 5	Research and development result and result application plan.	47
Chapter 6	The overseas scientific and technical information which collects from research and development process.	50
Chapter 7	Reference.	53

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	17
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	40
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	47
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	50
제 7 장	참고문헌	53

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

버섯은 삼국시대에도 식용된 근거가 있으며, 오랫동안 동서양에서 약용 및 식품소재로 사용되고 있는 주요한 자원이다. 송로버섯(*Rhizopogon rubescens* Tul.) 같이 일반인의 상상을 초월한 고가의 버섯이 최고급 음식재료로 사용되고 있는가 하면, 우리에게 친숙한 일반 식용버섯들은 저렴한 가격으로 우리의 식탁에 오르기도 한다. 이러한 버섯의 가장 큰 특징은 독특한 향과 뛰어난 식감을 가지고 있으며 영양학적으로는 칼로리는 거의 없어도 오히려 β -glucan 등 건강에도 매우 유익한 성분과 식이섬유도 풍부하여 영양과잉으로 각종 성인병이 문제가 되는 현대인에게는 특히 중요한 식품이다. 이러한 식품적 특성으로 볼 때 일반적으로는 소득수준이 높을수록 비례하여 버섯의 소비량도 증가한다. 그러나 한국은 이러한 현상에 대하여 상대적으로 버섯의 소비가 매우 적은 편이다.

또한 생산, 소비되는 버섯의 종류도 이웃의 일본이나 중국에 비하여도 적은 편이다. 현재 국내에서 식용으로 소비되는 버섯은 오랫동안 애용되어온 표고, 느타리, 양송이와 90년대 이후 주요 버섯으로 자리 잡은 팽이, 새송이버섯과 그 외 제철마다 자연산 송이, 능이, 싸리버섯 등이 있으며, 이들 버섯의 소비는 년 중 일정한 소비 형태를 보여주지 않고 계절별 특성이나 명절 전후에 따라 큰 차이를 보이고 있다. 최근에는 외국의 여행이 잦아지고 각종 언론에서도 건강에 대한 관심으로 버섯에 대한 국민의 관심이 높아지고 있어서 소비자층에 따른 다양한 요구에 따라 여러 가지 버섯의 재배가 이루어지고 있지만 아직까지는 기존의 버섯에 비하여 소비도 매우 적고 따라서 생산도 미미한 현실이다. 하지만 생활수준의 향상 및 다양한 소비자 계층에 따른 기호에 부합하기 위해서는 지속적으로 신제품의 도입이 필요하다.

젯빛 만가닥버섯은 식감이 좋고, 버섯 특유의 밀가루 냄새를 가지고 있어 요즘 젊은 층에게도 거부감이 없는 식용버섯으로 한동안 인공재배에 대한 연구가 이루어졌지만 재배과정상 복토를 해야 하는 번거로움이 있어서 대량재배에 어려움이 많고, 버섯 배지로서 수피(bark)를 사용해야 하는데 수피(bark) 가격은 일반 톱밥보다도 4~5 정도 고가이기 때문에 다른 버섯에 비하여 생산원가는 높고 소비시장은 형성되지 않아서 아직 한국에서는 경제적으로 인공재배하지 않고 있는 품목이다. 그러나 최근 들어서 젯빛 만가닥버섯은 식용버섯 임에도 불구하고 뛰

어난 가능성을 가지고 있어서 일본에서는 매우 주목을 받고 있으며, 제품으로도 개발되어 백화점에서도 판매가 되고 있다. 특히 잣빛 만가닥버섯의 기능성은 일반적인 항암 활성뿐만 아니라 2형 당뇨와 아토피에도 효과가 있는 연구결과가 보고되어 있어서 대표적인 성인병인 2형 당뇨와 요즘 어린이의 30 ~ 40%가 겪고 있는 아토피로 남녀노소 누구에게나 유익하고 필요한 식품이다.

따라서 본 연구의 목적은, 재배과정에서 번거로운 복토를 하지 않고 고가의 수피(bark) 사용이 없이 현실적으로 잣빛 만가닥버섯을 재배하는 재배법과 이를 위해 재배가 용이한 품종을 개량하여 최종적으로 재배농가에는 신규 고소득 품종을 도입하고, 소비자는 보다 우수한 기능성을 갖춘 버섯을 섭취함으로써 건강에도 기여 할 것으로 기대되며, 이러한 버섯의 기능성은 다른 버섯의 소비를 촉진시키며, 현재 집중된 소품종 재배에서 안정화된 재배 환경을 이룰 수 있을 것으로 기대한다.

제 2 절 연구개발의 범위

기능성이 뛰어나고 맛이 좋은 잣빛 만가닥버섯의 재배조건을 개선하여 현실적으로 손쉽게 재배하는 재배법과 이를 위한 적합한 품종을 개발하고자 하였다. 국내에서 재배조건을 안정화시키기 위한 새로운 잣빛 만가닥버섯 재배법을 개발하고자 하였다. 이를 위해 동시에 손쉽게 재배할 수 있는 버섯 품종 개량도 동시에 진행하였다. 버섯 품종은 국내외에서 수집한 5종의 버섯의 활성을 검정하여 최종 국내 1종(충북대), 국외(일본 나가노) 1종을 선정하였다.

본 연구에서는 선발한 국내외 품종을 변이체 유도 법으로 변이체 17종을 만들고 재배과정을 거쳐 재배가 용이한 2종의 품종을 선별하였다. 선별된 품종을 다시 재배과정을 거쳐 주배지(톱밥)를 선정하여, 2차 영양원의 종류 및 함량을 결정하여 최종적으로 복토와 수피(bark) 사용 없이 재배가 가능한 잣빛 만가닥버섯 배지조성을 완료하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 국내 관련분야에 대한 기술개발현황

젯빛 만가닥버섯에 대한 국내에서의 관심이 높아지고 있어 최근에는 많은 연구가 이루어지며 특허 및 논문도 연이어 보고되고 있다. 국내에서의 기술개발현황에서 보면 2009년도 균주의 계통학적 연구를 통해 RAPD 분석으로 종속간 유연관계 및 종의 다양성에 대한 분석연구가 보고되었으며, 인공재배에 관한 연구로는 1994년 처음 인공재배에 대한 논문이 발표된 이래 2007년 경북전문대학 산학협력단에서 젯빛 만가닥버섯 재배용 배지 및 이를 이용한 젯빛 만가닥버섯의 재배방법이 특허 등록되었다. 그러나 특허의 내용상 참나무피, 포플러톱밥, 미송톱밥, 폐톱밥, 소나무피, 낙엽부식, 수피부식 및 부엽토를 포함하여 구성되는 배지혼합물에 발효첨가제로서 미강(쌀겨)을 부가하여 호기성 발효시킨 혼합 배지조성물임을 특징으로 하는, 젯빛 만가닥버섯 재배용 배지조성물로 다양한 재료를 사용할 수 있으나 가장 큰 단점으로는 복토와 값비싼 수피(bark)를 사용하는 점이다. 우성미 등에 의해 2009년에 보고된 재배법에 대한 연구에서는 최적배지로 발효톱밥을 사용한 참나무톱밥과 포플러톱밥, 영양원으로 미강과 밀기울을 사용한 배지로서 원재료에 대한 가격을 낮췄으나 복토를 해야 하는 번거로움이 남아있다. 이상과 같이 젯빛 만가닥버섯은 새로운 소득원 품목으로서 여러 기관에서 다양한 연구시험을 하고 있어 앞으로 국내에서의 젯빛 만가닥버섯에 대한 좋은 연구결과가 보고될 것으로 기대한다.

2. 국외 관련분야에 대한 기술개발현황

일본에서는 1992년 왕자제지 임림자원연구소(건강산업신문 : 2007년 2월 21일 제 1187호)에서 다년간의 연구결과 대량재배에 성공한 뒤 현재 11개 품종(일본의 버섯 연구 및 재배동향 : 나카무라 키미요시)이 개발되어 사용되고 있으며, 시장의 흐름은 왕자제지가 기능성에 대해 장기적이고 집중적인 투자로 시장을 주도하고 있으며, 바이오다카라는 유럽산을 도입하여 보급하며 동경 등 대도시의 마트에서도 손쉽게 접할 수 있다. 그 밖에 기녹스 종균회사는 재배농가와

계약을 맺고 육종한 품종 및 재료를 공급하며 시장을 형성하고 있다. 전반적으로는 현재 일본에서도 잿빛 만가닥에 대해서는 재배기술에 대한 보완이 철저하며, 외부인에게는 특별한 경우를 제외하고는 공개하지 않고 있다. 왕자제지는 관련된 특허가 20개가 넘으면 10년이 넘는 연구기간동안 다양한 생리활성에 대한 연구개발로 기능식품으로도 개발하여 백화점등 매장에서도 판매하고 있다. 또한 기능성 자체가 일반적인 항암에서 간기능 장애, 2형 당뇨병, 아토피치료 및 방사선에 대한 예방효과도 보고되어 있어서 지난 3월 발생한 일본의 방사선 오염에 더불어 수요도 크게 증가할 것으로 예상된다. 일본에서의 기술개발현황을 보면 재배 방식과 더불어 품종 육종에 대한 연구가 많이 이루어져 있는 것이 특징이라 볼 수 있으며, 이제는 기능성 연구 방향으로 확대되어 전반적으로 국내의 기술개발현황보다 앞선 것으로 볼 수 있다. 그러나 아직까지도 일본에서도 재배가 다른 버섯에 비하여 까다롭기 때문에 아직 많은 농장에서 재배하고 있지는 않으나 앞으로의 전망 때문에 많은 농장에서 관심을 가지고 있어 한국도 기술개발에 적극 투자하면 새송이버섯의 경우처럼 일본보다 늦게 시작하였으나 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1년차 연구개발수행 내용 및 결과

1. 실용적 재배기술 개발

가. 잿빛 만가닥버섯 균주 수집 및 수집균주별 재배 특성조사

(1) 인천대학교 버섯균주 및 DNA은행에서 4종, 일본 나가노에서 1종 균주의 수집

잿빛 만가닥버섯의 실용적 재배기술 개발을 위한 첫 단계로서 국내 시중에서는 유통중인 버섯의 수집이 불가하여 균주를 수집하였다. 국내에서는 다양한 연구기관에서 버섯 균주를 보관하고 있으나 본 실험에서는 버섯균주은행에서 분양받았다. 또한 일본 현지를 방문하여 잿빛 만가닥버섯 재배 시설을 견학하고 유통시장을 방문하여 계대배양에 사용하고자 버섯 시료를 수집하였다.

