

느티만가닥버섯의 품종 및 안정적 재배기술 개발과
산업화를 위한 기능성 분석

Development of New Cultivar, Stable Cultivation Process and
Functional analysis of *Hypsizigus marmoreus* for the
Industrialization

한국농수산대학

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “느티만가닥벼섯의 품종 및 안정적 재배기술 개발과 산업화를 위한
기능성 분석에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 일

주관연구기관명 : 한국농수산대학

주관연구책임자 : 서 건 식

세부연구책임자 : 서 건 식

연 구 원 : 김 민 경

연 구 원 : 임 정 아

연 구 원 : 권 경 열

협동연구기관명 : (주)제이케이바이오테크

협동연구책임자 : 김 종 균

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 이 만 휘

요 약 문

I. 제 목

느티만가닥버섯의 품종 및 안정적 재배기술 개발과 산업화를 위한 기능성 분석

제1세부과제명 : 유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발

제1협동과제명 : 느티만가닥버섯의 신품종 육성

제2협동과제명 : 느티만가닥버섯의 기능성 효능분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

느티만가닥버섯은 1972년 일본에서 인공재배에 성공하여 현재는 그 생산량이 팽이버섯 다음으로 많은 버섯으로 자리 매김하고 있다. 한국에서도 1980년대 중반 만가닥버섯을 도입 재배하여 “은방울버섯” 등의 이름으로 유통시킨 바 있었으나 정착에 실패하였다. 그러나 2002년에 일본의 다카라주조와 한국의 풀무원의 협약으로 한국에서도 인공재배 되어 현재 “백일송이”라는 이름으로 유통되고 있다. 이 버섯은 균사생장이 매우 늦고 후숙 배양이 필요하여 전체 재배기간이 약 100일 이상 소요된다.

느티만가닥버섯의 국내에서 안정적인 재배를 실현하기 위해서는 80~100일 소요되는 ① 배양 및 숙성과정을 단축시키고 ② 생육과정에서 필수적인 광조사의 비용 등 생산비를 절감할 필요가 있다. 배양 및 숙성과정을 단축시키기 위해서는 저비용, 우량 배지 및 품종개발이 선행되어야하며 소비 촉진을 위하여 식품 및 기능성 성분의 실체를 밝혀야 할 필요가 있다

<유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발>

일본에서 재배법과 품종이 개발되어 현재의 재배법과 품종으로 국내에서 재배한다면 일본에 로열티를 지불해야하는 실정으로 국내의 유전자원 확보 및 재배법 개발이 절실하다. 또한 다양한 유전자원의 확보는 국내 고유 품종 개발을 위하여 매우 중요하다. 일본의 재배 방법으로는 자실체 수확까지 약 120일이 소요되며 광에 민감하여 고품질버섯 생산을 위해서는 재배사 전체를 약 1,000lux 이상으로 유지해야하기 때문에 생산비가 많이 드는 단점이 있어 이를 해결하기 위한 연구가 절실하다.

본 연구의 목적은 느티만가닥 버섯의 국내외 유전자원을 확보하여 유전자원의 재배, 생리학적 특성 분석을 통하여 시험균주와 육종모본을 선발하기 위함이다. 생육기간 단축과 고품질 버섯 생산을 위하여 생육기간별 LED 광원의 최적 광질, 최적 광량, 최적 조사시간을 구명하고, 재배기간의 단축과 비용 절감을 위한 최적배지를 개발하는 것이 목적이다.

<느티만가닥버섯의 신품종 육성>

세계 각국이 종자전쟁에 대비한 유전자원주권 강화추세에 있으며, 2002년 정부의 종자보호에 관한 국제협약(UPOV) 가입 및 2009년 전 농산물의 품종보호대상 지정 등으로 수출 및 국내 유통 종자의 고유성 로열티문제가 심각 품종분쟁의 소지가 있으며 국내에서 생산되는 느티만가닥버섯 품종은 모두 일본품종으로 로열티를 지불 하고 있는 실정에 있어 한국고유

품종육성이 절실한 상태이다.

본 연구의 목적은 방사선 돌연변이 유도로 다양한 만가닥버섯의 변이집단을 육성하고 특성화 하여 육종소재를 확보하고 특유 기능성과 생산성을 나타내는 우량품종을 선발 육성하여 UPOV에 대비한 한국고유 신 품종개발 보급 하는데 있다. TILLING법과 방사선처리에 의한 돌연변이 유도는 버섯류의 새로운 육종 방법으로 널리 활용할 수 있는 기법으로 기대되고 있으며 UPOV 협약에 대비하여 국내의 버섯 품종을 육성하고 보호할 수 있는 방법으로 기대된다.

<느티만가닥버섯의 기능성 효능분석>

생물자원의 무기화, 전략화에 대비하여 국내 생물유전자원 확보와 이용 기술에 대한 국가 전략적 개발 연구가 시급하다. 미국, 일본, 독일 등의 선진각국은 산학연 유기체를 형성한 후, 장기적이며 체계적인 생물자원 수집 및 활용을 위한 화합물 library 구축 등의 기반연구가 이루어지고 있다.

버섯은 항생물질, 항종양물질, 항바이러스물질, 면역조절물질, 혈압조절물질, 혈당조절물질, 콜레스테롤저하물질, 항혈전물질, 간기능 보호물질, 항소염물질 등 다양한 생물활성을 나타내는 것이 알려져 있어 기능성 바이오소재로의 활용가치가 매우 높은 것으로 알려져 있다.

이같이 버섯의 높은 활용가치 및 선진국들의 적극적 활용에도 불구하고, 국내의 산업화연구는 대부분 균사 배양물을 기능성 소재로 이용하려는 연구가 주류를 이루며 자실체의 효능 및 생리활성성분에 관한 연구는 초보적 수준이다. 따라서 버섯의 고분자 활성성분인 다당류와 저분자 생리활성 성분에 관한 체계적인 산업화 연구가 절실히 요구되고 있다.

본 연구에서는 느티만가닥버섯의 자실체와 균사체의 기능성성분을 탐색하고 in vivo 효능 분석을 통하여 산업화 소재로의 개발가능성을 검토하고 이를 적극 홍보하여 소비촉진을 꾀하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 최종 목표는 느티만가닥버섯의 ① UPOV 협약 대비 신품종 육성, ② LED 광원을 이용한 고품질 버섯 생산기술 개발 및 최적 재배환경 구명, ③ 기능성 성분 분석과 효능을 홍보로 소비기반 확대이며 최종 목표를 달성하기 위하여 수행하고자하는 세부과제와 세부과제별 목표 및 연구 범위는 다음과 같다.

<유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발>

- (가) 유전자원확보 : 국내의 유전자원 30균주이상 확보
- (나) 확보유전자원의 재배생리학적 특성 분석 : 확보 유전자원의 재배방식생리학적 특성 분석을 통하여 시험균주와 육종모본 선발
- (다) LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발 : 생육기간 단축과 고품질 버섯 생산을 위하여 생육기간별 LED 광원의 최적 광질, 최적 광량, 최적 조사시간을 구명
- (라) 저비용 속성재배용 배지 개발 : 재배기간 단축과 비용 절감을 위한 최적배지 개발
- (마) 최적 온습도 조건 구명 : 개발된 신품종의 최적 배양 및 생육 환경 조건 구명

<느티만가닥버섯의 신품종 육성>

- (가) 확보유전자원의 분자유전학적 특성분석 : 확보유전자원의 분자유전학적 특성분석을 통

하여 육성모본을 확보하고 국내에서 수집된 유전자원의 차별성을 확보함

(나) 방사선 돌연변이 유기에 의한 고품질 느티만가닥버섯 품종개발 : 방사선 돌연변이 유기하여 고품질, 다수확, 생육기간 단축형 돌연변이 품종을 개발하여 국내 고유품종을 확보함

<느티만가닥버섯의 기능성 효능분석>

느티만가닥 버섯의 자실체와 균사체의 기능성성분을 탐색하고 in vivo 효능분석을 통하여 산업화 소재로의 개발가능성을 검토하고, 기능성 성분은 항산화 활성, 만가닥버섯류의 항암, 면역활성, 만가닥버섯류의 혈행개선 효과 등을 분석하여 그 효능을 밝힘

IV. 연구개발결과

<제1세부과제 : 유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발>

느티만가닥버섯 유전자원은 국내외에서 111 균주를 확보하였다. 이들 균주의 수집 지역별 분포는 한국 자생균주 2균주, 중국 도입균주 35균주, 대만도입균주 13균주이고 나머지는 명확하지 않으나 일본에서 수집된 것으로 추정된다.

본 연구에서 수집한 유전자원은 91균주가 자실체를 형성하였다. 이중 HYM-031, -047, -109균주는 갓의 크기가 크고 갓 표면의 무늬가 없이 옅은 회갈색의 자실체를 형성하였다. 이들 균주는 잣빛만가닥버섯(*L. decastes*)으로 판단된다. 느티만가닥버섯으로 판단되는 나머지 88균주 중 10균주는 흰색 자실체를 형성하였고 나머지 78균주는 전형적인 느티만가닥버섯의 형태를 하고 있었다. URP prime로 RAPD-PCR을 수행하여 UPGMA 분석과 Neighbor-Joining 분석으로 유연관계를 분석한 결과 수집지역, 자실체의 형태 등 특징과는 관계가 없이 4그룹으로 나뉘었다. 많은 균주들이 유사도 100%를 보여 같은 균주가 다른 재배 농가 혹은 지역에서 널리 재배되고 있는 것으로 추정된다. 자실체 형태가 느티만가닥버섯과 달라 잣빛만가닥버섯으로 추정되는 HYM-031, HYM-047, HYM-069, HYM-109균주도 outgroup로 분류되지 않고 cluster 안으로 포함되어 이들 중 역시 유전적으로 매우 밀접한 종으로 추정된다.

재배 생리학적 특성을 분석하기 위하여 한천배지에 배양한 결과 수집된 느티만가닥버섯 균의 균사생장은 RBA, MCM, MEA, PDA 순으로 좋았다.

느티만가닥버섯의 인공재배 조건을 검토한 결과 배양 일수는 전배양이 균사생장이 빠른 균사가 35일에서 균사생장이 늦은 균주는 55일 소요되었으며 후숙 배양까지 포함하여 총 80일 이상 소요되었다.

균급기를 하여 자실체 발생을 유도한 결과 발이소요일수는 7일에서 19일까지 균주별로 매우 다양하였으며 생육일수는 6일에서 14일까지 다양하였다. 종균을 접종하여 배양기간과 자실체 생육일수까지 총 재배소요 기간은 96일에서 107일까지 소요되었다.

느티만가닥버섯 110균주를 인공재배 실험을 실시하여 자실체를 발생한 균주 중 HYM-008, HYM-064, HYM-089, HYM-092 등 4균주가 병당 150g 이상 생산하여 생산성이 매우 우수하였으며 특히 HYM-089 균주는 백색 자실체를 형성하는 균주임에도 150g 이상 생산하여 매우 우수한 것으로 판단된다. 또 HYM-009 등 17 균주도 130g 이상 생산되어 재배용 품종으로 아주 적합한 것으로 판단된다. 그러나 대부분의 균주가 병당 100g 이상을 생산하여 재배용 품종으로 문제가 없을 것으로 판단되었으나 HYM-022 등 23균주는 생산성이 매우 저조하여 100g에도 미치지 못하였다. 국내 야산에서 채집하여 분리한 HYM-069, HYM-109, HYM-110 균주는 100g 미만을 생산하였다.

LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술을 개발하기 위하여 파장이 다른 NUV(Wave length 405nm), Blue(Wave length 460nm), Green(Wave length 530nm), Yellow(Wave length 590nm), Red(Wave length 630nm), White(Wave length 6500K) LED 광원을 조사하면서 균사생장 및 자실체 발생, 생육에 미치는 영향을 조사하였다.

적색광 처리구에서 느티만가닥버섯 균주는 암조건과 비슷한 균사생장을 보여 적색광은 광역제 효과는 없는 것으로 판명되었다. 그러나 청색광, 녹색광, 황색광 처리구에서는 약 10에서 20%의 광역제 효과를 보였다. 느티만가닥버섯의 자실체 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 단파장인 Blue광과 Green광 그리고 White LED 광을 조사한 처리구에서 자실체 품질과 수량이 우수하였으며 장파장인 Red 광과 Yellow 광 처리구에서는 갖의 분화가 불량하고 대가 길어지는 경향을 보여 품질이 저조하였다. LED 광을 사용할 경우 가장 이상적인 조합은 Blue와 White 조합이 가장 좋은 것으로 밝혀졌다.

저비용 속성재배용 배지 개발을 위하여 액체 종균용 배지와 재배용 배지를 선발하였으며 액체종균용 배지는 미강배지가, 재배용배지는 미송톱밥, 콘코브, 대두피, 밀기울을 40:30:15:15(v/v)비율로 혼합한 배지에서 균사생장이 가장 빠르고 수량도 가장 좋았다.

<제 1 협동과제: 느티만가닥버섯의 신품종 육성>

방사선 처리선량 (감마선)에 따른 균사체 및 원형질체로부터 0.25K Gy 방사선량에서 80%이상의 치사율을 보여 변이체 선발 유효조건으로 설정하여 감마방사선 조사 변이체 2,000균주를 분리하였다. 분리한 방사선조사 균사체의 변이는 생장이 느리고 균총 모양에 차이가 있는 것이 약 10% 분리되었다. 변이체균주중 plate상에서 균사의 생장이 빠른 500균주를 선발하여 1차로 M1세대 자실체를 형성하였다. 대조구로 사용한 느티만가닥 Brown균주와 비교하여 생장이 우수한 150균주를 2차로 선발하여 M2세대 자실체를 형성하였다. M2세대 자실체에서 대조균주보다 생장이 빠르고 생산량이 높은 50균주를 선발하였다. 최종으로 10균주의 생산과 품질이 우수한 균주를 선발하고, URP-PCR primer를 이용하여 느티만가닥버섯 방사선 변이체의 PCR 다형성 분석을 실시한 결과, 특이적인 PCR 다형성 밴드는 검출되지 않았지만 대조구로 사용한 느티만가닥 Brown균주보다 생산량이 증가하고, 품질이 우수한 10균주를 최종 선발하였다.

<제2협동과제: 느티만가닥버섯의 기능성 효능분석>

느티만가닥 버섯의 메탄올 추출물은 농도 의존적으로 콜라겐에 유도된 혈소판 응집반응을 억제하였으나 ADP나 트롬빈에 유도된 혈소판 응집반응에는 효과를 보이지 않았다. 추출물은 콜라겐에 유도된 혈소판의 세포내 칼슘농도의 증가와 ATP 분비를 감소시켰다. 또한 추출물은 콜라겐에 유도된 fibrinogen의 integrin 결합을 억제시켰음. 하지만 ERK의 인산화에는 아무런 효과도 보이지 않았다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

<제1세부과제 : 유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발>

- 본 연구를 통하여 느티만가닥버섯 유전자원 110균주를 확보하였으며 이는 육종 소재로 활용할 계획이며 신품종 등록 예정임
- 품종의 지적재산권 확보 및 신규 품종등록으로 새로운 종균의 산업화에 기여

- LED 광원을 이용한 고품질 버섯 생산기술 개발 및 최적 재배환경 구명하여 에너지 절감형 재배기술을 확보하고 이를 식용버섯류의 재배에 응용하여 버섯산업의 발전을 도모할 수 있음. 이 결과는 재배 농가에 기술을 보급하여 생산성 향상과 생산비 절감에 기여할 수 있음
- 고품질버섯 생산과 배양기간 단축을 위한 첨가제 및 저비용 배지재료 개발로 생산비 절감을 가져와 느티만가닥버섯의 국내 재배 보급에 기여할 것임
- 고품질버섯 생산을 위한 최적 온습도 조건 구명으로 버섯생산의 안정화를 꾀할 수 있었으며 이 결과는 재배 농가에 기술을 보급하여 생산성 향상에 기여할 수 있음

<제 1 협동과제: 느티만가닥버섯의 신제품 육성>

- 방사선 돌연변이체를 이용한 버섯 품종 육종법을 개발, 보급하여 국내 버섯류의 품종 육성에 신기술을 제공할 것임. 이 결과는 식용버섯류의 육종에 활용할 수 있음
- 방사선 돌연변이체 집단을 확보함으로써 육종 모본체로서의 활용
- 방사선을 이용한 만가닥버섯 자원개발과 국내 유전자원의 확보는 UPOV 협약에 따른 품종 로얄티 지불에 대응하여 국내외 경쟁력 및 지적재산권제고에 기여

<제2협동과제: 느티만가닥버섯의 기능성 효능분석>

- 느티만가닥 버섯의 자실체와 균사체의 식품영양성분 및 기능성성분을 탐색하고 in vivo 효능분석을 통하여 산업화 소재로 개발하고 여기에서 얻어지는 성과를 적극 홍보하여 버섯의 소비 확대에 기여
- 느티만가닥버섯의 재배 안정화와 대량생산으로 먹거리의 다양화와 외국 바이어의 다양한 요구에 부응하여 수출증대에 기여할 것으로 기대

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of New Cultivar, Stable Cultivation Process and Functional analysis of *Hypsizygus marmoreus* for the industrialization

<The 1st particulars project> Procurement of the genetic source of *Hypsizygus marmoreus* and development of stable cultivation technique.

<The 1st cooperated project> Development of new variety of *Hypsizygus marmoreus*

<The 2nd cooperated project> Analysis of functional efficacy of *Hypsizygus marmoreus*

II. Purpose and Significance of Research

- To shorten timescale and reduce cost of the cultivation, we evaluated of optimum quality, amount and time duration of the light.
- To obtain fosterage sample of *Hypsizygus marmoreus* and develop mutated mycelium of high-quality that has rapid growth rate
- To obtain fosterage sample of *Hypsizygus marmoreus* and develop mutated mycelium of high-quality that has rapid growth rate
- To investigate functional efficacies of mycelia and fruiting bodies from *Hypsizygus marmoreus*

III. Contents and Scope of Research

- securement of genetic source of *Hypsizygus marmoreus*
- analysis of cultivation characteristic of secured genetic sources
- development of cost-reducing cultivation technique using LED light source
- development of low-cost medium for *Hypsizygus marmoreus* cultivation
- evaluation of optimum temperature and humidity
- RAPD-PCR, AFLP analysis of secure genetic information
- Development of high-quality mutated mycelium derived form irradiation
- exploration of nutritional and functional contents
- evaluation of antioxidant, anti-tumor and immuno-modulatory effects
- improvement effect of blood circulation

IV. Results of Research

<The 1st particulars project> Procurement of the genetic source of *Hypsizygus marmoreus* and development of stable cultivation technique.

111 strains of *Hypsizygus marmoreus* were collected from the domestic and international. The geographic distribution of strains collected wild strains of the two strains

of Korea, 35 strains from China, 13 strains isolates in Taiwan and the rest of the introduction is unclear, but is estimated to be collected in Japan.

Genetic resources collected in this study, 91 strains formed fruiting bodies. Isolates HYM-031, -047 and -109 strains was form to large pileus and pale with fresh brown pattern on the surface of the pileus. These strains is determined by L. decastes. Out of 88 strains of *Hypsizigus marmoreus*, 10 of the remaining 88 isolates were strains of white remaining 78 strains formed fruiting bodies typical *Hypsizigus marmoreus* types of mushrooms had been stranded.

UPGMA analysis and Neighbor-Joining analysis based on RAPD-PCR with URP primer, a flexible relationship collecting area, the shape of fruiting bodies, without regard to such features were divided into four groups. Many strains showing 100% similarity with the same strain, or other farmers in the region is estimated to be widely grown. Isolates HYM-031, HYM-047, HYM-069 and HYM-109 is not classified as outgroup strains included in cluster also genetically very closely kinds of those species is estimated..

In order to analyze the cultivation-physiological characteristics were cultured on agar medium, mycelial growth of *Hypsizigus marmoreus* were RBA, MCM, MEA, PDA good order. *Hypsizigus marmoreus* of artificial cultivation of mushroom cultivation conditions, review the results of the ex-amount of days the fast spawn mycelial growth by 35 days late strains of mycelial growth was 55 working days up to and including maturing culture took a total of 80 days or more. The days required for initiation was vary by strain 7 to 19 days the growth was varied from 6 to 14 days. Inoculated with spawn and fruiting growth of the incubation period of days it takes a total cultivation period of 96-107 days have been spent. Artificial mushroom cultivation experiments carried out on 110 strains that caused the fruiting bodies of strain HYM-008, HYM-064, HYM-089, HYM-092, and four strains produced by more than 150g per a bottle productivity were very good, especially HYM-089 strains of white strains to form fruiting bodies being produced by more than 150g is considered very good. The HYM-009, and 17 strains have been produced more than 130g by growing varieties are considered very appropriate. However, most strains can produce more than 100g per a bottle growing varieties is not considered an issue, but the 23 strains including HYM-022, with very low productivity did not even 100g. Collected from wild and domestic disconnect HYM-069, HYM-109, HYM-110 strain was producing less than 100g.

LED lights for energy-saving cultivation techniques to develop a different wavelength NUV (Wave length 405 nm), Blue (Wave length 460 nm), Green (Wave length 530 nm), Yellow (Wave length 590 nm), Red (Wave length 630 nm), White (Wave length 6500K) LED light source, while investigating the mycelial growth and fruiting occurs, the impact on growth were investigated. In treatments red ligh, the mycelial growth of strains show similar dark condition, effect of red light was found to be without. However, Cool white, green, yellow light approximately 10-20% of treatment effects were light inhibited. Fruiting body survey of the impact on growth wave president and white LED light, blue light and

green light treatments examined were excellent quality and quantity in the fruiting body present, Red light and yellow light-wave treatment and a poor differentiation pileus, price increases tend to show the quality was poor. If use the LED light is the ideal combination of blue and white combination was found to be the best.

To develop low-cost medium, rice bran extract medium selected to best medium for liquid media. For cultivation, media with Douglas fir sawdust, corn cob, soybean seedcake and wheat bran[40:30:15:15 (v/v)] mixture as a percentage mycelial growth in the medium of the fastest, most good quantity.

<The 1st cooperated project : Development of new variety of *H. marmoreus* >

This study was performed to develop new *Hypsizygus marmoreus* cultivars that have enhanced functional materials and improved physiological characteristics with mutagenesis by gamma ray irradiation. Protoplasts of *H. marmoreus* brown strain HYM-056 were irradiated by gamma ray for mutagenesis, and then 2,000 clones of mutants were randomly selected and the fruiting bodies were induced by bottle culture. Among them, 157 isolates with fast-growing, heavy and many fruiting body-producing were selected. The isolates were cultured in plastic bottle containing rice bran, barley hulls and fir sawdust to form the fruiting bodies. About 100 days after inoculation, characteristic of fruiting bodies were investigated. The isolates were divided into 6 groups based on color, shape and size of pileus, and length, diameter, number and weight of stipe. In addition, the genetic variation of the isolates was analyzed by URP-PCR fingerprinting.

<The 2nd cooperated project : Analysis of functional efficacy of *H. marmoreus*>

We found that *H. marmoreus* methanol extract dose-dependently inhibited platelet aggregation that was induced by collagen, but not by thrombin or ADP. Collagen-induced intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ was also dose-dependently suppressed in *H. marmoreus* extract treated platelets. In addition, collagen-activated ATP secretion was lowered by the *H. marmoreus* extract treatment. Moreover, *H. marmoreus* extract was revealed to attenuate fibrinogen binding initiated by collagen. However, ERK phosphorylation was not affected.

In conclusion, *H. marmoreus* extract inhibit platelet aggregation induced by collagen, intracellular calcium mobilization, and dense granule secretion while suppressing integrin α IIb β 3 activation. Finally, this suggests that *H. marmoreus* could be developed as a functional food or phytomedicine against platelet related cardiovascular disease, including thrombosis, stroke, and atherosclerosis.

CONTENTS

Chapter 1	Overview of R & D projects	15
Section 1	The purpose and need for R & D projects	15
Section 2	Range of R & D projects	19
Chapter 2	Domestic and foreign technical developments	22
Chapter 3	Contents and results of research performed	23
Section 1	Collecting and stable development of cultivation techniques of genetic resources	23
1.	Introduction	23
2.	Materials and Methods	25
(1)	Collecting of genetic resources of <i>H. mamoreus</i>	25
(2)	Analysis of genetic diversity of genetic resources	26
(3)	Cultivation and Physiological characteristics of genetic resources	27
(4)	Effect of maturing culture periods on the fruiting	27
(5)	Development of energy-saving cultivation technology using LED light	27
(6)	Development of low-cost medium	28
(7)	Establish a stable cultivation methods	29
3.	Result and Discussion	30
(1)	Collecting of genetic resources of <i>H. mamoreus</i>	30
(2)	Analysis of genetic diversity, genetic resources collected by URP-PCR analysis	35
(3)	Cultivation and Physiological characteristics of genetic resources	38
(4)	Effect of maturing culture periods on the fruit development	44
(5)	Development of energy-saving cultivation technology using LED light	45
(6)	Development of low-cost medium	59
(7)	Establish a stable cultivation methods	64
4.	Summary	68
Section 2	Development of new varieties of <i>H. mamoreus</i>	70
1.	Introduction	70
2.	Materials and Method	70
(1)	Establishment of mutation condition using radiation	70
(2)	Analysis of molecular genetic characterization of genetic resources	70
(3)	Development of mutant M1 generation and characteristics of fruit body	73
(4)	Development and genetical mutation analysis of M2, M3, M4 generation	74
3.	Result and Discussion	74
(1)	Establishment of mutation condition using radiation	74

(2) Analysis of molecular genetic characterization of genetic resources	75
(3) Development of mutant M1 generation and characteristics of fruit body	76
(4) Development and genetical mutation analysis of M2, M3, M4 generation	82
4. Summary	87
Section 3 Food & Nutrition, navigation and effectiveness analysis of functional materials ...	88
1. Introduction	88
2. Materials and Method	88
(1) Analysis of food ingredients	88
(2) <i>in vitro</i> analysis of functional of mycelia anf fruit body	88
(3) <i>in vivo</i> analysis of functional of mycelia anf fruit body	89
3. Result and Discussion	91
(1) Food ingredients of <i>H. mamoreus</i>	91
(2) <i>in vitro</i> analysis of functional of mycelia anf fruit body	92
(3) <i>in vivo</i> analysis of functional of mycelia anf fruit body	102
4. Summary	104
Chapter 4 Goals and contribution to related areas	106
Chapter 5 Result of R & D and Utilization plan of the results	108
Chapter 6 International Scientific and Technical Information	112
Chapter 7 Reference	113

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제1절	연구개발 목적 및 필요성	15
제2절	연구개발 범위	19
제 2 장	국내외 기술개발 현황	22
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	23
제1절	유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발	23
1.	서 론	23
2.	재료 및 방법	25
가.	느티만가닥버섯의 유전자원 확보	25
나.	확보 유전자원의 유전적 다양성 분석	26
다.	확보 유전자원의 재배생리학적 특성	27
(1)	한천배지에서 수집균주의 배양적 특성	27
(2)	톱밥배지에서 수집균주 자실체의 인공재배	27
라.	후배양 기간이 자실체 생육에 미치는 영향	27
마.	LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발	27
(1)	광질이 느티만가닥버섯균의 균사 생장에 미치는 영향	27
(2)	광질이 느티만가닥버섯균의 자실체 생장에 미치는 영향	27
(3)	혼합 LED 광처리가 느티만가닥버섯균의 자실체 생장에 미치는 영향	28
(4)	광조사시기다 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향	28
(5)	광량이 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향	28
바.	저비용 속성재배용 배지 개발	28
(1)	액체종균용 염가 배지 개발	28
(2)	첨가제가 느티만가닥버섯의 균사생장에 미치는 영향	29
(3)	느티만가닥버섯 재배를 위한 최적 배지 선발	29
사.	안정적 재배법 확립	29
3.	결과 및 고찰	30
가.	느티만가닥버섯의 유전자원 확보	30
나.	URP-PCR 분석에 의한 수집 유전자원의 유전적 다양성 분석	35
다.	확보 유전자원의 재배생리학적 특성	38
(1)	한천배지에서 균사 생장 조사	38
(2)	공시균주의 인공재배조건 검토	40
(3)	인공재배 자실체의 형태 및 수량성 조사	41

라. 후배양 기간이 자실체 생육에 미치는 영향	44
마. LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발	45
(1) 광질이 느티만가닥버섯균의 균사 생장에 미치는 영향	45
(2) 광질이 느티만가닥버섯균의 자실체 생장에 미치는 영향	46
(3) 혼합 LED 광 처리가 느티만가닥버섯균의 자실체 생장에 미치는 영향	51
(4) 광 조사시기가 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향	52
(5) 광량이 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향	54
바. 저비용 속성재배용 배지 개발	59
(1) 액체종균용 염가 배지 개발	59
(2) 첨가제가 느티만가닥버섯의 균사생장에 미치는 영향	61
(3) 느티만가닥버섯 재배를 위한 최적 배지 선발	63
사. 안정적 재배법 확립	64
4. 요약	68
제2절 느티만가닥버섯의 신품종 육성	70
1. 서론	70
2. 재료 및 방법	70
가. 느티만가닥버섯의 방사선 돌연변이 유기 조건 확립	70
(1) 느티만가닥버섯의 원형질체 분리	70
(2) 균사절편의 제조	71
(3) 감마 방사선을 이용한 느티만가닥버섯의 돌연변이 유기	71
나. 확보 유전자원의 분자유전학적 특성 분석	71
(1) Genomic DNA 분리	71
(2) RAPD-PCR 핵산지문 분석	72
다. 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사	73
라. M2, M3, M4로 육성 및 변이체의 유전적 변이부위 분석, 특성조사	74
3. 결과 및 고찰	74
가. 느티만가닥버섯의 방사선 돌연변이 유기 조건 확립	74
(1) 원형질체를 이용한 방사선 돌연변이체 유기조건 확립	74
나. 확보 유전자원의 분자유전학적 특성 분석	75
다. 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사	76
(1) 방사선돌연변이체를 순수 분리하여 PDA 배지에서의 균사생장과 형태적 특성 조사	76
(2) 방사선돌연변이체의 톱밥배지에서의 성장속도 비교	77
(3) 느티만가닥버섯의 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사	79
(4) 감마방사선을 이용한 느티만가닥 M1세대의 분자유전학적 특성 분석	80
라. M2, M3, M4로 육성 및 변이체의 유전적 변이부위 분석, 특성조사	82
4. 요약	87
제3절 느티만가닥버섯의 식품영양성분, 기능성 물질 탐색 및 효능분석	88

1. 서론	88
2. 재료 및 방법	88
가. 느티만가닥버섯의 식품성분 분석	88
나. 시험관내 방법에 의한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석	88
(1) DPPH radical scavenging activity	88
(2) 항암, 면역활성	88
다. 동물실험을 통한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석	89
(1) 혈소판 응집반응에 미치는 효과 규명	89
(2) rat의 혈전형성에 미치는 효과 규명	90
3. 결과 및 고찰	91
가. 느티만가닥버섯의 식품성분 분석	91
(1) 느티만가닥버섯 자실체의 일반성분 조사	91
(2) 느티만가닥버섯 열수추출물의 GC mass 분석	92
나. 시험관내 방법에 의한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석	92
(1) 느티만가닥버섯의 면역활성	92
(2) 느티만가닥 버섯의 항산화능	93
(3) 느티만가닥 버섯의 항암활성	94
(4) 느티만가닥버섯 열수 추출물의 혈소판응집반응 억제능	95
(5) 느티만가닥버섯 메탄올 추출물의 혈소판응집반응 억제능	98
다. 동물실험을 통한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석	102
(1) 느티만가닥버섯 추출물이 랫트 흉대동맥윤에 미치는 영향	102
4. 요약	104
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	106
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	108
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	112
제 7 장 참고문헌	113

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적 및 필요성

느티만가닥버섯은 1972년 일본의 “다카라주조”에서 인공재배에 성공하여 나가노켄 (長野縣) 을 중심으로 재배하였으나 1990년에 “다카라 1호”균의 특허기간이 종료되어 재배가 일본 전국에서 이루어졌다. 일본에서 느티만가닥버섯은 비교적 새로운 버섯으로 독특한 맛과 다양한 요리에 사용될 수 있어 시장에서 높은 평가를 받아 고가로 판매되어 왔으며 현재는 그 생산량이 팽이버섯 다음으로 많은 버섯으로 자리 매김하고 있다. [일본의 버섯생산량, 2010년 : 팽이버섯(131,107톤), 만가닥(108,104톤), 생표고(70,342톤), 잎새버섯(43,398톤), 큰느타리(새송이, 38,214톤), 맛버섯(25,945톤), 건표고(3,867톤), 기타(4,476톤)-2010年版きのこ年鑑, 農村文化社]

한국에서도 1980년대 중반 일본에서 팽이버섯 균주와 재배법을 도입할 무렵에 일부 사업장에서 만가닥버섯을 도입 재배하여 “은방울버섯” 등의 이름으로 유통시킨 바 있었으나 소비자와 시장의 인식부족으로 재배, 유통에 실패하였다.

그러나 2002년에 일본에서 만가닥버섯의 품종과 재배법을 최초로 개발한 다카라주조와 한국의 풀무원의 협약으로 한국에서도 인공재배 되어 현재 “백일송이”라는 이름으로 유통되고 있다. 이 버섯은 군사생장이 매우 늦고 후숙 배양이 필요하여 전체 재배기간이 약 100일 소요된다. 그래서 상품명을 백일송이로 명명하였으며 150g 1봉지에 소비자가격 1,500원 이상의 고가버섯으로 유통되고 있다. 국내에서 풀무원-다카라아그리는 느티만가닥버섯을 2003년부터 1일 약 3,500병 규모로 재배생산, 유통하였으며 2007년부터는 팽이버섯 재배유통 전문업체인 그린피스에 1일 10,000병 규모의 OEM 생산을 체결하기도 하였으나 2008년에 다카라주조가 한국에서 철수하면서 풀무원에서는 다카라주조에 품종사용료를 지불하는 것으로 알려져 있다.

국내 버섯산업은 느타리, 팽이, 새송이, 양송이, 표고재배를 중심으로 진행되어 왔으나 2000년대 이후 국내 경기의 침체, 자동화 시설재배에 의한 과잉생산 등으로 최근에는 미주, 유럽, 중국 등지에 수출을 꺾고 있다.

그러나 주요 수입국에서는 국내의 수출 유망품목인 느타리, 팽이, 새송이와 함께 일본에서 많이 재배되고 있는 느티만가닥버섯과 잎새버섯도 함께 수출할 것을 요구하는 경우가 많아 이들 버섯의 재배가 절실한 실정이다.