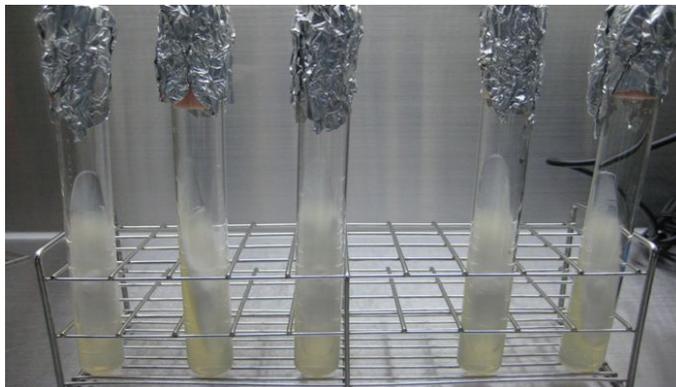


Fig. 1 Subculture of collectioned strains.

(2) 수집한 균주는 균사를 배양하여 배양활성 정도를 측정하고 계대배양을 통하여 균주를 관리하였다. 또한 배지를 통한 배양 활성정도를 측정하며 재배 실험을 통하여 재배 특성을 조사하고, 최종적으로 국내 수집 1종(충북대 균주)과 일본 수집 1종(나가노 균주) 등 총 2개 균주를 선발하였으며, 이들을 통해 품종을 개량하고자 하였다.



Fig. Selected 2 strains mycelia.

(3) 수집 균주별 재배적 특성조사

수집된 균주별 재배 특성조사 실험은 다음과 같은 조건에서 실험하였다.

① 시험구 : 2(품종별) × 4(배지별) × (복토별) = 총 16구

② 품종별 : A구(자연종) × B구(개발종)

③ 배지별 :

a구 : 수피퇴비(80%) + 영양원(20%)

b구 : 후숙미송톱밥(80%) + 영양원(20%)

c구 : 후숙미송톱밥(40%) + 활엽톱밥(40%) + 영양원(20%)

d구 : 활엽톱밥(80%) + 영양원(20%)

④ 복토별 : 복토균, 비복토균

*복토는 45~50일간 배양 후 균류기 단계에서 노화한 접종원을 제거하고 공극률 70~80% 이상으로 공기의 흐름이 원활하고 보습력이 양호한 낙엽부식질(70%)과 마사토(30%)를 혼합하여 2 cm 정도 덮었으며, 일주일 후 제거하였다.

재배시험 결과 수집된 자연종보다는 개발종들이 전반적으로 우수하였다. 이는 자연종의 경우 개발종보다 개대배양을 거치며 비교적 활력이 떨어진 것으로 판단된다.

Table. 1. Cultivation state of wild type and mutant type

시험구별	배양상태	발이상태	생육상태	수확량	복토상태
Aa	6	6	6	4	○
Ab	2	2	2	2	×
Ac	2	2	2	2	×
Ad	0	0	0	0	×
Ba	6	6	6	6	○
Bb	4	6	6	4	○
Bc	4	4	4	2	×
Bd	0	0	0	0	×

* 매우불량 = 0, 불량 = 2, 보통 = 4, 양호 = 6, 매우 양호 = 8

* 복토상태 : 복토해야만 발생 = O, 복토해도 발생안함 = ×

나. 기존 재배방식의 문제점 및 개선사항 점검

(1) 기존 주배지 재료인 수피(bark)와 복토재배의 문제점을 확인하고, 주재료 선발 및 복토공정을 생략한 실용적 재배 가능성 확보를 위한 실험 수행

국내에서 연구되어진 특허 및 문헌을 통해 잣빛 만가닥버섯의 재배법을 검토한 결과 공통적으로 복토와 값비싼 수피(bark)를 사용하였다. 잣빛 만가닥버섯 재배에서 복토와 수피를 사용하는 하는 가장 큰 목적은 복토로 버섯 발생을 유도하고 온습도를 유지시켜주는 역할을 하며 충분히 부식된 수피는 잣빛 만가닥버섯의 자연 발생 조건에 적합하므로 그동안 인공재배는 자연 재배조건에 부합된 조건으로 재배하였다. 그러나 일부 선행 연구결과에서는 발효 톱밥을 사용하여 좋은 결과를 얻었으며, 연구 성과에 따라서 영양원 및 배양조건에 대한 개선사항도 보고되었다. 본 연구팀에서는 잣빛 만가닥버섯의 인공재배에 대한 근본적인 개념을 복토와 수피(bark)를 사용하지 않는 재배법을 개발하고자 하였으므로 국내의 재배방법과 일본의 재배 방법을 비교 분석하였다. 분석결과 재배 방법과 균주의 특성, 고습에 따른 오염원등의 원인을 파악하였다.



Fig. 3 Cultivation mushroom bottle.

2. 변이체 유도에 의한 잣빛 만가닥버섯 신품종 개발

가. 품종을 개발하기 위한 변이체 형성 및 선발

버섯의 품종 개량에는 대표적으로 선발육종, 교잡육종법, 자연돌연변이 육종법, 이식유전자 육종법 외에 균사로부터 분리된 원형질을 이용하여 새로운 계통을 생성하는 방법과 돌연변이원을 이용한 육종법이 있다 (Leifa 등, 2006).

원형질체를 이용한 육종은 1965년에 달팽이소화액추출물을 이용하여 구름버섯에서 처음으로 원형질체 분리가 이루어졌고 이후 교배가 어려웠던 종간의 교배로 유용한 균주를 만들기 위한 육종법으로 이용되었다 (Choi 등, 2003). 원형질체 분리 요인으로는 세포벽을 효과적으로 분해시킬 수 있는 분해효소의 종류와 농도, 반응시간 및 온도, 원형질체의 삼투압 안정성을 유지시키는 삼투압 조절제의 농도, 균사 배양 시간 및 pH 등이 있다 (Choi 등, 2003). 잣빛만가닥 버섯의 원형질체 분리 요인에는 효소로 Novoym234를 10mg/ml의 농도로 4시간처리하고 삼투압 조절제로 0.6M MgSO₄와 5일 액체 배양한 균사체가 적합하였다 (Bok 등, 1994).

돌연변이 육종법은 방사선이나 방사능물질, 화학약품과 같은 돌연변이원으로 인위적인 유전자의 변화를 유발하는 육종법으로 어떤 성분 함량을 증가시키거나 유전자의 변화로 목적에 부합되는 균주를 육성하는 방법이다. 화학적 돌연변이원에는 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO), N-methy-N-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG), ethyl methanesulfonate(EMS) 등이 있고 원형질체를 이용한 변이체 유도시 4-NQO가 사용 후 폐기처분 시 편리하고 안전하여 쉽게 이용할 수 있다 (Bal 등, 1977). 4-NQO는 UV 유사 작용제로써 GC에 선택적으로 작용하여 AT로 전이 시키거나 TA나

CG로 염기전환을 일으킨다 (Prakash., 1974; Wu 등., 2006).

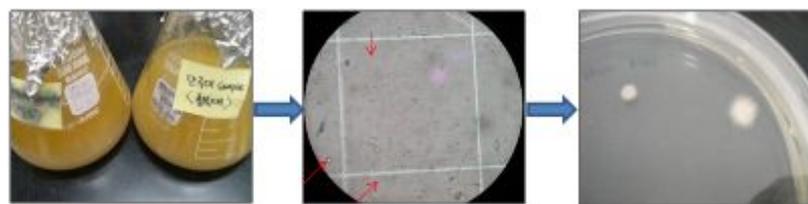
Ballance와 Turner 등 (1985)은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 4-NQO처리를 통해 protoplast로부터 버섯 재분화율을 확인하였다. NQO처리를 통해 돌연변이체를 만들었다고 보고하고 있다.

이에 본 연구에서는 국내(C) 및 일본(J)으로부터 잣빛 만가닥버섯의 원형질체 생산 및 mutagens(4-NQO)처리로 돌연변이 유도 균주 (국내C series 9종), (일본 J series 8종) 17종을 계통 분리하였다.

Table. 2 Protoplast Regeneration(%)

Code	Treatment condition	Treatment time(min)	Regeneration (%)
J-001	4NQO-1.0 $\mu\text{g/ml}$	20	0.0065
		40	0.026
	4NQO-0.5 $\mu\text{g/ml}$	20	0.0043
		40	0.0173
	NT		0.1603
K-001	4NQO-1.0 $\mu\text{g/ml}$	20	0.0099
		40	0.0321
	4NQO-0.1 $\mu\text{g/ml}$	20	0.0099
		40	0.0123
			0.0962

* regeneration percent = (regeneration hypha yield/Protoplast yield) \times 100



A. Mycelium, B. Protoplasts separation and NQO treatment
C. Regenerated hyphae.

Fig. 4. Mutant hyphae colony processing method from mycelium.

나. 선행연구에서 획득한 변이체 연구 기술에 대한 안정성 확보

(1) 원형질체를 분리 및 재생시험

본 연구팀에서는 공시된 방법에 의하여 새송이버섯 돌연변이 유도방법을 적용하여 생존 젓빛 만가닥버섯으로부터 원형질체를 획득하는 실험을 진행하였다.

균사체(충북대, 일본 나가노 군주)는 2~3주간 대두박액체배지(KH_2PO_4 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, 황설탕 20 g/L, 대두박 3 g/L, 안티폼 20 μL /L)에서 배양하였다. 배지와 균사체를 분리하기 위하여 교반기를 이용하여 파쇄하고 50 ml 시험관으로 옮겨 800 RCF에서 5분 동안 원심분리 후 상등액을 제거하고 균사체를 얻었다. 균사체를 세척하기 위하여 멸균수로 재현탁 하였고 원심분리했다. 이를 2회 반복한다. 원형질체 분리 용액은 0.6 M MgSO_4 에 lysing enzyme 10 mg/ml 농도로 사용 하였다. 세척이 끝난 균사체에 원형질체 분리 용액을 pellet의 두배 volume으로 넣고 28°C 암상태에서 4시간 동안 120 rpm으로 흔들며 배양한 후 $4 \times 2 \times 0.3$ (cm^3)의 탈지면을 30 ml 주사기에 담아 멸균한 filter로 여과하여 효소 처리한 균사 현탁액을 넣어 원형질체를 분리하였다. 분리된 원형질체에 0.6 M MgSO_4 를 넣고 원심력을 600 RCF와 1200 RCF로 달리하여 5분 동안 원심분리 하였고 원형질체를 2회 세척한 후 최종 1 ml 의 0.6 M MgSO_4 에 재현탁 하였다. 얻어진 원형질체를 hemocytometer (Superior 사)를 이용하여 정량한 후 재분화 배지 {PDA (Poteto Dextrose Agar, Duchefa 사), 0.6 M mannitol이 포함된 PDA, 대두박고체배지 (KH_2PO_4 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, 황설탕 20 g/L, 대두박 3 g/L, 안티폼 20 μL /L, micro agar 15 g/L), 0.6M mannitol이 포함된 대두박고체배지에 각기 도달하여 28°C 암상태에서 배양하였다.