<유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발>

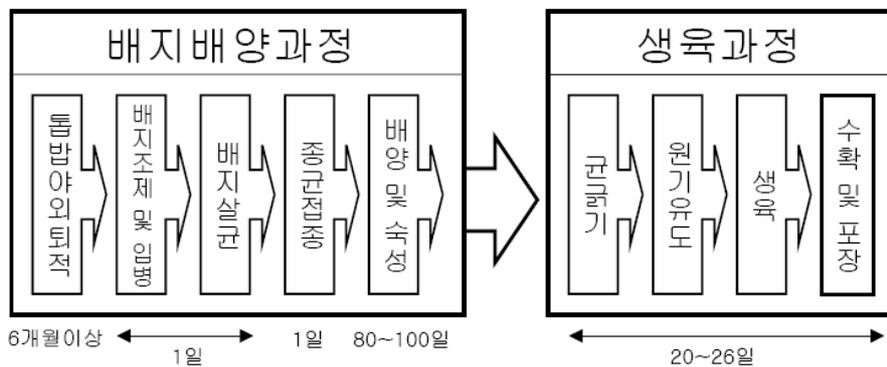
느티만가닥버섯은 주름버섯목 송이과에 속하는 버섯으로 활엽수 그루터기에 발생하는 목재부후균이며 우리나라에서도 자생하기 때문에 유전자원 확보에는 큰 문제가 없다. 그러나 일본에서 재배법과 품종이 개발되어 현재의 재배법과 품종으로 국내에서 재배한다면 일본에 로열티를 지불해야하는 실정으로 국내의 유전자원 확보 및 재배법 개발이 절실하다. 다양한 생리, 형태적, 기능적 변이를 가진 유전자원은 육종소재로 유용하며 향후 품종개발을 위하여 매우 중요한 유전자원이 될 수 있으며 다양한 유전자원의 확보는 국내 고유 품종 개발을 위하여 매우 중요하다.

느티만가닥버섯 재배의 원조라고 할 수 있는 일본에서 개발된 재배법은 자실체 수확까지 약 120일이 소요되며 광에 민감하기 때문에 고품질버섯 생산을 위해서는 재배사 전체를 약 1,000lux 이상으로 유지해야하기 때문에 생산비가 많이 드는 단점이 있어 국내에서의 재배 유통이 쉽지 않은 실정이다.

느티만가닥버섯의 안정적인 재배를 국내에서 실현하기 위해서는 80~100일 소요되는 ① 배양 및 숙성과정을 단축시키고 ② 생육과정에서 필수적인 광조사의 비용 등 생산비를 절감할 필요가 있다.

배양 및 숙성과정을 단축시키기 위해서는 저비용, 우량 배지개발이 선행되어야하며 신규 품종 육종 목표를 배양기간을 단축시키는 것으로 할 필요가 있다.

버섯 균의 생장은 영양생장과 생식생장으로 나눌 수 있으며 각각의 생육기간 동안 각각 다른 환경요인(광, 온도, 습도, 환기 등)을 요구하기 때문에 각각의 시기에 가장 효과적인 환경을 만들어 주는 것이 고품질버섯을 생산하기 위한 필수조건임. 요구되는 환경조건 중에서 광은 균사생장기인 영양생장기에는 필요하지 않지만 자실체를 형성하는 생식생장기에는 양송이버섯을 제외하고 광의 조사가 필수적으로 작용한다.



(느티만가닥버섯의 재배공정)

느티만가닥버섯의 배양 및 숙성과정을 단축시키기 위해서는 저비용, 우량 배지개발이 선행되어야하며 신규 품종 육종 목표를 배양기간을 단축시키는 것으로 할 필요가 있다.

버섯 균의 생장은 영양생장과 생식생장으로 나눌 수 있으며 각각의 생육기간 동안 각각 다른 환경요인(광, 온도, 습도, 환기 등)을 요구하기 때문에 각각의 시기에 가장 효과적인 환경을 만들어 주는 것이 고품질버섯을 생산하기 위한 필수조건임. 요구되는 환경조건 중에서 광은 균사생장기인 영양생장기에는 필요하지 않지만 자실체를 형성하는 생식생장기에는 양송이버섯을 제외하고 광의 조사가 필수적이다. 따라서 버섯을 생산하기위해서 재배사에는 조명시설을 설치하고 있는데 대부분이 광원으로 백열등이나 백색형광등을 사용하고 있고 이들 광원은 가시광선의 파장역을 거의 포함하고 있기 때문에 청색광 영역에서 생식생장이 유도되는 담자균류의 재배에는 부적합할 뿐 아니라 운용 비용도 많이 소요되는 편이다.

최근에 차세대 조명기구로 각광을 받고 있는 LED(Light Emitting Diode) 광원은 파장영역을 단파장으로 나눌 수 있기 때문에 가장 효과적인 파장영역 만을 버섯에 조사하여 생산비를 절감하고 고품질버섯을 생산할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

또한 LED 산업은 차세대국가 동력산업으로 지정(2015년 세계 7대 조명산업 기술 강국 실

현 목표)되어 차후에는 모든 조명기구가 LED 광으로 전환될 가능성이 있으며 이에 대비 하여 버섯 재배사에 사용되는 최적의 광과장을 구명할 필요가 있다.

LED란 '발광 다이오드'(Light Emitting Diode)의 약자로 전류가 흐를 때 빛을 내는 일종의 반도체로 기존 전구나 네온등과 달리 전력 소모가 적어 업계에서는 차세대 광원(光源)으로 각광받고 있다. LED의 전력 소비량은 일반 백열등의 17%, 형광등의 67% 수준이며, 백열등이나 삼파장등이 열로 인한 에너지 손실이 최고 95%에 달하는데 반해 LED 조명은 전기 에너지의 90% 이상을 빛으로 바꿔 에너지 절감 효과가 높은 특징이 있다. 또한 LED 광원은 네온형광등 대비 8배 이상의 수명을 보여 유지보수가 용이하며 비용을 절감할 수 있다(백열등 수명 1,000시간, 형광등 8,000시간, LED 20,000시간).

산업자원부에 따르면 국내 조명의 30%만 LED로 교체할 경우 연간 1조6000억원 가량의 에너지를 절감할 수 있는 것으로 추하고 있으며, LED조명은 화력발전소 등의 이산화탄소 배출량을 줄일 수 있고, 기존 조명기구와 달리 수은 납 등 유해물질이 들어있지 않기 때문에 조명기구에 대해서도 환경규제를 엄격히 하고 있는 유럽연합(EU) 등에도 수출할 수 있는 효과 품목으로 국내 기업들 사이에서도 관심을 끌고 있다.

버섯 재배에 LED 광을 적용하면 단과장을 조사할 수 있기 때문에 버섯의 품질을 높이고 생육기간을 단축시킬 수 있으며 생산비를 절감하는 효과를 얻을 것으로 기대되고 있다.

<느티만가닥버섯의 기능성 효능분석>

생물자원의 무기화, 전략화에 대비하여 국내 생물유전자원 확보와 이용 기술에 대한 국가 전략적 개발 연구가 시급함. 미국, 일본, 독일 등의 선진각국은 산학연 유기체를 형성한 후, 장기적이며 체계적인 생물자원 수집 및 활용을 위한 화합물 library 구축 등의 기반연구가 이루어지고 있다.

버섯은 항생물질, 항종양물질, 항바이러스물질, 면역조절물질, 혈압조절물질, 혈당조절물질, 콜레스테롤저하물질, 항혈전물질, 간기능 보호물질, 항소염물질 등 다양한 생물활성을 나타내는 것이 알려져 있어 기능성 바이오소재로의 활용가치가 매우 높은 것으로 알려져 있다.

버섯 유래 생리활성소재를 개발하기 위한 연구는 1970년 초부터이며 버섯류가 생산하는 다당류(polysaccharide)를 항암면역증강제로 개발하는 연구가 주류를 이루고 있다. 그 결과 구름버섯 배양균사체로부터 분리하여 Sankyo에 의하여 제조 판매되고 있는 항종양제품 krestin (PSK), 표고버섯 자실체로부터 분리, 정제하여 Aginomoto, Yamanouchi 제약, Morisita 제약 등에 의해서 판매되고 있는 생체방어 증강물질 lentinan, *Schizophyllum commune* 균주의 배양 시에 균체외로 분비되는 다당류를 활용한 schizophyllan 등이 개발되어 시판되고 있다.

국내에서는 한국신약, 광동제약, 일양약품 등에서 다당체 항암활성물질을 개발하였는데 한국신약에서 *Phellinus linteus*로부터 meshima, 광동제약에서 *Coprinus versicolor*로부터 copolang이 개발되어 시판되고 있고, 일양약품에서는 *Ganoderma applanatum*으로부터 간염 치료 물질을 분리하여 개발연구가 진행 중에 있다.

버섯 유래 다당류의 화학구조는 β -glucan이며 모두 평균 분자량이 10만-50만 정도의 화합물로, macrophage, 보체, T cell, B cell, NK cell 등에 관여하여 면역기능을 활성화하고 인터페론이나 인터루킨 등의 cytokine의 생성을 촉진시킴으로 항암효과를 나타내므로 화학요법제의 상용에 따른 부작용의 문제점이 없다.

제품화된 상기의 면역조절 항암활성물질 이외에도 Polyporaceae (구멍장이 버섯과), Tricholomataceae (송이버섯과), Agaricaceae (주름버섯과) 등에 속하는 버섯류, *Ganoderma lucidum* (불로초), *Griboia frondosa* (일새버섯), *Flammulina velutipes* (팽나무버섯), *Pleurotus ostreatus* (느타리)의 자실체 및 균사 배양액으로부터 항종양 활성을 나타내는 다당류가 분리된 바 있으나 느티만가닥버섯의 성분 및 효능 연구는 찾아 보기 어렵다.

이같이 버섯의 높은 활용가치 및 선진국들의 적극적 활용에도 불구하고, 국내의 산업화 연구는 대부분 균사 배양물을 기능성 소재로 이용하려는 연구가 주류를 이루며 자실체의 효능 및 생리활성성분에 관한 연구는 초보적 수준이다. 따라서 버섯의 고분자 활성성분인 다당류와 저분자 생리활성 성분에 관한 체계적인 산업화 연구가 절실히 요구되고 있다.

자생 버섯류 및 기능성 버섯으로부터 분리한 활성소재 및 버섯 가공제품에 대하여 생물학적 효능을 구명하기 위한 실험동물 수준에서의 생물활성 검정이 필요하다.

<느티만가닥버섯의 신제품 육성>

세계 각국이 종자전쟁에 대비한 유전자원주권 강화추세에 있으며, 2002년 정부의 종자보호에 관한 국제협약(UPOV) 가입 및 2009년 전 농산물의 품종보호대상 지정 등으로 수출 및 국내 유통 종자의 고유성 로열티문제가 심각 품종분쟁의 소지가 있으며 국내에서 생산되는 느티만가닥버섯 품종은 모두 일본품종으로 로열티를 지불 하고 있는 실정에 있어 한국고유 품종육성이 절실한 상태이다.

버섯에 존재하는 건강기능성 물질의 함량을 강화한 새로운 개념의 품종의 개발을 통하여 침체기에 있는 만가닥버섯류의 국내수요에 새바람을 일으키고, 수출시장 개척과 확대를 꾀할 필요가 있다.

바이오 기술을 이용한 식품을 둘러싼 논쟁은, 유전자 조작 기술에 집중하고 있으며, 유전자 조작에서는 다른 생물종의 유전자가 삽입과 유전자 삽입여부를 검출 하는 항생제 마커가 문제점이 되고 있으나 방사선돌연변이체 유기에 따른 품종개발은 원래 그 생물에 존재하는 유전자 밖에 사용하지 않기 때문에 유전자 변형산물 논란에서 자유스러울 수 있다. 돌연변이 유도 기술은 많은 방법이 개발되어 있으나 이중 안전이 확보된 방법은 그다지 많지 않다. 방사선은 돌연변이 처리제로 매우 유용하며, 시간과 노동력의 차원에서 비교적 효과적인 방법이며, 이것의 기작은 DNA염기서열의 변화를 일으키고, DNA가닥의 절단에 의해 돌연변이가 유기됨으로 인하여 화학적 또는 UV조사 등에 의한 방법보다 유전적 변이가 뚜렷히 나타나는 특징이 있어 새로운 품종개발에 유용하게 사용되고 있다. 유전적 변이를 확인하는 방법으로는 모든 돌연변이 개체를 재배해 보지 않고 유전자 변이를 분석하는 방법이 매우 유용하게 사용될 수 있는데 그 중 TILLING법(Targeting Induced Local Lesions In Genomes)은 셀러리에서 추출한 효소인 CEL1으로 유전자를 절단하여 변이체와 야생주간의 변이부위를 확인할 수 있는 방법으로 변이부위를 증명하고 새로운 품종의 특성을 증명 할 수 있는 매우 유용한 방법으로 버섯의 품종육성에 새로운 기술로 기대되는 기술이나 버섯균에서 활용한 예는 그다지 많지 않다.

TILLING법과 방사선처리에 의한 돌연변이 유도는 버섯류의 새로운 육종 방법으로 널리 활용할 수 있는 기법으로 기대되고 있으며 UPOV 협약에 대비하여 국내의 버섯 품종을 육성하고 보호할 수 있는 방법으로 기대된다.

제2절 연구개발 목표 및 범위

본 연구의 최종 목표는 느티만가닥버섯의 ① UPOV 협약 대비 신품종 육성, ② LED 광원을 이용한 고품질 버섯 생산기술 개발 및 최적 재배환경 구명, ③ 기능성 성분 분석과 효능을 홍보로 소비기반 확대이며 최종 목표를 달성하기 위하여 수행하고자하는 세부과제와 세부과제별 목표 및 연구 범위는 다음과 같다.

<유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발>

- (가) 유전자원 확보 : 국내외 유전자원 30균주이상 확보
- (나) 확보유전자원의 재배생리학적 특성 분석 : 확보 유전자원의 재배방식생리학적 특성 분석을 통하여 시험균주와 육종모본 선발
- (다) LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발 : 생육기간 단축과 고품질 버섯 생산을 위하여 생육기간별 LED 광원의 최적 광질, 최적 광량, 최적 조사시간을 구명
- (라) 저비용 속성재배용 배지 개발 : 재배기간 단축과 비용 절감을 위한 최적배지 개발
- (마) 최적 온습도 조건 구명 : 개발된 신품종의 최적 배양 및 생육 환경 조건 구명

<느티만가닥버섯의 신품종 육성>

- (가) 확보유전자원의 분자유전학적 특성분석 : 확보유전자원의 분자유전학적 특성분석을 통하여 육종모본을 확보하고 국내에서 수집된 유전자원의 차별성을 확보함
- (나) 방사선 돌연변이 유기에 의한 고품질 느티만가닥버섯 품종개발 : 방사선 돌연변이 유기하여 고품질, 다수확, 생육기간 단축형 돌연변이 품종을 개발하여 국내 고유품종을 확보함

<느티만가닥버섯의 기능성 효능분석>

느티만가닥 버섯의 자실체와 균사체의 기능성성분을 탐색하고 in vivo 효능분석을 통하여 산업화 소재로의 개발가능성을 검토하고, 기능성 성분은 항산화 활성, 만가닥버섯류의 항암, 면역활성, 만가닥버섯류의 혈행개선 효과 등을 분석하여 그 효능을 밝힘

<연차별 연구개발의 목표 및 내용>

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	2008	제1세부	○ 유전자원 확보 (30균주 이상)	- 국내외 유전자원 보존기관 분양의뢰, 시판버섯에서의 조직분리, 야생버섯수집분리
			○ 확보유전자원의 재배생리학적 특성 분석	- 한천배지 및 톱밥 배지에서 균사 생장조사 - 기 확보균주(5균주)의 인공재배 조건 검토

			<ul style="list-style-type: none"> - 인공재배 후 자실체의 품질(모양, 색) 및 수량성 조사 ○ LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 생육기간별 LED 광원의 최적 광질, 최적 광량, 최적 조사시간을 구명(수집균주)
		제1협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 느티만가닥버섯의 방사선 돌연변이 유전 조건 확립 ○ 확보 유전자원의 분자유전학적 특성 분석 ○ 종내 교배에 의한 우량품종 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 포자 또는 균사체/protoplast를 활용한 감마선 100Gy부터 400Gy를 조사하여 50%치사율상에서 고 변이율조건 조사 - RAPD-PCR, AFLP 등 - 단핵균사체 선발 - 극성확인
		제2협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품성분 분석 ○ 시험관내 방법에 의한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 비타민류, 무기질류 등 - 항산화 활성 비교분석 - 항암 활성 비교분석 - 면역 활성 비교분석 - 혈소판응집반응 억제효능 비교분석
2차년도	2009	제1세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 생육기간별 LED 광원의 최적 광질, 최적 광량, 최적 조사시간을 구명(육성균주)
			<ul style="list-style-type: none"> ○ 저비용 속성재배용 배지 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 주재료와 첨가제(영양제) 선발 - 주재료 및 첨가제의 최적 혼합비율 구명 - 최적 배양기간, 자실체 수량, 품질 조사 - 배지 재료 가격, 자실체 수량, 품질, 재배기간 등에서 원가 분석
		제1협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 방사선돌연변이체를 순수분리 하여 균사생장과 형태적 특성을 관찰 - 특성을 보인 변이 개체를 선발 자실체로 육성 : 형태적, 생리적, 생산적 특성을 조사
			<ul style="list-style-type: none"> ○ M1의 고 생산성 형태적 변이체를 선발 하여 M2로 육성 및 변이체의 유전적 변이부위 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - M2세대의 자실체 특성조사 및 Database화 - Tilling 법에 의한 변이부위 검정
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 종내 교배에 의한 우량품종 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 단핵균사체 선발 - 돌연변이체와 육종모본 단핵균사체 간 교배 	
제2협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성물질 분석 ○ 동물실험을 통한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 식이섬유(β-glucan), 파이토스테롤 등 - 면역 활성 비교분석 - 혈전형성 억제효능 비교분석 		
3차년도	2010	제1세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저비용 속성재배용 배지 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 주재료와 첨가제(영양제) 선발 - 주재료 및 첨가제의 최적 혼합비율 구

			<ul style="list-style-type: none"> - 최적 배양기간, 자실체 수량, 품질 조사 - 배지 재료 가격, 자실체 수량, 품질, 재배기간 등에서 원가 분석
		○ 개발된 신품종의 최적 배양 및 생육 환경 조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> - 배양기와 생육기의 최적 환경 구명 - 광 : 1, 2차년도에서 구명된 최적 조건 - 온도 : 배양 23℃전후 3처리 생육 15℃전후 3처리 - 습도 : 생육 전기 90%전후 3처리 생육후기 70%전후 3처리
		○ 안정적 재배법 확립	- 농가실증시험 및 품종 등록
	제1협동	○ M3, M4 육성균주 및 교배 균주의 유전적 특성조사 ○ 신규품종 선발	<ul style="list-style-type: none"> - 생산성, 생리 형태적 특성검정 - 품종내 균주의 유전적 안정성조사 - 농가실증시험 및 품종등록 - 종균산업화 및 농가보급
	제2협동	○ 시험관내 및 동물실험을 통한 신규 육성품종의 기능성 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 항산화 활성 비교분석 - 항암 활성 비교분석 - 면역 활성 비교분석 - 혈소판응집반응 억제효능 비교분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

버섯류의 품종 육성은 국가별로 소비자가 선호하여 중점적으로 재배하는 버섯의 종류가 다르기 때문에 품종개발 역시 국가별로 다른 실정이다. 네덜란드를 중심으로 한 유럽의 경우는 양송이류의 재배 육성이 중심이고, 일본의 경우는 전통적으로 표고버섯을 중점적으로 육성하였고 최근에는 팽이버섯, 만가닥류, 잎새버섯, 맛버섯 등 자동화 재배 가능한 버섯 중심으로 품종개발이 이루어지고 있다. 세계적으로 버섯류의 품종 육성은 기본적으로 교배를 통한 품종 개발이 주류를 이루고 있고 돌연변이와 형질변환체를 이용한 육종도 일부 시도되고 있지만 아직 산업화 단계까지는 이르지 못하고 있는 실정이다. 버섯류의 품종 육성은 자실체의 품질, 수확량 등 재배학적 특성을 향상시키는데 목적을 두어 진행되어 왔고 기능성 강화 품종 육성은 미흡한 실정이다.

<유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발>

느티만가닥버섯은 일본에서 재배법이 개발, 재배가 시작되어 최근 중국에서도 재배되고 있으나 재배 기술은 일본의 재배 기술을 원용하고 있고, 배지의 종류, 재배 환경에 관한 연구 결과는 부족한 실정이며 특히 LED광원을 활용한 연구 개발 결과는 찾아 보기 어렵다. LED 광원을 이용한 버섯류의 재배법 개발 연구는 국내에서는 큰느타리버섯 등에서 현재 진행되고 있고 일본에서는 일부 재배사에 적용되고 있으나 생육 단계별 조절 기술은 아직 정확히 구명되고 있지 않다.

<느티만가닥버섯의 신품종 육성>

느티만가닥버섯의 품종 육성에 관한 연구는 일본에서 재배법이 개발, 재배가 시작되어 품종개발도 대부분 일본에서 개발되었으나 최근에는 중국에서도 많은 품종이 개발 재배되고 있다. 국내에서는 풀무원에서 2002년 재배가 시작되어 최근에는 그린합명회사에서도 재배하고 있으며 2008년에 시작한 수출연구사업단에서도 품종개발 연구를 진행하고 있다. 국내에서 품종의 생산 수입 판매 신고가 이루어진 품종은 좋은 농촌진흥청에서 도입 보급한 만가닥 1호와 2호가 있으며, 품종보호 출원은 농촌진흥청과 그린피스 등에서 2010년과 2011년에 각각 6건과 2건이 출원되어 있으며 일본에서는 24개의 품종이 등록되어 있다. 지금까지의 연구 개발된 품종은 거의 대부분 교배를 통한 신품종 개발로 돌연변이 유도에 의한 신품종 개발 연구는 찾아 보기 어렵다.

<느티만가닥버섯의 기능성 효능분석>

한편 품종 및 재배법에 관한 연구가 미비한 것에 반해 기능성 성분 연구는 국내외에서 수많은 연구가 수행되어 항산화효과와 동맥경화 예방효과가 보고되어 있으며, polysaccharide 성분인 s-(1-3)-D-glucan은 높은 항종양 효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 국내에서는 농림수산식품부 연구과제로 “신품종 해송이버섯을 이용한 항당뇨 및 항비만 효능이 있는 편의 가공식품 개발”(조진호, 2009), “팽이 및 만가닥버섯의 식품소재화 및 고품질 제품 다양화 기술 개발”(김현구, 2003) 등이 수행되어 추출물의 생리활성물질(베타글루칸, 식이섬유 등)과 in vitro 항산화, ACE저해효과 항암, 항당뇨 및 항비만효과 등이 연구된 바 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 유전자원 확보 및 안정적 재배기술 개발

1. 서 론

만가닥버섯은 주름버섯목 송이버섯과에 속하는 버섯으로 활엽수 그루터기 등을 분해시키는 목재부후균의 일종이다. 가을에 참나무, 칠엽수, 느릅나무 등에 발생한다.

갓은 직경 4~15cm 정도의 짙은 갈색을 띤 크림색으로 진한 색의 무늬가 있다. 육질, 주름살, 대 모두 백색으로, 일본에서는 맛은 땅찌만가닥버섯(*Lyophyllum shimeji*) 보다는 덜하지만 버섯의 형태가 닮았기 때문에 소비자들이 선호하여 톱밥을 이용한 병재배가 많이 이루어지고 있다. 일본에서 1990년대 초반부터 에느타리버섯의 재배가 퇴조하면서 대체 버섯으로 생산량이 급격히 증가하여 현재는 팡이 다음으로 생산량이 많다. 일본의 2010년도 버섯생산량은 팡이버섯 131,107톤, 만가닥 108,104톤, 생표고 70,342톤, 잎새버섯 43,398톤, 큰느타리 새송이, 38,214톤, 맛버섯 25,945톤, 건표고 3,867톤, 기타 4,476톤(2010年版きのこ年鑑, 農村文化社) 순으로 생산되고 있으며 만가닥 버섯의 생산이 전체 2위로 매년 그 생산량이 증가하고 있다.

※ 만가닥버섯의 특징(大森清壽, 小出博志, 2001,きのこ栽培全科, 農文協)

생 태	자연분포	참나무류, 칠엽수, 느릅나무 등의 활엽수 고사목, 그루터기 등에 발생
	자연발생시기	9월에서 10월
생 리	균사생장온도	범위 5~30℃, 최적온도 20~25℃
	균사생장습도	-
	자실체발생온도	범위 12~20℃, 최적온도 15℃ 전후
	자실체발생습도	95% 이상
	이산화탄소	이산화탄소 농도 0.3% 이하
	광	발이유도기 : 50~100Lux 버섯생육기 : 500~1,000Lux
재 배	적합수종	참나무류, 삼나무, 적송, 낙엽송, 전나무 등
	배지재료	미강, 밀기울, 대두박, 콘코브, 비지
	품종 및 종균의 형태	만가닥 1호 및 2호 일본에는 22품종이 등록(2005년) 톱밥종균(액체종균도 적용 가능)
	재배소요기간	100~120일
	년간발생횟수	주년재배
	수확물의 규격	갓 개산율 70~80%(갓 직경 20~25mm)

한국에서도 1980년대 중반 일본에서 팡이버섯 균주와 재배법을 도입할 무렵에 일부 사업장에서 만가닥버섯을 도입 재배하여 “은방울버섯” 등의 이름으로 유통시킨 바 있었으나 소비자와 시장의 인식부족으로 재배에 실패하였다.

그러나 2002년에 일본에서 만가닥버섯의 품종과 재배법을 최초로 개발한 다카라주조와 한국

의 풀무원의 협약으로 한국에서도 인공재배 되어 현재 “백일송이”라는 이름으로 유통되고 있다. 이 버섯은 군사생장이 매우 늦고 후숙 배양이 필요하여 전체 재배기간이 약 100일 소요된다. 그래서 상품명을 백일송이로 명명하였다. 그 후 그린합명에서 팽이버섯 대체버섯으로 2000년대 후반부터 재배 생산하고 있으며 수출 유망 품목으로 각광 받고 있다.

만가닥버섯은 공조시설을 갖추어 온도, 습도, 광 등의 환경조절을 하지 않으면 인공재배는 아주 어렵다. 비닐하우스 등에서는 재배가 불가능하고 균상재배도 생각할 수 있으나 안정적인 수확이 불가능하다. 따라서 만가닥버섯의 경영은 재배를 위한 시설투자비가 많이 소요되기 때문에 전업 경영이 아니면 어렵다.

만가닥버섯은 자실체 발생온도가 15℃전후로 활엽수 고사목 등에 발생하는 목재부후균이기 때문에 우리나라를 비롯한 온대지방에 많이 발생하고 있다. 기러나 재배 역사가 그리 오래되지 않았기 때문에 각국에서 보존하고 있는 유전자원과 연구 결과는 그다지 많지 않은 편이다. 또 일본을 제외하고는 재배 역사와 생산량이 미비하기 때문에 최적의 배지재료에 관한 연구, 재배 환경 조절 관리 기술에 관한 연구는 많지 않은 편이다.

느티만가닥버섯은 버섯 재배용 배지에서 군사생장이 매우 늦고 장기간 후숙 배양을 하지 않으면 자실체의 발생이 불량하고 수량도 많이 떨어지기 때문에 자동화 시설 병재배가 가능한 느타리, 팽이 버섯에 비하여 넓은 면적의 배양실을 필요로 한다. 또 자실체 생육 기간 중에는 많은 양의 광 조사를 필요로 하기 때문에 시설비가 생산비 부담이 커서 국내의 영세 농가에서는 재배하기 어려운 버섯 중 하나이다.

버섯 균의 생장은 영양생장과 생식생장으로 나눌 수 있으며 각각의 생육기간 동안 각기 다른 환경요인(광, 온도, 습도, 환기 등)을 요구하기 때문에 각각의 시기에 가장 효과적인 환경을 만들어 주는 것이 고품질버섯을 생산하기 위한 필수조건임. 요구되는 환경조건 중에서 광은 군사생장기인 영양생장기에는 필요하지 않지만 자실체를 형성하는 생식생장기에는 양송이버섯을 제외하고 광의 조사가 필수적이다. 따라서 버섯을 생산하기위해서 재배사에는 조명시설을 설치하고 있는데 대부분이 광원으로 백열등이나 백색형광등을 사용하고 있어 생산비용이 많이 소요되는 편이다.

최근에 차세대 조명기구로 각광을 받고 있는 LED(Light Emitting Diode) 광원은 과장영역을 단과장으로 나눌 수 있기 때문에 가장 효과적인 과장영역 만을 버섯에 조사하여 생산비를 절감하고 고품질버섯을 생산할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

LED란 ‘발광 다이오드’(Light Emitting Diode)의 약자로 LED의 전력 소비량은 일반 백열등의 17%, 형광등의 67% 수준이며, 백열등이나 삼파장등이 열로 인한 에너지 손실이 최고 95%에 달하는데 반해 LED 조명은 전기에너지의 90% 이상을 빛으로 바꿔 에너지 절감 효과가 높은 특징이 있다.

버섯 재배에 LED 광을 적용하면 단과장을 조사할 수 있기 때문에 버섯의 품질을 높이고 생육기간을 단축시킬 수 있으며 생산비를 절감하는 효과를 얻을 것으로 기대되고 있다.

따라서 본 연구에서는 느티만가닥 버섯의 유전자원을 수집 혹은 채집하여 확보하고 기존의 품종과 생리 유전학적 특성을 비교 분석하고, 이를 육종 모본으로 활용하며, 느티만가닥 버섯의 에너지 절감형 안정적 재배 기술을 확립하기 위하여 배양적 특성 및 LED를 활용한 재배를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 느티만가닥버섯의 유전자원 확보

느티만가닥버섯 유전자원은 국내외 균주 보존기관에서 분양받거나, 시판버섯과 국내에서 자생하는 버섯에서 chloramphenicol이 첨가된 PDA 배지에서 조직분리법으로 분리하여 확보 하였다. 확보된 유전자원은 공시균주는 20% Glycerol용액에 침지하여 -70℃ 보관하였으며 PDA(Potato Dextrose Agar) slant에 계대하여 5℃미만에 보관하면서 필요한 실험에 이용하였다.

Table 1-1. List of *Hypsizygus marmoreus* isolates and related species used in this study

Isolate	Source and geographic origin ¹⁾			Isolate	Source and geographic origin ¹⁾			Isolate	Source and geographic origin ¹⁾		
HYM-001	MKACC50205	G2052	Japan	HYM-038	MKACC52011	ASI 8041		HYM-075	IUM 2157		Taipei
HYM-002	MKACC50363	G3280 A5387	Jeju	HYM-039	MKACC52013	ASI 8043		HYM-076	IUM 2232		China
HYM-003	MKACC50636	A6100	China	HYM-040	MKACC52014	ASI 8044		HYM-077	IUM 2277		China
HYM-004	MKACC50710	A6101		HYM-041	MKACC52015	ASI 8046		HYM-078	IUM 2279		China
HYM-055	MKACC51135	A9675		HYM-042	MKACC52016	ASI 8047		HYM-079	IUM 2306		China
HYM-006	MKACC51976	ASI 8002		HYM-043	MKACC52017	ASI 8049		HYM-080	IUM 2326		China
HYM-007	MKACC51978	ASI 8004		HYM-044	MKACC52018	ASI 8050		HYM-081	IUM 2638		China
HYM-008	MKACC51979	ASI 8006		HYM-045	MKACC53978	ASIS 12652	해송이	HYM-082	IUM 2641		China
HYM-009	MKACC51980	ASI 8007	만가닥 1호	HYM-046	MKACC54026	ASIS13026		HYM-083	IUM 3375		China
HYM-010	MKACC51981	ASI 8008		HYM-047	MKACC54367	ASI 8061		HYM-084	IUM 3376		China
HYM-011	MKACC51983	ASI 8010		HYM-048	MKACC54368	ASI 8062		HYM-085	IUM 3377		China
HYM-012	MKACC51985	ASI 8012		HYM-049	MKACC54640	ASIS15136		HYM-086	IUM 3383		China
HYM-013	MKACC51986	ASI 8013		HYM-050	MKACC54876	ASI 8063		HYM-087	IUM 3390		China
HYM-014	MKACC51987	ASI 8014		HYM-051	MKACC54877	ASI 8064		HYM-088	IUM 3391		China
HYM-015	MKACC51988	ASI 8015		HYM-052	MKACC54878	ASI 8065		HYM-089	IUM 3405		China
HYM-016	MKACC51989	ASI 8016		HYM-053	MKACC55125	ASI 8067		HYM-090	IUM 3406		China
HYM-017	MKACC51990	ASI 8017		HYM-054	MKACC55200	ASI 8066		HYM-091	IUM 3434		Taipei
HYM-018	MKACC51991	ASI 8019		HYM-055	Commercial white fruit body			HYM-092	IUM 3444		China
HYM-019	MKACC51992	ASI 8020		HYM-056	Commercial brown fruit body			HYM-093	IUM 3455		China
HYM-020	MKACC51993	ASI 8021		HYM-057	IUM 1378		Taipei	HYM-094	IUM 3555		China
HYM-021	MKACC51994	ASI 8022		HYM-058	IUM 1406		China	HYM-095	IUM 3556		China
HYM-022	MKACC51995	ASI 8023		HYM-059	IUM 1408		China	HYM-096	IUM 3564		China
HYM-023	MKACC51996	ASI 8025	만가닥 2호	HYM-060	IUM 1414		China	HYM-097	IUM 3750		China
HYM-024	MKACC51997	ASI 8026		HYM-061	IUM 1502		China	HYM-098	IUM 3835		China
HYM-025	MKACC51998	ASI 8027		HYM-062	IUM 1515		Taipei	HYM-099	IUM 3845		China
HYM-026	MKACC51999	ASI 8028		HYM-063	IUM 1523		Taipei	HYM-100	IUM 3868		China
HYM-027	MKACC52000	ASI 8029		HYM-064	IUM 1562		Taipei	HYM-101	IUM 3880		China
HYM-028	MKACC52001	ASI 8030		HYM-065	IUM 1588		Taipei	HYM-102	IUM 3883		China
HYM-029	MKACC52002	ASI 8031		HYM-066	IUM 1591		Taipei	HYM-103	IUM 3891		China
HYM-030	MKACC52003	ASI 8032		HYM-067	IUM 1621		China	HYM-104	IUM 3897		China

HYM-031	MKACC52004	ASI 8033	HYM-068	IUM 1652		China	HYM-105	IUM 3900		China
HYM-032	MKACC52005	ASI 8034	HYM-069	IUM 1879	Mt. of Jeoksang	Korea	HYM-106	Hm-001		Japan
HYM-033	MKACC52006	ASI 8035	HYM-070	IUM 2021		China	HYM-107	ASIS18965		
HYM-034	MKACC52007	ASI 8036	HYM-071	IUM 2129		Taipei	HYM-108	ASIS18894		
HYM-035	MKACC52008	ASI 8037	HYM-072	IUM 2140		Taipei	HYM-109	ASIS19043		
HYM-036	MKACC52009	ASI 8038	HYM-073	IUM 2142		Taipei	HYM-110	ASIS19210	대관령	Korea
HYM-037	MKACC52010	ASI 8040	HYM-074	IUM 2145		Taipei	HYM-111	Turbo48		Japan

¹⁾ ASI, Institute of Agriculture Science, RDA, Korea; MKACC, Mushroom-Korean Agricultural cultural Collection, RDA, IUM, Incheon University Mushroom.