반복적인 실험 결과는 젓빛 만가닥버섯은 새송이버섯 보다 원형질체 수확율이 낮음을 확인 하여, 젓빛 만가닥버섯은 지속적인 실험이 필요한 것으로 판단되었으며, 최적의 원형질체 생산을 위해 젓빛 만가닥버섯의 균사체 양과 배양시기 등의 조건을 변경하여 진행할 필요성이 있음을 확인하였다.

(2) 4- NQO처리에 의한 변이체 유도

4-NQO (4-nitroquinolene oxide)를 0.6 M mannitol용액에 각각 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 제작하고 분리된 원형질체에 처리시간을 20분, 40분으로 달리하여 처리하고 끝난 즉시 0.6M mannitol로 3회 세척하고 0.6 M mannitol이 포함된 PDA 배지에 도달하여 28°C 암상태에서 배양하였다.

(3) 유도된 변이체 검정

(가) Genomic DNA 추출 및 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 분석.

각 변이체로부터 분화된 자실체 100 mg을 액화질소와 막자사발을 이용하여 곱게 갈아준 후 DNeasy

Plant Mini Kit (Promega 사)를 이용하여 Genomic DNA를 추출하여 -20℃에 보관하였다. RAPD(Tomizawa 등, 2007; Sunagawa 등, 1995)분석을 위하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행하였으며 PCR mixture {DNA 1 μ l, OPT random primer(Operon 사) 1 μ l, 2 \times PCR master mix soln (Intron 사) 10 μ l, 멸균수 8 μ l}를 준비한 후 95℃에서 5분간 DNA를 완전히 denature 시킨 후 94℃에서 1분, OPT random primer 각각의 annealing temperature에서 1분, 72℃에서 1분 조건에서 40 cycle을 수행한 다음 72℃에서 5분간 DNA 조각을 완전히 extension 하였다. PCR을 마친 후 1.4% agarose gel에서 전기영동하고 야생형과 DNA 밴드 양상을 비교하고 data base로서 활용 가능하도록 연구초기 단계에서 부터 자료를 확보하였다.

제 2 절 2년차 연구개발수행 내용 및 결과

1. 실용적 재배기술 개발

가. 경제성 및 대량 생산에 적합한 수준의 배지개발

(1) 복토과정 없는 재배방법 시험

대량생산을 위한 병재배(용기재배)에 있어서 복토과정은 재배과정에 있어서 각 병당 중간에 복토를 해야 하므로 매우 번거롭고 시간과 인력이 많이 소요되는 과정이다. 따라서 복토과정의 생략은 매우 중요한 사항으로 기존의 잣빛 만가닥버섯 재배 시에는 복토과정이 필수였으나 본 과제수행을 통한 반복적인 실험으로 잣빛 만가닥버섯 재배 시 복토과정 없이 재배할 수 있는 기술을 확보하였다. 복토 없는 재배방법에서 가장 중요한 요소는 배양 후 충분한 후숙 기간을 확보하는 것이 반복적인 실험결과 확인되었다.



Fig. 5. Cultivation of fruit bodies without soil covering and bark.

(2) 수피(bark) 사용 없는 재배방법 시험

수피(bark)는 일반 버섯재배 원료인 톱밥보다 5배정도 가격이 높아 수피 사용 시 경제성 있는 재배가 어려우나 본 과제수행을 통한 실험으로 수피를 사용하지 않고 발효미송톱밥과 밀기울을 사용하여 재배가 가능한 기술을 확보하였다. 가장 중요한 주재료인 톱밥은 활엽수톱밥이나 생톱밥 대신 후숙 미송톱밥만을 사용하여 복토를 하지 않고도 자실체를 발생시키는 결과를 얻었다.

나. 변이육종에 의해 개발된 균주별 재배특성 실험

(1) 변이 육종에 의해 개발된 균주를 사용한 반복 재배시험

변이 육종에 의해 개발된 균주를 사용한 반복 재배시험으로 수량이 우수하고 자실체의 모양이 좋은 품종 5종(국내 1종, 일본 4종)을 1차로 선별하였음. 비교결과 2종(충북대 변이종 C9, 일본 나가노 변이종 J4)에 대해 최종 품종등록 후보로 결정함. 나머지 제외된 변이종은 DNA 상에서는 기존 품종과 차이를 보이지만 실질적으로 재배가 원활하지 않아서 제외하였다.



Fig. 6. Selected mutant strains J4 and C9.

(2) 일본에서 유통중인 버섯자실체 확보와 비교

일본에서 유통 판매되는 상품들을 비교 분석하고 조직 분리하여 계대 배양하며 향후 품종등록을 위한 개발 균주에 대한 대조균으로 삼았다. 또한 잿빛 만가닥버섯은 뛰어난 기능성으로

다른 식용버섯과는 다르게 분말화되어 판매되는 제품도 있다.



Fig. 7. *Lyophyllum decastes* goods in Japan market.

다. 품종 선발을 위한 재배조건 다양화시험

(1) 변이 육종에 의해 개발된 균주 대한 적정 pH 시험

평판 배지에서 pH별 균주 성장실험을 통해 pH 5에서 변이체 젯빛 만가닥버섯 균주(일본 나가노 변이종 J4)가 가장 활성 있는 성장을 보여줌을 확인하였으며, 기존에 보고된 자료에 따르면 젯빛 만가닥버섯은 pH 5~6에서 가장 좋은 활성을 보였다.

Table 2. Comparisons of the mycelia growth to pH value

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

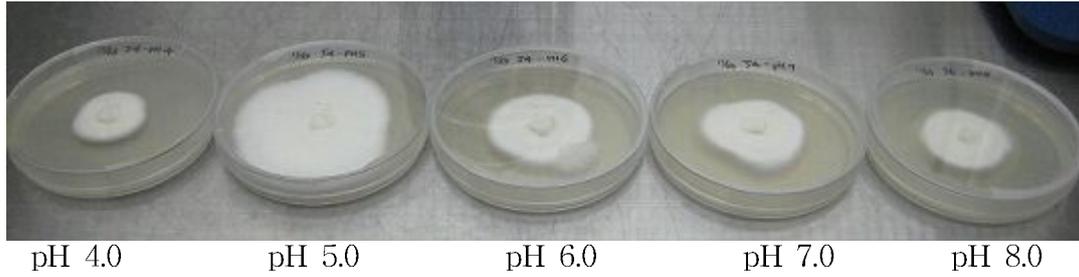


Fig. 8. Effect of the pH of media on the mycelial growth in *Lyophyllum decastes*.

(2) 재배사 조건시험

일반 버섯 재배사에서 재배실험을 통한 빛의 영향을 비교한 결과 선발된 균주인 국내 충북 대 변이종 C9과 일본 나가노 변이종 J4는 다른 변이체에 비하여 활력이 우수하고 재배가 용이하였으며 자실체의 모양도 균일하였다. 그러나 동일한 광원 조건하에서 C9는 J4에 비하여 갓의 색깔이 갈색이었으며 습도는 95% 이상 고습이 필요한 만가닥버섯의 재배와 동일하였다.

라. 적정 영양제 종류와 배합비율시험

(1) 미강, 밀기울, 면실박의 종류 및 함량에 대한 현장 재배시험.

6개 시험군(일본 나가노 변이종 J4)으로 주재료는 발효미송톱밥을 사용하였으며, 영양원은 미강, 밀기울, 면실박을 단독 및 혼합하여 함량을 조절하여 사용하였다. 그러나 영양원으로 면실박을 사용한 시험군은 거의 배양이 되지 않았으며, 미강보다는 밀기울을 사용한 시험군이 좋은 결과를 보였지만 밀기울의 함량이 높아지면 오히려 배양 속도가 늦어졌다. 시험결과 최적으로서 발효미송톱밥 71.0%, 밀기울 29.0% 비율이 가장 우수한 것으로 확인되었다.



- A. Fermented pine sawdust 68.0% and rice bran 32.0%, B. Fermented pine sawdust 41.0% and rice bran 58%, C. Fermented pine sawdust 71.0% and wheat bran 29.0%, D. Fermented pine sawdust 51.0% and wheat bran 49.0%, E. Fermented pine sawdust 58.8, rice 20.6% and wheat bran 20.6%, F. Fermented pine sawdust 70.6% and cotton bark 29.4%.

Fig. 9. Comparison experiment of Nutrition class.

Table 4. The composition of sawdust and nutrition material

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

2. 변이체 유도에 의한 잣빛 만가닥버섯 신품종 개발

가. 변이 유도에 의한 잣빛 만가닥버섯 2종에 대한 품종을 선발함

(1) 변이체 유도 시험법 확립에 따른 품종을 개발하고 재배시험을 통한 품종선발

균사체는 2~3주간 이상 대두박액체배지(KH_2PO_4 0.5 g/l, MgSO_4 0.5 g/l, 황설탕 20 g/l, 대두박 3 g/l, 안티폼 20 $\mu\text{l/l}$)에서 배양하였다. 배지와 균사체를 분리하기 위하여 교반기를 이용하여 파쇄하고 50 ml 시험관으로 옮겨 800 RCF에서 5분 동안 원심분리 후 상등액을 제거하고 균사체를 얻었다. 균사체를 세척하기 위하여 멸균수로 재현탁 하였고 원심분리했다. 이를 2회 반복한다. 원형질체 분리 용액은 0.6 M MgSO_4 에 lysing enzyme 10 mg/ml 농도로 사용 하였다. 세척이 끝난 균사체에 원형질체 분리 용액을 pellet의 두배 volume으로 넣고 28°C 암상태에서 4시간 동안 120 rpm으로 흔들어주며 배양한 후 $4 \times 2 \times 0.3$ (cm^3)의 탈지면을 30 ml 주사기에 담아 멸균한 filter로 여과하여 효소 처리한 균사 현탁액을 넣어 원형질체를 분리하였다. 분리된 원형질체에 0.6 M MgSO_4 를 넣고 원심력을 600 RCF와 1200 RCF로 달리하여 5분 동안 원심분리 하였고 원형질체를 2회 세척한 후 최종 1 ml 의 0.6 M MgSO_4 에 재현탁 하였다. 얻어진 원형질체를 hemocytometer (Superior 사)를 이용하여 정량한 후 재분화 배지 {PDA (Poteto Dextrose Agar, Duchefa 사), 0.6 M mannitol이 포함된 PDA, 대두박고체배지 (KH_2PO_4 0.5 g/l, MgSO_4 0.5 g/l, 황설탕 20 g/l, 대두박 3 g/l, 안티폼 20 $\mu\text{l/l}$, micro agar 15 g/l, 0.6M mannitol이 포함된 대두박고체배지에 각기 도말하여 28°C 암상태에서 배양하였다.

4-NQO (4-nitroquinolene oxide)를 0.6 M mannitol용액에 각각 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 제작하고 분리된 원형질체에 처리시간을 20분, 40분으로 달리하여 처리하고 끝난 즉시 0.6M mannitol로 3회 세척하고 0.6 M mannitol이 포함된 PDA 배지에 도말하여 28°C 암상태에서 배양하였다.



Fig. 10. Hyphae transferred to PDA medium from Regenerated protoplasts.

Table 5. Option number of processing conditions

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

나. 기존 품종과 육성 품종의 유전적 차별성 검증

(2) 변이체 RAPD 분석시험으로 기존 품종과 다른 유전적 차별성을 검증함

RAPD(random amplified polymorphic DNA)는 유전적 차이 및 유연관계를 확인하는데 널리 사용되는 분석법으로 기존 품종과 육성 품종의 유전적 차별성 검증에는 RAPD 분석을 통하여 분석결과 RAPD 분석을 통한 변이체를 wild type과 비교한 결과 계통적 차이가 있음을 확인하였다. 사용한 random primer는 OPT 1에서 OPT 20 까지 총 20 가지 이었으며, annealing 온도는 25.6℃ 에서 40.5℃ primer에 따라 달랐으며, wild type과 변이체간에 OPT 2, OPT 3, OPT 4, OPT 9, OPT 10, OPT 17, OPT 18, OPT 19는 증폭이 안 되었으며, OPT 6은 차이가 없었다. 차별 밴드의 종류는 1) wild type에 는 있지만 변이체에는 없는 밴드(-), 2) wild type에는 없지만 변이체에는 있는 밴드(+), 3) wild type에 도 있으나 변이체에서는 증폭되는 밴드(×) 등 3가지로 분류하여 평가하였다.

Table 6. Used random primer and annealing temperature

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

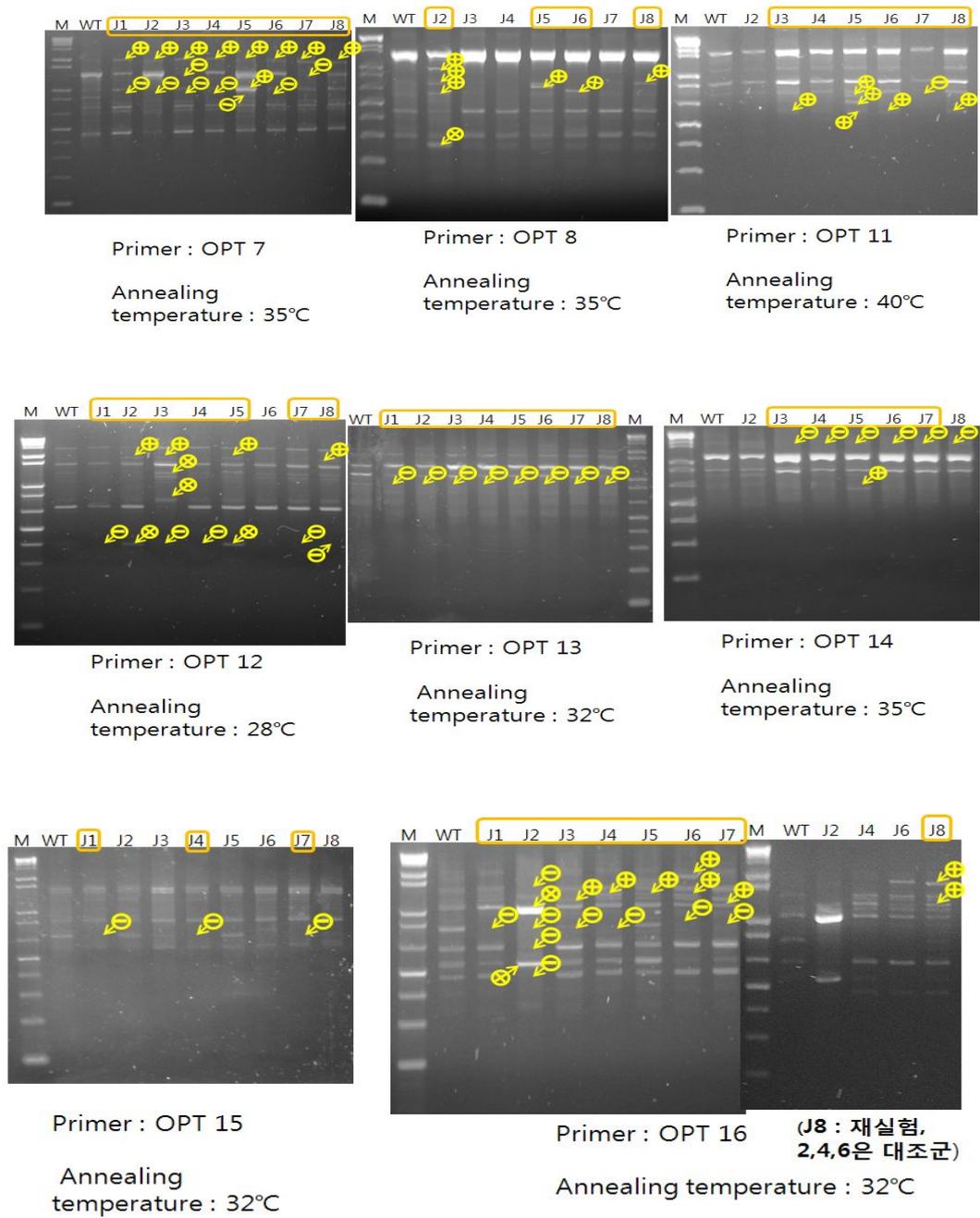


Fig. 11. RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) band of mutant.

제 3 절 3년차 연구개발수행 내용 및 결과

1. 실용적 재배기술 개발

가. 경제성 및 대량 생산에 적합한 수준의 배지개발

(1) 복토과정 없는 재배방법 시험

대량생산을 위한 병재배(용기재배)에 있어서 복토과정은 재배과정에 있어서 각 병당 중간에 복토를 해야 하므로 매우 번거롭고 시간과 인력이 많이 소요되는 과정이다. 따라서 복토과정의 생략은 매우 중요한 사항으로 기존의 잣빛 만가닥버섯 재배 시에는 복토과정이 필수였으나 본 과제수행을 통한 반복적인 실험으로 잣빛 만가닥버섯 재배 시 발효미송톱밥과 밀기울만을 사용하여 충분한 후숙기간을 거치면 복토과정 없이 재배할 수 있는 기술을 확보하였다.

(2) 수피(bark) 사용 없는 재배방법 시험

수피(bark)는 일반 버섯재배 원료인 톱밥보다 5배정도 가격이 높아 수피(bark) 사용 시 경제성 있는 재배가 어려우나 본 과제수행을 통한 실험으로 바크를 사용하지 않고 발효미송톱밥과 밀기울을 사용하여 재배가 가능한 기술을 확보하였다.



Fig. 12. Artificial cultivation processing of *Lyophyllum decastes* without soil covering and bark.

나. 변이육종에 의해 개발된 균주별 재배특성 실험

(1) 변이 육종에 의해 개발된 균주를 사용한 반복 재배시험

변이 육종에 의해 개발된 균주(충북대 변이종 C9, 일본 나가노 변이종 J4)를 사용한 재배실험은 반복적으로 재배하며 장기적으로 품종에 대한 안정성을 확인하였다. 반복적인 재배과정에서도 두 가지 품종은 갖의 색깔이나 모양이 달라서 앞으로 충분한 상품적 특색이 있는 것으로 기대된다.

(2) 일본에서 유통중인 버섯자실체 확보와 비교

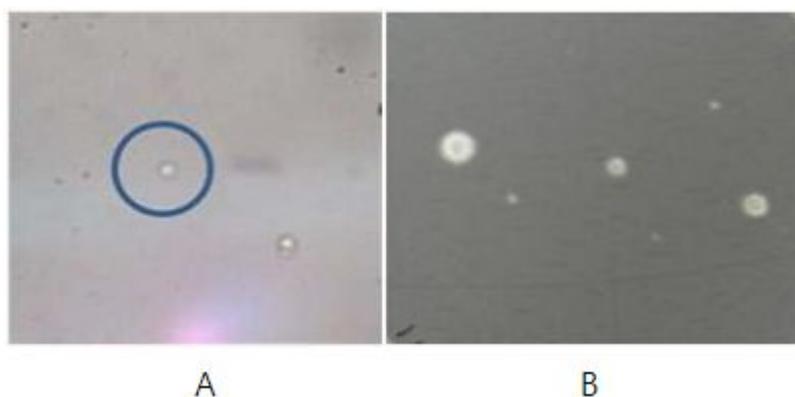
일본에서 판매되는 판매되는 버섯과는 갖의 형태나 색깔이 조금씩 다르나 이는 재배과정상 재배사의 환경에 따른 영향도 있을 수 있는 것으로 추정하며 또한 품종의 특성에 따른 차이로 판단한다. 그러나 크기 및 모양에 있어서는 현재 국내 판매가 없었던 품목이므로 앞으로 반복적인 재배과정을 거치며 시장의 요구에 부합된 품질 규격을 확보하는 것도 필요한 것으로 판단한다.

2. 변이체 유도에 의한 잣빛 만가닥버섯 신제품 개발

가. 변이체 유도에 의한 잣빛 만가닥버섯 2종에 대한 품종 선발 과정

(1) 변이체 유도 위한 원형질체 재생

원형질체를 이용하여 변이체 유도를 하기 위하여 원형질체 분리 조건 및 재생 조건을 확인 하고자 원심력과 재생 배지를 달리하여 수행하였다. 원형질체 분리 용액 처리 후 원심력을 1200 RCF와 600 RCF로 달리 하였고 1200 RCF에서 216×10^4 개를 600 RCF에서 107×10^4 개의 원형질체를 얻어 1200 RCF의 원심력에서 더 많은 원형질체를 얻었다. 얻은 원형질체를 사용하여 배지에 따른 균사의 재생을 확인하였다 (Figure 13). 재생의 경우 PDA배지와 대두박 배지에 따라 큰 차이가 없었고 삼투압 조절제인 0.6 M Mannitol이 포함된 배지와 0.6 M Mannitol이 포함되지 않은 배지에 따라서도 균사 재생율에 차이가 없었다 (Table 7). 다만 삼투압 조절제인 0.6 M Mannitol이 포함된 배지와 포함되지 않은 배지에서 재생된 기간과 재생율의 차이가 없음에도 퍼짐이 더뎠다 (Table 8, Figure 14).