나. 확보 유전자원의 URP-PCR에 의한 유연관계 분석

(1) Genomic DNA 분리

국내외의 다양한 지역으로부터 수집된 111균주(Table 1-1)의 Genomic DNA를 분리하기 위하여 14일간 PDA(Potato Dextrose Agar)에서 배양 후, 직경 5mm의 균사체를 20ml의 PDB배지에서 진탕배양(120 rpm)으로 25°C에서 14일간 배양한 균사체를 여지에 걸러내어 동결건조를 하였다. 동결 건조한 균사체를 Tissu Lyser를 이용하여 곱게 마쇄한 다음 100 μ g을 1.5ml의 Eppendorf tube에 옮기고 추출용 완충액(200mM Tris-HCl, pH 8.0; 200mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS) 400 μ l를 첨가하여 잘 섞어주고, 2 \times CTAB buffer (2% CTAB [w/v], 100mM Tris [pH8.0], 1.4M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone Mr 40,000)를 400 μ l 첨가하여 65°C에서 30분간 방치 후 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 넣고 혼합 한 후, 14,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮겨 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치 후 14,000 rpm 에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 70% ethanol로 DNA 침전물을 세척하여 진공 건조한 후 1 \times TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA) 50 μ l에 용해하였다. 10mg/ μ l RNase 2 μ l를 넣어 37°C에서 30분 처리하여 추출한 용액에 함유된 RNA를 제거하였다. 추출한 DNA는 spectrophotometer 260nm 파장으로 정량 분석을 실시하였다.

(2) RAPD-PCR 핵산지문 분석

RAPD-PCR 핵산지문분석은 URP-PCR 핵산지문 Kit (JK BioTech.)를 구입하여 비교적 증폭산물이 뚜렷하고 변이가 적은 두 개의 primer를 선발하여 제공된 Protocol에 준하여 수행하였다. URP primer를 이용한 기본적인 PCR반응 조건은 100ng의 DNA template 5 μ l에 10 \times PCR buffer(10mM tris-HCl(pH.8.0), 50mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% gelatin) 5 μ l와 URP primer(20pmol) 1 μ l, 2.5mM dNTP 4 μ l, HQ Taq polymerase(JK BioTech.) 0.5 μ l에 D.W로 total volum을 50 μ l로 맞추었다. DNA변성을 위하여 94°C에서 4분간, 그 후 cycle에서 DNA 변성은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분, DNA합성은 72°C에서 2분으로 총 35cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 7분으로 PCR을 수행하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA는 1.5%의 agarose gel 상에서 50V 전압으로 전기영동 한 뒤 Ethidium bromide에 염색하여 UV lamp 하에서 PCR다형성을 관찰하고 NTSYSpc(ver. 2.1)를 이용하여 유연관계를 분석하였다.

다. 확보유전자원의 재배생리학적 특성

(1) 한천배지에서 수집균주의 배양적 특성

버섯균 배양에 일반적으로 사용되는 4종류의 한천배지[Potato dextrose agar(PDA), Malt extract agar(MEA), Mushroom complete medium(MCM), Rice bran extract agar(RBA), (Table 1-2)]에 접종하여 25°C±1.0, 암상태로 9일간 배양하여 균사 성장량을 조사하였다.

Table 1-2. Composition of media used in this study

PDA		MEA		MCM		Rice bran extract agar	
PDA (Difco)	39g	Malt extract	20g	Glucose	20g	Rice bran extract	30 g/ ℓ
		Glucose	20g	Peptone	2g		
		Peptone	5g	Yeast extract	2g	Sugar	10 g
		Agar	2%	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g		
				KH ₂ PO ₄	0.46g	Agar	2%
				K ₂ HPO ₄	1g		
				Agar	2%		
Distilled water							1L

(2) 톱밥배지에서 수집균주 자실체의 인공재배

공시균주의 인공재배 조건을 검토하기 위하여 재배용 배지는 미송, 콘코브, 대두피, 미강을 각각 42:22:14:22(W/W) 비율로 혼합한 후 배지의 함수량을 약 65%로 조절하고 1,400ml p.p.병에 입병, 고압증기멸균, 냉각 후 수집된 공시균주를 접종하여 23.0±1.0°C에서 전배양과 후숙배양을 포함하여 총 80일간 배양한 후 균급기를 하여 온도 15.0±1.0°C, 공중습도 RH 95%로 환경 조절한 재배사에서 자실체 발생을 유도하였다.

라. 후배양 기간이 자실체 생육에 미치는 영향

후숙 배양기간이 느티만가닥버섯의 자실체 형성 및 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 미송톱밥, 콘코브, 대두피, 밀기울을 40:30:15:15(% , v/v) 비율로 혼합하여 폐화석 석분을 2% 첨가한 후 배지의 수분을 약 70%로 조절하여 고압 증기멸균하여 사용하였다. HYM-023 균주를 공시하여 종균을 접종한 후 23±1°C에서 40일간 배양한 후 20°C와 25°C로 옮겨 10일에서 50일간 후숙배양을 실시한 후 온도 15.0±1.0°C, 습도 95.0±5.0%, CO₂ 농도 1,000ppm 이하로 조절된 재배실로 옮겨 자실체 발생과 생육을 조사하였다. 광조사는 10분 광 - 50분 암주기로 자실체 수확 일까지 1일 24회 총 4시간 광을 조사하였다.

마. LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발

(1) 광질이 느티만가닥버섯균의 균사 성장에 미치는 영향

파장이 다른 NUV(Wave length 405nm), Blue(Wave length 460nm), Green(Wave length 530nm), Yellow(Wave length 590nm), Red(Wave length 630nm), White(Wave length 6500K) LED 광원을 16시간 광, 8시간 암 주기로 조사하면서 온도 23±1°C에서 10일간 배양하여 조사하였다.

(2) 광질이 느티만가닥버섯균의 자실체 성장에 미치는 영향

균급기한 후에 자실체 원기 발생시켜 5종의 LED 광원(White, Yellow, Green, Blue, Red)과

NUV)과 암 처리구에서 생육을 시켰으며 광 조사시간은 16시간 광 - 8시간 암 주기로 수확까지 조사하였다. 광조사 이외의 환경 조건은 온도 15.0±1℃, 습도 90%이상, 이산화탄소 농도 1,000ppm 이하로 조절하였다.

(3) 혼합 LED 광 처리가 느티만가닥버섯균의 자실체 성장에 미치는 영향

균급기 후에 자실체 원기를 발생 시킨 후 LED 광원을 ① Blue와 White, ② Green과 White, ③ Blue와 Red ④ Blue와 Green 그리고 ⑤ Green과 Red로 혼합하여 조사하면서 생육을 시켰으며 광 조사시간은 16시간 광 - 8시간 암 주기로 수확까지 조사하였다. 광 조사 이외의 환경 조건은 온도 15.0±1℃, 습도 90%이상, 이산화탄소 농도 1,000ppm 이하로 조절하였다.

(4) 광 조사시기가 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향

최적의 광조사 시기를 조사하기 위하여 자실체 발이 전·후의 배지를 5종의 LED광원(White, Yellow, Green, Blue, Red)과 NUV)과 암 처리하여 자실체 발이 유도와 생육기간에 미치는 영향을 자실체의 형태적 특성 및 수량으로 조사하였다.

(4) 광량이 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향

LED광원 조사가 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각 다른 파장을 가진 5종의 LED 광원을 5μmol/m²s⁻¹과 30μmol/m²s⁻¹로 광량을 조절한 2개의 처리구로 나누어 발이유도, 자실체 생육기간과 자실체의 형태적 특성을 조사하였다. 그 외 환경은 온도 15.0±1.0℃, 습도 95.0±5.0%, CO₂ 농도 1,000ppm 이하와 광조사는 10분 광 - 50분 암주기로 자실체 수확 일까지 1일 24회 총 4시간 광을 조사하였다.

마. 저비용 속성재배용 배지 개발

(1) 액체종균용 염가 배지 개발

느티만가닥버섯 액체 종균용 염가배지를 선별하기 위하여 Table 1-3과 같이 10종류의 액체 배지를 조제하여 고압 증기멸균한 후 공시균주를 접종하여 10일간 25.0±1.0℃에서 배양하여 균사 성장을 조사하였다.

Table 1-3. Composition of culture media for liquid spawn of *H. marmoreus*

Composition(won/g)	PD (Potato dextrose)	MG (Malt- Glucose)	CM (Complete)	MYP (Malt -Yeast-P eptone)	SY (Sucrose - Yeast)	YPMG (Yeast- Peptone- Malt -Glucos)	SB (Soybean)	RB (Rice bran)	WB (Wheat bran)	LY (Lycine)
Glucose (20)		20g	20g			10g				
K ₂ HPO ₄ (20)			1g							
KH ₂ PO ₄ (14)			0.46g		1g		1g	1g	1g	1g
Malt extract (114)		5g		30g						
Meat extract (180)						3g				
MgSO ₄ ·7H ₂ O (170)			0.5g		1g		0.5g	0.5g	0.5g	0.5g
PD broth (210)	24g									
Peptone (158)			2g	1g		5g				
Sucrose (16)					30g					
Yeast extract (198)			2g	2g	3g	3g				
Soybean (12)							3g			
Rice bran (0.13)								3g		
White bran (0.25)									3g	
Feed										3g

Yellow sucrose (1)							3g	3g	3g	3g
Cost(won)/1ℓ	5,040	970	1,223	3,974	1,258	2,324	138	102	102	102+?
Agar	2%									

D.W 1L

(2) 첨가제가 느티만가닥버섯균의 균사 생장에 미치는 영향

저비용 속성재배용 배지 개발을 위하여 첨가제가 느티만가닥버섯의 균사 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 첨가제로 NaCl(200, 500, 1000, 2000, 3000ppm), 굴껍질 Ca powder(50, 100, 500, 1000ppm), 산호 Ca powder(50, 100, 500, 1000ppm), Ca ion water(50, 100, 130ppm), 허브추출물(50, 100, 250, 500, 1,000ppm), 상용액비(50, 100, 250, 500, 1,000ppm) 등 6종류를 사용하였다. 첨가제는 각 농도의 PDA(Potato Dextrose Agar)로 제조하여 균사 생장을 조사하였다. 한천배지의 pH는 평균 6.0±1.0로 조절하였고, 균사 배양 조건은 25.0±1.0°C, 암상태에서 실시하였다.

(3) 느티만가닥버섯 재배를 위한 최적 배지 선발

느티만가닥 버섯의 최적 배지를 선발하기 위하여 미송톱밥, 콘코브, 대두피, 밀기울, 비트펄프, 옥분 등을 공시재료로 하여 Table 1-4와 같이 혼합하여 각각의 배지에 폐화석 석분을 2% 첨가한 후 배지의 수분을 약 70%로 조절하여 고압 증기멸균하여 사용하였다. HYM-023 균주를 공시하여 종균을 접종한 후 배양 소요일수를 측정하였으며 초발이일수, 생육일수와 수량 품질을 조사하였다.

Table 1-4. Composition of sawdust media for the cultivation of *H. marmoreus*

	Douglas sawdust	Corn cob	Soybean seedcake	Wheat bran	Beet pulp	Corn grits
Medium 1	40 ¹⁾	30	15	15		
Medium 2	40	30	15		15	
Medium 3	40	30	15			15
Medium 4	40	30	10		10	10

¹⁾ volume

사. 안정적 재배법 확립(농가실증재배)

느티만가닥버섯의 안정적 재배를 위하여 톱밥 배지 제조부터 수확까지 환경을 조절하여 농가 실증 재배를 실시하였다. 실험은 경기도 여주군 대신면 계림리에 위치한 느티만가닥버섯 재배농가에서 수행하였으며 본 연구에서 확립한 배지와 청색과 백색 LED 광원을 적용하였 재배 시험을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 느티만가닥버섯의 유전자원 확보

느티만가닥버섯 유전자원은 국내외 균주 보존기관에서 분양받거나, 시판버섯과 국내에서 자생하는 버섯에서 조직분리법으로 분리하여 확보 하였으며, 총 111 균주를 확보하였다. 이 중 한국농수산대학 보유 균주가 12균주이며, 농촌진흥청 농업과학원에서 44균주, 인천대학교에서 48균주를 각각 분양 받았다. 이들 균주의 수집 지역별 분포는 한국 자생균주 2균주, 중국 도입 균주 35균주, 대만도입균주 13균주이고 나머지는 명확하지 않으나 일본에서 수집된 것으로 추정된다(Table 1-5).

본 연구에서 수집한 유전자원은 *Hypsizygus marmoreus*와 근연종인 *Lyophyllum decastes*를 수집하였으며 인공재배를 통하여 그 자실체를 모두 확인한 결과 농촌진흥청에서 보존하고 있는 ASI 15136(HYM-049, MKACC54640 균주는 큰느타리버섯 균으로, HYM-107(ASIS18965) 균주는 노루궁뎅이버섯 균으로 판명되었다.

Table 1-5. Collected isolates of *Hypsizygus marmoreus* and related species for the study

Isolate	Scientific Name	Remark	Isolate	Scientific Name	Remark	Isolate	Scientific Name	Remark
HYM-001	<i>H. marmoreus</i>		HYM-038	<i>L. ulmarium</i>		HYM-075	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-002	<i>Lyophyllum sp.</i>		HYM-039	<i>L. ulmarium</i>		HYM-076	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-003	<i>H. marmoreus</i>		HYM-040	<i>L. ulmarium</i>		HYM-077	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-004	<i>H. marmoreus</i>		HYM-041	<i>L. ulmarium</i>		HYM-078	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-055	<i>H. marmoreus</i>		HYM-042	<i>L. ulmarium</i>		HYM-079	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-006	<i>L. ulmarium</i>		HYM-043	<i>L. ulmarium</i>		HYM-080	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-007	<i>L. ulmarium</i>		HYM-044	<i>L. ulmarium</i>		HYM-081	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-008	<i>L. ulmarium</i>		HYM-045	<i>H. marmoreus</i>		HYM-082	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-009	<i>L. ulmarium</i>	Mangadak No. 1	HYM-046	<i>Lyophyllum sp.</i>		HYM-083	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-010	<i>L. ulmarium</i>		HYM-047	<i>H. marmoreus</i>		HYM-084	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-011	<i>L. ulmarium</i>		HYM-048	<i>H. marmoreus</i>		HYM-085	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-012	<i>L. ulmarium</i>		HYM-049	<i>P. eryngii</i>		HYM-086	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-013	<i>L. ulmarium</i>		HYM-050	<i>H. marmoreus</i>		HYM-087	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-014	<i>L. ulmarium</i>		HYM-051	<i>H. marmoreus</i>		HYM-088	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-015	<i>L. ulmarium</i>		HYM-052	<i>H. marmoreus</i>		HYM-089	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-016	<i>L. ulmarium</i>		HYM-053	<i>L. ulmarium</i>		HYM-090	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-017	<i>L. ulmarium</i>		HYM-054	<i>L. ulmarium</i>		HYM-091	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-018	<i>L. ulmarium</i>		HYM-055	<i>H. marmoreus</i>	Commercial white fruit body	HYM-092	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-019	<i>L. ulmarium</i>		HYM-056	<i>H. marmoreus</i>	Commercial brown fruit body	HYM-093	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-020	<i>L. ulmarium</i>		HYM-057	<i>H. marmoreus</i>		HYM-094	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-021	<i>L. ulmarium</i>		HYM-058	<i>H. marmoreus</i>		HYM-095	<i>H. marmoreus</i>	
HYM-022	<i>L. ulmarium</i>		HYM-059	<i>H. marmoreus</i>		HYM-096	<i>H. marmoreus</i>	

HYM-023	<i>L. ulmarium</i>	Mangadak No. 2	HYM-060	<i>H. marmoreus</i>	HYM-097	<i>H. marmoreus</i>
HYM-024	<i>L. ulmarium</i>		HYM-061	<i>H. marmoreus</i>	HYM-098	<i>H. marmoreus</i>
HYM-025	<i>L. ulmarium</i>		HYM-062	<i>H. marmoreus</i>	HYM-099	<i>H. marmoreus</i>
HYM-026	<i>L. ulmarium</i>		HYM-063	<i>H. marmoreus</i>	HYM-100	<i>H. marmoreus</i>
HYM-027	<i>L. ulmarium</i>		HYM-064	<i>H. marmoreus</i>	HYM-101	<i>H. marmoreus</i>
HYM-028	<i>L. ulmarium</i>		HYM-065	<i>H. marmoreus</i>	HYM-102	<i>H. marmoreus</i>
HYM-029	<i>L. ulmarium</i>		HYM-066	<i>H. marmoreus</i>	HYM-103	<i>H. marmoreus</i>
HYM-030	<i>L. ulmarium</i>		HYM-067	<i>H. marmoreus</i>	HYM-104	<i>H. marmoreus</i>
HYM-031	<i>L. ulmarium</i>		HYM-068	<i>H. marmoreus</i>	HYM-105	<i>H. marmoreus</i>
HYM-032	<i>L. ulmarium</i>		HYM-069	<i>H. marmoreus</i>	HYM-106	<i>H. marmoreus</i>
HYM-033	<i>Lyophyllum sp.</i>		HYM-070	<i>H. marmoreus</i>	HYM-107	<i>Hericeum erinaceus</i>
HYM-034	<i>L. ulmarium</i>		HYM-071	<i>H. marmoreus</i>	HYM-108	<i>H. marmoreus</i>
HYM-035	<i>L. ulmarium</i>		HYM-072	<i>H. marmoreus</i>	HYM-109	<i>H. marmoreus</i>
HYM-036	<i>H. marmoreus</i>		HYM-073	<i>H. marmoreus</i>	HYM-110	<i>H. marmoreus</i>
HYM-037	<i>Lyophyllum sp.</i>		HYM-074	<i>H. marmoreus</i>	HYM-111	<i>H. marmoreus</i>



HYM-001



HYM-003



HYM-005



HYM-007



HYM-008



HYM-009



HYM-010



HYM-012



HYM-013



HYM-014



HYM-015



HYM-016

Fig. 1-1. Fruit bodies of collected isolates generated by sawdust bottle cultivation.



HYM-042



HYM-043



HYM-044



HYM-045



HYM-047



HYM-048



HYM-050



HYM-051



HYM-055



HYM-056



HYM-057



HYM-059



HYM-060



HYM-061



HYM-062



HYM-063



HYM-064



HYM-065



HYM-066



HYM-068



HYM-069



HYM-070



HYM-071



HYM-073

Fig. 1-1. to be continue



HYM-074



HYM-075



HYM-076



HYM-077



HYM-078



HYM-079



HYM-080



HYM-081



HYM-082



HYM-083



HYM-084



HYM-085



HYM-086



HYM-087



HYM-088



HYM-089



HYM-090



HYM-091



HYM-092



HYM-093



HYM-094



HYM-095



HYM-096



HYM-098

Fig. 1-1. to be continue

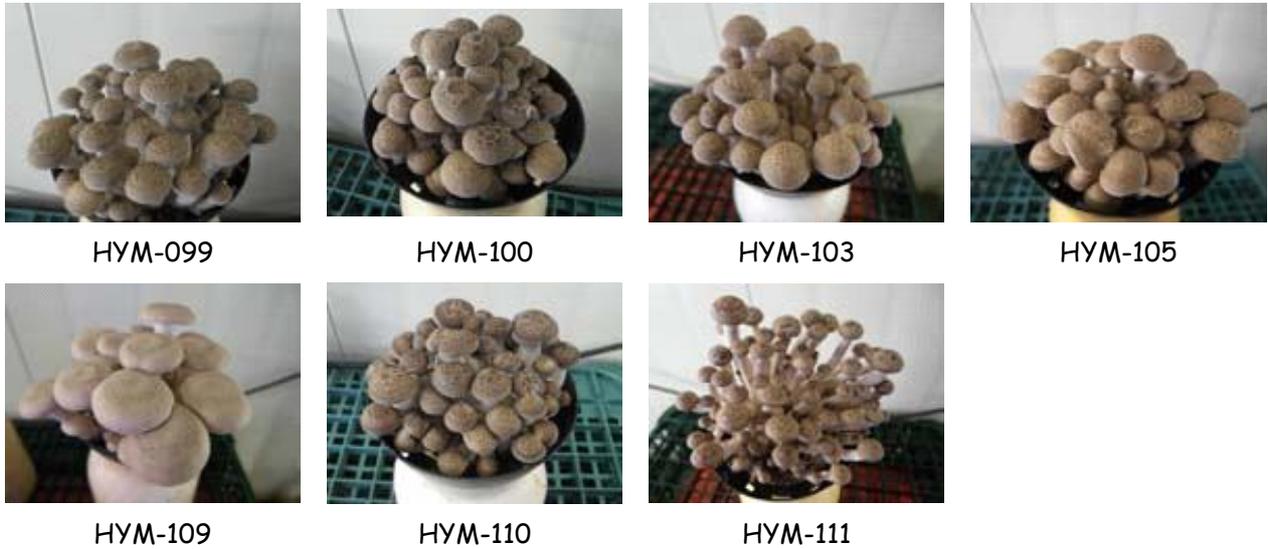


Fig. 1-1. to be continue

수집한 느티만가닥버섯의 111균주를 인공재배 한 결과 2균주는 각각 새송이버섯과 노루궁뎅이 버섯으로 판명되었고 이는 균주 보존기관에서 분양 받을 당시 착오가 있었던 것으로 판단된다. 나머지 109균주 중 91균주가 자실체를 형성하였다. 이 중 HYM-031, -047, -109균주는 갓의 크기가 크고 갓 표면의 무늬가 없이 옅은 회갈색의 자실체를 형성하였다. 이들 균주는 잣빛만가닥버섯(*L. decastes*)으로 판단된다. 느티만가닥버섯으로 판단되는 나머지 88균주 중 10균주는 흰색 자실체를 형성하였고 나머지 78균주는 전형적인 느티만가닥버섯의 형태를 하고 있었다(그림 1-1). 자실체 형태만으로 정확히 판단하기는 어려우나 유전적으로 아주 밀접한 균주들이 혼재되어 있는 것으로 판단된다.

나. URP-PCR에 의한 수집 느티만가닥버섯의 유전적 유연관계 분석

수집한 느티만가닥버섯의 111균주를 대상으로 URP primer(JK BIO TECH) 중 가장 다양한 패턴을 보인 1F primer를 이용하여 RAPD-PCR을 수행하여 유연관계 분석한 결과는 그림 1-2, 그림 1-3, 그림 1-4와 같다. PCR 결과는 재배 중 다른 버섯인 것이 확인된 HYM-049(*P. eringii*)와 HYM-107(*H. erinaceus*)균주와 증폭이 되지 않은 HYM-002, HYM-011, HYM-046, HYM-054, HYM-064, HYM-072, HYM-099, HYM-108균주까지 10균주를 제외한 101균주를 분석하였다.

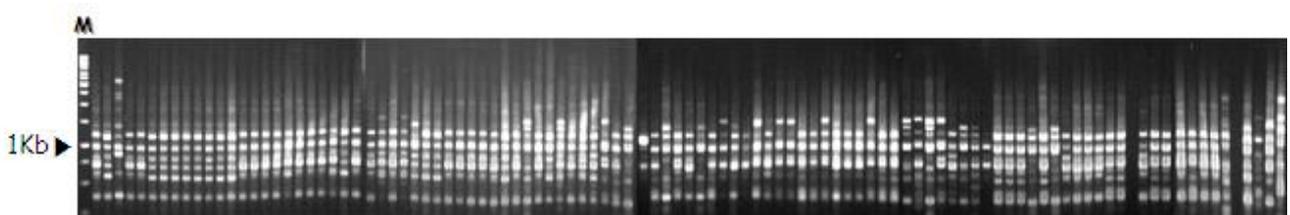


Fig. 1-2. RAPD-PCR profiles derived from *H. marmoreus* with URP-PCR primer URP 1F

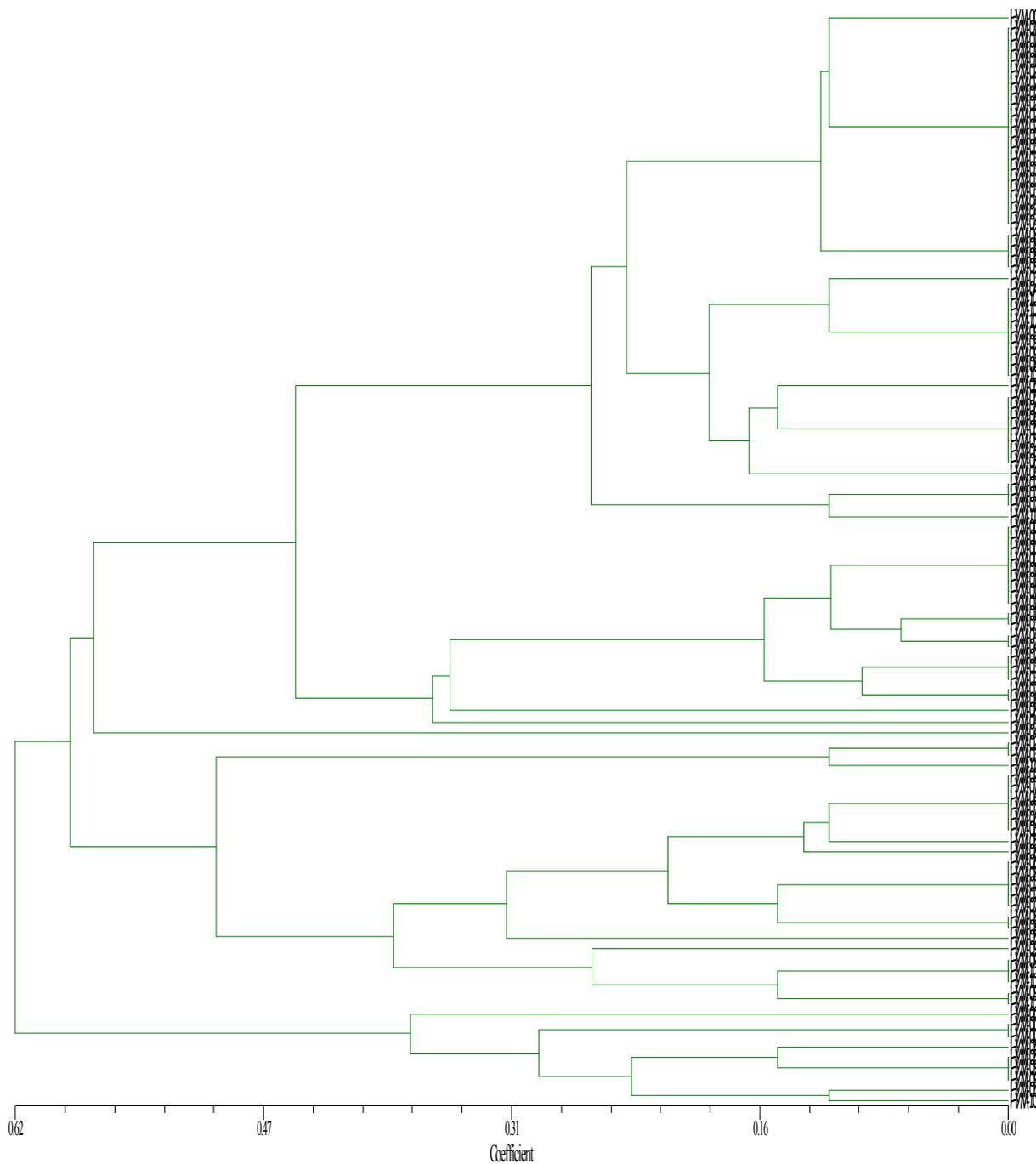


Fig 1-3. Dendrogram derived from RAPD-PCR DNA analysis of *H.marmoreus* or *L.ulmarium* produced by URP 1F primers by unweighted paired group method with arithmetic averages(UPGMA). Scale is the percentage of coefficient similarity.

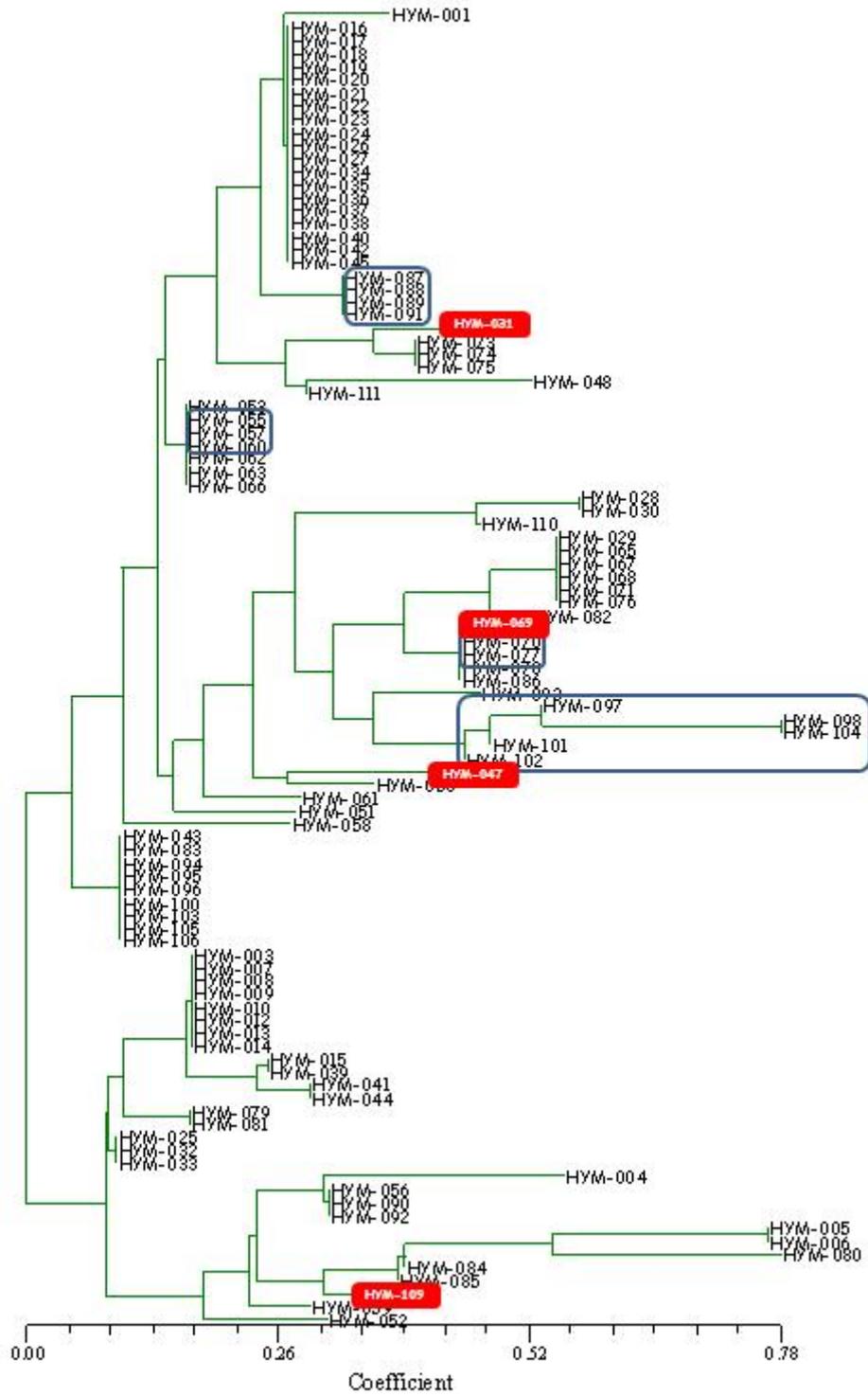


Fig 1-4. Phylogenetic tree of *H. marmoreus* or *L. ulmarium* produced by URP 1F primers. the tree was inferred using the Neighbor-Joining method.

RAPD-PCR 산물을 UPGMA 분석에 의하여 유연관계를 분석한 결과(그림 1-2) 수집지역, 자실체의 형태 등 특징과는 관계가 없이 4그룹으로 나뉘었다. 많은 균주들이 유사도 100%를 보여 같은 균주가 다른 재배 농가 혹은 지역에서 널리 재배되고 있는 것으로 추정된다. 이들 균주가 동일한 균주인지 혹은 유전적 유연관계가 밀접한 균주인지에 대해서는 추후 대치 배양 등을 통하여 재 분류할 필요가 있는 것으로 판단된다. 한편 Neighbor-Joining 분석에 의한 결과도 UPGMA 분석과 크게 다르지 않고 그룹별로 형태학적으로나 유전적으로 특징지어지지 않는 특징이 있다. 이 역시 재배 품종을 육성하면서 한두 균주에 의존하였을 것으로 추정된다. 한편 자실체 형태가 느티만가닥버섯과 달라 잿빛만가닥버섯으로 추정되는 HYM-031, HYM-047, HYM-069, HYM-109균주도 outgroup로 분류되지 않고 cluster 안으로 포함되어 이들 중 역시 유전적으로 매우 밀접한 종으로 추정된다. 이들 품종은 정확한 분류를 위해서는 형태학적인 특징 뿐만 아니라 유전 생리학적 특징을 추가로 고려하여 재분류해야할 것으로 사료된다.

한편 백색자실체를 형성한 HYM-087, HYM-088, HYM-089, HYM-091 균주는 하나의 cluster로 독립되어 동일한 균주로 판단되며, 역시 백색 자실체를 형성하는 HYM-055, HYM-057, HYM-060균주는 갈색 자실체를 형성하는 HYM-052, HYM-062, HYM-063, HYM-066 균주와 하나의 cluster를 형성하고 있어 이들 백색 자실체를 형성하는 균주는 이 cluster에 속하는 갈색자실체에서 유래한 것으로 추정된다.

URP-PCR 분석에 따라 국내외에서 수집한 느티만가닥 균주는 그 근원이 다양하지 않고 한 두개의 균주에서 유래되어 재배 종으로 정착되어 재배되고 있는 것으로 추정된다.

다. 확보유전자원의 재배생리학적 특성 분석

(1) 한천배지에서 균사 성장 조사

1차년도에 확보한 느티만가닥버섯 56균주를 버섯균 배양에 일반적으로 사용되는 4종류의 한천배지에 접종하여 25°C±1.0, 암상태로 9일간 배양하여 균사성장량을 조사하였다(Table 1-5).

4종의 한천배지에 가장 고른 성장을 보인 균주는 HYM-009(만가닥 1호)이었고, HYM-002(제주)와 HYM-055 균주는 1일 평균 균사생장이 3mm정도로 매우 늦은 균사 성장을 보였다. HYM-028 균주는 MEA에서 3mm이하의 균사 성장을, HYM-025 균주는 PDA에서 3.4 ± 2.9mm/day로 균사생장이 매우 저조하였다.

수집된 느티만가닥 버섯균의 균사생장은 RBA와 MCM에서 PDA나 MEA보다 좋은 균사생장을 보였고 1일 균사생장은 RBA, MCM, MEA, PDA 순이었다. RBA, MCM 그리고 PDA에서 균사생장이 빠른 균주는 HYM-009로 각각 7.3±0.6mm/day, 6.6mm/day 그리고 6.3±1.5mm/day 성장했고, MEA에서는 HYM-033(6.4±3.8mm/day)와 HYM-046(6.4±1.5mm/day)균주가 좋은 균사생장을 보였다.

Table 1-5. Mycelial growth of *H. marmoreus* isolates on the various agar media

No.	RB agar	PDA	MEA	MCM	No.	RB agar	PDA	MEA	MCM
HYM-001	5.9 ± 2.1 ¹⁾	4.7 ± 0.0	4.6 ± 2.6	5.1 ± 0.7	HYM-028	6.0 ± 1.0	5.4 ± 1.7	2.9 ± 5.0	4.4 ± 4.6
HYM-002	3.5 ± 2.5	3.9 ± 1.7	1.4 ± 0.6	1.6 ± 0.6	HYM-029	4.9 ± 3.0	4.6 ± 1.2	3.3 ± 4.6	3.7 ± 12.7
HYM-003	6.9 ± 1.2	4.2 ± 2.6	6.1 ± 1.4	6.5 ± 1.2	HYM-030	5.0 ± 0.6	4.5 ± 1.5	5.1 ± 2.6	5.3 ± 0.6
HYM-004	4.2 ± 2.0	3.5 ± 5.7	2.4 ± 3.0	3.1 ± 3.0	HYM-031	5.4 ± 1.5	4.6 ± 5.5	5.4 ± 1.5	5.4 ± 0.6

HYM-055	6.0 ± 1.7	4.0 ± 3.0	4.2 ± 4.7	5.2 ± 3.2	HYM-032	6.7 ± 0.6	5.4 ± 3.2	6.3 ± 2.5	6.6 ± 0.0
HYM-006	5.9 ± 3.0	4.6 ± 1.0	4.8 ± 0.0	4.5 ± 2.1	HYM-033	6.3 ± 2.0	5.9 ± 2.6	6.4 ± 3.8	6.6 ± 0.0
HYM-007	6.9 ± 1.5	5.0 ± 2.9	5.2 ± 1.2	6.7 ± 1.5	HYM-034	5.4 ± 0.6	4.9 ± 2.1	4.3 ± 4.6	5.5 ± 3.0
HYM-008	6.2 ± 1.5	5.4 ± 2.3	5.9 ± 0.0	6.3 ± 0.6	HYM-035	5.3 ± 1.0	4.9 ± 0.6	4.7 ± 1.0	5.1 ± 1.4
HYM-009	7.3 ± 0.6	6.3 ± 1.5	6.1 ± 1.0	6.6 ± 0.0	HYM-036	5.5 ± 0.6	4.8 ± 2.5	4.4 ± 1.0	5.5 ± 1.5
HYM-010	6.9 ± 1.5	5.3 ± 1.4	5.3 ± 3.5	6.6 ± 0.0	HYM-037	5.7 ± 1.2	4.7 ± 2.1	5.1 ± 1.5	5.3 ± 3.6
HYM-011	5.9 ± 1.0	4.4 ± 0.6	4.0 ± 0.6	3.7 ± 1.2	HYM-038	5.8 ± 2.1	4.9 ± 1.2	3.2 ± 5.8	3.4 ± 4.5
HYM-012	6.3 ± 1.5	4.8 ± 1.5	5.9 ± 2.1	6.5 ± 1.2	HYM-039	6.7 ± 0.6	4.7 ± 1.4	5.5 ± 1.5	6.6 ± 0.0
HYM-013	6.0 ± 0.6	4.7 ± 2.5	4.4 ± 0.0	5.0 ± 1.0	HYM-040	4.7 ± 1.5	4.0 ± 4.5	4.0 ± 1.2	4.5 ± 2.1
HYM-014	7.0 ± 2.0	5.8 ± 3.0	5.9 ± 1.2	6.3 ± 1.5	HYM-041	6.4 ± 1.2	5.0 ± 3.6	5.5 ± 5.3	6.2 ± 2.5
HYM-015	6.6 ± 1.5	5.0 ± 1.5	5.6 ± 1.4	6.4 ± 2.8	HYM-042	5.3 ± 2.8	4.7 ± 2.6	5.5 ± 3.8	5.0 ± 3.5
HYM-016	5.8 ± 1.7	4.5 ± 0.6	4.2 ± 0.6	4.8 ± 5.3	HYM-043	5.3 ± 1.0	4.1 ± 1.5	4.7 ± 9.2	5.1 ± 3.6
HYM-017	5.4 ± 1.5	4.5 ± 0.6	3.6 ± 3.2	4.3 ± 9.8	HYM-044	6.2 ± 0.6	5.0 ± 3.5	5.6 ± 1.0	5.6 ± 2.6
HYM-018	5.7 ± 0.0	4.4 ± 2.1	4.6 ± 0.0	4.4 ± 1.1	HYM-045	5.2 ± 1.2	4.1 ± 1.2	5.3 ± 1.7	5.8 ± 1.7
HYM-019	5.6 ± 2.6	4.6 ± 1.0	3.6 ± 3.5	4.6 ± 6.1	HYM-046	4.9 ± 1.0	7.0 ± 2.3	6.4 ± 1.5	6.2 ± 4.9
HYM-020	5.7 ± 2.0	4.3 ± 1.7	4.4 ± 8.6	5.6 ± 2.6	HYM-047	5.0 ± 0.6	3.3 ± 3.6	2.1 ± 2.6	2.8 ± 5.0
HYM-021	5.3 ± 0.6	4.9 ± 1.7	4.3 ± 2.5	4.8 ± 5.5	HYM-048	6.3 ± 3.6	5.0 ± 3.2	5.6 ± 5.0	6.3 ± 2.1
HYM-022	5.1 ± 2.9	4.6 ± 1.0	4.9 ± 3.6	5.7 ± 2.5	HYM-050	5.6 ± 2.5	3.2 ± 1.7	4.7 ± 2.5	5.4 ± 1.7
HYM-023	5.5 ± 2.1	4.3 ± 2.1	4.4 ± 2.4	4.6 ± 0.6	HYM-051	5.7 ± 1.2	4.9 ± 2.0	4.7 ± 3.1	4.8 ± 1.5
HYM-024	5.3 ± 1.2	3.4 ± 2.9	4.0 ± 4.0	4.3 ± 2.0	HYM-053	4.5 ± 1.2	3.1 ± 0.6	3.7 ± 4.0	5.0 ± 3.5
HYM-025	5.7 ± 2.0	3.8 ± 4.5	6.0 ± 0.6	5.8 ± 7.1	HYM-054	3.2 ± 0.6	2.2 ± 1.0	2.9 ± 0.6	2.9 ± 0.6
HYM-026	5.2 ± 0.6	4.6 ± 2.3	4.5 ± 2.1	5.3 ± 2.1	HYM-055	5.7 ± 0.6	4.9 ± 3.6	5.0 ± 2.0	5.4 ± 0.0
HYM-027	4.9 ± 2.1	4.2 ± 3.6	3.5 ± 5.5	3.8 ± 5.6	HYM-056	6.1 ± 3.1	5.1 ± 7.9	5.9 ± 2.3	6.2 ± 1.2

¹⁾ Mycelial growth shown in Mean±SD_{mm}/day

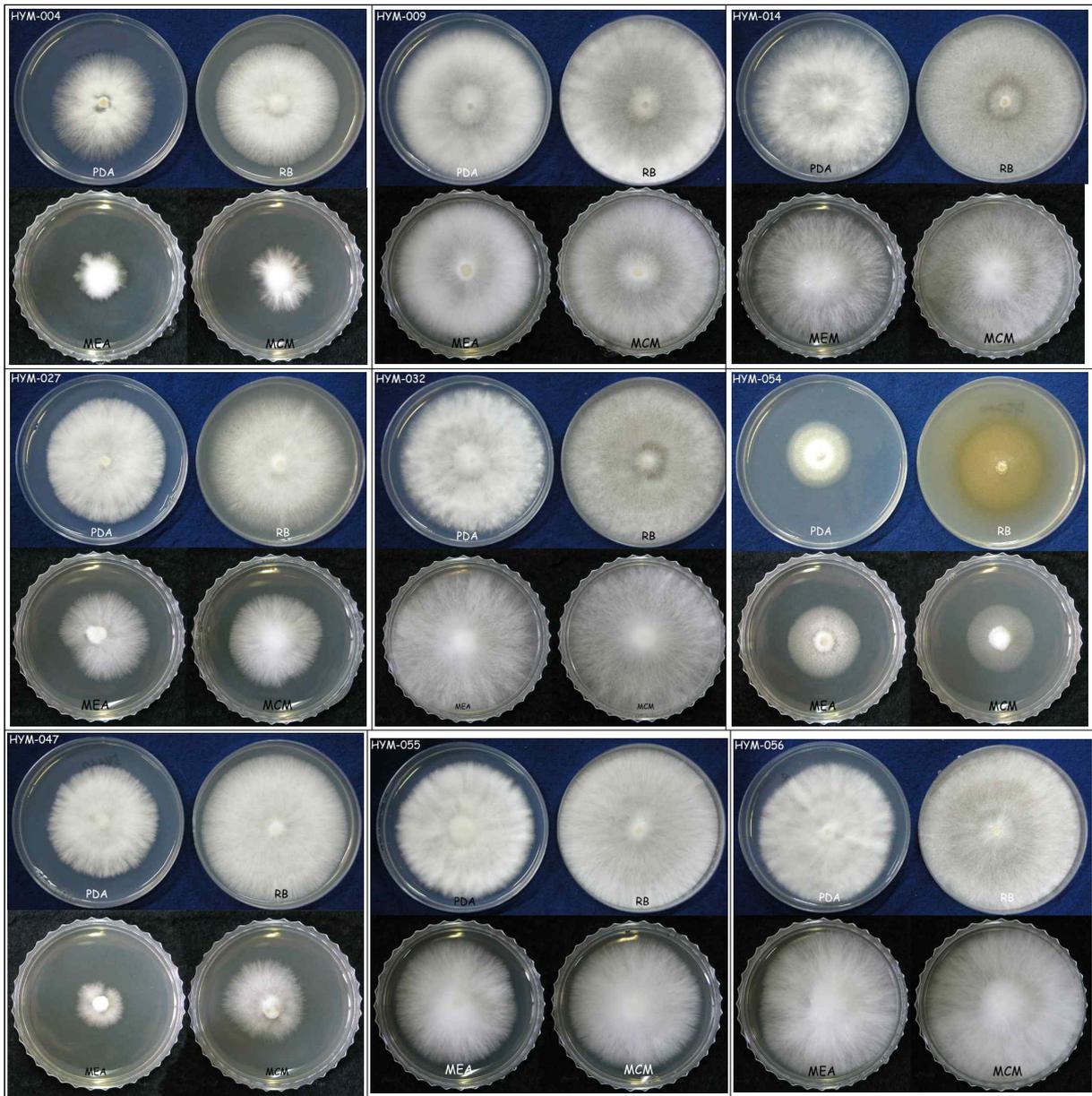


Fig 1-5. Mycelial colonies of *H. marmoreus* isolates on the various agar media.

(2) 공시균주의 인공재배조건 검토

공시균주의 인공재배 조건을 검토하기 위하여 재배용 배지는 미송, 콘코브, 대두피, 미강을 각각 42:22:14:22(W/W) 비율로 배지의 함수량을 약 65%로 조절하면서 혼합하여 1,400ml p.p.병에 입병, 고압증기멸균, 냉각 후 수집된 공시균주 중 27균주를 접종하여 23.0±1.0℃에서 배양하였다(Table 1-6). 27균주 중 수집한 HYM-049 균주는 큰느타리버섯이 발생하여 균주 보존 중에 오류가 있었을 것으로 추정된다. 재배에 성공한 균주들의 배양 일수는 전배양이 균사생장이 빠른 균사가 35일에서 균사생장이 늦은 균주는 55일 소요되었으며 후숙배양까지 포함한 총 80일까지의 배양기간 중 공시한 톱밥배지에서 균사생장이 이루어지지 않는 균주도 발견되었다(HYM-014, 016, 020, 034, 039, 047).

전배양과 후숙배양을 포함하여 총 80일간 배양한 후 균균기를 하여 온도 15.0±1.0℃, 공중습도 RH 95%로 환경 조절한 재배사에서 자실체 발생을 유도하였으며 발이소요일수는 7일에서

19일까지 균주별로 매우 다양하였으며 생육일수는 6일에서 14일까지 다양하였다. 종균은 집중하여 배양기간과 자실체 생육일수까지 총 재배소요 기간은 96일에서 107일까지 소요되었다.

Table 1-6. Required periods for the artificial cultivation of *H. marmoreus* isolates on the sawdust media

Isolate	Requiring days				Isolate	Requiring days			
	Mycelial growth	Initiation of fruit body	Growing of fruit body	Total		Mycelial growth	Initiation of fruit body	Growing of fruit body	Total
HYM-001	39	12	7	108	HYM-028	38		7	103
HYM-003		11	9	100	HYM-029	38	12	7	104
HYM-006		12	7	104	HYM-030	37	12	6	107
HYM-007		11	10	104	HYM-031	63	7	8	100
HYM-009	37				HYM-032	55	11	7	96
HYM-010		11	8	97	HYM-034				
HYM-014					HYM-035	39	12	7	106
HYM-015		19			HYM-037	38	12	7	104
HYM-016					HYM-038	37	12	7	104
HYM-017	39	11	7	105	HYM-039				
HYM-018		19	7	107	HYM-040	39	12	7	106
HYM-019		19			HYM-041	39	11	10	100
HYM-020					HYM-042	36	11	7	102
HYM-021	55	12	10	95	HYM-044		11	7	97
HYM-023		13	7	100	HYM-047				
HYM-024		11	7	107	HYM-049	36	7	<i>P. eringii</i>	93
HYM-025	35	11	7	101	HYM-050		11	14	107
HYM-026	38	11	7	107	HYM-051		11	10	102
HYM-027		19			HYM-052	39	7	8	100

느티만가닥버섯은 소요일수가 약 100일정도 소요되는 것으로 알려져 있고 이 버섯을 많이 재배하고 있는 일본에서는 배양 40일, 후숙배양 20일, 그 후 자실체 생육에 20일정도 소요되어 총 재배일수가 약 80일 전후로 재배하고 있다. 본 연구에서 공시한 균주는 전배양일수가 균주에 따라 최대 40일까지 차이가 있고 후숙배양 일수에 따른 자실체의 발생 및 수량 등을 검토하지 않았기 때문에 직접 비교하기는 어렵지만, 전배양이 40일 전에 완료되는 균주들은 대체로 일본수준인 80~85일에 재배가 가능한 균주를 선발할 수 있을 것으로 사료된다.

또 HYM-014균주등 6균주는 공시한 배지에서 거의 균사 생장이 이루어지지 않았고 일부 균사생장이 거의 이루어지지 않은 상태에서 발생한 자실체의 형태가 갓 표면의 무늬가 없는 등 형태적으로 다른 균주들이 발생하여 HYM-049균주의 재분류가 필요할 것으로 사료된다.

(3) 인공재배 자실체의 형태 및 수량성 조사

느티만가닥버섯 38균주를 인공재배 실험을 실시하여 자실체를 발생한 균주는 그 중 26균주였고(Table 1-7), 빠른 배양과 발이를 보인 HYM-049균주는 큰느타리버섯으로 판명되었다.

HYM-051 균주는 유일하게 백색 자실체를 형성하였고, HYM-009 균주는 검은색에 가까운 진한 색을 띠었다. 만가닥 1호로 등록된 HYM-009 균주는 한천배지와 인공재배용 배지(37일)에서 빠른 생장을 보였지만, 정상적인 자실체 형성은 하지 못하여 분류학적 위치의 재검토가 필요한 것으로 판단된다.

수집된 느티만가닥버섯 균주의 자실체 갖의 형태는 크게 3종류로 나눌 수 있었는데 가장 많은 group은 전형적인 느티만가닥버섯으로 갖의 색택이 회색이며 짙은색의 무늬가 있는 것(HYM-023, HYM-024, HYM-026, HYM-026, HYM-028, HYM-029, HYM-030, HYM-032, HYM-038, HYM-040, HYM-041, HYM-044, HYM-052)과 약간 베이지색의 갖을 형성하는 것(HYM-031) 그리고 백색자실체를 형성하는 균주(HYM-051)가 있었다. 이 3 group은 분자유전학적 또는 형태적 재분류가 필요할 것으로 판단된다. 병당 자실체 수량은 병당 약 70g에서 170g까지 매우 다양하였고, 수량이 낮은 균주 group을 대부분 발이된 자실체 중 일부만 빨리 생육하여 동일 병에서 발생한 자실체의 크기가 매우 불규칙한 경향을 보였다. 수량성이 160g 이상인 HYM-031균주와 HYM-051균주는 자실체의 크기는 작으나 발생한 자실체 원기의 대부분이 균일하게 성장하여 품질과 수량이 우수하였다.

갖의 크기가 20mm를 초과하는 버섯을 형성하는 균주는 대부분 유효 자실체의 수가 적고 크기, 형태가 불균일하여 농가 인공재배용으로는 부적합한 것으로 판단된다.

Table 1-7. Characteristics and yield of *H. marmoreus* fruit bodies grown under the white fluorescent lamp

Isolate	Fruit body				Isolate	Fruit body			
	Yield/ bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe			Yield/ bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe	
			Length(mm)	Diameter(mm)				Length(mm)	Diameter(mm)
HYM-001					HYM-003				
	119.2 ± 23.9	21.8 ± 2.6	58.7 ± 8.4	17.0 ± 4.6		67.8 ± 56.7	23.8 ± 7.6	54.0 ± 11.5	15.8 ± 4.4
HYM-006					HYM-007				
	105.6 ± 46.7	22.0 ± 5.3	54.2 ± 13.6	17.5 ± 3.5		61.3 ± 60.2	24.9 ± 5.5	63.6 ± 10.8	18.0 ± 4.8
HYM-023					HYM-024				
	89.2 ± 45.5	15.6 ± 3.5	50.3 ± 7.1	12.8 ± 3.1		120.1 ± 21.1	17.5 ± 4.7	54.7 ± 10.6	12.2 ± 3.9
HYM-037					HYM-038				
	149.8 ± 25.0	20.2 ± 3.3	64.1 ± 5.8	15.5 ± 3.4		142.2 ± 27.0	17.2 ± 3.2	56.6 ± 8.9	14.0 ± 3.4

Table 1-7. Continued

Isolate	Fruit body				Isolate	Fruit body			
	Yield/ bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe			Yield/ bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe	
			Length(mm)	Diameter(mm)				Length(mm)	Diameter(mm)
HYM-040					HYM-041				
	129.1 ± 15.7	14.4 ± 2.8	54.8 ± 4.3	12.5 ± 4.4		88.8 ± 53.4	24.4 ± 5.3	70.3 ± 11.7	10.1 ± 2.8
HYM-044					HYM-051				
	77.3 ± 50.8	25.0 ± 5.2	63.5 ± 10.1	14.2 ± 8.6		118.0 ± 46.7	19.5 ± 6.3	48.9 ± 11.3	13.0 ± 4.4
HYM-052									
	171.1 ± 11.6	14.9 ± 3.0	55.8 ± 7.31	7.4 ± 1.5					

라. 후배양 기간이 자실체 생육에 미치는 영향

느티만가닥버섯은 재배용 톱밥배지에서 약 80일의 배양기간을 필요로 하는데 이렇게 장기간의 배양기간은 40일 간의 배양기간 후에 후숙 배양이 약 40일 정도 소요되기 때문이다. 후숙배양을 하지 않으면 자실체의 발생 및 생육이 불량하여 재배 실패의 원인이 되기도 한다. 또한 지나치게 장기간 소요되는 배양 기간은 유해균 오염의 원인이 되기도 하며 생산비 증가의 원인이 되기도 한다.

따라서 본 연구에서는 후숙 배양기간이 느티만가닥버섯의 자실체 형성 및 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본 배지에 HYM-023 균주를 공시하여 종균을 접종한 후 23±1℃에서 40일간 배양한 후 20℃와 25℃로 옮겨 10일에서 50일간 후숙배양을 실시한 후 온도 15.0±1.

0℃, 습도 95.0±5.0%, CO₂ 농도 1,000ppm 이하로 조절된 재배실로 옮겨 자실체 발생과 생육을 조사하였다. 광조사는 10분 광 - 50분 암주기로 자실체 수확일까지 1일 24회 총 4시간 광을 조사하였다.

Table 1-8. Effect of maturing culture periods and temperature on the fruiting and yield of *H. marmoreus*

Incubation condition		Requiring Days			Yield (g/bottle) ¹⁾
Temperature (°C)	Periods (day)	Initiation of fruiting	Maturation	Total cultivation	
20	10	15	11	76	147 ^c
	20	17	9	86	152 ^b ^c
	30	17	10	97	171 ^a
	40	17	9	106	165 ^a
	50	17	9	116	154 ^{bc}
25	10	15	11	76	158 ^b
	20	16	12	88	172 ^a
	30	16	11	97	175 ^a
	40	17	10	107	165 ^b
	50	17	10	117	148 ^c

¹⁾ DMRT at 5%

느티만가닥 버섯균을 공시 배지에 배양한 후 20℃와 25℃에서 각각 후숙배양을 10일에서 50일간 실시한 후에 자실체 발이와 생육을 실시하였다. 그 결과 발이 소요일 수는 15일에서 17일까지 후숙배양 기간이 길어질수록 자실체 발생이 늦어지는 경향을 보였으나 생육기간은 반대로 후숙 배양 기간이 짧아질수록 생육에 필요한 기간이 길어졌다. 모든 처리구에서 그 차이는 2일 이내로 후숙배양 소요일 수에 따른 자실체 발생과 생육기간에는 큰 차이를 보이지 않는 것으로 밝혀졌다. 자실체 수량은 20℃에서는 30일과 40일이 170g 정도의 수량을 보였고 25℃에 후숙배양하였을 경우에는 20일과 30일이 수량이 가장 좋았다. 따라서 최적의 후숙배양은 25℃에서 20일, 30일간 배양 하는 것이 가장 좋은 것으로 밝혀졌다.

마. LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발

(1) 광질이 느티만가닥버섯균의 균사 성장에 미치는 영향

광질이 느티만가닥버섯균의 균사 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 파장이 다른 NUV(Wave length 405nm), Blue(Wave length 460nm), Green(Wave length 530nm), Yellow(Wave length 590nm), Red(Wave length 630nm), White(Wave length 6500K) LED 광원을 16시간 광, 8시간 암 주기로 조사하면서 온도 23.0±1.0℃에서 10일간 배양한 결과는 Fig. 1-6과 Table 1-8과 같다. LED의 광량은 NUV를 제외하고는 10~20μmol/m²s⁻¹으로 조절하였고 NUV 광은 약 2μmol/m²s⁻¹의 광량으로 조절하였다.

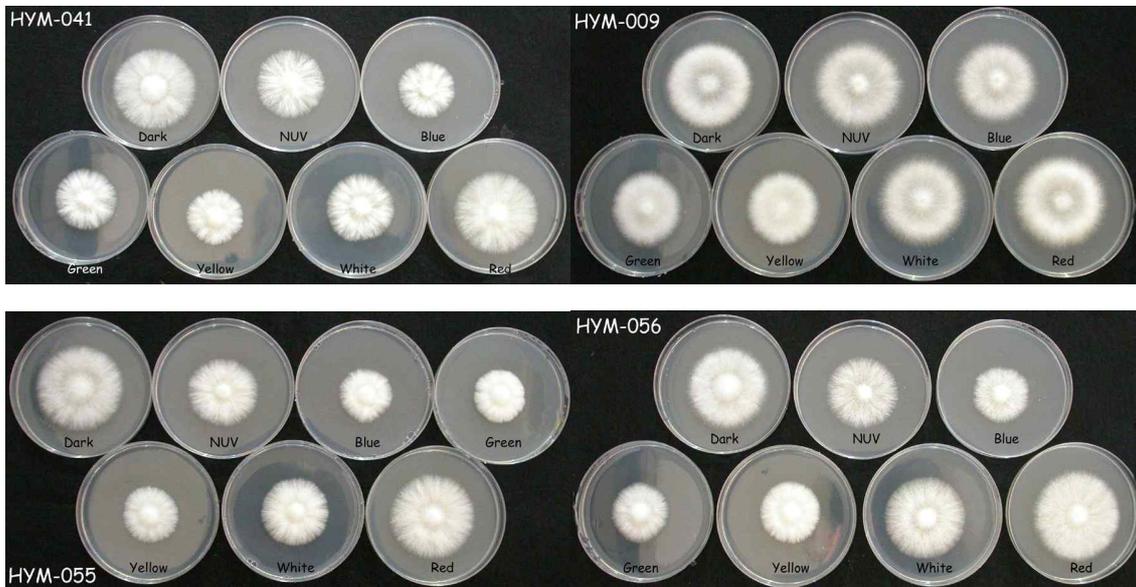


Fig. 1-6. Mycelial colonies of *H. marmoreus* isolates under the various light sources.

Table 1-8. Effect of light quality on the mycelial growth of *H. marmoreus* isolates on the PDA media

	HYM-009	HYM-041	HYM-055	HYM-056	HYM-049
Dark	6.1 ± 0.6	5.6 ± 0.5	5.7 ± 1.7	5.9 ± 1.0	8.5 ± 0.0
NUV	6.4 ± 0.6	4.4 ± 1.0	4.1 ± 1.0	4.7 ± 0.7	3.3 ± 2.1
Blue	5.7 ± 1.5	3.6 ± 0.6	2.9 ± 1.5	3.8 ± 0.6	3.5 ± 1.6
Green	5.0 ± 0.0	3.9 ± 0.6	2.9 ± 0.6	3.6 ± 1.5	5.3 ± 2.1
Yellow	5.0 ± 1.2	3.5 ± 2.1	3.3 ± 0.0	4.1 ± 1.7	8.3 ± 2.7
Red	6.3 ± 0.6	5.5 ± 0.0	5.5 ± 1.2	6.1 ± 1.1	8.4 ± 2.2
White	5.8 ± 0.6	4.5 ± 3.1	4.1 ± 0.6	4.8 ± 2.0	4.0 ± 0.6

공시균주로 한천배지에서 균사생장이 양호한 5균주(HYM-009, -041, -049, -055, -056)를 선발하여 균사생장을 조사한 결과 만가닥 1호인 HYM-009균주는 광질에 따른 균사생장 차이는 거의 없었다. 적색광 처리구에서 HYM-041, HYM-055 그리고 HYM-041 균주는 암조건과 비슷한 균사생장을 보여 적색광은 광억제 효과는 없는 것으로 판명되었다. 그러나 청색광, 녹색광, 황색광 처리구에서는 약 10에서 20%의 광억제 효과를 보였고 단파장인 NUV 처리구에서는 청색광, 녹색광, 황색광 처리구보다 낮은 억제율을 보였다. 이는 다른 처리구보다 NUV 처리구의 광량이 약 1/10 정도로 광도가 낮았기 때문으로 판단된다. 복합광인 백색광처리구에서는 400~600nm의 파장을 가진 청색광, 녹색광보다 낮은 억제율을 보였다. 한편 큰느타리버섯 균주인 HYM-049균주는 NUV, 청색, 녹색광에서는 50% 이상의 광억제율을 보였으나 장파장인 황색과 적색광에서는 큰 영향을 주지 못하였다.

(2) 광질이 느티만가닥버섯 자실체 생육에 미치는 영향

광질이 느티만가닥버섯 자실체 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Table 1-9, 1-10, 1-11, 1-12과 같이 백색형광등 조사 조건에서 비교적 자실체의 생육이 양호하였던 4균주를 균

균기한 후에 자실체 원기 발생시켜 5종의 LED 광원(White, Yellow, Green, Blue, Red)과 NUV, 암 처리구에서 생육을 시켰으며 광 조사시간은 16시간 광 - 8시간 암 주기로 수확까지 조사하였다. 광조사 이외의 환경 조건은 온도 15.0±1℃, 습도 90%이상, 이산화탄소 농도 1,000ppm 이하로 조절하였다.

Table 1-9. Characteristics and yield of *H. marmoreus* isolate HYM-017 fruit bodies grown under the various light sources

Light Sources	HYM-017	Yeild/bottle (g)	No. mature fruit body/bottle	Size of fruit body		
				Diameter of pileus(mm)	Stipe	
					Length (mm)	Diameter (mm)
Dark		113.0 ± 8.5	10.5	11.2 ± 2.2	58.3 ± 7.0	16.3 ± 3.9
NUV		151.0 ± 17.0	27	14.3 ± 3.0	55.5 ± 6.5	11.6 ± 3.3
Blue		156.0 ± 18.4	25.5	15.0 ± 2.7	56.4 ± 8.3	13.5 ± 3.1
Green		134.0 ± 48.1	8	17.3 ± 2.7	62.7 ± 6.8	14.0 ± 3.3
Yellow		123.0 ± 4.2	8	12.6 ± 1.7	57.7 ± 8.9	12.6 ± 4.9
Red		155.0 ± 28.3	25.2	14.4 ± 10.1	64.4 ± 15.8	10.0 ± 2.7
White		153.0 ± 45.3	22	16.8 ± 2.9	60.2 ± 7.9	14.8 ± 3.9

광조사 방법은 백색형광등하에서 자실체 원기를 발생시킴 후에 각각의 광처리 chamber 에 각 균주당 8병씩 넣고 1시간 light - 5 시간 dark cycle로 자실체 수확일까지 1일 4회 총 4시간 광을 조사하였다.

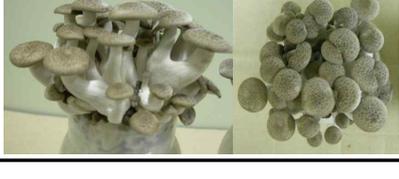
느티만가닥버섯의 자실체 수량과 품질은 균주에 따라 광반응이 약간의 차이가 있었으나 생산량은 HYM-017균주는 단과장영역은 NUV, Blue, 장과장은 Red 그리고 복합광인 White에서 양호하였다. 자실체의 형태는 단과장에서 대의 길이가 짧았으나 장과장인 Red와 Green에서는 대길이가 길어지고 암처리구와 마찬가지로 자실체가 심하게 굽어지는 경향을 보였다. 갓 크기도 단과장인 NUV와 Blue, Green에서 크게 형성되었다. 전체적인 자실체 발생과 모양, 품질, 균일도 등을 평가하면 NUV, Blue광이 가장 효과적인 것으로 판단되었다.

Table 1-10. Characteristics and yield of *H. marmoreus* isoalte HYM-021 fruit bodies grown under the various light sources

Light Sources	HYM-021	Yeild/bottle (g)	No. mature fruit body/bottle	Size of fruit body			
				Diameter of pileus(mm)	Stipe		
					Length (mm)	Diameter (mm)	
NUV	 	143.0 ± 7.1	27	14.5 ± 2.8	63.3 ± 9.1	13.4 ± 3.7	
Blue	 	157.0 ± 19.8	31	14.3 ± 3.5	62.6 ± 9.7	12.6 ± 3.4	
Green	 	126.0 ± 35.4	22.5	13.7 ± 2.4	58.3 ± 10.7	13.6 ± 4.8	
Yellow	 	144.0 ± 17.0	34	12.7 ± 3.1	59.9 ± 14.1	13.7 ± 4.2	
Red	 	87.0 ± 56.6	14.5	11.6 ± 1.8	69.9 ± 12.7	12.7 ± 3.1	
White	 	117.5 ± 33.2	14.5	12.4 ± 2.3	48.4 ± 8.4	11.4 ± 2.3	

HYM-021균주는 NUV와 Blue, Yellow 광처리구에서 양호하였고 갓 직경은 장과장인 Yellow와 Red에서 적었고, 대길이는 Red광 처리구에서 길게 형성되었다. HYM-021 균주는 장과장인 Yellow와 Red에서 갓이 매우 작게 형성되고 대가 굵어지는 등 품질이 불량하였다. NUV와 Blue, Green에서도 1병에서 발생하는 자실체의 생육이 전반적으로 균일하지 못한 단점을 보였다.

Table 1-11. Characteristics and yield of *H. marmoreus* isoalte HYM-025 fruit bodies grown under the various light sources

Light Sources	HYM-025	Yeild/bottle (g)	No. mature fruit body/bottle	Size of fruit body		
				Diameter of pileus(mm)	Stipe	
					Length (mm)	Diameter (mm)
Dark		148.5 ± 16.3	10.5	17.8 ± 2.8	69.2 ± 11.9	11.8 ± 4.2
NUV		170.5 ± 31.8	26.5	19.5 ± 3.8	73.8 ± 12.4	11.8 ± 3.8
Blue		177.0 ± 4.2	22	20.6 ± 5.9	70.3 ± 14.5	12.7 ± 4.3
Green		181.0 ± 15.6	32.5	19.0 ± 4.6	75.9 ± 11.0	10.3 ± 2.9
Yellow		164.5 ± 4.9	24.5	19.1 ± 4.6	72.5 ± 13.5	12.5 ± 5.0
Red		178.0 ± 5.7	22.5	18.2 ± 4.5	83.8 ± 21.6	12.7 ± 4.6
White		181.0 ± 24.0	26.5	16.9 ± 4.3	60.8 ± 7.7	11.8 ± 3.7

HYM-025 균주의 자실체 수량은 광질에 따라 큰 차이가 없이 170g 이상을 수확할 수 있었으나 암상태에서 생육시킨 것과 장과장인 Yellow와 Red광하에서는 기형의 개체 많이 발생하여 품질이 좋지 않았다. 유효자실체 수량은 Green 광처리구에서 많았으나 자실체의 크기가 균일하지 않았고 갓 크기는 백색광과 암상태에서 생육시킨 자실체가 작은 경향이었고 대길이는 Green과 Red에서 길게 형성되었으나 다른 균주에 비해 전체적으로 광 억제 효과는 적은 것으로 나타났다. HYM-042균주도 다른 균주와 마찬가지로 장과장에서 갓 크기가 작고 대길이가 길어지는 반면 단과장에서는 자실체가 비교적 균일하고 갓의 크기가 크고 대가 직립형으로 발생하였다.