A: protoplasts isolated from the mycelium of the *Lyophyllum decastes* Sing ($\times 400$),
 B: hypha regenerated from protoplast of the *Lyophyllum decastes*.
 Figure 13. Protoplasts isolated and regenerated from the *Lyophyllum decaste* Sing.

Table 8. Influence of the different media on hypha regeneration

Relative centrifugal force (RCF)	Protoplast yield	Regeneration of medium (%)			
		PDA	PDA (0.6 M Man)	soybean meal	soybean meal (0.6 M Man)
1200	1×10^5	0.009	0.009	0.004	0.006
	4×10^5	0.008	0.009	0.009	0.01
600	1×10^5	0.009	0.008	0.011	0.009
	2×10^5	0.004	0.006	N.D	0.006

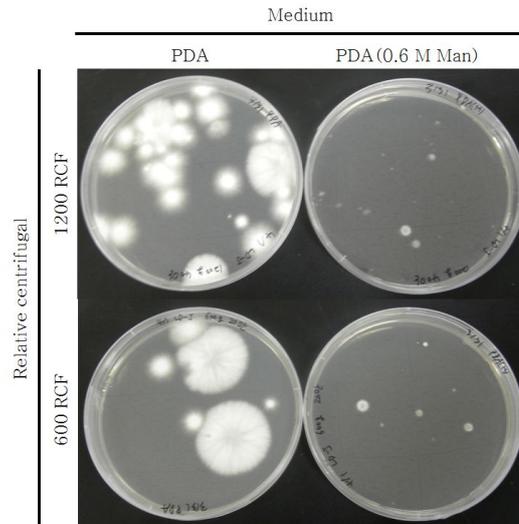


Figure 14. Effect of different osmotic stabilizers on the regeneration of protoplasts.

Bok 등 (1944)의 방법을 참고하여 원형질체 분리 용액을 처리하였고 재분화 배지의 조건을 설정하였다. 원형질체 분리 용액 처리 전 균사체 배양 방법에서는 5일 배양했을 때 높은 분리 효율을 보여주었다. 하지만 5일 동안 균사체를 액체배양하였을 때 분리한 원형질체를 얻을 수 없었고 충분히 배양된 균사체에서 분리한 원형질체를 얻을 수 있었다. 원형질체 분리 전 균사체의 상태와 활력의 균일한 조건을 수립하지 못하여 배양 조건에 대한 원형질체 분리조건을 수립하지 못한 것으로 생각된다. 균사체의 활력이 균일하도록 배양 조건 수립이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

(2) 4-NQO 처리 후 원형질체 재생

Ballance 와 Turner 등 (1986)은 protoplast에 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 4-NQO 처리해 버섯의 재생률을 확인하였고 농도가 높아질수록 생존율이 낮아지는 것을 확인하였다. 분리한 원형질체에 4-NQO를 농도와 처리 시간에 따라 처리하여 재생률을 확인하였으며 무처리구의 재생률이 0.16%로 4-NQO 처리구보다 높았으나 4-NQO 처리구의 재생률은 0.006%에서 0.02%의 일정하지 않은 재생률을 보였다 (Table 9). 이후 8 개의 mutant를 선발하여 자실체 유도를 의뢰하였다 (Table 10).

다른 버섯들에 비하여 잣빛 만가닥버섯의 선행 연구가 미비한 점이 있어 원형질체 분리 전 균사체의 상태와 활력의 조건이 균일하지 못하여 원형질체 분리조건이 균일하지 못하였기에 NQO 처리에 따른 적합한 재생률을 얻지 못한 것으로 생각된다.

Table 9. Effects of 4-NQO treatment concentration and time on protoplasts regeneration

Treatment concentration	Treatment time (min)	Regeneration percent (%)
0 $\mu\text{g}/\text{ml}$		0.1603
0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20	0.0043
	40	0.0173
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20	0.0065
	40	0.026

* regeneration percent = (regeneration hypha yield/Protoplast yield) \times 100

Table 10. Nomenclature of the hypha lines from 4-NQO treatment

Treatment concentration	Treatment time (min)	Selection name
0 $\mu\text{g}/\text{ml}$		WT
0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20	J1, J2
	40	J3, J4
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20	J5, J6
	40	J7, J8

나. 기존 품종과 육성 품종의 유전적 차별성 검증

(2) 변이체 RAPD 분석시험으로 기존 품종과 다른 유전적 차별성을 검증함

RAPD(random amplified polymorphic DNA)는 유전적 차이 및 유연관계를 확인하는데 널리 사용되는 분석법으로 RAPD 분석을 통한 유도 변이체 검정.

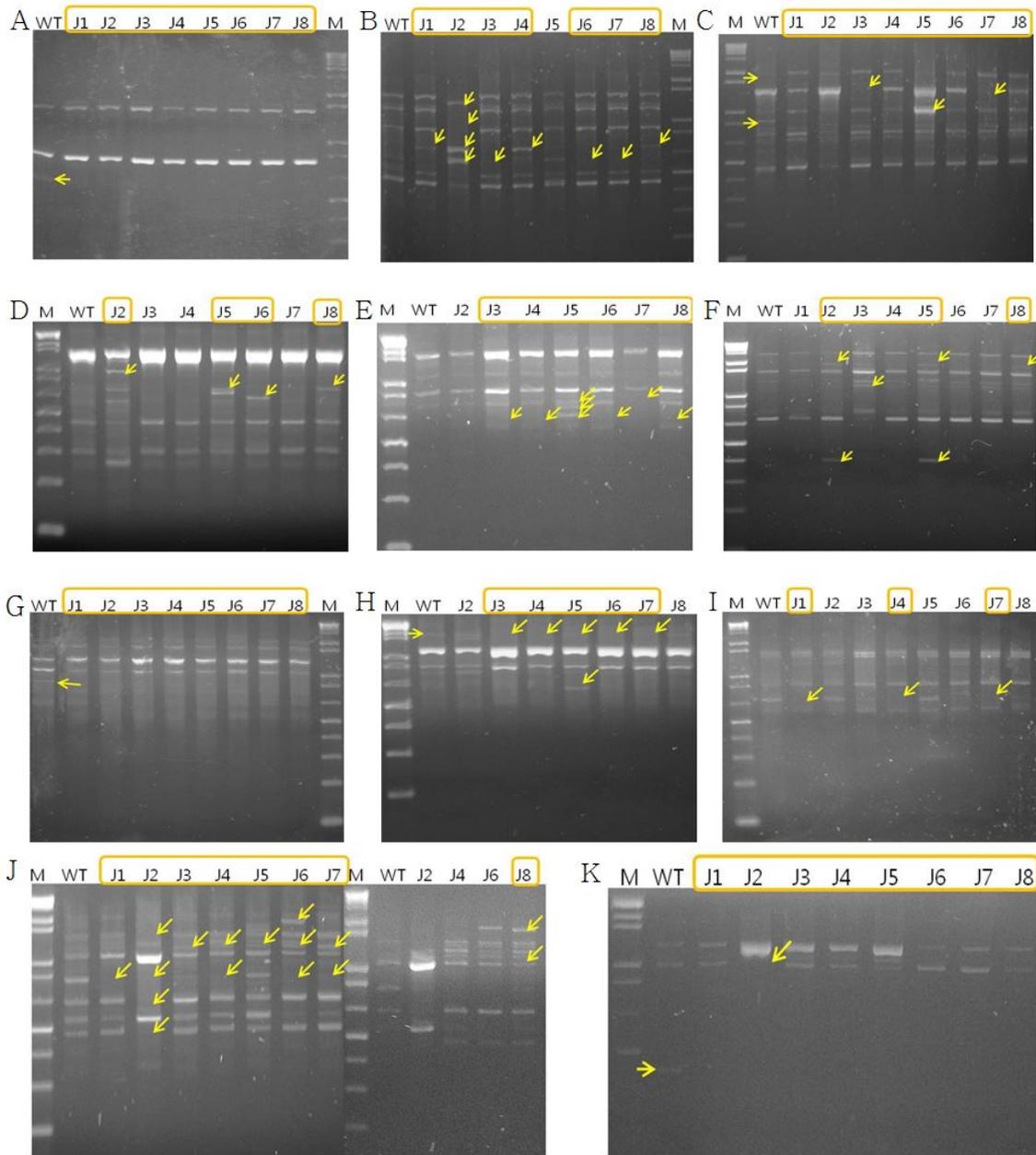
유도한 변이체(일본 변이종)를 야생형과 유전적 차별성을 검정하기 위하여 잣빛만가닥 버섯 자실체를 이용해 Genomic DNA를 추출하여 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 분석을 수행하였다. 변이체 8개를 OPT primer 20개를 (Tabel 11) 이용하여 야생형과 밴드 양상을 비교 분석하였다.

OPT-01 primer에서 야생형에 있는 밴드가 변이체인 J1부터 J8에서 없었다. OPT-05 primer에서는 J1, J4, J8에서 야생형에는 없던 밴드가 나타났으며 J3, J6, J7에서는 야생형에 있던 밴드가 없었고 J2에서는 없던 밴드가 강하게 나타났고 밴드의 차이가 가장 컸다. OPT-07 primer에서는 야생형에 있던 밴드가 변이체 모두에서 나타났고 있던 밴드가 모든 변이체에서 없었다 J3과 J7에서는 야생형에서 강하

게 나타난 밴드가 나타나지 않았고 J5에서는 야생형에 있는 밴드가 강하게 나타났다. OPT-08 primer에서는 J2, J5, J6, J8에서 야생형에는 없던 밴드가 나타났다. OPT-11 primer에서는 J3, J4, J5, J6, J7, J8에서 차이가 나는 밴드를 볼 수 있고 J5에서 차이 나는 밴드 많이 볼 수 있다. OPT-12 primer에서는 J2, J3, J4, J5, J8에서 차이 나는 밴드를 확인할 수 있고 J2와 J5의 밴드 패턴이 같았다. OPT-13 primer에서는 야생형에 있던 밴드가 변이체 모두에서 나타나지 않았다. OPT-14 primer에서는 J3, J4, J5, J6, J7에서 야생형에서 약하게 나온 밴드가 나타나지 않았다. OPT-15 primer에서는 J1, J4, J7에서 밴드나 나타나지 않았고 서로 밴드 패턴이 같았다. OPT-16 primer에서는 가장 많은 차이가 났고 특히 J2와 J6의 밴드 차이가 많이 났다 J2의 경우 야생형에 있던 밴드가 강하게 나타났는데 ImageJ로 측정된 결과 위에서부터 3배와 5배의 차이가 났다. OPT-20 primer에서는 야생형에 있던 밴드가 변이체 모두에서 나타나지 않았고 J2에서는 있던 밴드가 나타나지 않았다 (Figure 15). 결과를 표 9로 요약하여 나타내었으며 유도한 변이체 모두에서 유전적 변이를 확인하였고 변이체 J2, J5, J6, J8의 차이가 가장 컸다. Figure 4는 야생형과 변이체로써 많은 변이를 확인했던 RAPD 분석과는 다르게 야생형과 변이체의 형태적 차이가 없었다.