Table 1-12. Characteristics and yield of *H. marmoreus* isoalte HYM-042 fruit bodies grown under the various light sources

Light Sources	HYM-042	Yeild/bottle (g)	No. mature fruit body/bottle	Size of fruit body		
				Diameter of pileus(mm)	Stipe	
					Length(mm)	Diameter(mm)
Dark		104.5 ± 13.4	19	9.4 ± 2.7	58.8 ± 9.1	9.2 ± 3.2
NUV		133.0 ± 1.4	24	14.9 ± 2.4	63.0 ± 8.1	11.1 ± 2.4
Blue		108.5 ± 12.0	25	13.9 ± 3.5	57.4 ± 7.5	12.0 ± 3.2
Green		117.5 ± 26.2	16.5	14.1 ± 2.6	63.7 ± 9.6	11.8 ± 4.3
Yellow		125.5 ± 48.8	26	14.8 ± 3.4	69.7 ± 13.0	10.9 ± 2.5
Red		115.5 ± 0.7	28	10.5 ± 3.1	64.9 ± 14.8	9.4 ± 3.3
White		107.5 ± 10.6	15.5	13.7 ± 3.6	51.5 ± 8.0	10.5 ± 2.7

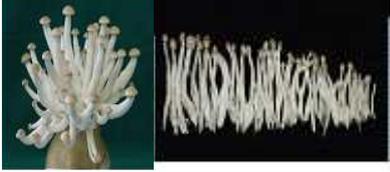
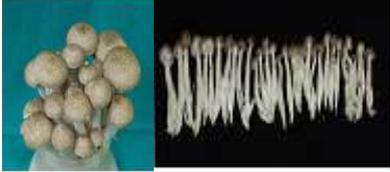
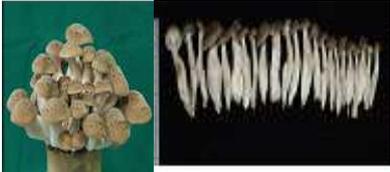
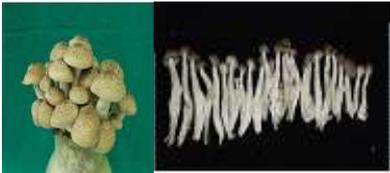
본 실험에서 느티만가닥버섯은 Green 이하의 단파장에서 자실체 형태가 균일하고 갓의 색, 모양 등이 상품성이 있었으나 장파장에서는 갓이 작고 연하며 대의 신장이 좋고 대가 굵어지는 등 기형 버섯이 많이 발생하였다. 가장 단파장인 NUV처리구에서 자실체 품질이 양호한 것은 광량이 다른 LED 광원에 비하여 1/10수준이기 때문으로 사료되며 동일한 광량을 조사하면 자실체 언제가 심할 것으로 추정된다. 또 본 실험에서 1병에서 발생한 자실체의 형태 변이가 심하였는데 이를 균일하게 하기 위해서는 광조사 시간을 좀 더 조절해 줄 필요가 있을 것으로 판단된다.

광질이 느티만가닥버섯의 자실체 형태 형성에 미치는 영향을 조사한 결과, 대의 신장에는 Yellow, Red등 장파장이, 갓의 발달에는 Blue, Green의 단파장이 효과가 있을 것으로 판단되며 고품질의 버섯을 생산하기 위하여 생육시기별 광 조사 시간, 주기, 광량등을 추가로 조사할 필요가 있을 것으로 판단된다.

(3) 혼합 LED 광 처리가 느티만가닥버섯균의 자실체 성장에 미치는 영향

균급기 후에 자실체 원기를 발생 시킨 후 LED 광원을 ① Blue와 White, ② Green과 White, ③ Blue와 Red ④ Blue와 Green 그리고 ⑤ Green과 Red로 혼합하여 조사하면서 생육을 시켰으며 광 조사시간은 16시간 광 - 8시간 암 주기로 수확까지 조사하였다. 광 조사 이외의 환경 조건은 온도 15.0±1℃, 습도 90%이상, 이산화탄소 농도 1,000ppm 이하로 조절하였다.

Table 1-13. Effect of combination light on the fruit body formation of *H. marmoreus* isoalte HYM-025 grown under the various light sources

Light Sources	Yeild/bottle (g)	No. mature fruit body/bottle	Size of fruit body		Fruit bodies
			Diameter of pileus(mm)	Length of stipe(mm)	
Dark	110.5 ± 16.3	15	17.8 ± 2.8	89.2 ± 11.9	
Fluorescent light	145.5 ± 31.8	33	27.5 ± 3.8	79.8 ± 13.4	
Blue	160.5 ± 31.8	38	30.5 ± 3.8	73.8 ± 13.4	
Blue and Green	157.0 ± 4.2	41	20.6 ± 3.9	77.3 ± 16.5	

Blue and Red	151.0 ± 15.6	31	26.0 ± 4.6	77.9 ± 14.5		
Blue and White	168.0 ± 15.6	43	26.0 ± 3.6	76.9 ± 13.0		
Green and Red	145.5 ± 4.9	33	23.1 ± 2.6	79.5 ± 14.5		
Green and White	140.0 ± 5.7	41	24.2 ± 4.5	80.8 ± 17.6		

광질이 느티만가닥버섯의 생육에 미치는 영향을 검토한 결과 단과장광인 Blue와 Green 광 그리고 혼합광인 White 광 처리구에서는 갓의 색택이 진하고 갓이 잘 발달한 반면에 장과장영역인 Red와 Yellow 광을 조사한 처리구에서는 갓의 색이 연하고 대가 길어지는 경향을 보여 모든 처리구에서 최고의 품질의 버섯을 수확하기 어려웠다. 따라서 자실체 색택이 진하고 비교적 품질이 균일하게 형성되었던 Blue와 Green 광을 기본으로 하여 Red와 White 그리고 Blue와 Green 광을 혼합한 처리구에서 느티만가닥버섯의 생육 실험을 진행하였다. 그 결과 생산량은 Blue 단독광 처리와 Blue와 White를 혼합하여 조사한 처리구에서 가장 많았고 갓의 직경도 다른 처리구에 비해 크게 형성되었다. Blue 광에서는 대의 길이가 가장 짧게 형성되어 청색광은 갓 형성시기, 즉 출하 직전에 집중적으로 조사하면 품질이 좋은 버섯을 생산할 수 있을 것으로 판단된다. 현재 농가에서 가장 많이 사용하고 있는 백색 형광등은 수량과 품질면에서 LED 광 처리구에비하여 떨어지는 경향을 보였다. LED 광을 사용할 경우 가장 이상적인 조합은 Blue와 White 조합이 가장 좋은 것으로 밝혀졌다.

(4) 광 조사시기가 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향

느티만가닥버섯은 재배 소요일수가 약 100일정도 소요되는 것으로 알려져 있고 이 버섯을 많이 재배하고 있는 일본에서는 배양 40일, 후숙 배양 20일, 그 후 자실체 생육에 20일정도 소요되어 총 재배일수가 약 80일 전후로 재배하고 있다. 본 연구에서 선발 공시한 군주도 총 재배 일수가 80~85일로 배양 완료 후 발이까지 10일 전후로 소요되었으며 일반 농가에서 사용하고 있는 군주의 12일보다 빠른 편이었다.

LED 광원의 조사가 느티만가닥버섯의 자실체 유도 및 생육에 미치는 영향을 조사 한 결과 Table 1-14와 같이 자실체 원기 형성은 광의 영향을 그다지 많이 받지 않았으나 청색광을 처리한 경우에는 암처리구보다 오히려 1일이 늦어져 자실체 원기 유도는 청색광에 의해 억제를 받는 것으로 밝혀졌다. 이는 Table 1-6에 나타낸 바와 같이 단과장의 광은 균사생장을 심하게

억제하였는데 자실체 원기 유도도 균사생장과 마찬가지로 영양생장의 연장선상에 있기 때문이거나 또는 균류기 후 균사의 부상이 억제를 받았기 때문 인 것으로 판단된다. 한편 자실체 수확까지의 소요 일수도 암처리구를 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았으나 혼합광인 백색광에서 약 1일 정도 빠르게 수확할 수 있었다.

Table 1-14. Effect of LED light with different wave length on the requiring days for fruit body initiation and development of *H. marmoreus*

	Requiring days for	
	fruit body initiation	fruit body development
Dark	10.0±0.0	23.8±0.0
Blue	11.0±2.8	21.3±1.8
Green	9.4±0.6	21.0±1.3
Yellow	9.9±0.1	21.7±1.1
Red	9.9±0.0	21.5±0.6
White	9.6±0.8	20.3±0.4

각 처리구별 초발이 소요일수를 조사한 결과, Table 1-14와 같이 각 처리구 별 큰 차이는 없었으나 녹색광, 백색광이 빠르게 나타나 발이유도에 적합한 광질로 선발되었으며 상대적으로 발이 유도가 늦은 광(황색광, 적색광)은 생육 기간과 자실체 형태에도 좋지 않은 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. 균사 생장 실험에서는 암처리와 적색광이 균사 생장이 빠른 것으로 나타나 균사 생장과 자실체 생육에 필요한 광질이 다른 것으로 조사되었다.

따라서 느티만가닥버섯 재배시에 배양실은 항상 암상태를 유지하는 것이 중요하고 자실체 유도 및 생육에는 청색과 백색의 LED 소자를 혼합한 광이 효과적인 것으로 판단된다.

느티만가닥버섯의 생육에 최적의 광 조사 시기를 구명하기 위하여 LED 광원을 균류기 후 조사한 경우와 자실체 원기 유도 후부터 조사한 경우의 각 LED 광원하에서 자실체 생육 소요 일수를 조사한 결과 Table 1-15와 같다.

Table 1-15. Effect of light illumination timing on the requiring days for fruit body development of *H. marmoreus*

Illumination timing	Requiring days for fruit body development(day)				
	Blue	Green	Yellow	Red	White
After mycelial scratching	22.5	21.9	22.5	24.1	20.7
After forming fruit body primordium	20	20	20	20	20

느티만가닥버섯은 자실체 원기 발이 후 광 조사를 시작한 처리구가 일정하고 빠른 생육을 보인 반면에 균류기 후에 LED 광을 처리한 경우는 처리구는 광질, 광량에 영향을 받아 불규칙

적인 생육기간을 보였다. 백색 LED광을 처리한 경우는 발이 후 광 조사를 한 처리구와 거의 동등한 생육일수를 보였으나 청색, 녹색, 황색, 적색광하에서는 1일에서 4일정도 늦은 생육을 보였다. 이 결과 느티만가닥버섯은 자실체 원기 유도 후 광을 조사하는 것이 안정적인 생육을 유지할 수 있는 것으로 조사되었다.

(5) 광량이 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육기간에 미치는 영향

광량이 느티만가닥버섯의 자실체 발생 유도 및 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각 다른 파장을 가진 5종의 LED 광원을 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 과 $30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 광량을 조절한 2개의 처리구로 나누어 발이유도, 자실체 생육기간과 자실체의 형태적 특성을 조사하였다.

느티만가닥버섯의 자실체 원기 형성 유도는 군사생장과 자실체 발생 유도 억제 효과가 미약했던 적색광, 황색광 처리구는 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구와 $30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구간 광도에 따른 자실체 발생 소요 일수에 차이가 없었다. 그러나 군사생장 억제 효과를 보였던 청색광과 녹색광 그리고 백색광은 $30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구가 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구보다 각각 4일, 0.8일, 1.1일 늦게 자실체 원기가 형성되었다. 따라서 청색광, 녹색광 그리고 백색광은 광의 강도가 강해질수록 자실체 원기의 형성이 늦어지는 것으로 밝혀졌다.

Table 1-16. Effect of LED light intensity with different wave length on the requiring days for fruit body initiation and development of *H. marmoreus*

	Requiring days for fruit body initiation		Requiring days for fruit body development	
	$5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Dark	10		22	
Blue	9	13	20	22.5
Green	9	9.8	20	21.9
Yellow	9.9	9.8	20.9	22.5
Red	9.9	9.9	21.9	21.1
White	9	10.1	20	20.6

한편 자실체 생육기간은 적색광을 제외한 처리구에서 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구가 $30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구보다 0.6일(백색광처리구)에서 최대 2.5일(청색광 처리구)까지 빠르게 수확할 수 있었다. 따라서 단파장영역의 광이 군사생장 뿐 아니라 자실체 생육에도 억제 작용을 하는 것으로 나타났다. 그러나 적색광 처리구는 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구가 0.8일 늦게 자실체를 수확했다. 따라서 적색광은 자실체 생육에 아무 반응을 보이지 못하였고, 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다.

LED 광처리가 느티만가닥버섯의 품질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 공시배지 군사 배양 후 균긋기 한 뒤 LED 광원을 조사하면서 20일간 재배한 후 형성된 자실체의 갓 크기, 대길이 및 대의 직경, 수확량등을 조사한 결과는 Table 1-15와 Fig. 1-3과 같다. 이 실험 역시 5종류의 LED 광원을 사용하였으며 각 광원의 광도는 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 과 $30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 조정하였다.

Table 1-17. Effect of LED light illumination after mycelium scratching on the morphology and yields of fruit body of *H. marmoreus*

	LED light intensity							
	$5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$				$30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$			
	Diameter of pileus(mm)	Stipe		Yeild /bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe		Yeild /bottle (g)
Length(mm)		Diameter(mm)	Length(mm)			Diameter(mm)		
Dark	10.3±2.2	73.8±10.7	6.5±1.5	84.9±30.3	10.3±2.2	73.8±10.7	6.5±1.5	84.9±30.3
Blue	19.9±1.8	55.6±6.2	7.6±1.1	99.3±11.7	22.7±5.7	60.7±6.9	8.4±1.6	74.2±29.6
Green	15.9±2.8	75.3±7.1	7.6±1.6	100.5±10.8	19.3±5.5	79.0±10.8	8.5±1.7	138.3±14.9
Yellow	11.0±2.2	85.6±10.6	7.8±1.4	90.2±50.2	8.6±1.8	67.8±8.4	6.5±1.2	97.7±32.2
Red	9.6±1.9	58.8±9.5	7.1±1.3	61.9±17.7	11.2±2.4	74.7±9.9	7.3±1.9	79.4±30.3
White	19.3±4.5	70.7±9.5	6.7±1.3	93.1±17.0	13.5±3.5	54.4±8.9	6.7±1.6	94.1±41.9

$5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광을 조사하였을 경우 갓의 직경은 청색광과 백색광이 거의 동일한 수준이었으며 장과장일수록 갓의 직경이 작아졌다. 대의 길이는 청색광이 장과장일수록 대의 길이가 길어졌다. 그러나 적색광의 경우 청색광과 비슷한 수준으로 나타났는데 이는 생육이 전체적으로 부진했고, 발이일수가 차이가 있었지 때문으로 사료된다. 대의 굵기는 백색광을 제외하고는 거의 동등한 수준으로 형성되었다. 또한 수량은 청색광과 녹색광이 가장 양호하였다.

한편 $30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광원을 처리한 경우에도 갓의 직경은 장과장일수록 작아지는 경향을 보였고 대의 길이는 장과장일수록 길어지고 대의 굵기는 큰 차이가 없었다. 수량은 녹색광이 월등히 우수하였고 청색광은 오히려 감소하였다.

따라서 LED광원을 사용하여 느티만가다버섯을 재배할 경우에는 청색광이나 녹색광 또는 백색광으로 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 정도의 광량이 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다.

Fig. 1-3은 균굽기 후 광조사가 느티만가다버섯 자실체 형태와 품질에 미치는 영향을 나타낸 것으로 $5\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와 $30\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 처리구 모두 녹색광과 청색광에서 자실체의 크기와 생육상태가 비교적 균일하고 효과적인 것으로 밝혀졌고 백색광의 경우 개체간의 변이가 심하였고, 대가 굵은 자실체 발생 비율이 높았다. 황색광은 2개의 처리구 모두에서 유사하긴 하지만 대 길이는 65~67mm로 80%정도 감소되었고, 자실체는 형태가 팽이버섯처럼 대가 길고 갓이 작으며 대굵기도 가장 가늘었다. 적색광은 처리구는 가장 적은 수량과 작은 갓 크기를 보였고, 대의 꼬임 현상도 가장 많았으며, 광조사 시기와 생육기간에 관계없이 재분화 현상을 보였고, 갈색품종임에도 거의 백색에 가까운 색을 내었다.

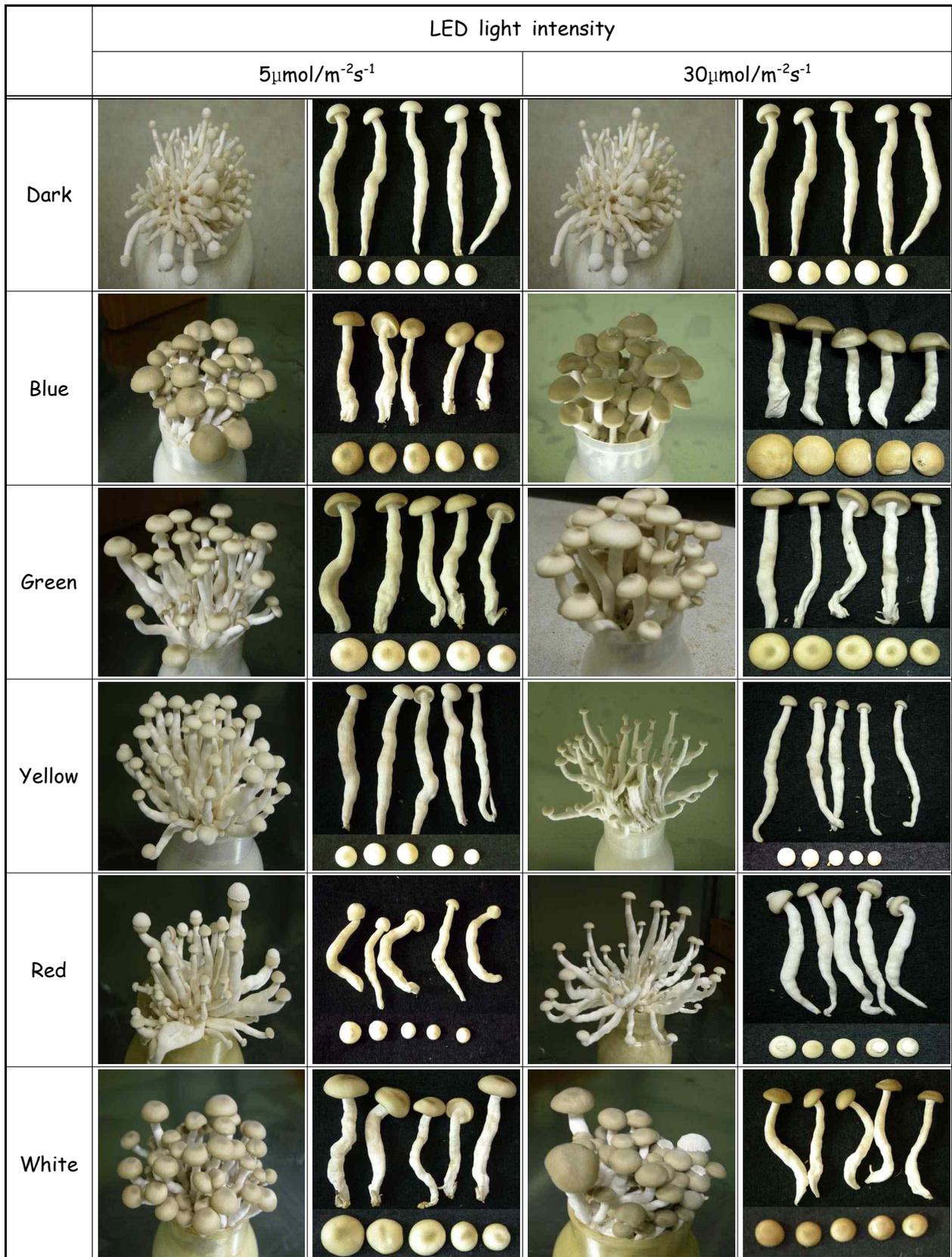


Fig. 1-7. Effect of LED light illumination after mycelium scratching on the morphology of fruit body of *H. marmoreus*

대체적으로 $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 처리구에서 발이 전 광조사는 생육기간을 지연시켜 개체가 불균일

하게 성장하고, 대길이 생장이 억제되고, 갓 성숙은 진행되어 재분화 현상이 많이 나타났다. 광량이 높을수록 자실체 생장을 억제시키는 것으로 보여진다.

백색형광등 8시간 조사 - 16시간 암상태로 9일간 재배하여 자실체 원기 유도 후 LED광원을 조사하면서 재배한 결과는 Table 1-18과 Fig. 1-8와 같다.

Table 1-18. Effect of LED light illumination after formation of fruit body primordium on the morphology and yields of fruit body of *H. marmoreus*

	LED light intensity							
	$5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$				$30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$			
	Diameter of pileus(mm)	Stipe		Yeild /bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe		Yeild /bottle (g)
Length(mm)		Diameter(mm)	Length(mm)			Diameter(mm)		
Dark	10.0±2.5	67.7±13.7	7.1±1.6	55.3±26.2	10.0±2.5	67.7±13.7	7.1±1.6	55.3±26.2
Blue	18.7±2.1	65.6±4.4	8.2±1.5	93.1±10.2	16.5±3.3	53.2±5.7	7.1±1.1	76.3±8.7
Green	16.0±2.9	72.4±9.2	7.4±1.4	101.2±10.8	13.9±3.6	64.7±11.6	8.0±1.3	75.0±9.0
Yellow	13.9±2.9	85.0±8.0	7.8±1.2	89.0±33.0	10.7±1.9	65.3±7.3	7.8±1.6	77.1±44.3
Red	10.4±3.1	71.4±8.3	8.4±1.3	52.9±9.9	11.7±2.0	79.7±6.3	7.4±1.2	62.4±14.8
White	17.4±2.7	67.6±8.1	7.0±1.2	103.4±6.2	17.6±3.2	53.4±6.0	8.1±1.9	74.4±7.2

$5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 의 광량을 가진 LED광원을 조사하였을 경우 갓의 직경은 Table 1-15의 균류 기 후 광처리한 경우와 같은 결과를 보여 장과장일수록 갓의 크기가 작아졌고, 대의 길이는 길어졌으며 대의 굵기는 큰 차이가 없었다. 수량 역시 녹색광과 청색광이 양호하였고 적색광은 아주 불량하여 녹색광에 비하여 50%정도 밖에 수확하지 못하였다. $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 의 광을 조사한 경우, $5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 처리구와 비슷한 경향을 보였으나 수량은 광원의 종류에 따른 차이는 거의 없었다.

Fig. 1-8은 발이 후 광조사하면서 재배한 자실체의 형태와 품질을 비교 분석한 결과로, $5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 광을 처리하였을 경우 청색광이 가장 우수하였고, 발생한 자실체의 크기가 거의 균일하였으나 수량이 좋았던 녹색광에서 생육한 자실체는 갓의 크기에서 변이가 심하였고 색택이 옅은색으로 상품성이 그다지 좋지 않았다. 황색광과 적색광은 대가 아주 불규칙하여 상품성이 떨어지는 것으로 판단된다. 또 $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 을 처리하였을 경우 청색광에서 형성된 자실체는 갓의 색이 아주 진하였으나 균일성은 녹색광 하에서 우수하였다. 적색광의 경우 $5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 와 $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 처리구 모두 상품화하기에는 어려운 품질의 버섯을 형성하였다.

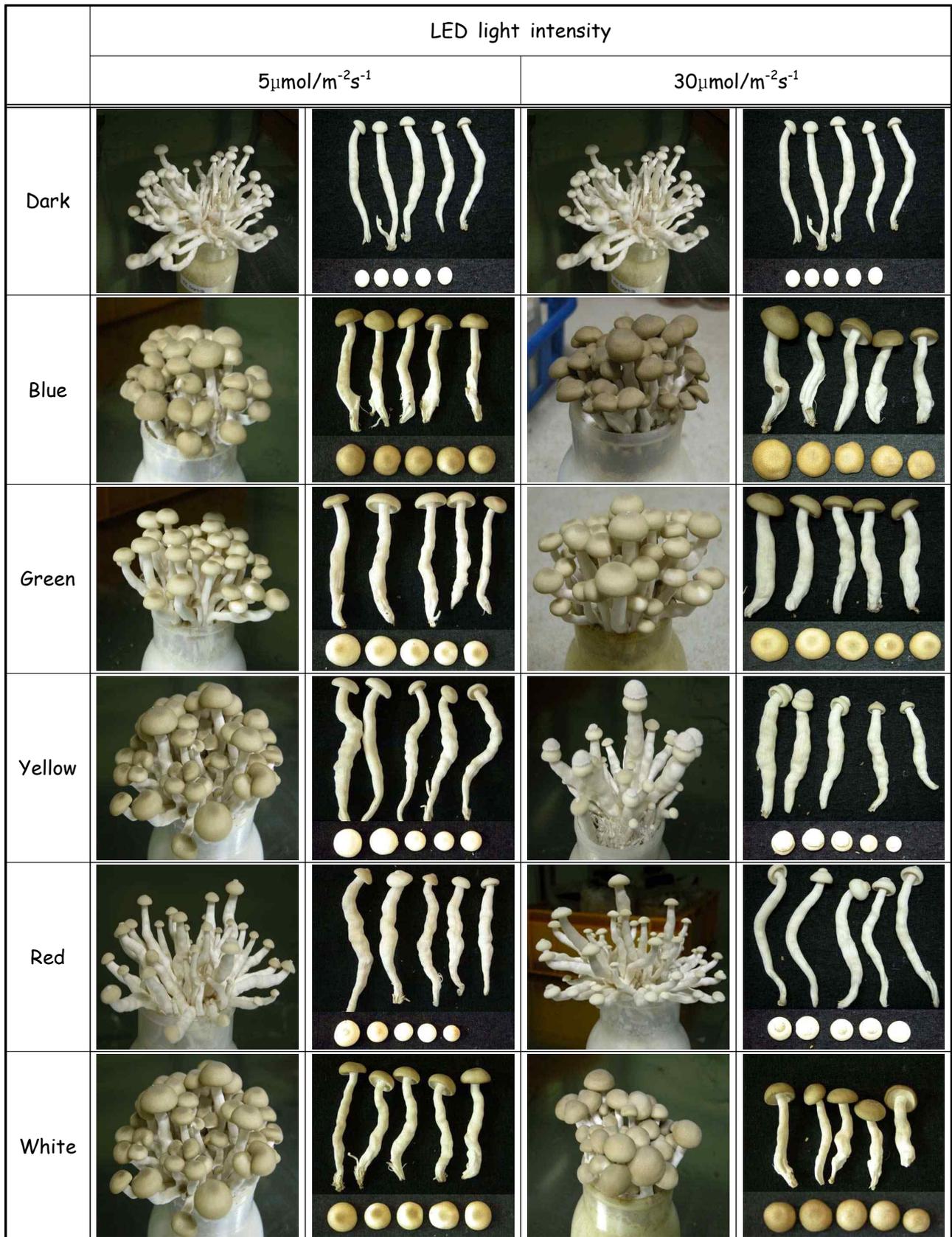


Fig. 1-8. Effect of LED light illumination after formation of fruit body primordium on the morphology of fruit body of *H. marmoreus*

한편 $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 의 광을 처리하였을 경우, Fig. 1-9에 제시한 바와 같이 갓의 재분화가 쉽게 일어나 느티만가닥버섯 재배에는 부적합한 것으로 밝혀졌다.



Fig. 1-9 광량 $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 에서 느티만가닥버섯의 재분화

LED 광원을 이용한 느티만가닥버섯의 재배 실험 결과 광원의 종류로는 청색광 또는 녹색광이 최적의 광원으로 밝혀졌고 광량은 강할수록 성장 억제가 심하였고, 생육 기간 지연과 품질 하락(갓은 커지고, 대는 짧아지고, 갓의 재분화 현상)으로 버섯 재배에 적합하지 않았다. 느티만가닥버섯의 재배에서는 $5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 정도의 아주 낮은 광으로 충분히 가능한 것으로 밝혀졌다. 최근 식물 재배에 적용하는 고휘도 LED광의 경우 느티만가닥버섯 재배에는 오히려 심한 억제 작용을 하고 기형버섯을 형성하는 원인이 되는 것으로 밝혀졌다. 또한 광조사 시기는 안정된 생산성과 품질을 보이는 자실체 발이 후가 적합한 것으로 밝혀졌다. 한편 광조사주기는 연속광 조사보다는 광조사에 의한 생식생장전환, 암배양에 의한 영양생장을 연속적으로 짧게 변환시켜주는 것이 유리한 것으로 밝혀졌다.

다. 저비용 속성재배용 배지 개발

(1) 액체종균용 염가 배지 개발

느티만가닥버섯 액체 종균용 염가배지를 선별하기 위하여 Table 1-3과 같이 10종류의 액체 배지를 조제하여 고압 증기멸균한 후 공시균주를 접종하여 10일간 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 배양하여 균사 생장을 조사하였다(Table 1-19). 최적 배지 선별을 위한 배지 1ℓ를 조제를 하기 위해 소요되는 비용은 PD broth가 약 5,000원인 반면에 미강, 밀기울, 축산사료를 사용한 배지는 약 100원 내외의 비용으로 조제가 가능하였다. 그 외에 곰팡이 배양에 자주 사용하는 MG, CM, MYP, SY, YPMG 배지도 약 1,000원에서 4,000원의 비용이 소요되어 미강, 밀기울을 사용한 배지보다 10배에서 40배 정도의 비용이 소요되었다.

Table 1-19. Mycelial growth of isolate HYM-106 on the various media at 25°C for 10 days

Media	Solid culture		Liquid culture
	Mycelial growth (mm)	Aerial mycelia	Weight (mg)
PD	69.0 ± 8.3	+++	37.0 ± 5.0
MG	63.5 ± 11.4	+	<10
CM	77.6 ± 2.0	+++	47.0 ± 5.0
MYP	81.0 ± 1.7	+++	50.0 ± 8.0
SY	65.2 ± 5.7	+	23.0 ± 5.0
YPMG	80.4 ± 1.5	+++	110.0 ± 8.0
SB	62.8 ± 7.5	++	43.0 ± 5.0
RB	73.2 ± 2.8	++	57.0 ± 5.0
WB	73.4 ± 2.2	++	37.0 ± 5.0
LY	65.4 ± 1.9	++	40.0 ± 6.0
Average	63.9 ± 21.0		45.7 ± 25.5

공시배지에서 균사생장을 조사한 결과 느티만가닥버섯 HYM-106 균주는 고체배지에서는 MYP배지와 YPMG배지에서 균사생장이 가장 양호하였고 PD, CM, MYP, YPMG 배지에서 기중균사가 많이 형성되고 균사의 밀도도 높은 경향을 보였다(Fig. 1-10). 액체배지에서는 YPMG, RB, MYP, CM, SB, LY, PD, WB, SY, MG 배지 순으로 균사 생장이 양호하였다. YPMG 배지는 고체배양과 액체배양에서 모두 가장 좋은 균사생장량을 보였고 특히 액체 배지에서는 다른 종류의 배지에서 보다 2, 3배의 균사생장을 보여 느티만가닥버섯의 최적배지로 선 발할 수 있었다. 그러나 제조비용이 1ℓ당 2,300원 이상 소요되어 농가에서 종균용 배지로는 부적합할 것으로 사료되었다. 그러나 미강배지는 제조비용이 1ℓ당 100원 정도이면서 균사생장도 양호하여 농가에서 대량으로 사용하는 종균용 배지로 적합한 것으로 판단된다.

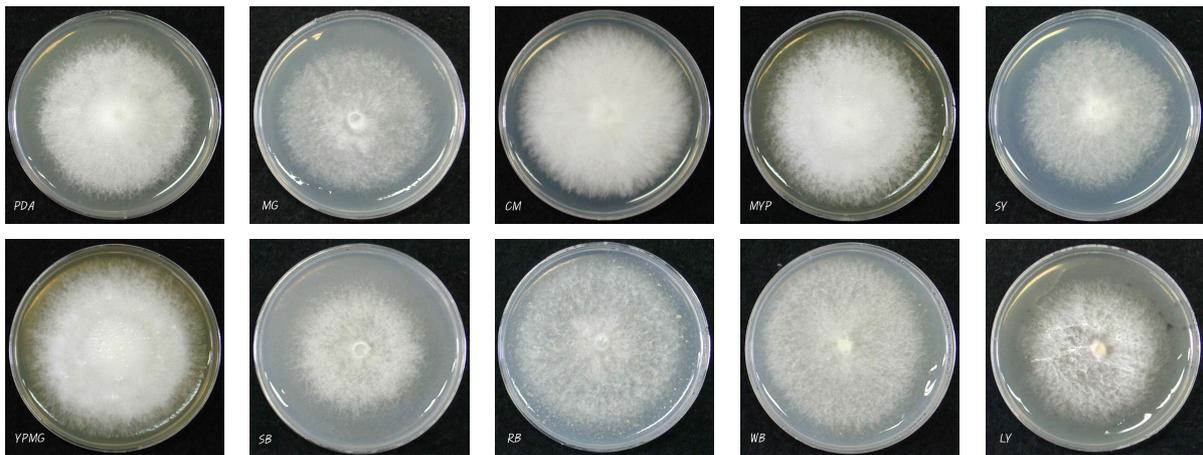


Fig. 1-10. Mycelial colony of isolate HYM-106 on the various media at 25°C for 10 days

배지 제조비용도 저렴하며 느티만가닥버섯의 균사 생장도 매우 양호한 것으로 판명된 미강 배지의 미강과 황설탕의 최적 농도를 정하기 위하여 미강 3%를 기본배지로 하여 황설탕을 3, 5, 7, 10%로 첨가한 배지와 황설탕 3%를 기본배지로 하여 미강을 3, 5, 7, 10%로 첨가한 배지

를 제조하여 균사생장을 조사한 결과는 Table 1-20과 같다.

Table 1-20. Effect of rice bran and sugar concentration on mycelial growth of isolate HYM-106 at 25°C for 15 days

Concentration(%)	Basal material	
	Yellow sugar(3%)	Rice bran(3%)
3	66.7±11.5	66.7±11.5
5	93.3±23.1	80.0±20.0
7	106.7±11.5	86.7±11.5
10	116.7±5.8	93.3±11.7

미강 혹은 황설탕 3% 기본배지에 황설탕과 미강의 농도를 3, 5, 7, 10%를 첨가한 배지에서 느티만가닥버섯의 균사생장은 배지 재료의 농도가 증가할수록 균사생장량은 정비례하여 증가하는 경향을 보였다. 그러나 미강 농도가 10% 이상이 되면 배지 제조시에 미강성분의 추출액을 제조하는데 많은 어려움이 있고 배지의 탁도도 매우 흐려 종균배지로 사용할 시에는 균사생장과 오염 여부의 관찰이 어려워 미강의 농도는 7%가 가장 적당한 것으로 판단되었다. 황설탕을 첨가한 배지도 농도가 증가하면 할수록 균사생장이 좋았고 10% 첨가해도 삼투압에 의한 균사생장 억제는 발생하지 않았다.

(2) 첨가제가 느티만가닥버섯균의 균사 생장에 미치는 영향

저비용 속성재배용 배지를 개발하기 위하여 첨가제가 느티만가닥버섯의 균사 생장에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1-7과 같다. 본 연구에 사용한 첨가제로는 NaCl (0.2, 0.5, 1, 2, 3%), Ca-ion 水(50, 100, 130ppm), 산호분말(50, 100, 500, 1000ppm), 굴껍질분말(50, 100, 500, 1000ppm), 허브추출물(50, 100, 250, 500, 1,000ppm)과 상용액비(50, 100, 250, 500, 1,000ppm)등 6종류를 사용하였으며, 이들 재료를 PDA에 각각 다른 농도로 첨가하여 느티만가닥버섯균의 균사 생장을 조사하였다. 배지 pH는 평균 6.0±1.0이었고, 온도는 25.0±1.0°C, 암상태에서 배양하였다.

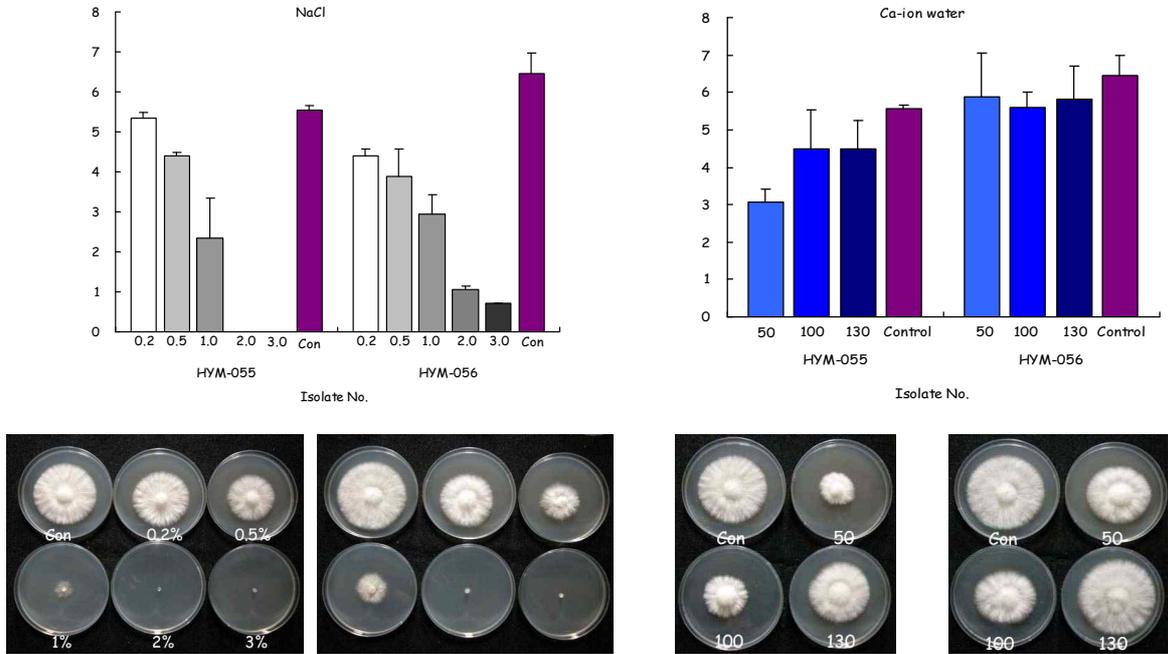


Fig. 1-11. Effect of NaCl and Ca-ion water on mycelial growth of *H. marmoreus*

NaCl은 느티만가닥버섯의 균사생장을 심하게 저해하였고, 다만 HYM-055 균주는 200ppm NaCl 처리에도 대조구와 유사한 균사 성장을 보였다. Ca-ion 수 처리구도 대부분 대조구보다 늦은 성장을 보였지만, HYM-055균주는 50ppm 처리구보다 100, 130ppm을 처리한 배지에서 더 빠른 성장을 보였다. HYM-056 균주는 NaCl 모든 농도에서 균사 성장을 했지만, HYM-055균주보다는 NaCl에 약하였다. Ca-ion 수에서는 대조구보다 생장이 약간 저조하였으나, 큰 차이 없이 모든 농도에서 균사 생장이 양호하였다.

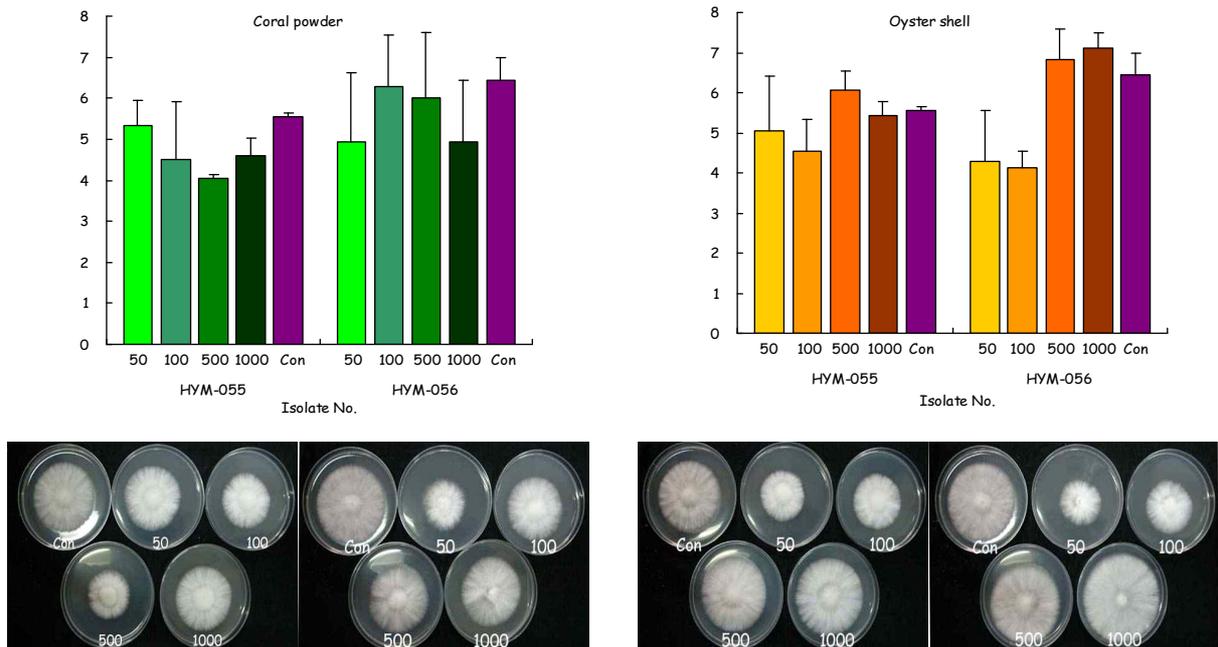


Fig. 1-12 Effect of coral powder and oyster shell on mycelial growth of *H. marmoreus*

산호분말 처리구에서 HYM-055균주는 50ppm, HYM-056균주는 100ppm에서 대조구와 유사한 성장 속도를 보였고, 굴껍질 분말 처리구에서 HYM-055균주는 500ppm, HYM-056균주는 500ppm과 1000ppm에서 대조구보다 빠른 성장 속도를 보였다. 그러나 굴껍질을 50, 100ppm의 저농도로 사용해도 균사 생장이 저해를 받아 적정 사용농도에 대한 추가 실험이 필요한 것으로 사료된다. 사용 첨가제에 따른 균주 특성이 다르게 나타났지만, 산호 분말보다는 굴껍질분말이 느티만가닥버섯의 균사 성장을 더 촉진시키는 것으로 판단된다.

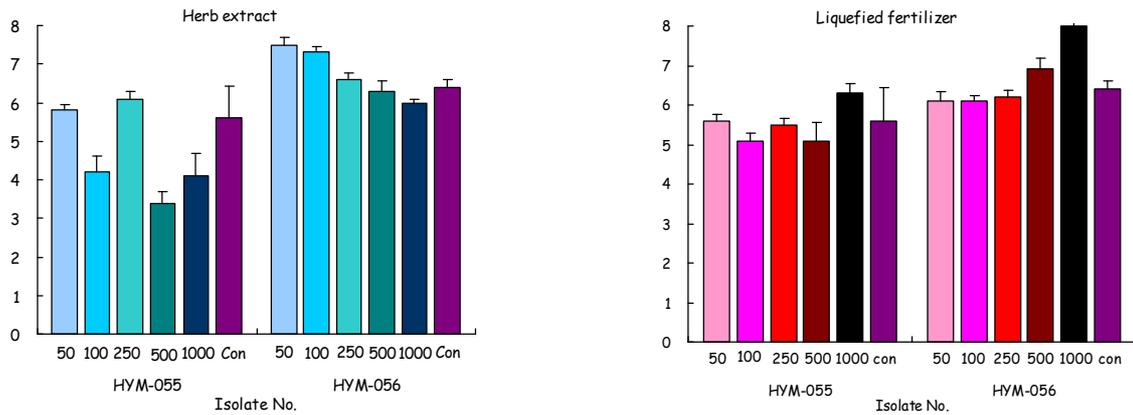


Fig. 1-13. Effect of herb extract and liquefied fertilizer on mycelial growth of *H. marmoreus*

허브추출물을 처리하였을 경우 HYM-055균주의 균사 성장을 저해하였고, HYM-056균주는 50~250ppm 첨가시 균사 성장 촉진 효과를 보였다. 허브추출물은 고농도일 경우 균주에 따라 균사생장을 억제하기도 하지만 저농도 첨가로 균사 성장 촉진 효과도 있어 속성배지 첨가제로 사용 가능할 것으로 판단된다. 액비의 경우에는 2 균주 모두 성장속도가 모든 농도에서 대조구와 유사하였고, 1000ppm에서는 1.2배정도 더 빨랐다. 1000ppm에서 효과가 가장 좋아 재배용 배지의 대량 생산시 재료비 원가에 영향을 미칠 수 있어 사용 농도에 대한 추후 실험이 필요하다.

느티만가닥버섯의 재배용 속성배지를 제조하기 위하여 6종의 첨가제로 균사생장 조사를 한 결과, 첨가에 따른 균주 특성 차이는 있지만, 굴껍질분말과 허브추출물, 액비의 첨가는 재배용 배지에서의 균사 성장 속도를 높이는데 도움이 될 것으로 사료된다.

(3) 느티만가닥버섯 재배를 위한 최적 배지 선발

느티만가닥 버섯의 최적 배지를 선발하기 위하여 미송톱밥, 콘코브, 대두피, 밀기울, 비트펄프, 옥분 등을 공시재료로 하여 Table 1-4와 같이 혼합하여 각각의 배지에 폐화석 석분을 2% 첨가한 후 배지의 수분을 약 70%로 조절하여 고압 증기멸균하여 사용하였다. HYM-023 균주를 공시하여 종균을 접종한 후 배양 소요일수를 측정하였으며 초발이일수, 생육일수와 수량 품질을 조사하였다.

Table 1-21. Effect of cultivation media on the fruit body formation of *H. marmoreus*

Media	Mycelial growth (40days)	Requiring days for fruit body		No. mature fruit body/bottle	Size of fruit body		Yeild/bottle (g)
		initiation	development		Diameter of pileus(mm)	Length of stipe(mm)	
Medium 1	118.4	15	11	39.7	26.7 ± 2.8	81.9 ± 11.9	171.5 ± 16.3
Medium 2	95.3	15	11	35.3	22.4 ± 3.8	58.0± 13.4	160.5 ± 31.8
Medium 3	98.2	13	11	35.1	21.6 ± 3.8	54.8 ± 13.4	135.5 ± 31.8
Medium 4	91.6	13	11	38.6	22.3 ± 3.9	63.3 ± 16.5	160.0 ± 4.2

느티만가닥버섯은 미송톱밥, 콘코브, 대두피, 밀기울을 40:30:15:15(v/v)비율로 혼합한 배지에서 균사생장이 가장 빠르고 수량도 가장 좋았다. 미송톱밥과 콘코브를 기본 배지 재료로 하여 밀기울, 비트펄프, 옥분을 부재료로 하여 배지를 조성하였을 때 밀기울이 영양원으로는 가장 좋았으며 비트펄프와 옥분 첨가 배지에서는 균사생장도 늦고 수량도 높지 않아 최종 배지로 미송톱밥, 콘코브, 대두피, 밀기울을 40:30:15:15(v/v)비율로 혼합한 배를 선발할 수 있었다.

마. 안정적 재배법 확립

느티만가닥버섯의 안정적 재배법 확립을 위하여 1, 2차년도 연구 결과를 토대로 Fig. 1-10과 같은 과정으로 농가 실증 재배를 실시하였다.



고압 혹은 상압살균

고압살균 115~118℃ 약 2시간
 상압살균 100~105℃ 약 6시간

냉각실, 무균실, 자동접종기

냉각실에서 냉각 후 자동접종기로 접종, 종균 1병으로 약 32병 접종 가능

배양숙성실

초기 : 20℃, 50~60% RH
 중기 : 18~20℃, 60~70% RH
 숙성 : 22~23℃, 60% RH
 총 배양일수 : 60~65일

균류기



균류기기

접종 후 80~100일 이상 경과하면 노화균사와 균 덩이 제거하여 균일한 발이 유도

⇒

발이유도



발이실

광: 5μmol/m²s⁻¹이하
 온도: 15℃전후
 습도: 95~100%
 기간: 약 10일

⇒

생육



생육실

광: 5μmol/m²s⁻¹이하
 온도: 15℃전후
 습도: 95~100%
 기간: 10~13일

수확



수확

갓이 전개되고 대의 길이가 60~80mm일때

⇒

포장



포장

다발 포장

⇒

탈병



자동 탈병

잔여 배지 제거하고 병세척 실시

Fig. 1-14. Suggestion for Standard bottle cultivation process of *H. marmoreus*

광원은 예비실험에서 좋은 결과를 낸 백색+청색의 혼합광을 사용했으며, 최적의 광주사 주기를 Table 1-22와 같이 자실체 생육단계를 I, II, III, IV, V 단계로 나누어 온습도, 환기, 광을 조절하면서 재배하였다.

Table 1-22. Environmental conditions of cultivation house of *H. mamoreus*

	Temp.(℃)	Humidity(%)	Aeration (min) on-off	Light illumination(min) Light-Dark
Stage I 1st day	13.5	about 95%	3 - 8	-
Stage II 13th day	14.5	about 100%	4 - 8	5 - 15
Stage III 16th day	14.5	about 98%	5 - 8	8 - 15
Stage IV 17th day	14.5	about 95%	5 - 8	10 - 15
Stage V 19th day	14.5	about 95%	5 - 8	12 - 15

재배에 사용한 균주는 총 105균주로 재배까지 성공한 균주는 90균주이다. 미송, 콘코브, 대두

박, 밀기울(40:30:15:15, v/v)배지에 접종 후 23.0±1.0℃에서 60일동안 배양하고, 균긋기 후 10일 정도 후숙처리하여 발이를 유도하였다. 초발이는 균긋기 후 10일 ~ 14일 정도가 소요되었다. 실험에 사용한 균주 중 15균주는 백색품종이었고, 갈색품종보다 생육이 2~3일정도 늦고, 1~2℃ 정도 낮은 온도가 생육 적온이다. Fig. 1-15과 같이 농가 실증재배에서 재배한 자실체를 형성하였다. HYM-055와 HYM-056 균주는 현재 국내에서 시판되고 있는 균주로 다른 균주들의 대조구로 사용하였다. 갓색에 따라 크게 백색과 갈색으로 2개의 품종으로 나누었는데, HYM-047균주의 경우 회갈색에 갓 표면이 매끈하지 않고 점무늬도 거의 없었다.



Fig. 1-15. 느티만가닥버섯 농가실증재배한 자실체 형태

재배한 느티만가닥버섯의 자실체 형태적 특성과 수량은 Table 1-23과 같다. HYM-008, HYM-064, HYM-089, HYM-092 등 4균주가 병당 150g 이상 생산하여 생산성이 매우 우수하였으며 특히 HYM-089 균주는 백색 자실체를 형성하는 균주임에도 150g 이상생산하여 매우 우수한 것으로 판단된다. 또 HYM-009, HYM-010, HYM-014, HYM-031, HYM-045, HYM-047, HYM-051, HYM-055, HYM-057, HYM-062, HYM-065, HYM-078, HYM-082, HYM-087, HYM-090, HYM-091, HYM-094 균주 등도 130g 이상 생산되어 재배용 품종으로 아주 적합한 것으로 판단 된다. 그러나 대부분의 균주가 병당 100g 이상을 생산하여 재배용 품종으로 문제가 없을 것으로 판단되었으나 HYM-042, HYM-030, HYM-022, HYM-035, HYM-079, HYM-038, HYM-059, HYM-068, HYM-093, HYM-097, HYM-001, HYM-028, HYM-074, HYM-050, HYM-110, HYM-044, HYM-034, HYM-037, HYM-100, HYM-075, HYM-070, HYM-027, HYM-086, HYM-069은 생산성이 매우 저조하여 100g에도 미치지 못하였다.

한편, 국내 야산에서 채집하여 분리한 HYM-069, HYM-108, HYM-109, HYM-110 균주 중 자실체

발생에 성공한 HYM-069, HYM-109, HYM-110 균주는 100g 미만을 생산하여 품종화하기에는 적합한 배지 선발 연구가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

Table 1-23. Morphology and yields of fruit body of *H. marmoreus*

Isolate	Fruit body				Isolate	Fruit body			
	Yeild/ bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe			Yeild/ bottle (g)	Diameter of pileus(mm)	Stipe	
			Length(mm)	Diameter(mm)				Length(mm)	Diameter(mm)
HYM-001	88.5±5.7	14.3±2.1	7.8±1.4	46.8±5.2	HYM-056	127.0±10.0	18.4±3.7	8.2±1.7	80.8±7.6
HYM-003	123.0±26.7	14.3±1.6	6.7±1.1	76.6±5.6	HYM-057	131.4±25.6	17.7±4.0	12.1±3.2	71.3±10.4
HYM-055	119.6±18.3	14.9±3.0	10.1±2.0	60.7±6.5	HYM-059	92.1±26.0	13.3±3.6	9.7±2.1	61.4±6.1
HYM-007	127.2±29.5	13.2±3.1	6.6±1.4	68.8±7.6	HYM-060	109.6±31.0	19.8±3.8	10.5±2.8	67.4±5.5
HYM-008	167.0±9.9	12.9±2.6	6.4±1.1	76.2±4.6	HYM-061	110.7±32.5	20.6±3.7	10.2±2.6	78.1±8.4
HYM-009	143.3±16.4	17.3±3.9	14.2±18.9	74.1±8.7	HYM-062	133.8±25.6	14.6±3.9	6.2±1.7	71.5±5.3
HYM-010	140.8± 19.6	16.0±2.0	6.7±0.9	76.1±5.5	HYM-063	103.1±18.7	12.7±1.9	6.2±0.9	70.2±5.8
HYM-012	110.2±22.3	18.6±2.7	7.2±1.0	79.2±9.2	HYM-064	165.6±8.2	17.3±3.7	8.3±1.6	85.0±5.8
HYM-013	113.6±14.2	16.6±3.6	6.8±1.4	51.1±7.2	HYM-065	140.8±15.5	22.0±5.5	9.8±2.0	88.5±15.6
HYM-014	132.2±18.0	18.6±3.7	7.0±1.2	81.1±6.1	HYM-066	117.6±34.2	12.5±1.8	6.1±1.2	71.8±5.7
HYM-015	119.6±27.1	14.7±3.9	6.6±1.0	81.9±12.3	HYM-068	90.4±25.0	17.3±2.6	11.5±2.5	68.1±12.4
HYM-016	116.5±28.8	17.8±2.5	8.0±1.8	67.5±7.4	HYM-069	61.3±14.2	16.9±2.6	7.2±1.0	67.6±5.4
HYM-017	108.7±28.7	15.0±4.3	8.1±1.4	57.4±14.5	HYM-070	70.5±15.7	12.8±2.1	7.5±1.8	49.1±3.0
HYM-018	111.1±24.0	17.4±2.9	9.4±1.8	57.0±5.3	HYM-071	110.2±33.1	16.3±2.5	9.6±1.4	81.3±6.9
HYM-019	117.1±22.0	14.6±2.5	10.5±2.8	62.5±7.8	HYM-073	113.1±23.3	14.1±2.7	7.2±1.7	64.0±5.5
HYM-020	108.2±20.4	17.5±3.7	9.5±1.8	68.4±5.1	HYM-074	86.3±22.2	12.1±2.6	6.4±1.8	66.3±7.4
HYM-021	105.2±26.1	12.9±3.0	8.8±1.6	63.6±6.4	HYM-075	71.6±27.6	14.7±2.6	7.6±0.9	66.4±6.0
HYM-022	98.1±30.2	15.7±2.7	10.0±1.5	50.9±4.4	HYM-076	122.5±15.4	18.6±3.5	8.8±1.5	72.8±8.1
HYM-024	100.6±34.7	13.5±2.5	7.9±1.6	53.2±8.2	HYM-077	118.3±19.5	16.3±3.4	10.7±2.9	68.0±3.1
HYM-025	128.6±31.0	14.3±1.7	8.1±1.3	74.3±6.5	HYM-078	133.1±23.8	17.1±3.3	8.3±1.6	73.7±7.2
HYM-026	118.2±13.3	14.9±2.0	8.4±1.1	61.7±7.7	HYM-079	95.9±20.9	24.6±4.8	11.6±2.7	91.1±8.2
HYM-027	68.7±25.9	15.3±3.4	8.1±2.0	55.0±5.6	HYM-080	120.1±11.6	19.6±5.0	9.8±2.8	74.8±10.4
HYM-028	87.4±27.1	13.5±3.1	7.5±1.8	61.8±6.0	HYM-081	107.1±21.7	21.3±4.1	8.1±1.8	71.1±9.7
HYM-029	115.1±30.5	16.3±3.7	8.5±1.6	67.0±6.1	HYM-082	135.1±15.3	20.7±3.9	11.8±1.9	74.3±5.4
HYM-030	99.5±28.4	17.0 3.9	9.4±2.8	61.1±5.0	HYM-083	114.6±34.3	15.7±5.8	7.9±1.9	59.0±8.2
HYM-031	142.0±28.0				HYM-086	64.5±16.2	17.3±2.2	9.3±2.2	62.1±5.9
HYM-032	119.0±24.8	21.7±2.6	8.6±1.2	73.8±9.6	HYM-087	144.3±26.4	17.5±4.3	9.0±2.3	72.9±5.7
HYM-033	128.5±18.8	15.4±4.5	7.9±1.7	70.7±6.7	HYM-088	113.8±32.0	15.2±3.0	8.1±1.5	67.8±6.7
HYM-034	77.1±27.8	15.7±3.1	7.6±1.5	58.9±4.5	HYM-089	164.9±11.8	19.9±4.7	11.3±3.3	71.8±7.9
HYM-035	96.8±19.4	15.2±2.9	8.5±1.5	53.5±4.4	HYM-090	146.0±25.6	19.3±3.5	7.4±1.0	86.2±7.5
HYM-036	125.7±12.0	15.6±4.5	7.8±2.0	62.7±9.4	HYM-091	137.7±18.8	20.2±5.7	10.8±2.6	74.8±11.6
HYM-037	76.0±35.2	15.1±2.1	7.9±1.4	60.3±3.9	HYM-092	155.7±25.3	17.0±4.9	7.8±1.7	79.8±8.7
HYM-038	95.5±31.2	16.4±2.3	9.0±1.6	62.6±6.0	HYM-093	88.7±30.6	17.7±3.8	9.0±2.1	60.4±3.0
HYM-039	109.9±25.6	17.1±2.5	9.9±1.5	79.9±8.3	HYM-094	136.3±23.1	16.6±4.3	8.0±1.7	71.1±7.9
HYM-040	117.7±16.6	13.9±2.8	9.4±1.8	67.2±4.9	HYM-095	113.3±30.0	22.9±3.1	10.3±2.2	75.8±4.7
HYM-041	115.0±11.9	21.5±5.7	8.1±2.2	88.3±13.6	HYM-096	124.8±28.1	17.0±3.6	9.6±2.6	63.0±5.8
HYM-042	99.5±29.1	12.7±3.2	7.4±1.5	59.9±6.5	HYM-097	88.7±18.2			
HYM-043	128.5±22.0	16.8±2.4	8.3±1.4	75.5±5.1	HYM-098	117.3±40.5	15.5±2.9	9.2±1.8	68.8±6.3
HYM-044	82.8±13.9	16.6±2.0	8.8±0.7	75.8±5.3	HYM-099	128.8±17.9	15.1±1.9	8.7±1.1	71.2±2.7
HYM-045	135.5±20.4	17.1±4.0	10.1±2.0	62.8±4.5	HYM-100	76.0±26.0	18.1±3.8	10.9±2.1	58.9±4.7
HYM-047	141.4±31.4	15.1±3.5	8.1±1.5	70.8±4.8	HYM-103	116.2±29.2	19.4±2.5	12.0±2.0	71.2±7.5
HYM-048	110.1±31.8	18.1±2.4	7.3±1.2	78.9±8.2	HYM-105	116.8±27.8	17.6±4.0	8.8±2.7	58.4±7.3
HYM-050	85.1±27.2	17.3±2.4	10.4±1.5	64.4±5.5	HYM-109	109.6±22.6	23.7±4.8	10.7±1.4	77.7±9.0
HYM-051	146.9±21.5	18.6±2.2	10.7±3.1	72.7±5.1	HYM-110	84.6±31.7	14.9±4.1	8.5±2.5	54.4±6.2
HYM-055	130.8±22.1	20.4±3.6	12.6±2.8	61.5±5.9	HYM-111	122.2±29.8	15.2±3.8	8.6±1.8	76.9±11.7

4. 요약

느티만가닥버섯 유전자원은 국내외에서 111 균주를 확보하였다. 이들 균주의 수집 지역별 분포는 한국 자생균주 2균주, 중국 도입균주 35균주, 대만도입균주 13균주이고 나머지는 명확하지 않으나 일본에서 수집된 것으로 추정된다.

본 연구에서 수집한 유전자원은 91균주가 자실체를 형성하였다. 이중 HYM-031, -047, -109균주는 갓의 크기가 크고 갓 표면의 무늬가 없이 옅은 회갈색의 자실체를 형성하였다. 이들 균주는 잣빛만가닥버섯(*L. decastes*)으로 판단된다. 느티만가닥버섯으로 판단되는 나머지 88균주 중 10균주는 흰색 자실체를 형성하였고 나머지 78균주는 전형적인 느티만가닥버섯의 형태를 하고 있었다. URP prime로 RAPD-PCR을 수행하여 UPGMA 분석과 Neighbor-Joining 분석으로 유연관계를 분석한 결과 수집지역, 자실체의 형태 등 특징과는 관계가 없이 4그룹으로 나뉘었다. 많은 균주들이 유사도 100%를 보여 같은 균주가 다른 재배 농가 혹은 지역에서 널리 재배되고 있는 것으로 추정된다. 자실체 형태가 느티만가닥버섯과 달라 잣빛만가닥버섯으로 추정되는 HYM-031, HYM-047, HYM-069, HYM-109균주도 outgroup로 분류되지 않고 cluster 안으로 포함되어 이들 중 역시 유전적으로 매우 밀접한 종으로 추정된다.

재배 생리학적 특성을 분석하기 위하여 한천배지에 배양한 결과 수집된 느티만가닥버섯 균의 균사생장은 RBA, MCM, MEA, PDA 순으로 좋았다.

느티만가닥버섯의 인공재배 조건을 검토한 결과 배양 일수는 전배양이 균사생장이 빠른 균사가 35일에서 균사생장이 늦은 균주는 55일 소요되었으며 후속 배양까지 포함하여 총 80일 이상 소요되었다.

균급기를 하여 자실체 발생을 유도한 결과 발이소요일수는 7일에서 19일까지 균주별로 매우 다양하였으며 생육일수는 6일에서 14일까지 다양하였다. 종균을 접종하여 배양기간과 자실체 생육일수까지 총 재배소요 기간은 96일에서 107일까지 소요되었다.

느티만가닥버섯 110균주를 인공재배 실험을 실시하여 자실체를 발생한 균주 중 HYM-008, HYM-064, HYM-089, HYM-092 등 4균주가 병당 150g 이상 생산하여 생산성이 매우 우수하였으며 특히 HYM-089 균주는 백색 자실체를 형성하는 균주임에도 150g 이상 생산하여 매우 우수한 것으로 판단된다. 또 HYM-009 등 17 균주도 130g 이상 생산되어 재배용 품종으로 아주 적합한 것으로 판단된다. 그러나 대부분의 균주가 병당 100g 이상을 생산하여 재배용 품종으로 문제가 없을 것으로 판단되었으나 HYM-022 등 23균주는 생산성이 매우 저조하여 100g에도 미치지 못하였다. 국내 야산에서 채집하여 분리한 HYM-069, HYM-109, HYM-110 균주는 100g 미만을 생산하였다.

LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술을 개발하기 위하여 파장이 다른 NUV(Wave length 405nm), Blue(Wave length 460nm), Green(Wave length 530nm), Yellow(Wave length 590nm), Red(Wave length 630nm), White(Wave length 6500K) LED 광원을 조사하면서 균사생장 및 자실체 발생, 생육에 미치는 영향을 조사하였다.

적색광 처리구에서 느티만가닥버섯 균주는 암조건과 비슷한 균사생장을 보여 적색광은 광역제 효과는 없는 것으로 판명되었다. 그러나 청색광, 녹색광, 황색광 처리구에서는 약 10에서 20%의 광역제 효과를 보였다. 느티만가닥버섯의 자실체 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 단파장인 Blue광과 Green광 그리고 White LED 광을 조사한 처리구에서 자실체 품질과 수량이 우수하였으며 장파장인 Red 광과 Yellow 광 처리구에서는 갓의 분화가 불량하고 대가 길어지

는 경향을 보여 품질이 저조하였다. LED 광을 사용할 경우 가장 이상적인 조합은 Blue와 White 조합이 가장 좋은 것으로 밝혀졌다.

저비용 속성재배용 배지 개발을 위하여 액체 종균용 배지와 재배용 배지를 선발하였으며 액체종균용 배지는 미강배지가, 재배용배지는 미송톱밥, 콘코브, 대두피, 밀기울을 40:30:15:15(v/v)비율로 혼합한 배지에서 균사생장이 가장 빠르고 수량도 가장 좋았다.

제2절 느티만가닥버섯의 신품종 육성

1. 서 론

느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus*)은 담자균류의 주름버섯목, 송이과에 속하는 식용버섯으로 가을철 너도밤나무 등 활엽수의 고사목과 생목에 발생하며, 주로 북반구 온대 지역에 분포한다(임 등, 2010). 현재 국내에서는 소량으로 재배되고 있으며, 일본에서는 큰느타리버섯에 이어 가장 많이 소비되고 있는 버섯이며, 중국, 대만 등에서도 대량으로 소비되고 있다. 이러한 느티만가닥버섯은 항암효과와 항동맥경화 효과가 있는 것으로 보고된 바 있고(Matsuzawa et al., 1998; Mori et al., 2008), 특히 여기에서 분리한 다당류는 매우 높은 항종양활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Akavia et al., 2009). 또한 최근에는 혈전증, 뇌졸중, 동맥경화와 같은 심혈관계 질환에도 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되었다(Park et al., 2011).

한편, 느티만가닥버섯은 조직이 치밀하여 식감이 좋고, 저장성이 좋기 때문에 수출용 버섯으로서의 가능성이 매우 크다. 그러나 이러한 장점에도 불구하고 느티만가닥버섯은 균의 성장 속도가 매우 느리기 때문에 재배기간이 100일 이상 소요되는 단점이 있어 우리나라에서는 본격적인 재배가 되고 있지 않다. 따라서 국내에서도 새로운 품종의 개발이나 재배기술, 유용한 성분 분석 등 느티만가닥버섯에 대한 연구가 필요한 실정이다. 특히 교배 및 선발 육종을 이용한 품종 개발에는 한계가 있기 때문에 돌연변이 유발 육종, 형질전환 등이 대안으로 제시되고 있다. 그러나 형질전환과 같은 유전자 조작에 의한 품종 개발은 GMO 논란이 계속되고 있어 새로운 품종 개발을 위한 육종법으로 사용하기에는 한계가 있다. 반면 방사선 조사와 같이 무작위로 유발되는 돌연변이를 이용한 방법은 적용 방법이 비교적 단순하고 표준화된 프로세스에 의해 대량의 시료에 적용이 가능하며, 특히 유전체 상에 항생제 내성 유전자와 같은 마커를 남기지 않고, 자연계에서 일어나는 진화 과정과 유사하게 변이 되며, 화학적 또는 자외선 조사 등에 의한 방법에 비해 유전적 변이가 뚜렷하게 나타나는 등 여러 가지 장점이 있다(정과 김, 2010). 따라서 본 연구에서는 감마방사선 조사를 통하여 느티만가닥버섯의 돌연변이를 유발하고, 이들 돌연변이체의 특성을 분석하여 느티만가닥버섯의 신품종을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 느티만가닥버섯의 방사선 돌연변이 유기 조건 확립

(1) 느티만가닥버섯의 원형질체 분리

원형질체를 대량으로 나출하기 위해서 우선 균사의 성장을 빠르게 유도하였다. PDA(Potato Dextrose Agar) plate 에 코르크보더를 이용해 찍어내어 PD broth 200ml이 든 삼각플라스크에서 100rpm으로 진탕배양하였다. 배양 후 14일에 균체를 수집하여 Homogenizer를 이용하여 10,000 rpm 으로 30 초 동안 마쇄 하였다. 마쇄된 균사체를 다시 회수하여 하루 동안 배양한 다음 원형질체 분리에 사용 하였다. 균사체를 50ml tube에 나누어 담고 4,000rpm 으로 10분간 원심분리 하여 회수 하였다. 상층액을 버리고 40ml의 1M MgSO₄ 를 균사체에 첨가하고 천천히 섞어주고 4,000rpm 으로 10 분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 균사체

로, 원형질나출을 위하여 0.5M MgSO₄ 5ml 에 0.4g의 Glucanex 200(novozyme사)와 Cellulase R-10 0.2g 첨가하여 완전히 녹이고 40ml 최종농도 0.5 mg/ml로 40ml로 최종볼륨으로 조정 하였다. 28℃ 에서 첨가 80rpm 으로 4시간동안 효소반응 하고 멸균수 10ml 을 넣고 10분간 실온에 방치 하였다. G4 Glass filter로 균사찌꺼기를 제거한 다음 멸균수를 넣어 볼륨을 맞추고 4,000rpm 으로 10분간 원심분리 하여 새로운 튜브에 상층 액을 회수하고 동량의 1M sorbitol 을 넣고 4,000rpm 으로 10분간 원심하고 상층액을 조심해서 버린다. 0.5M sorbitol을 넣고 4,000rpm 으로 10분간 원심하여 Tube 에 남아있는 enzyme를 씻어 상층액을 주의하여 버리고 회수된 나출된 protoplast를 실험에 사용 하였다.