Table 11. Primers for RAPD assay to show a genetic variability among the *Lyophyllum decastes* mutants generated

Primer name	Sequence (5' to 3')	T _m (°C)	Primer name	Sequence (5' to 3')	T _m (°C)
OPT-01	GGGCCACTCA	35	OPT-11	TTCCCCGCGA	40
OPT-02	GGAGAGACTC	26	OPT-12	GGGTGTGTAG	28
OPT-03	TCCACTCCTG	29	OPT-13	AGGACTGCCA	32
OPT-04	CACAGAGGGA	29	OPT-14	AATGCCGCAG	35
OPT-05	GGGTTTGCA	35	OPT-15	GGATGCCACT	32
OPT-06	CAAGGGCAGA	32	OPT-16	GGTGAACGCT	32
OPT-07	GGCAGGCTGT	35	OPT-17	CCAACGTCGT	32
OPT-08	AACGGCGACA	35	OPT-18	GATGCCAGAC	29
OPT-09	CACCCCTGAG	32	OPT-19	GTCCGTATGG	30
OPT-10	CCTTCGGAAG	33	OPT-20	GACCAATGCC	32



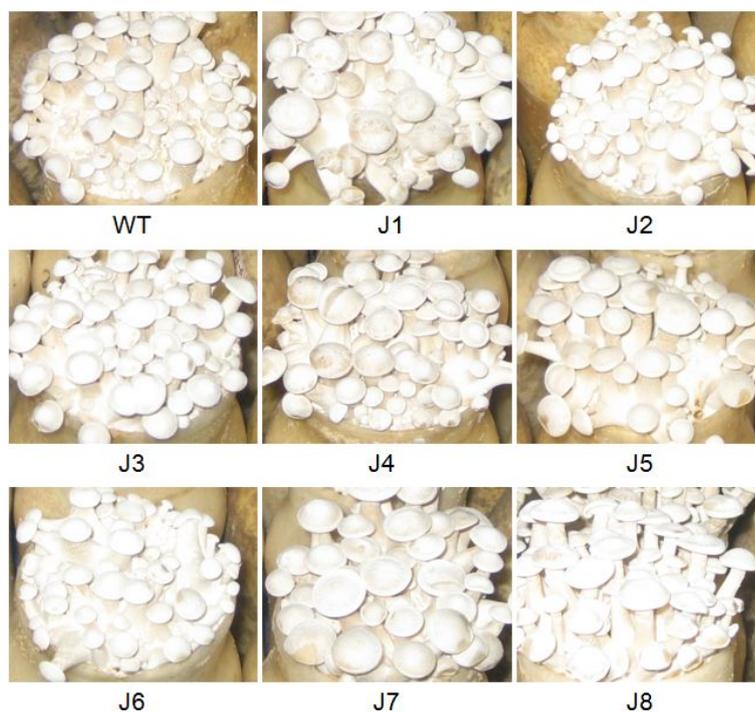
WT, wild type. J1~J8, 4-NQO treated mutant lines. (A) OPT-01 primer. (B) OPT-05 primer. (C) OPT-07 primer. (D) OPT-08 primer. (E) OPT-11 primer. (F) OPT-12 primer. (G) OPT-13 primer. (H) OPT-14 primer. (I) OPT-15 primer. (J) OPT-16 primer. (K) OPT-20 primer

Figure 15. RAPD assay of *Lyophyllum decastes* mutants using random primers.

Table 12. RAPD primers and markers detected for *Lyophyllum decastes* mutants

Primer name	Different mutant line	Primer name	Different mutant line
OPT-01	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8	OPT-11	J3, J4, J5, J6, J7, J8
OPT-02	*N.S	OPT-12	J2, J3, J4, J5, J8
OPT-03	*N.S	OPT-13	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8
OPT-04	*N.S	OPT-14	J3, J4, J5, J6, J7
OPT-05	J1, J2, J3, J4, J6, J7, J8	OPT-15	J1, J4, J7
OPT-06	*N.D	OPT-16	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8
OPT-07	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8	OPT-17	*N.S
OPT-08	J2, J5, J6, J8	OPT-18	*N.S
OPT-09	*N.S	OPT-19	*N.S
OPT-10	*N.S	OPT-20	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8

* N.S, No signal. N.D, No agreement date



WT, wild type. J1~J8, 4-NQO treated mutant lines.

Figure 16. Pictures of the fruit body from the *Lyophyllum decastes* mutants.

제 4 절 연구개발수행에 대한 고찰

복토와 수피(bark) 사용 없이 잿빛 만가닥버섯을 재배하기 위한 재배방법에 이에 대한 적절한 품종 육성에 대한 연구는 본 연구개발의 최종 목표이다.

국내외에서 기존 품종을 5종 수집하고(국내 4종, 일본 1종) 이들 품종에 대한 활성과 재배특성을 확인하고 기간 내 원활한 연구성과를 이루기 위해 실제 버섯이 재배되는 일본 현지 재배 농장을 방문하고 담당자들과의 충분한 회의를 하였고, 관련된 버섯 종사자들과의 토의를 통해 잿빛 만가닥버섯에 대한 적절한 정보를 수집하였다. 이런 정보를 분석하고 3년간의 연구기간동안 재배방법에 대한 개선시험을 하며, 이에 적합한 품종육종을 위해 변이체 유도법에 의한 품종을 육성하였다. 육성된 품종(충북대 변이종 C9, 일본 나가노 변이종 J4)은 국내외 유통중인 기존 품종과의 차별성을 RAPD 분석을 통해 검증하여 신품종으로서의 규격을 확보하였으며 이들에 대한 재배를 통해 현실적으로 재배가 가능한지를 반복적인 재배 과정을 거치며 시험하였다.

최종적으로 변이체 유도법으로 육종한 2개의 품종을 복토를 하지 않으며 경제성이 확보된 일반 재료를 사용하여 잿빛 만가닥버섯에 대한 재배법을 확립하였으므로 향후 새로운 버섯 재배에 관심이 많은 버섯 재배 농가에게는 재배 품목에 대한 선택을 넓힐 수 있으며, 시장에서는 다양한 소비계층에 대한 수요도 충족시킬 수 있는 좋은 식품이라 생각하며 잿빛 만가닥버섯은 이미 일본에서 우수한 기능성으로 시장이 형성되었으므로 국내에서도 좋은 성과가 기대된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 1년차 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 실용적 재배기술 개발

가. 잣빛 만가닥버섯 균주 수집 및 수집균주별 재배 특성조사

(1) 균주 수집 및 수집균주별 재배 특성조사

(가) 인천대학교 버섯균주 및 DNA은행에서 4종(설악산, 제주도, 충북대, 일본)과 일본 현지에서 1종 수집을 수집하고 이들의 활성을 검정하며 국내 1종(충북대)와 일본 현지(나가노)에서 수집한 1종, 총 2종의 균주를 최종 선발하였다. 또한 일본 현지에서 유통 중인 버섯시료를 수집하여 향후 분석 자료로 사용하기 위하여 조직분리 및 계대 배양하였다.

(2) 기존 재배방식의 문제점 및 개선사항 점검

(가) 기존 주배지 재료인 수피(bark)와 복토재배의 문제점을 확인하고, 주재료 선발 및 복토 공정을 생략한 실용적 재배 가능성 확보를 위한 실험을 수행하였다.

(나) 나가노 현지에서 잣빛 만가닥버섯 재배 현장에서 방문하여 대량재배 과정을 견학하였다.

(3) 잣빛 만가닥버섯 균주에 대한 특성을 조사하고 매우 어렵게 장기간 준비하여 일본 현지의 실제 재배과정을 견학함으로써 복토와 수피(bark)를 사용하지 않고 재배할 수 있는 가능성과 잣빛만가닥버섯은 다른 버섯들보다 재배기간이 길고 키우기도 매우 어렵다는 점도 같이 확인하였다. 또한 복토와 수피를 사용하지 않고 재배하고 장기적으로 종균에 대한 마찰을 피하기 위해서는 품종개량도 필요함도 확인하였다. 이상의 결과로 실용적 재배기술에 대한 목표달성도는 90% 수준이라고 판단하며, 일본인도 견학하기 어려운 잣빛 만가닥버섯 재배사의 재배 전과정을 견학함으로써 앞으로 국내 농가에 보급 시 좋은 도움이 될 수 있을 것이라 기대한다.

2. 잣빛 만가닥버섯 신품종육성

가. 잣빛 만가닥버섯 균주 수집 및 수집균주별 재배 특성조사

(1) 품종을 개발하기 위한 변이체 형성 및 선발

(가) 국내 및 일본으로부터 수집한 2종(충북대 1종, 일본 1종)의 균주에 대하여 잣빛만가닥버섯의 원형질체 생산 및 mutagens (4NQO)처리를 하여 17종의 변이체(충북대 변이종 C series, 일본 변이종 J series)를 얻었다. 이후 활성 및 재배실험을 통하여 최종 2종의 균주를 선정하였다. 얻은 변이체 및 최종 선정 균주 2종에 대해서는 RAPD 분석을 통하여 계통적 차별성을 확인하였다.

(2) 선행연구에서 획득한 변이체 연구 기술에 대한 안정성 확보

(가) 연구개발 과정에서 기술한 방법대로 본 연구팀에서는 공시된 방법대로 새송이버섯을 이용한 변이체 연구 기술을 적용하여 잣빛 만가닥버섯을 이용한 변이체 유도 시험을 실시하여 변이체에 의한 균주(충북대 변이종 C9, 일본 변이종 J4)를 획득하였다.

(3) Data base로서 활용 가능하도록 연구초기 단계에서 부터 자료를 확보함

(가) 연구단계에서부터 다른 버섯류에도 실험실에서 단기간에 품종육성이 가능하도록 자료를 정리하였다.

(4) 수집한 균주(충북대 1종, 일본 1종)로부터 변이체(충북대 변이종 C9, 일본 변이종 J4)를 얻어 RAPD 방법으로 계통적 차별성을 확인하여 신품종을 육성하였다. 신규 육성한 신품종 2종(충북대 변이종 C9, 일본 변이종 J4)은 유전적으로 종래와는 차별성을 있음을 과학적으로 확인하였으므로 본래 목표의 70% 수준은 달성한 것으로 판단되며, 향후 개발된 신품종을 이용하여 새로운 유전자원으로 활용할 수 있는 것으로 기대한다.

제 2 절 2년차 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 실용적 재배기술 개발

가. 실용적 재배기술 개발

(1) 경제성 및 대량 생산에 적합한 수준의 배지개발

(가) 수피(bark)를 사용하지 않고 발효미송톱밥을 이용하여 재배가 가능함을 확인하였다.

(2) 기존 재배방식의 문제점 및 개선사항 점검

(가) 기존 재배방식에서 가장 큰 문제점은 복토를 하는 방식이므로, 본 재배법은 복토를 하지 않고도 재배가 가능함을 확인하였다.

(3) 일본에서 유통 중인 버섯자실체 확보와 비교

(가) 현재 일본에서 유통 중인 자실체와 비교하여 시장에서 필요한 규격을 산정하였다.

(4) 품종 선발을 위한 재배조건 다양화시험

(가) 다양한 재배방법을 적용해본 결과 만가닥버섯과 동일한 재배조건을 가졌으나, 배양 후 충분한 후숙이 필요하였다.

(5) 적정 영양원 종류와 배합비율 시험

(가) 미강, 밀기울, 면실피 등을 이용한 영양제 종류 및 배합비율에 대한 시험을 실시하였다.

(6) 일반 발효미송톱밥을 이용하고 영양원으로 밀기울을 사용하여 복토와 수피(bark) 사용 없이 잿빛 만가닥버섯의 재배가 가능함을 확인하였다. 이상의 결과는 연구목표의 90% 수준은 되는 것으로 판단하며, 일본의 재배법과 유사한 수준을 보인 것으로 추정한다.

2. 잣빛 만가닥버섯 신품종육성

가. 변이체 유도에 의한 잣빛만가닥버섯 신품종육성

(1) 변이 유도에 의한 잣빛만가닥버섯 2(충북대 변이종 C9, 일본 나가노 변이종 J4)종에 대한 품종을 선발함

(가) 변이체 유도 시험법 확립에 따라 개발한 품종을 현장에서 재배시험을 통해 반복적으로 품종에 대한 안정성을 검토하였다.

(2) 기존 품종과 육성 품종의 유전적 차별성 검증

(가) 반복적인 재배시험을 통해 얻은 잣빛만가닥버섯에 대해 RAPD 분석을 통한 계통적 차별성을 검증하였다.

(3) 변이체 유도에 의해 개발한 품종은 현장에서 재배시험을 실시하며, 수확한 버섯에 대해서는 RAPD 분석법으로 유전적 차별성을 지속적으로 확인하였으므로 연구목표 100%를 달성하였다고 판단한다.

제 3 절 3년차 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 실용적 재배기술 개발

가. 실용적 재배기술 개발

(1) 경제성 및 대량 생산에 적합한 수준의 배지개발 완료

(가) 복토 없이 후숙 미송톱밥과 밀기울을 이용하여 경제성이 확보된 배지를 개발하였다.

(2) 대량 현장재배

(가) 대량 현장재배를 통한 재배법 확립에 대한 시험을 진행하며, 국립종자원에 품종등록을 위한 반복재배를 진행 중이다.

(3) 복토 없이 후숙 미송톱밥 71% 과 밀기울 29%를 사용한 대량 재배가 가능하였다. 그러나 대량재배 시에는 영양원으로 미강 2.5%와 면실피 2.5%를 추가하여 배양하는 것이 배양 속도가 빠른 것으로 나타나 대량 재배 시에는 영양원의 비율을 29%에서 34% 높이는 것이 유리하다고 판단하며 최종 실용적 재배기술 개발은 본 연구의 핵심 목표인 복토와 고가의 수피(bark)를 사용하지 않는 재배법의 개발이므로 연구목표 90% 수준은 달성하였다고 판단한다.

2. 잣빛 만가닥버섯 신품종육성

가. 변이체 유도에 의한 잣빛 만가닥버섯 신품종육성

(1) 변이 유도에 의한 잣빛 만가닥버섯 2종에 대한 품종선발

(가) 변이 유도에 의해 개발한 2종의 품종에 대하여 반복적인 대량재배가 현장에서 진행 중이다.

(2) 변이 유도체 육종법 확립

(가) 공시된 방법에 따라 새송이버섯을 통해 확인한 변이 유도체 육종법으로 잣빛 만가닥버섯의 최종 변이체 2종을 선발하였다. 이들에 대한 재배실험을 통해 안정적인 재배가 이루어지고 유도 변이체 검정을 위해 RAPD 분석 및 세포주에 대한 단백질 추출 및 정량, Two-Dimensional electrophoresis 분석을 시행하였다.

(3) 변이 유도에 의해 개발한 2종(충북대 변이종 C9, 일본 나가노 변이종 J4)의 품종이 반복적인 재배를 통해 재배됨을 확인하였고, 개발한 품종의 변이 유도체 육종법으로 안정적으로 버섯균주에 대하여 편리하게 품종 육성에 사용할 수 있음을 확인하였으므로 본 연구목표는 100% 달성 되었다고 판단한다. 또한 육성된 품종은 앞으로 국립종자원에 정식 품종 등록에 따른 절차를 진행할 예정이고 이러한 품종개발은 앞으로 외국과의 마찰을 피할 수 있는 좋은 선례라고 기대한다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획

1. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화 방향

(1) 일본에서 안전성과 기능성이 높아 차세대 버섯중의 하나로 자리를 잡아가고 있으며 시장의 흐름에 따라 국내에 도입될 가능성이 높아졌다. 국내 도입 시기에는 이미 과포화 상태인 새송이버섯과 느타리버섯 시설을 이용하면 추가 비용 없이 품목을 분산 재배해 시장을 개척하면 시장 경쟁력을 확보해 재배 농가의 수익률 감소를 해결하는 측면으로 자리를 잡을 것으로 기대한다.

(2) 여러 가지 품목이 시장을 형성하고 있지만 식용이면서 기능성이 강한 버섯은 남녀노소에 적절한 상품으로 역할을 할 수 있을 것으로 기대하며 이 과정에서 기능성이 높은 식용버섯인 만큼 소비자 계층에 적합한 과학적 자료를 토대로 홍보활동을 강화할 계획이다.

나. 산업화를 통한 기대효과

(1) 시장이 요구하는 적절한 히트 상품의 개발은 신규 시장의 개척이전에 기존 버섯 재배 농가의 어려움을 어느 정도 대체하면서 앞으로 FTA의 확대에 따른 국제 시장의 경쟁력에 있어서도 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대되어 농촌의 불안감과 불균형을 해소하고 전문 지식을 가지는 의욕있는 젊은 농업 관계자에게 좋은 기회를 줄 수 있을 것으로 기대한다. 기존의 간이 재배사를 주축으로 한 느타리버섯 시장에서 큰느타리인 새송이버섯 품목의 등장은 시설의 현대화를 가져오며 대형화로 발전해 주변의 잉여 인력 활용에도 기여한 전례가 있으므로 과잉 생산에 따른 유휴 시설의 활용 및 생산 품목의 분산으로 버섯 산업의 안정화에 기여할 것으로 기대된다.

제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산

1. 교육·지도·홍보

본 영농조합법인을 방문하는 버섯관계자 및 잣빛 만가닥버섯을 비롯한 신품목 버섯 재배에 관심이 있는 버섯재배 관계자를 대상으로 연구 성과 및 향후 발전방향에 대하여 세미나 및 교육을 실시할 예정이며, 또한 학교 등 교육기관과 버섯에 관심 있는 관련 연구소와도 기능성에 대한 토론 및 세미나도 계획하고 있다. 이어서 재배에 관심 있는 재배농가에 대해서는 균주 및 종균을 분양하고 잣빛만가닥버섯 재배 전과정에 대한 기술을 공개하며 기술이전 업무도 수행할 계획이다. 그러나 현재까지 국내에서는 잣빛만가닥버섯이 유통되지 않기 때문에 시장에서의 초기 가격 형성에 어려움이 있을 것으로 판단하며 일본을 기준으로 100 g당 100~120엔에 일반 판매가 이루어지고 있지만 느티만가닥버섯의 경우 일본과 한국에서의 시장 형성 가격이 차가 크므로 잣빛만가닥버섯이 국내에서 신규 품목으로 자리를 잡기 위해서는 재배 뿐 아니라 일반 소비자에 대한 홍보가 매우 중요하며, 이러한 전반적인 재배기술 및 홍보는 3년간 과제를 수행한 경험을 바탕으로 본 영농조합법인에서 기술을 더욱 발전시키고 재배농가를 대상으로 한 기술지도와 소비자를 대상의 홍보를 병행할 계획이다.

제 3 절. 특허, 품종, 논문

1. 특허출원

가. 특허명 : 복토와 바크의 사용이 없는 잣빛 만가닥버섯의 배지 조성물 및 이를 이용한 잣빛 만가닥버섯의 재배방법.

나. 출원일자 : 2010. 11. 29

다. 출원번호 : 10-2010-0119335(접수번호 1-1-2010-0778783-38)

라. 출원인 명칭 : 허니버섯영농조합(1-2010-056417-8)외 1명

마. 대리인 성명 : 서희원(9-1998-000280-9)

바. 발명자 : 이대진, 이병의, 권미성, 홍윤표

2. 품종

변이체 유도방법을 통하여 신품종 2종을 육성하였다. 과학적 규명은 RAPD 방법을 통하여 확인하였으며, 현재 국립종자원에 품종등록을 위한 준비절차를 진행 중이다. 추후 품종이 등록 되면 복토와 수피(bark) 사용 없이 잣빛 만가닥버섯을 재배하고, 나아가 현재 재배중인 일본 품종과도 명확한 구분이 되므로 수출 등 앞으로 발생할 가능성이 있는 종자문제도 해결될 수 있는 것으로 판단한다.

3. 논문

가. 버섯학회지에 [잣빛 만가닥버섯의 변이체 유도와 실용적 인공재배에 대한 연구]라는 제목으로 2011년 6월호에 게재예정이며, 현재 진행 중인 생리활성 실험이 완료되면 추가 1편의 논문을 투고할 예정이다.