(2) 균사절편의 제조

PDA(Potato Dextrose Agar) plate 에 코르크보더를 이용해 찍어내어 PD broth 200ml 가 든 삼각플라스크에서 100rpm으로 진탕배양하였다. 배양 후 14일에 균체를 수집하여 호모게나이저를 이용하여 10,000 rpm 으로 30초 동안 마쇄 하였다. 마쇄된 균사체를 희석하여 방사선 조사를 위하여 사용 하였다.

(3) 감마 방사선을 이용한 느티만가닥버섯의 돌연변이 유기

느티만가닥버섯의 마쇄한 균사체와 균사체로부터 분리한 원형질체 1.5×10⁷ (cell/ml)를 1.5ml 에 넣고 각기 다른 감마 방사선량 조건하에 처리 하였다. 정읍의 한국원자력연구원 고준위 감마선 조사장치(그림 2)를 이용하여 느티만가닥버섯의 변이를 유기하였다. 느티만가닥버섯 원형질체에 감마 방사선을 0.0 kGy에서 1.25kGy까지 설정하여 1시간동안 방사선을 조사한 후 0.6M의 Sorbitol이 첨가된 YPMGA medium에 overlay 하여 25℃에서 1주일 후에 재생한 균사체 colony를 조사 하였다. 대조구로는 감마 방사선을 조사하지 않은 느티만가닥버섯 원형질체를 재생하여 감마 방사선에 조사된 원형질체의 재생율과 비교하였다.



Fig. 2-1 고준위 감마선조사장치

나. 확보 유전자원의 분자유전학적 특성 분석

(1) Genomic DNA 분리

국내외의 다양한 지역으로부터 수집된 96균주 중 45균주(Table 2-1)를 5ml의 PDB(Potato Dextrose Broth)에 배양하여 균사체를 수집하였다. Genomic DNA를 분리하기 위하여 14일간 PDA(Potato Dextrose Agar)에서 배양 후, 직경 5mm의 균사체를 20ml의 PDB배지에서 진탕배양(120 rpm)으로 25℃에서 14일간 배양한 균사체를 여지에 걸러내어 동결건조를 하였다. 동결

건조한 균사체를 Tissu Lyser를 이용하여 곱게 마쇄한 다음 100 μ g 정도를 1.5ml의 Eppendorf tube에 옮기고 추출용 완충액(200mM Tris-HCl, pH 8.0; 200mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS) 400 μ l를 첨가하여 잘 섞어주었다. 이 혼합액에 2 \times CTAB buffer (2% CTAB [w/v], 100mM Tris [pH8.0], 1.4M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone Mr 40,000)를 400 μ l 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하고 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 넣고 혼합 한 후, 14,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮겨 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치 후 14,000 rpm 에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 70%의 ethanol로 DNA 침전물을 세척하여 진공 건조한 후 1 \times TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA) 50 μ l에 용해하였다. 10mg/ μ l RNase 2 μ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분 처리하여 추출한 용액에 함유된 RNA를 제거하였다. 추출한 DNA는 spectrophotometer 260nm 파장으로 정량 분석을 실시하였다.

Table 2-1. List of *H. marmoreus* isolates in this study

Sample No.	Isolate No.	Sources	Sample No.	Isolate No.	Sources	Sample No.	Isolate No.	Sources
1	HYM-001	Japan	16	HYM-016	China	31	HYM-031	China
2	HYM-002	Korea	17	HYM-017	China	32	HYM-032	China
3	HYM-003	China	18	HYM-018	China	33	HYM-033	China
4	HYM-004	China	19	HYM-019	China	34	HYM-034	China
5	HYM-005	China	20	HYM-020	China	35	HYM-035	China
6	HYM-006	China	21	HYM-021	China	36	HYM-036	China
7	HYM-007	China	22	HYM-022	China	37	HYM-037	China
8	HYM-008	China	23	HYM-023	China	38	HYM-038	China
9	HYM-009	China	24	HYM-024	China	39	HYM-039	China
10	HYM-010	China	25	HYM-025	China	40	HYM-040	China
11	HYM-011	China	26	HYM-026	China	41	HYM-041	China
12	HYM-012	China	27	HYM-027	China	42	HYM-042	China
13	HYM-013	China	28	HYM-028	China	43	HYM-043	China
14	HYM-014	China	29	HYM-029	China	44	HYM-044	China
15	HYM-015	China	30	HYM-030	China	45	HYM-045	China

(2) RAPD-PCR 핵산지문 분석

RAPD-PCR 핵산지문분석은 URP primer(Table 2-2)는 URP-PCR 핵산지문 Kit (JK BioTech.)를 구입하여 비교적 증폭산물이 뚜렷하고 변이가 적은 두 개의 primer를 선발하여 제공된 Protocol에 준하여 수행하였다. URP primer를 이용한 기본적인 PCR반응 조건은 100ng의 DNA template 5 μ l에 10 \times PCR buffer(10mM tris-HCl(pH.8.0), 50mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% gelatin) 5 μ l와 URP primer(20pmol) 1 μ l, 2.5mM dNTP 4 μ l, HQ Taq polymerase(JK BioTech.) 0.5 μ l에 D.W로 total volum을 50 μ l로 맞추었다. DNA변성을 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 4분간, 그 후 cycle에서 DNA 변성은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing은 55 $^{\circ}$ C에서 1분, DNA합성은 72 $^{\circ}$ C에서

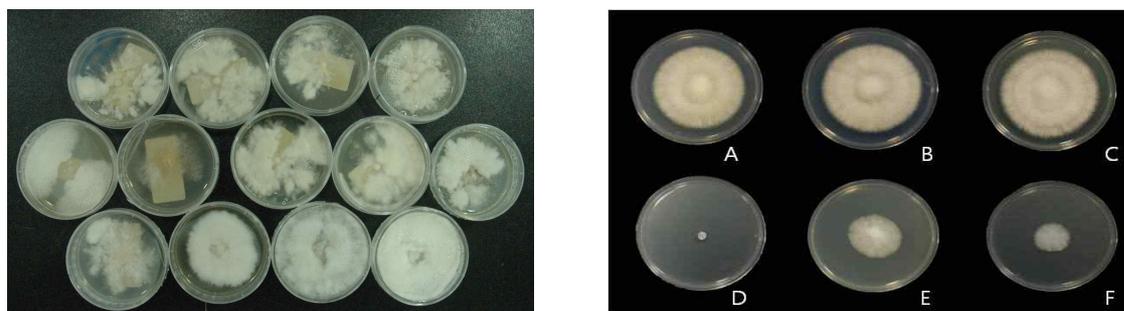
2분으로 총 35cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 7분으로 PCR을 수행하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA는 1.5%의 agarose gel 상에서 50V 전압으로 전기영동 한 뒤 Ethidium bromide에 염색하여 UV lamp하에서 PCR다형성을 관찰하고 유연관계를 분석하였다.

Table 2-2. Characteristics of URP primer in this study

Primers	Sequences(5-3)	CG content (%)	Tm(°C)
URP1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC	50	65
URP2F	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG	50	67
URP2R	CCCAGCAACTGATCGCACAC	50	65
URP4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC	50	66
URP6R	GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC	50	65
URP9F	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG	50	67
URP17R	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT	50	74
URP25F	GATGTGTTCTTGGAGCCTGT	50	65

다. 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사

방사선돌연변이체를 순수 분리하여 PDA 배지에서의 균사생장과 형태적 특성 조사를 위하여 느티만가닥버섯으로부터 원형질체를 분리하여 감마방사선 처리하여 돌연변이를 유도한 균주 2,000개체 중 91개 균주를 무작위 선발하여 PDA 배지에서의 형태적 및 성장특성을 조사하였다. 감마방사선처리 직후의 균사 배양시 다양한 균사형태는 보였으나, 돌연변이체 균주를 재계 대하여 배양한 결과, 균사형태가 복귀되는 현상을 보였다(Fig. 2-2).



Colony after gamma-irradiation

Colonies of isolate re-generation of mutant isolate

Fig. 2-2. Colony characteristics of mutant and the re-generated colony of *H. marmoreus* induced by gamma-irradiation on PDA

(A) control isolat; (B-F) mutant isolates by gamma-irradiation

돌연변이체의 특성조사의 접종원은 재계대한 배양균을 사용하였고 코르크보리를 이용하여 6 mm의 균사조각을 PDA에 접종하여 25°C에서 배양하였다. 배양 7일 후, 성장속도 및 형태를 조

사한 결과, 대조균주 균주보다 생장이 현저히 빠른 생육을 보이지 않았으며, 1.0K Gy 052, 102 변이체의 경우 대조균주보다 다소 늦은 성장을 나타냈다(Fig. 2-2). 그림 2-2의 경우 감마방사선처리 후 재계대 배양한 변이체의 PDA에서의 성장형태로 대조균주 A와 비교하여 감마선 처리균주인 B, C는 비슷한 성장속도를 보였으나 D, E, F의 경우 생장이 느려졌다.

라. M2, M3, M4로 육성 및 변이체의 유전적 변이부위 분석, 특성조사

감마방사선돌연변이 느티만가닥버섯의 M2세대를 육성하기위해 M1세대 자실체의 갓부분에서 조직을 분리하였다. PDA agar 배지에 균사체를 생장시켜 접종원으로 사용하였다. 자실체 생산용 배지조성은 미강, 소맥피, 미송이 함유된 850CC 플라스틱병에 PDA배지에서 14일동안 배양한 agar 종균을 사용하였다. 종균 접종 후, 60일간 23℃에서 암배양 후, 종균과 기존배지를 깊이 약 1cm정도 제거하는 균긋기를 하고, 온도 16℃, 습도 90%이상의 조건에서 자실체를 유도하여 자실체의 특성을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 느티만가닥버섯의 방사선 돌연변이 유기 조건 확립

(1) 원형질체를 이용한 방사선 돌연변이체 유기조건 확립

본 실험 방법에 의하여 느티만가닥버섯으로부터 나출된 protoplast양은 2.0×10^7 (cell/ml)이었으며 그림 1은 헤모사이토메터에 나타난 느티만가닥버섯의 protoplast 나출된 모습을 나타낸 것이다. 기존의 방법은 Novozyme을 주로 사용 하고 있었으나 이 효소는 단종 되어 대체 효소선발에 많은 문제점이 있었다. 그러던 중에 Yatalase (일본) 그 대응으로 곰팡이 원형질체 나출에 적용 되었으나 매우 고가라는 점에서 사용상 문제점으로 지적 되어 왔으나 본 실험에서 사용된 Glucanex 200는 1/50로 매우 저렴한 비용과 높은 효율로 느티만가닥버섯 원형질체 나출에 매우 유용 하였다.

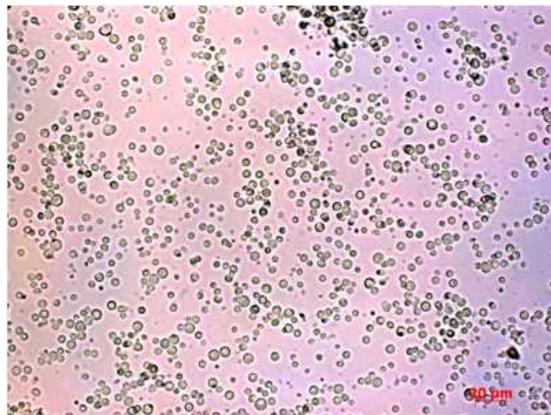


Fig. 2-3. 느티만가닥버섯으로부터 나출된 원형질체

느티만가닥버섯의 균사체로부터의 다량의 원형질체를 분리할 수 있었으나 재생율이 0.02%로 극히 저조한 것으로 나타났다. 원형질체에 2.0K Gy까지 감마 방사선 조사를 실시한 결과 0.25 kGy에서 80%이상의 치사율 나타내었으며 0.5K Gy에서는 급격히 치사율이 감소하여 95%이상의 치사율을 보였으며 0.75K Gy이상에서는 균사체 colony가 나타나지 않았다. 이상의 결과로

볼 때 느티만가닥버섯의 원형질체 방사선 유기는 0.25 kGy 선량에서 유효한 변이체를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

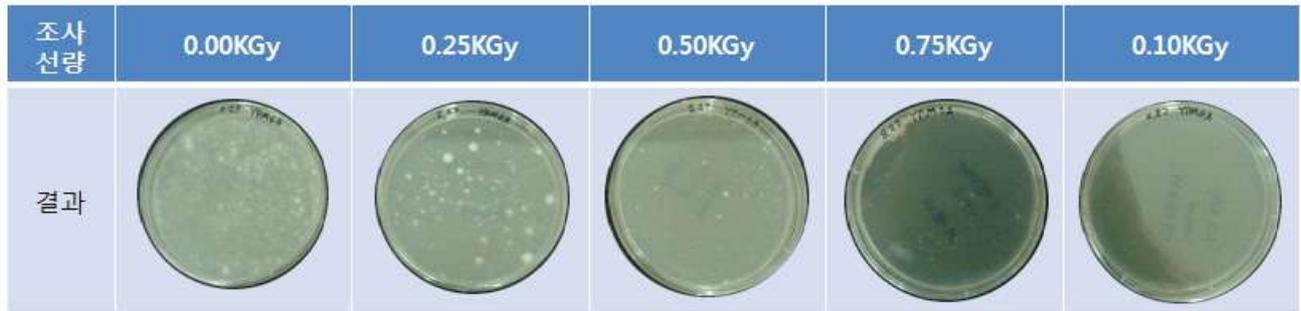


Fig. 2-4. 느티만가닥 원형질체의 방사선 조사에 따른 재생율

변이체의 자실체 형성을 위해선 자실체형성을 위해서 교배 등의 번거로운 과정이 필요하며 균사체 자체를 이용할 경우 세포개체의 변이를 단정할 수 없어 원형질을 이용하는 것이 유전적으로 단일개체를 선발하는데 유리 할 것으로 사료 되었다.

나. 확보 유전자원의 분자유전학적 특성 분석

다양한 지역에서 수집한 느티만가닥버섯의 45균주를 대상으로 두개의 URP primer (JK BIO TECH) 이용하여 RAPD-PCR을 수행한 결과 그림 2-5과 같다. 이 결과, 균주에 따라 다양한 밴드 패턴을 형성하는 것으로 보아 다양한 유전적 차이를 나타내는 것으로 보인다. 이에 따라, 같은 패턴을 보이는 균주들의 특성을 분석할 필요가 있을 것으로 판단된다..

URP 2R와 6R primer를 사용하여 수집된 총 96균주의 RAPD-PCR를 분석하였으며, 수집된 균주는 일본에서 상업화되어있거나 일본과 중국에서 도입된 균주가 많고 그리고 유럽에서 수집한 균주와 국내 자생지에서 채집한 버섯에서 분리한 5균주를 추가하여 분석하였다. 분자유전학적인 RAPD-PCR의 결과와 인공재배하여 형태학적인 특성과 연관성을 분석하여 국내 자생균주의 특성을 분석하고 있으며 국내 자생 균주의 유전자원 등록이 가능할 것으로 판단된다.

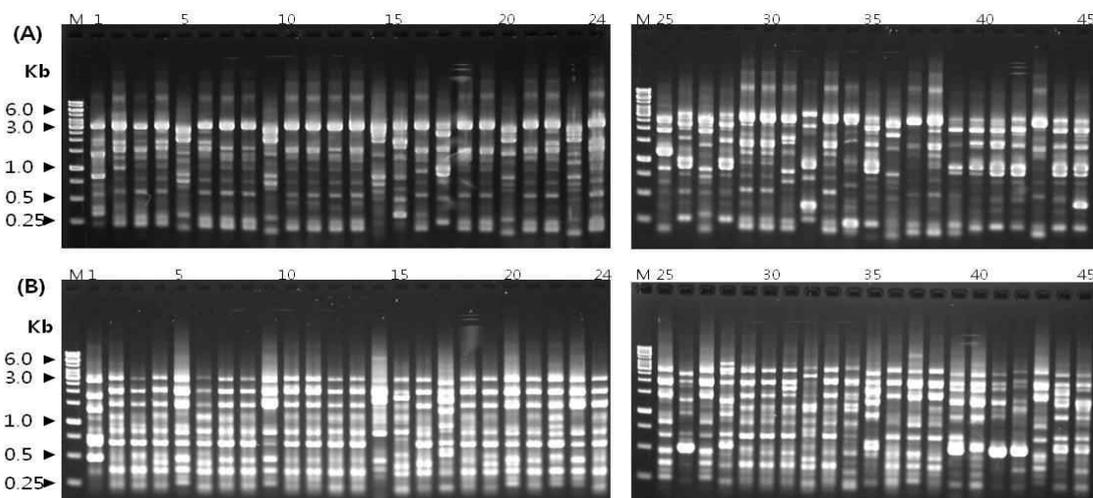
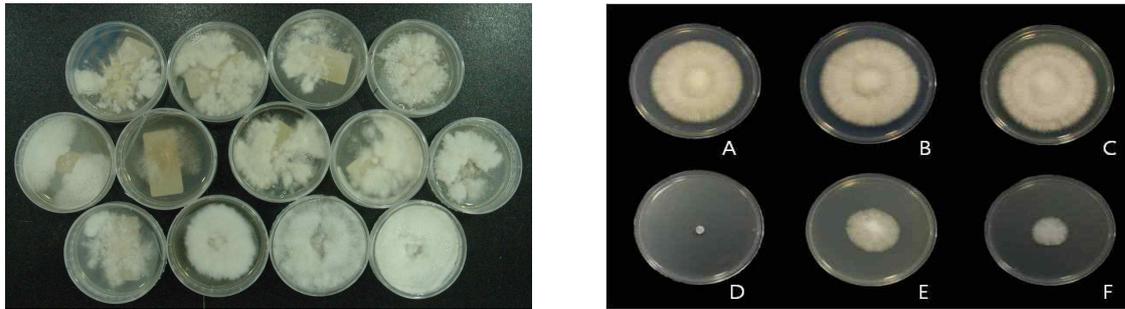


Fig. 2-5. RAPD-PCR profiles derived from *H. marmoreus* with URP-PCR
A) primer URP 2R, (B) primer URP 6R

다. 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사

(1) 방사선돌연변이체를 순수 분리하여 PDA 배지에서서의 균사생장과 형태적 특성 조사
 느티만가닥버섯으로부터 원형질체를 분리하여 감마방사선 처리하여 돌연변이를 유도한 균주 2,000개체 중 91개 균주를 무작위 선발하여 PDA 배지에서서의 형태적 및 성장특성을 조사하였다. 감마방사선처리 직후의 균사 배양시 다양한 균사형태는 보였으나, 돌연변이체 균주를 재계 대하여 배양한 결과, 균사형태가 복귀되는 현상을 보였다(Fig. 2-6).



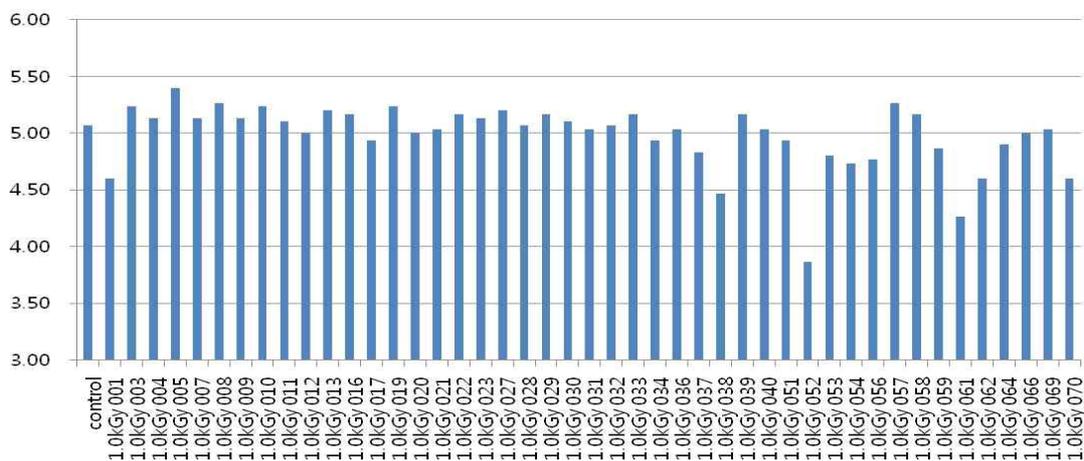
Colony after gamma-irradiation

Colonies of isolate re-generation of mutant isolate

Fig. 2-6. Colony characteristics of mutant and the re-generated colony of *H. marmoreus* induced by gamma-irradiation on PDA

(A) control isolat; (B-F) mutant isolates by gamma-irradiation

돌연변이체의 특성조사의 접종원은 재계대한 배양균을 사용하였고 코르크보러를 이용하여 6 mm의 균사조각을 PDA에 접종하여 25°C에서 배양하였다. 배양 7일 후, 성장속도 및 형태를 조사한 결과, 대조균주 균주보다 생장이 현저히 빠른 생육을 보이지 않았으며, 1.0KGy 052, 102 변이체의 경우 대조균주보다 다소 늦은 성장을 나타냈다(Fig. 2-7). 그림 2-7의 경우 감마방사선처리 후 재계대배양한 변이체의 PDA에서의 성장형태로 대조균주 A와 비교하여 감마선 처리균주인 B, C는 비슷한 성장속도를 보였으나 D, E, F의 경우 생장이 느려졌다.



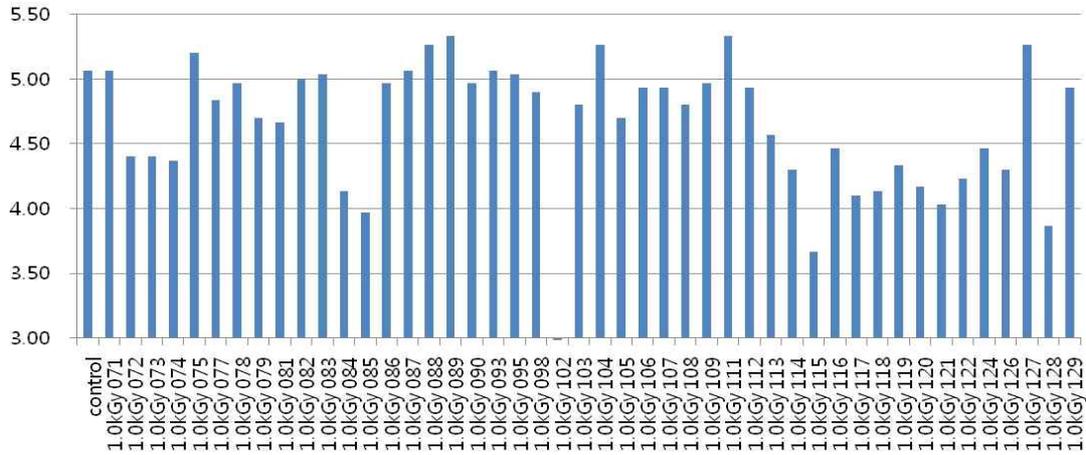


Fig. 2-7. Mycelial growth of mutant isolated induced by gamma-irradiation

(2) 방사선돌연변이체의 톱밥배지에서의 성장속도 비교

본 실험에서는 자실체 형성시 톱밥배지에서의 성장속도가 자실체의 형성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 성장속도를 분석하였다. 본 실험을 위해 미송, 미강, 소맥피를 혼합한 배지를 사용하였고, 850CC의 플라스틱 재배용 병에 담아 121℃에서 1시간동안 고압 멸균하였다. 접종원은 PDA배지에서 14일동안 배양하였으며, agar접종법을 이용하여 톱밥배지 병의 위, 아래에 균사조각을 얹어주어 23℃에서 배양하여 균사가 1/3정도 자랐을 때부터 6일 후 성장 길이를 조사하여 대조군주와 성장속도를 비교하였다(Fig. 2-8).

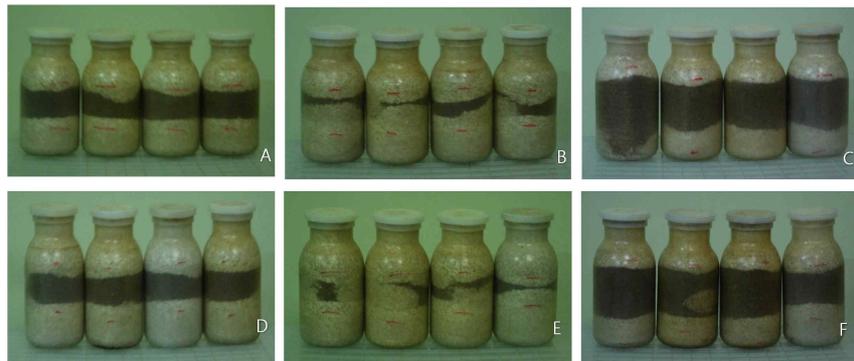


Fig. 2-8. Mycelial growth of mutant isolated on the sawdust media

(A) control isolates; (B, E) fasten isolates in mycelial growth; (C, F) slower isolated; (D) no signification

그 결과, 그림 2-9는 톱밥배지에서의 성장속도를 비교 것으로 대조군주의 성장속도와 다양한 차이를 나타냈다.

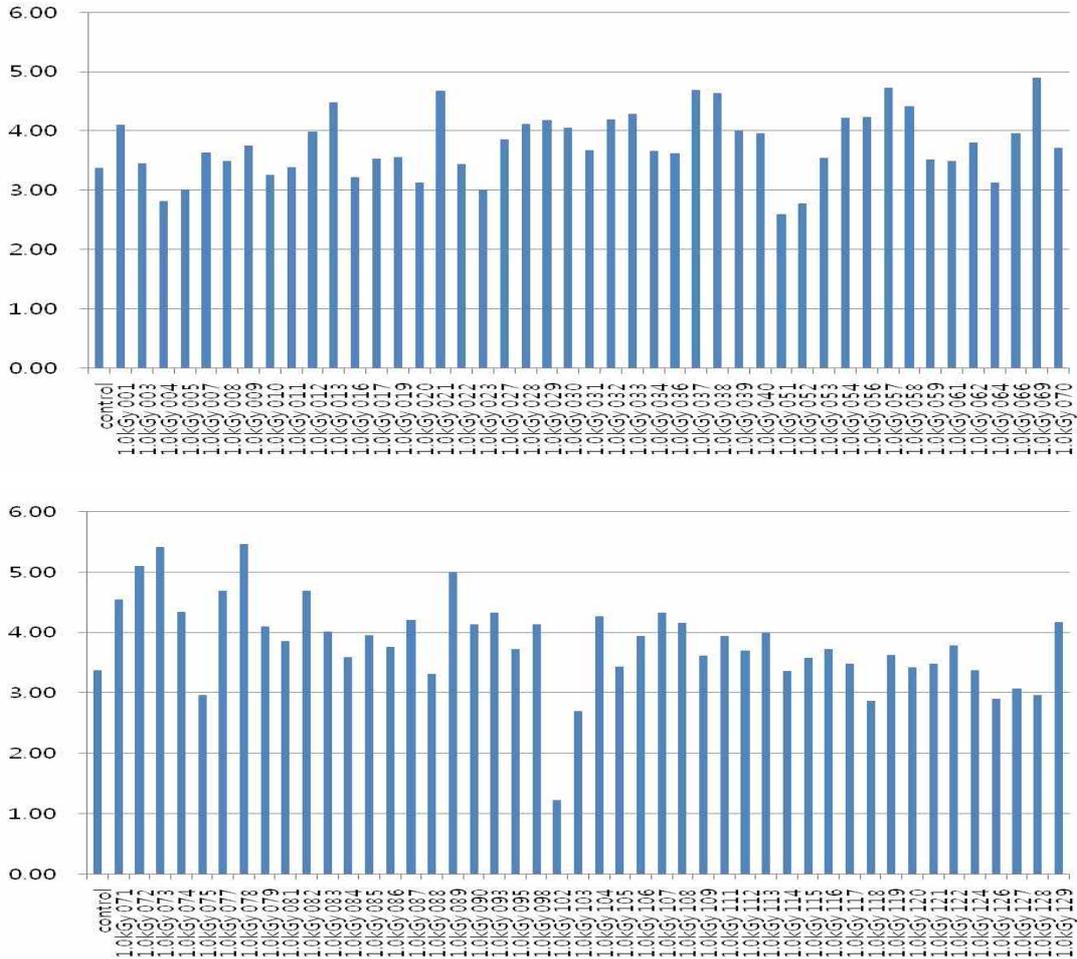


Fig. 2-9. Mycelial growth of mutant isolated inducted by gamma-irradiation on the sawdust medium

그 중 1.0K Gy 052, 102번이체는 PDA plate배지에서와 같이 늦은 성장속도를 나타냈다. 반면, 1.0K Gy 072, 073, 078 번이체의 경우 대조군주와 비교하여 빠른 생육을 나타냈다. 그림 2-10은 감마방사선 처리한 느티만가닥버섯 변이체의 성장패턴 비율로 58%가 비교적 대조군주에 비교하여 빠른 성장속도를 보였고 22%가 비슷한 성장속도를 보였으며, 변이체의 20%가 늦은 성장속도를 나타냈다.

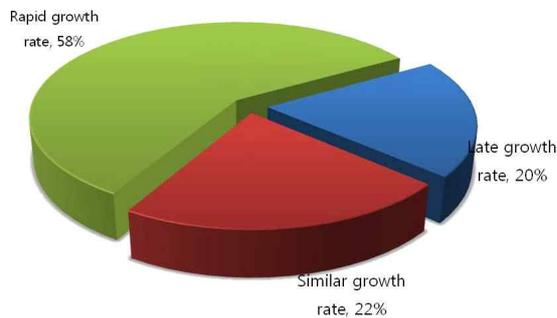


Fig. 2-10. Rates of mutant isolates by the mycelial growth index

(3) 느티만가닥버섯의 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사

감마-방사선 돌연변이 느티만가닥버섯의 M1세대를 육성하기 위해 미강, 소맥피, 미송이 함유된 850CC 플라스틱병에 PDA배지에서 14일동안 배양한 agar 종균을 사용하였다. 종균 접종 후, 60일간 23℃에서 암배양 후, 종균과 기존배지를 깊이 약 1cm 정도 제거하는 균긋기를 하고, 온도 16℃, 습도 90%이상의 조건에서 자실체를 유도하여 자실체의 특성을 조사하였다. 그림 2-7은 느티만가닥버섯의 M1세대 자실체로서 대조균주 A에 비하여 변이체 E, F, G는 현저히 많은 자실체의 개체수와 증가된 수확량을 얻을 수 있었다.



Fig. 2-11. Morphological characteristics of mutated isolates on the saw-dust media
 (A) control isolates, (B) fasten isolates in mycelial growth, (C, D) slower isolated, (E-F)fasten isolates in mycelial growth

표 2-3은 자실체의 특성을 도표화 한 것으로 변이체 M1세대와 대조균주의 형태적 특징을 비교하였다. 그 결과 M1세대의 갓직경, 대길이, 대직경 등은 대조균주와 현저한 차이를 나타내지 않았다. 또한 자실체 갓색상의 변화는 없었으며, M1세대 변이체 1.0kGy 034, 074, 082, 108는 대조균주에 비해 형태적인 변화는 거의 없었으나 수확량이 대조균주에 비하여 100%이상 증가하였다.

Table 2-3. Morphological characterist of mutated isolates by the artificial cultivation

Isolate	Characteristics				
	Dia. of pileus	Length of stipe	Dia. of stipe	colour	growth index
Control(brown)	1.86	7.20	1.03	Brown	82.57
1.0kGy 001	1.39	5.85	0.65	Brown	62.10
1.0kGy 003	1.83	7.41	0.92	Brown	100.70
1.0kGy 004	2.40	8.39	1.01	Brown	117.30
1.0kGy 005	1.89	7.53	0.90	Brown	97.17
1.0kGy 034	2.42	7.60	1.05	Brown	189.67
1.0kGy 036	2.18	8.58	0.84	Brown	109.80
1.0kGy 037	2.09	6.91	0.81	Brown	103.10
1.0kGy 038	2.83	9.15	0.84	Brown	154.00
1.0kGy 071	2.01	7.44	0.96	Brown	90.40
1.0kGy 072	1.70	7.84	0.78	Brown	86.60
1.0kGy 073	2.09	6.21	0.85	Brown	130.77
1.0kGy 074	2.35	8.19	1.03	Brown	165.97
1.0kGy 075	2.07	8.28	0.90	Brown	105.43
1.0kGy 081	2.24	7.50	0.85	Brown	92.97
1.0kGy 082	2.33	7.49	0.90	Brown	165.20
1.0kGy 083	2.07	8.22	1.02	Brown	86.67
1.0kGy 107	2.04	7.49	0.97	Brown	93.47
1.0kGy 108	2.64	8.31	0.80	Brown	167.90
1.0kGy 109	2.12	7.75	1.01	Brown	144.53
1.0kGy 111	2.17	6.88	1.05	Brown	88.73

그림 2-12은 느티만가닥버섯의 감마방사선 돌연변이 M1세대의 자실체의 성장 패턴을 분석하였다. 그 결과, M1세대 변이체의 55%가 대조군주보다 0-50%의 무게가 증가를 나타냈고, 변이체의 4%가 100%이상의 무게증가를 나타냈다.

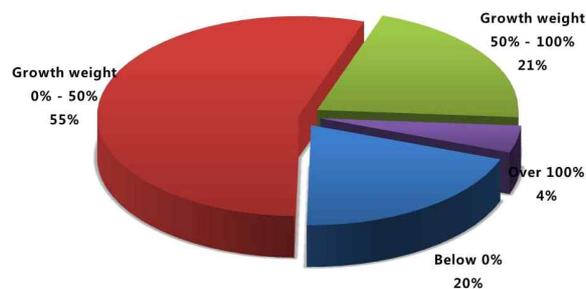


Fig. 2-12. Rates of mutant isolates by the mycelial growth index

(4) 감마방사선을 이용한 느티만가닥 M1세대의 분자유전학적 특성 분석

RAPD-PCR 핵산지문분석은 8종의 URP primer(표 2-2)를 사용하여 primer의 적용을 test하였다. 그 결과 URP-2F, URP-2R, URP-9F, URP-17R 의 primer를 선발하였다(그림 2-13).