4. 추가연구 및 타 연구 활용 계획

(1) 잣빛 만가닥버섯은 뛰어난 생리활성이 일반 약용버섯보다도 우수한 활성을 가지고 있는 버섯이다. 본 연구과제에서는 기능성 탐색에 대하여도 계획을 가지고 있었으나 주연구의 목적이 실용적 재배와 이를 위한 품종 육종이 주 연구목표이었다. 따라서 본 연구기간 동안 국내외 자료를 검토 분석하며 일본보다 떨어진 새로운 생리활성에 대한 연구가 필요하다고 판단하며 현재 일부 추가 연구가 진행되고 있으므로 지속적인 연구 활동을 통하여 얻는 연구 성과는 잣빛 만가닥버섯 보급 및 소비자의 홍보에 적극 활용할 계획이다. 또한 잣빛 만가닥버섯에 연구 과정에서 얻은 관련된 지식은 신규 버섯이나 기존 버섯에 대해 재배 방법의 개선이나 품종 육종에도 적용할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 기능성에 관한 자료

1. 일본 왕자목재녹화주식회사 논문

가. 잣빛 만가닥버섯에 대한 회의를 가진 왕자목재녹화주식회사는 일본 내에서 최초로 무복토에 의한 잣빛 만가닥버섯에 대한 재배방법을 개발한 회사로서 현재에도 그룹 내에서 잣빛 만가닥버섯에 대한 연구개발을 전담한 팀이 구성되어 있으며, 잣빛 만가닥버섯의 보급, 확대를 위하여 연구개발을 지속적으로 관리하고 있다. 이런 노력의 일환으로 10년 이상 장기적으로 생리활성에 대한 연구지원을 계속함으로써 17편에 이르는 기능성 연구논문을 보유하고 있다. 장기적으로 기능성에 집중 투자하는 회사의 설명은 잣빛 만가닥버섯이 가지고 있는 기능성이 매우 다양할 뿐 만 아니라 현대인의 건강과 매우 직결된 질병에 매우 유효하여 향후 다양한 소재로서의 개발이 가능해서이다.

(1) Antitumor effects of (1→3)-β-D-glucan and (1→6)-β-D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshmeji(*Lyophyllum decastes* Sing.)

Journal of Bioscience and Bioengineering. 90 :98-104(2000)

(2) ハタケシメジのアンジオテンシン変換酵素阻害活性および抗腫瘍活性

日本食品科学工学会誌. 48 :58-63(2001)

(3) ハタケシメジの血漿コレステロール上昇抑制作用

日本食品科学工学会誌. 48 :520-525(2001)

(4) Effect of Hatakeshmeji(*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom on Serum Lipid Levels in Rats.

Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 48 :73-76(2002)

(5) Antidiabetic Activity of *Lyophyllum decastes* in Genetically Type 2 diabetic Mice.

Biological Pharmaceutical Bulletin. 25 :1234-1237(2002)

(6) ハタケシメジ(*Lyophyllum decastes* Sing.) 熱水抽出物カプセル内服の犬および猫 における臨床効果 ~ウイルス性疾患および高齢時の活力回復と皮膚脂漏症の改善.

小動物臨床. 21 :457-462(2002)

(7) ハタケシメジ熱水抽出物カプセル内服によるQOL、脂漏症および脱毛の顕著な改善 — Malassezia皮膚炎の老犬の1症例.

小動物臨床. 22. 9-13(2003)

(8) 漢方補劑とハタケシメジの併用療法が有効であった進行肺癌の2症例.

Biotherapy. 19 :417-421(2005)

(9) Antitumor Effect of Trehalose on Sarcoma 180 in ICR Mice.

Journal of Applied Glycoscience. 52 :367-368(2005)

(10) ハタケシメジ熱水抽出物の安全性評価.

日本食品科学工学会誌. 54 :133-137(2007)

(11) 肥満性皮膚炎の犬にするハタケシメジ熱水抽出物の使用経験.

小動物臨床. 26 :271-274(2007)

(12) Oral Administration of the Extract from Hatakeshimeji(*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom Inhibits the Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice.

Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 53 :293-296(2007)

(13) ハタケシメジ抽出物がビーグル犬のリンパ球数に及ぼす影響についての基礎的検討.

日本獣医師会雑誌. 60. 585-587(2007)

(14) 獣医臨床におけるハタケシメジ抽出物 投与後の末梢血液中のリンパ球数の変化.

Biotherapy. 21. 335-338(2007)

(15) 腫瘍の犬3症例に對するハタケシメジ抽出物の使用經驗
—リンパ球數の変化について—.

動物臨床醫學. 16. 129-132(2007)

(16) ハタケシメジ抽出物によるカルボプラチン投与後の白血球 數減少抑制作用についての基礎
研究.

動物臨床醫學. 17. 87-89(2008)

(17) ハタケシメジ抽出物の細菌による變異原性 とビーグル犬に對する1年間の経口投与の影響.
健康.榮養食品研究. 11. 33-42(2008)

제 2 절 일본 현지 재배농장 견학

1. 우라야마 유한회사

가. 나가노의 우라야마 유한회사는 잣빛 만가닥버섯만을 재배하는 전문농장으로 외부인으로는 최초 방문하여 실제 버섯이 재배되는 전과정에 대하여 견학하였다.



Figure 17. Cultivation farm of Japan

제 7 장 참고문헌

강안석, 차동열, 장현유, 홍인표, 유승현. 1994. 잣빛만가닥버섯의 인공재배법 개발. 농업과학논문집 36(1) : 696-700.

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

이정옥, 김형수, 최응칠, 김병각. 1986. 한국산 고등 균류의 성분 및 배양에 관한 연구 (*Lyophyllum decastes*의 항암 성분 및 배양). 생약학회지. 17(1) : 23-34.

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

우성미, 박용환, 유영복, 신평균, 장갑열, 이강효, 성재모. 잣빛만가닥버섯의 발효톱밥에 의한 인공재배 특성에 관한 연구. 버섯학회지. 2009. Vol. 7, No. 4, pp156-162.

우성미, 박용환, 유영복, 신평균, 장갑열, 진용주, 성재모. 잣빛만가닥버섯의 ITS 영역염기서열 및 RAPD에 의한 계통학적 유연관계 분석. 버섯학회지. 2009. Vol 7, No. 3, pp98-104.

최현우, 박용환. 2007. 잣빛만가닥버섯 재배용 배지 및 이를 이용한 잣빛만가닥버섯의 재배방법, 특허청. 등록번호 100786744.

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

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

Ballancea DJ, and Turnera G. 1985. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 36(3): 321-331.

Bok JW, Kim JP, Jin MR Chio EC, Kim BK. 1994. Studies on protoplast formation and regeneration of *Lyophyllum decastes*. *The Korean Journal of Mycology*. 22(2): 130-133. Chang HH, Hsieh KY, Yeh CH, Tu YP, Sheu F. 2010. Oral administration of an Enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol*. 10(2): 239-46.

Choi HJ, Kim BK, Hyun JW. 2003. Studies on Protoplast Isolation and Regeneration of *Lyophyllum ulmarium*. *Korean Journal of Life Science*. 13(2): 143-149

Iwasa, M., Kaito, M., Horiike, S., Yamamoto, M., Sugimoto, R., Tanaka, H., Fujita, N., Kobayashi, Y. and Adachi, Y. 2000. Hepatotoxicity associated with *Lyophyllum decastes* Sing. (Hatakeshimeji). *J Gastroenterol*. 41(6) : 606-7.

Kang, Y. N., Maenake, Y., Itokawa, T., Yamashita, T., Nakamura, M., Oshima, T., Hasegawa, I., Suzuki, K., Tano, T., Ishida and Gu, Y. H. 2006. Embryonic death effects of hyperthermia induced by RF(Radiofrequency) waves. *Med. Bio*. 150(3) : 97-103.

Leifa F, Huijuan P, Andrea TS, Ashok P, Carlos RS. 2006. Advances in Mushroom Research in the Last Decade. *Biotechnol*. 44(3): 303-311.

Nakamura, T., Itokawa, Y., Tajima, M., Ukawa, Y., Cho, K. H., Choi, J. S., Ishid, T. and Gu, Y. 2007. Radioprotective effect of *Lyophyllum decastes* and the effect on immunological functions in irradiated mice. *J Tradit Chin Med*. 27(1) : 70-5.

Prakash L, Stewart JW, Sherman F. 1974. Specific induction of transitions and transversions of G · C base pairs by 4-nitroquinoline-1-oxide in iso-1-cytochrome c mutants of yeast. *Journal of Molecular*

Biology. 85(1): 51-6.

Sunagawa, M., Tamai, Y., Neda, H., Miyazaki, K., Miura, K. 1995. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. I. Analyses of fusants in edible mushrooms. *Mokuzai Gakkaishi* 41(10) : 945-948.

Tomizawa, M. M., Dias, E. S., de Assis, L. J., Gomide, P. H. O., Bosco dos Santos, J. 2007. Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei* using RAPD markers. *Ciencia e Agrotecnologia* 31(4): 1242-1249.

Toshihiro, M., Mizue, K., Yasushi, I., Naoki, I., Motoshi, K., Park, S. R., Yuuichi, U., Yukio, K. and Ikukatsu, S. 2002. Antidiabetic Activity of *Lyophyllum decastes* in Genetically Type 2 Diabetic Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 25(9) : 1224-1237.

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

Ukawa, Y., Furuichi, Y., Kokean, Y., Nishii, T. and Hisamatsu, M. 2002. Effect of Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom on serum lipid levels in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo). 48(1) : 73-6.

Wu X, Spitz MR, Amos CI, Lin J, Shao L, Jian Gu, Mariza de Andrade, Neal L. Benowitz³ Peter G. Shields, Gary E. Swan. 2006. Mutagen Sensitivity Has High Heritability: Evidence from a Twin Study. *Cancer Res.* 66(12): 5993-5996.

Yasushi, K., Takafumi, N., Hajime, S. and Yukio, F. 2005. Effect of Frying with Edible Oil on Antihypertensive Properties of hatakeshimeji(*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom. *Food Sci. Technol. Res.* 11(3) : 330-343.

Yasushi, O. Murakami, S. Matsumoto, T. Fukumasa-Nakai, Y. 2003. Isolation and characterization of a sporeless mutant in *Pleurotus eryngi*. *Mycoscience*. 44 : 33-40.

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

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 "젯빛 만가닥버섯의 품종육성과 실용적 재배기술 개발"에 관한 연구의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 "젯빛 만가닥버섯의 품종육성과 실용적 재배기술 개발"에 관한 연구의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.