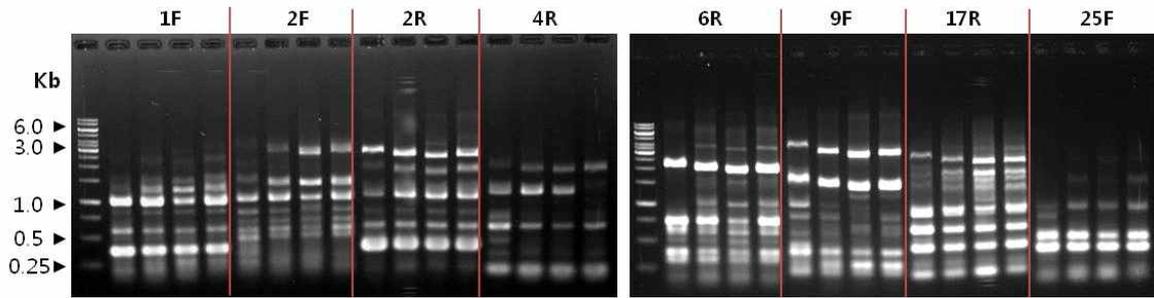


Fig. 2-13. RAPD-PCR profiles of M1 generation of *H. mamoreus* with URP primer URP-2R

그림 2-14는 URP-2F를 이용하여 느티만가닥버섯의 M1세대를 분석한 결과이다. lane 1번은 방사선 돌연변이의 모체로서 control균주이다. lane 2번에서 lane 92번까지는 M1세대의 PCR결과로서 0.5kb에서 2.5kb 까지 약 7개의 밴드를 형성하였다. lane 1번의 control균주와 매우 유사한 밴드패턴을 나타내었다. 이결과는 방사선돌연변체의 모균주인 control 균주와 M1세대간의 유전적 변이가 크지 않음을 시사하였다. 현재 control균주와 M1세대의 유전적 변이를 확인하기 위해 선발된 URP-primer (URP-2F, URP-2R, URP-9F, URP-17R) 로 PCR분석 중이며, control균주와 M1세대간에 유전적 변이를 나타내는 균주를 선발하여 M2세대 형성중에 있다. 표 2-4는 M1세대 91균주에 대조균주를 나타낸 표로서, 그림 2-14의 전기영동 순서를 나타낸다. 현재 변이체 2,000균주 중 1,500개의 M1세대 자실체를 유도 중이다. 이 후, 나머지 M1 자실체를 수확하여 URP-PCR 분석을 통해 특이적 균주를 선발하여 M2, M3세대를 유도할 예정이다.

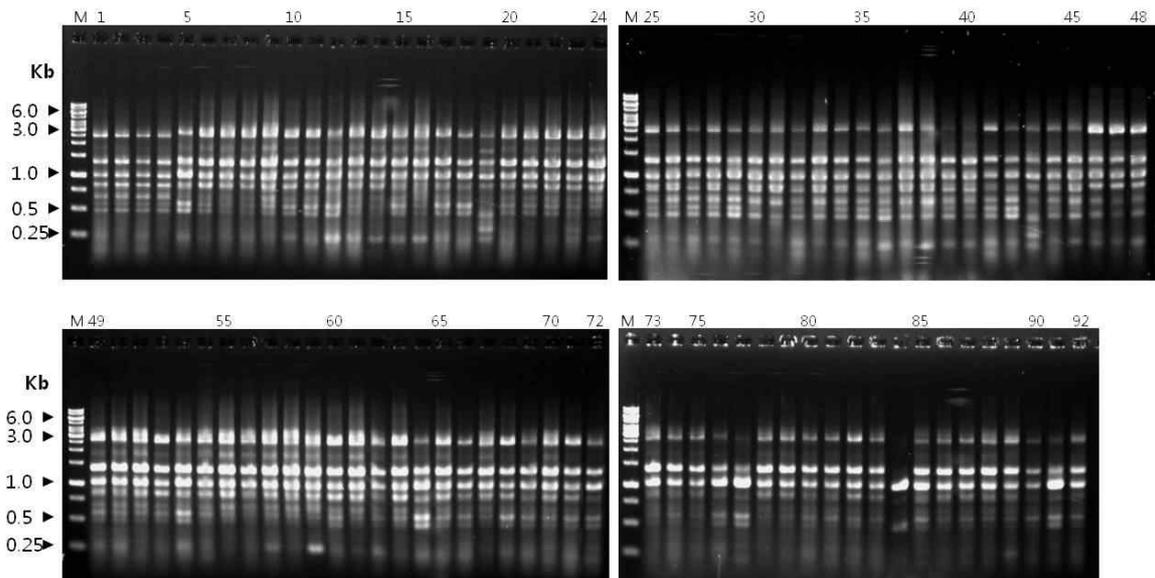


Fig. 2-14. RAPD-PCR profiles of M1 generation of *H. mamoreus* with URP primer URP-2F

Table 2-4. List of M1 isolates of *H. mamoreus*

NO.	Isolate	NO.	Isolate	NO.	Isolate	NO.	Isolate
1	control	24	1.0kGy 031	47	1.0kGy 071	70	1.0kGy 104
2	1.0kGy 001	25	1.0kGy 032	48	1.0kGy 072	71	1.0kGy 105
3	1.0kGy 003	26	1.0kGy 033	49	1.0kGy 073	72	1.0kGy 106
4	1.0kGy 004	27	1.0kGy 034	50	1.0kGy 074	73	1.0kGy 107
5	1.0kGy 005	28	1.0kGy 036	51	1.0kGy 075	74	1.0kGy 108
6	1.0kGy 007	29	1.0kGy 037	52	1.0kGy 077	75	1.0kGy 109
7	1.0kGy 008	30	1.0kGy 038	53	1.0kGy 078	76	1.0kGy 111
8	1.0kGy 009	31	1.0kGy 039	54	1.0kGy 079	77	1.0kGy 112
9	1.0kGy 010	32	1.0kGy 040	55	1.0kGy 081	78	1.0kGy 113
10	1.0kGy 011	33	1.0kGy 051	56	1.0kGy 082	79	1.0kGy 114
11	1.0kGy 012	34	1.0kGy 052	57	1.0kGy 083	80	1.0kGy 115
12	1.0kGy 013	35	1.0kGy 053	58	1.0kGy 084	81	1.0kGy 116
13	1.0kGy 016	36	1.0kGy 054	59	1.0kGy 085	82	1.0kGy 117
14	1.0kGy 017	37	1.0kGy 056	60	1.0kGy 086	83	1.0kGy 118
15	1.0kGy 019	38	1.0kGy 057	61	1.0kGy 087	84	1.0kGy 119
16	1.0kGy 020	39	1.0kGy 058	62	1.0kGy 088	85	1.0kGy 120
17	1.0kGy 021	40	1.0kGy 059	63	1.0kGy 089	86	1.0kGy 121
18	1.0kGy 022	41	1.0kGy 061	64	1.0kGy 090	87	1.0kGy 122
19	1.0kGy 023	42	1.0kGy 062	65	1.0kGy 093	88	1.0kGy 124
20	1.0kGy 027	43	1.0kGy 064	66	1.0kGy 095	89	1.0kGy 126
21	1.0kGy 028	44	1.0kGy 066	67	1.0kGy 098	90	1.0kGy 127
22	1.0kGy 029	45	1.0kGy 069	68	1.0kGy 102	91	1.0kGy 128
23	1.0kGy 030	46	1.0kGy 070	69	1.0kGy 103	92	1.0kGy 129

라. M2, M3, M4로 육성 및 변이체의 유전적 변이부위 분석, 특성조사

그림 2-15는 모균주로 사용한 (A)의 Brown 균주와 (H)의 white lines 균주를 비교하여 전체 159균주의 형태적인 차이에 따라 6그룹으로 분류하였다. (B)의 그룹 1에는 20균주가 속해있으며 갓과 대의 색이 밝고 갓부분에 무늬가 작게 나타나는 특징이 있다. (C)의 그룹 2는 갓과 대의 색이 진하고 갓부분의 무늬가 뚜렷하게 나타나는 특징이 있으며 전형적인 느티만가닥의 형태를 나타내었다. 2그룹에는 38균주가 속하였다. (D)의 3그룹에는 1그룹과 2그룹의 중간형태로서 가장많은 균주인 66균주가 이에 속하였다. (E)의 그룹 4에는 갓의 모양이 기형적으로 편평하고 대의 길이가 짧으며 갓의 색이 비교적 밝게 나타나는 특징이 있다. 16균주가 이에 속하였다. (F)의 그룹 5는 12균주가 속하며 갓부분에 무늬가 없는 특징이 나타났다. (G)의 그룹 6은 생육이 좋지 않으며 갓의 모양이 삼각형을 이루고 있으며, 대가 자라지않는 특징을 보였다. 6 그룹에는 7균주가 속하였다.



Fig. 2-15. Morphological characteristics of mutated isolates on the saw-dust media

그림 2-16의 (A)는 느티만가닥버섯의 감마방사선 돌연변이 M2 세대의 자실체의 성장 패턴을 분석하여 그룹 1에서 그룹 6까지 형태적인 특징을 분류하였다. (B)는 M2세대 변이체의 55%가 대조군주보다 0-50%의 무게가 증가를 나타냈고, 변이체의 4%가 100%이상의 무게증가를 나타냈다.

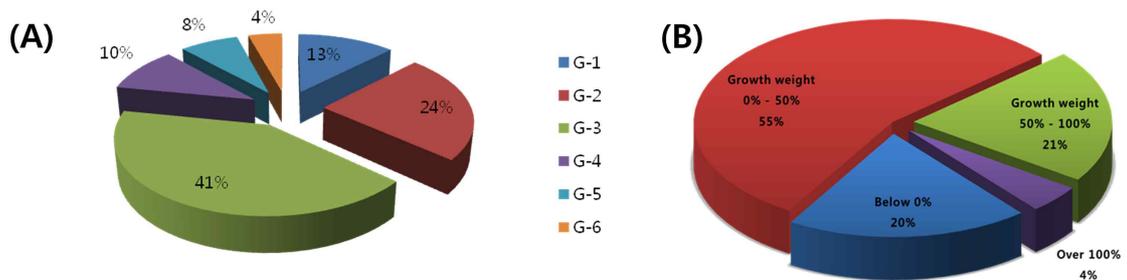


Fig. 2-16. Morphological characteristics of *H. marmoreus* on sawdust media; fruiting body characteristics(left), fruiting Bodies weight (right. 2).

그림 2-17은 느티만가닥버섯의 감마방사선 돌연변이 M2세대의 자실체의 성장 패턴을 비교 분석하여 생장이 우수한 균주를 선발하였다. 조사 항목은 갓의 크기, 대의 굵기와 크기, 자실체의 무게 등을 조사하여 모균주보다 생장이 빠르고 전형적인 느티만가닥버섯의 형태를 갖춘 56 균주를 선발하였다. 현재 선발한 56균주는 자실체에서 균사체를 분리하여 M3배양 중에 있다.

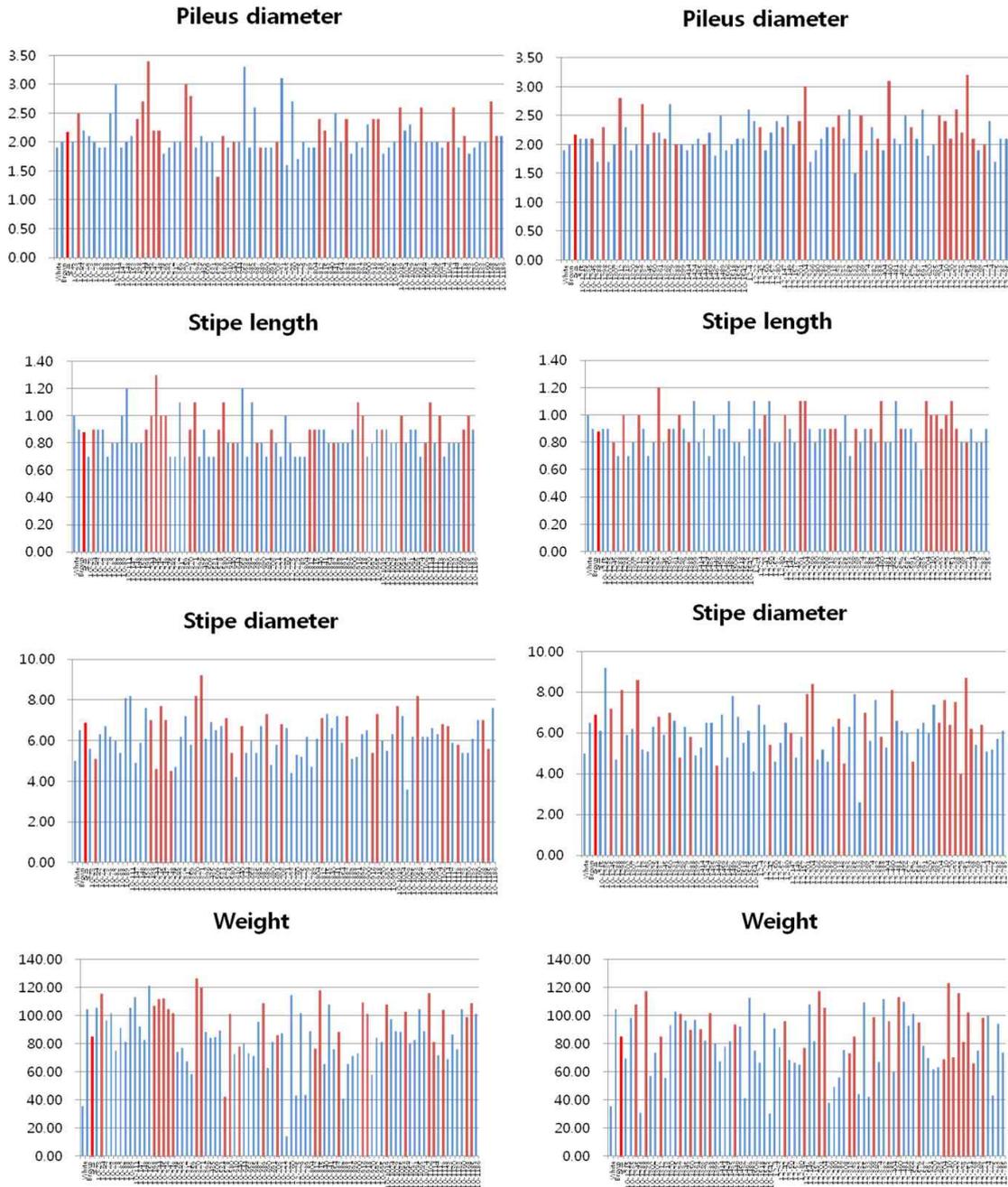


Fig. 2-17. Morphological characteristics of fruiting body growth rate of *H. marmoreus* on sawdust cultivation

(1) 감마방사선을 이용한 느티만가닥 M2세대의 분자유전학적 특성 분석

감마방사선을 이용한 느티만가닥 M2세대의 분자유전학적 특성 분석을 위해 돌연변이 M1균주 중 152개의 느티만가닥 M2세대의 자실체를 형성하여 RAPD-PCR을 수행하였다.

RAPD-PCR 핵산지문분석은 8종의 URP primer(표 2-2)를 사용하여 primer의 적용을 test하였다. 그 결과 재현성이 좋은 URP-2F primer를 선발하였다. 그림 2-18은 URP-2F를 이용하여 느티만가닥버섯의 M2세대를 분석한 결과이다. lane 1번은 방사선 돌연변이의 모체로서 control 균주이다. lane 2번은 대조구조로 사용한 느티만가닥 White line이다. lane 3에서 152번까지는

M2세대의 PCR결과로서 0.5kb에서 2.5kb 까지 약 7개의 밴드를 형성하였다. lane 1번의 control균주와 매우 유사한 밴드패턴을 나타내었다. 이 결과는 방사선돌연변체의 모균주인 control 균주와 M2세대간의 유전적 변이가 크지 않음을 시사하였다. 현재 control균주와 M2세대의 유전적 변이를 확인하기 위해 선발된 URP-primer (URP-2F, URP-2R) 로 PCR분석 중이며, control균주와 M2세대간에 유전적 변이를 나타내는 균주를 선발하여 M3세대 형성중에 있다.

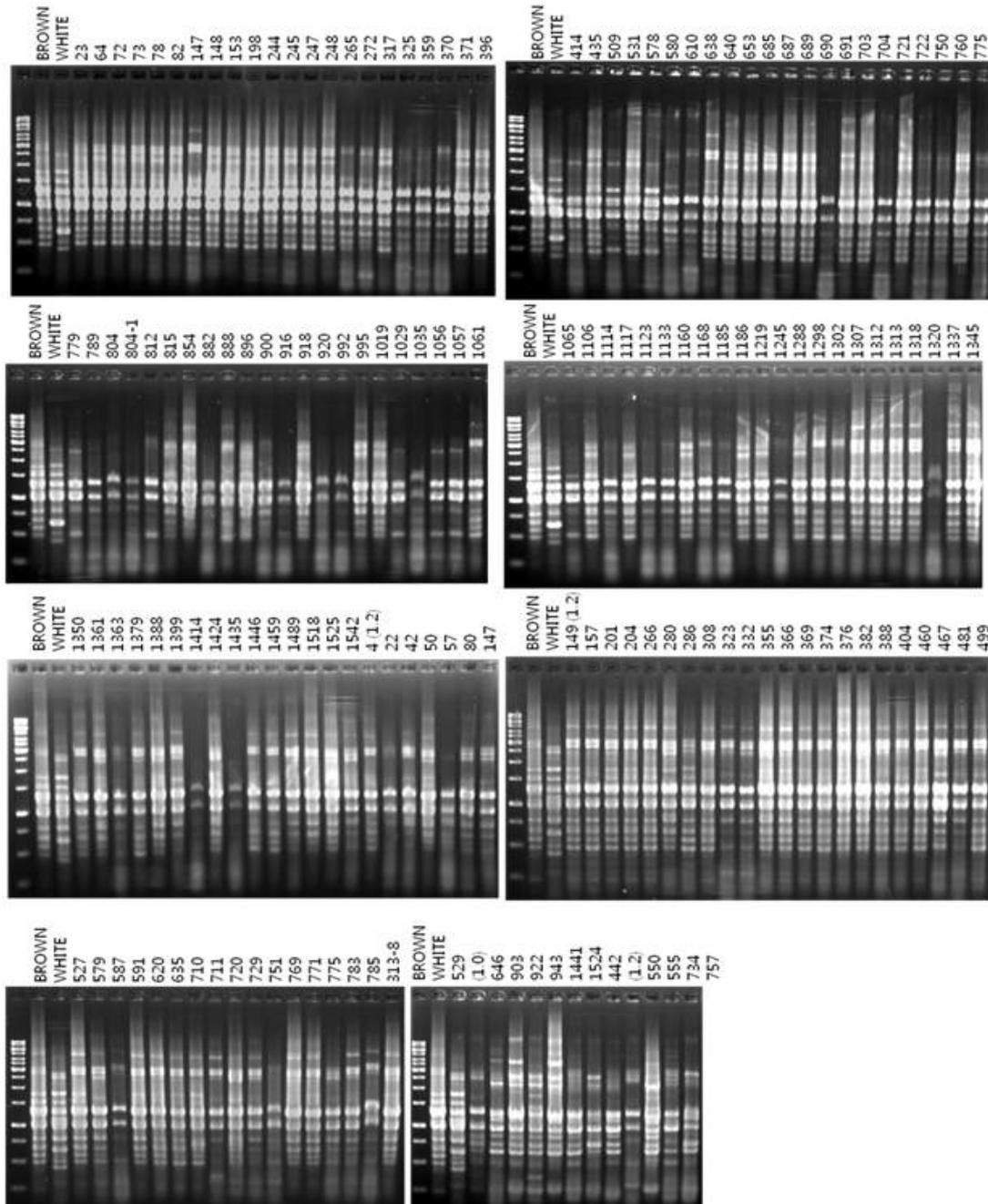


Fig. 2-18. RAPD-PCR profiles of M2 generation of *H. mamoreus* with URP primer URP-2F

표 2-5는 M2세대 152균주에 대조균주를 나타낸 표로서, 그림 2-18의 전기영동 순서를 나타낸다. 최초 감마방사선 변이체 2,000균주에서 1,500개의 M1세대 자실체를 생산하였고, M1세대

에서 생산성이 우수한 균주 152개체를 선발하여 M2세대를 형성하였다. 현재 M2세대 자실체 생산결과 모양이 양호하고 생산성이 우수한 56개체를 선발하여 M3자실체를 형성중에 있다. M3 자실체를 생산하여 품종의 가치를 평가하고 자실체에서 DNA를 분리하여 URP-PCR 분석을 통해 특이적 균주를 선발하고 유전적 변이를 조사할 예정이다.

Table 2-5. List of M2 isolates of *H. mamoreus*

NO.	Isolate	NO.	Isolate	NO.	Isolate	NO.	Isolate
1	wild type Brown	41	1.0kGy 690	81	1.0kGy 1160	121	1.2kGy 080
2	control White	42	1.0kGy 691	82	1.0kGy 1168	122	1.2kGy 147
3	1.0kGy 023	43	1.0kGy 703	83	1.0kGy 1185	123	1.2kGy 149
4	1.0kGy 023	44	1.0kGy 721	84	1.0kGy 1186	124	1.2kGy 157
5	1.0kGy 023	45	1.0kGy 722	85	1.0kGy 1215	125	1.2kGy 201
6	1.0kGy 064	46	1.0kGy 760	86	1.0kGy 1235	126	1.2kGy 204
7	1.0kGy 072	47	1.0kGy 775	87	1.0kGy 1245	127	1.2kGy 266
8	1.0kGy 073	48	1.0kGy 779	88	1.0kGy 1288	128	1.2kGy 280
9	1.0kGy 078	49	1.0kGy 789	89	1.0kGy 1298	129	1.2kGy 286
10	1.0kGy 082	50	1.0kGy 804	90	1.0kGy 1302	130	1.2kGy 308
11	1.0kGy 088	51	1.0kGy 812	91	1.0kGy 1307	131	1.2kGy 312
12	1.0kGy 089	52	1.0kGy 840	92	1.0kGy 1312	132	1.2kGy 323
13	1.0kGy 111	53	1.0kGy 841	93	1.0kGy 1313	133	1.2kGy 332
14	1.0kGy 147	54	1.0kGy 854	94	1.0kGy 1320	134	1.2kGy 355
15	1.0kGy 148	55	1.0kGy 882	95	1.0kGy 1325	135	1.2kGy 366
16	1.0kGy 153	56	1.0kGy 888	96	1.0kGy 1337	136	1.2kGy 369
17	1.0kGy 198	57	1.0kGy 891	97	1.0kGy 1345	137	1.2kGy 374
18	1.0kGy 244	58	1.0kGy 896	98	1.0kGy 1350	138	1.2kGy 382
19	1.0kGy 245	59	1.0kGy 900	99	1.0kGy 1361	139	1.2kGy 388
20	1.0kGy 247	60	1.0kGy 916	100	1.0kGy 1363	140	1.2kGy 404
21	1.0kGy 248	61	1.0kGy 918	101	1.0kGy 1379	141	1.2kGy 460
22	1.0kGy 265	62	1.0kGy 920	102	1.0kGy 1388	142	1.2kGy 481
23	1.0kGy 272	63	1.0kGy 992	103	1.0kGy 1399	143	1.2kGy 499
24	1.0kGy 317	64	1.0kGy 995	104	1.0kGy 1414	144	1.2kGy 527
25	1.0kGy 359	65	1.0kGy 1019	105	1.0kGy 1424	145	1.2kGy 579
26	1.0kGy 370	66	1.0kGy 1024	106	1.0kGy 1435	146	1.2kGy 587
27	1.0kGy 371	67	1.0kGy 1029	107	1.0kGy 1446	147	1.2kGy 591
28	1.0kGy 396	68	1.0kGy 1035	108	1.0kGy 1459	148	1.2kGy 620
29	1.0kGy 435	69	1.0kGy 1056	109	1.0kGy 1467	149	1.2kGy 635
30	1.0kGy 509	70	1.0kGy 1057	110	1.0kGy 1489	150	1.2kGy 704
31	1.0kGy 531	71	1.0kGy 1061	111	1.0kGy 1506	151	1.2kGy 710
32	1.0kGy 578	72	1.0kGy 1065	112	1.0kGy 1518	152	1.2kGy 711
33	1.0kGy 580	73	1.0kGy 1074	113	1.0kGy 1525	153	1.2kGy 720
34	1.0kGy 610	74	1.0kGy 1106	114	1.0kGy 1542	154	1.2kGy 722
35	1.0kGy 640	75	1.0kGy 1114	115	1.0kGy 815		
36	1.0kGy 644	76	1.0kGy 1117	116	1.2kGy 004		
37	1.0kGy 653	77	1.0kGy 1118	117	1.2kGy 022		
38	1.0kGy 685	78	1.0kGy 1123	118	1.2kGy 042		
39	1.0kGy 687	79	1.0kGy 1130	119	1.2kGy 050		
40	1.0kGy 689	80	1.0kGy 1133	120	1.2kGy 057		

4. 요약

본 연구는 감마방사선 조사에 의해 기능성 물질이 증가하고, 생리적 특성이 증진된 느티만가닥버섯의 새로운 품종을 개발하기 위하여 수행되었다. 돌연변이 유기를 위하여 느티만가닥버섯의 갈색 계통 균주 HYM-056의 원형질에 감마방사선을 조사하여 2,000개의 돌연변이체를 무작위로 선발하고 병 재배하여 자실체를 형성시켰다. 이 중 성장속도가 빠르고, 중량이 무거우며, 자실체를 다량으로 생산하는 500개 균을 선발하였다. 선발된 균주의 자실체 형성을 위하여 미강, 보리껍질, 미송이 함유된 플라스틱 병에 재배하였다. 접종 100일 후, 자실체의 특성을 조사하였다. 그 결과 갓의 색깔, 형태, 크기와 대의 길이, 직경, 숫자, 무게 등에 따라 6개의 그룹으로 나뉘었다. 또한 URP-PCR 핵산 지문 분석으로 유전적 변이를 조사하였다.

제3절 느티만가닥버섯의 식품영양성분, 기능성 물질 탐색 및 효능분석

1. 서론

산소는 생명체가 삶을 영위하는데 있어 에너지를 생성하기 위해 요구되는 필수 성분이다. 하지만 산소의 대사과정 중 생겨나는 자유기는 DNA, 단백질 등을 비롯한 많은 생활성 물질에 산화 손상을 야기한다. 자유기는 염증과 발암과정에도 밀접하게 관련되어 있는바 종양, 당뇨, 염증과 심혈관 질환 등을 일으켜 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이와 같은 자유기를 소거하는 항산화물질에 대한 탐색의 중요성은 두 말할 나위 없다. 항산화물질이 가지는 항산화 효과를 측정하기 위해 reactive oxygen species나 nitrogen species와 같은 자유기를 제거하는 능력을 측정하는 실험이 요구된다. 자연산물에서 유래되는 항산화물질의 발견은 사람의 식생활에 직접 적용되어 앞에서 언급했던 질병들을 예방하고 치료하는 기대를 불러온다.

혈소판은 지혈에 중추적인 역할을 분담하고 있을 뿐 아니라, 혈전증, 동맥경화 그리고 염증과 같은 병리생리학적 상태에도 밀접하게 연관되어 있다.

느티만가닥버섯은 아시아 지방에서 서식하고 재배되고 있는 약용 버섯으로 이미 항산화효과와 동맥경화 예방 효과가 보고된 바 있다. 또한 느티만가닥버섯에서 분리된 polysaccharide인 s-(1-3)-D-glucan는 높은 항종양 활성을 가진다. 하지만 느티만가닥버섯이 혈소판의 기능에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 이 연구에서 혈소판과 관련된 심혈관계 질환을 치료, 예방할 수 있는 느티만가닥버섯의 항혈소판 효과에 대하여 연구하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 느티만가닥버섯의 식품성분 분석

GC mass analysis was carried out by on an Agilent Technology 7890A-GC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to XLMSD-5975C equipment operating in electrospray ionisation (EI) mode.

나. 시험관내 방법에 의한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석

(1) DPPH radical scavenging activity

추출물의 자유기 소거능은 안정적인 자기유인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil)를 측정하여 평가하였다. 각기 다른 농도의 추출물에 DPPH의 메탄올 용액을 0.2mM이 되게 넣은 후, 어두운 상태를 유지한 채 30분간 배양하였다. 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음의 계산식으로 자유기 소거능을 측정하였다.

$$\text{EDA (\%)} = \left(\frac{\text{the absorbance of the control} - \text{the absorbance of the mixture}}{\text{the absorbance of the control}} \right) \times 100$$

(2) 항암, 면역활성

(가) Microculture Tetrazolium (MTT) 법

세포의 생존능 측정은 항암효과와 정상적인 세포에 대한 손상도를 측정하기 위해 수행되었다. RAW264.7 세포 (1×10^4)를 바닥에 부착할 수 있게 $100 \mu\text{l}$ 의 DMEM과 함께 96 well plate에 넣은 후 overnight 배양한다. 각기 다른 농도의 느티만가닥 버섯 샘플을 30분간 전처리한 후,

LPS (0.1 μ g/ml)으로 자극하여 24시간 배양한다. MTT solution 100 μ l씩 각 well에 넣은 후 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 세포의 대사산물인 formazan의 농도를 측정하기 위해 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) Nitric oxide (NO) 측정을 통한 면역활성 측정

RAW264.7 세포 (1 \times 10⁶)를 바닥에 부착할 수 있게 배양접시에 넣은 후 overnight 배양한다. 각기 다른 농도의 느티만가닥 버섯 샘플을 30분간 전처리한 후, LPS (0.1 μ g/ml)으로 자극하여 24시간 배양한다. 배양액의 상층액 100 μ l에 아질산염의 농도는 100 μ l 의 Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% -[1-naphthyl]-ethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid)를 첨가하여 실온에 10분간 배양한 후 570nm에서 흡광도를 읽음으로써 측정하였다. 아질산염의 농도를 계산하기 위한 standard curve는 sodium nitrite로 제작하였다.

(다) Cytokine mRNA 발현 검사를 통한 면역활성 측정

EasyBLUE reagent를 사용하여 RAW264.7 세포의 총RNA를 추출하였다. 반정량적 RT-PCR은 RT premix를 사용하여 진행하였다. 총2 μ g의 총RNA를 oligo-dT18으로 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 3분간 얼음에 식히고 RT premix를 첨가하여 42.5 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양하였다. 반응액을 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하여 reverse transcriptase를 불활성화시킴으로써 반응을 종료하였다. 각 cytokine에 해당하는 PCR premix를 사용하여 PCR 반응을 진행하였다. PCR결과물의 전기영동 밴드는 GAPDH의 밴드와 비교함으로써 그 밀도를 계산하였다.

다. 동물실험을 통한 균사체 및 자실체의 기능성 분석

(1) 혈소판 응집반응에 미치는 효과 규명

(가) 혈소판의 준비 및 혈소판 응집 반응 테스트

Rat의 복대동맥으로부터 venipuncture를 통해 뽑은 전혈 8ml을 1ml citrate phosphate dextrose solution (CPD in mM: 90 Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 14 C₆H₈O₇·H₂O, 128.7 NaH₂PO₄·H₂O, and 2.55g/100ml dextrose)이 든 15ml test tube에 옮겼음. platelet-rich plasma (PRP)는 혈액 샘플을 170 \times g에서 7분간 원심분리하여 얻었음. 잔여 적혈구 성분을 제거하기 위해 120 \times g에서 7분간 원심 분리하였음. CPD solution성분을 제거하고 혈소판을 분리하기 위하여, PRP를 350 \times g에서 10분간 원심분리하였음. 상층액은 platelet-poor plasma (PPP)로 간주하여 응집 반응 실험의 reference로 사용하였음. 침전된 혈소판은 Tyrode buffer (in mM: 137 NaCl, 12 NaHCO₃, 5.5 glucose, 2 KCl, 1 MgCl₂, 0.3 NaHPO₄, pH 7.4)에 녹여 실험에 사용될 적절한 농도(3 \times 10⁸/ml)로 맞추었다. 혈소판 응집은 aggregometer (Chronolog, Havertown, PA)를 사용하여, 빛 투과도를 측정하는 방법으로 테스트하였다. washed platelet은 37 $^{\circ}$ C에서 HYM-055와 HYM-056의 메탄올 추출물을 2분간 preincubation 한 이후, agonist 처리 후 250g로 stirring하면서 5분간 반응을 지켜보았다.

(나) 세포내 칼슘 농도의 측정

분리된 혈소판을 Fura-2/AM으로 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 배양하였음. 배양이 끝난 혈소판을 3 \times 10⁸/ml의 농도로 맞추는 후, 1 mM의 CaCl₂의 존재 하에 각기 다른 농도의 CE6를 2분간 전처리 후, ADP로 5분간 자극하였다. 혈소판의 공명형광 (fluorescence)는 spectofluometer로 계산하였다.

(다) ATP release assay

washed platelet을 37 $^{\circ}$ C에서 3분간 여러 농도의 HYM-055와 HYM-056에 preincubation 시킨

후, collagen, ADP, 그리고 thrombin으로 처리 후 5분간 반응 시킨 후, 각 샘플을 원심분리 후 그 상층액을 실험에 사용하였다. ATP release는 ATP assay kit (Biomedical Research Service Center, Buffalo, USA)를 사용하여 luminometer (GloMax 20/20, Promega, Madison, USA)로 측정하였다.

(라) Thromboxane A2 생성의 측정

분리된 혈소판을 각기 다른 농도의 CE6로 2분간 전처리 후, ADP로 5분간 자극하였다. 반응은 ice-cold EDTA 2mM과 100uM의 indomethacin을 처리하였다. 14,000 rpm으로 3분간 원심분리 후, 상층액의 Thromboxane B2 (TXB2)를 TXB2 EIA kit를 사용하여 측정하였다.

(마) cAMP의 측정

분리된 혈소판을 각기 다른 농도의 CE6로 2분간 전처리 후, ADP로 5분간 자극하여 반응은 ice-cold ethanol을 혈소판 부유액의 80%만큼 첨가하여 종료시켰다. 샘플을 4°C에서 10분간 2,000×g에서 원심분리 후, 상층액의 cAMP양을 cyclic AMP kit (Ann Arbor, MI, USA)로 측정하였다.

(바) Immunoblotting

혈소판 부유액($3 \times 10^8/ml$)을 다양한 농도의 CE6로 2분간 전처리 후, ADP로 5분간 반응시킨 후, 혈소판을 sample buffer (0.125M Tris - HCl at pH 6.8, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue)와 protease inhibitor protease inhibitors ($\mu g/ml$: 1 phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 2 aprotinin, 1 leupeptin, and 1 pepstatin A)로 용해화(溶解化)하였다. 단백질의 농도는 BCA assay (PRO-MEASURE, iNtRON Biotechnology, Korea)로 측정하였다. 30 μg 의 단백질을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후, transfer buffer (25mM Tris (pH 8.5), 0.2M glycine, and 20% methanol)에 담아 nitocellulose membrane으로 transfer하였다. Immunoblot은 5% nonfat dry milk가 포함된 TBS-T로 block한 후, 일차항체로 배양하였음. Immunoblot을 다시 이차항체로 배양한 후, membrane은 ECL (iNtRON Biotechnology, Korea)로 현상하였다.

(사) Flow cytometry

CE6로 전처리 후, ADP로 자극된 혈소판을 Alexa Fluor 488-human fibrinogen (20 $\mu g/ml$)로 5분간 배양하여 혈소판을 0.5% paraformaldehyde로 4°C에서 30분간 고정한 후, 2000×g에서 원심분리 하여 PBS로 부유시켰다. 혈소판 샘플의 공명형광 (fluorescence)은 FACS Calibur cytometer (BD Bioscience, San Jose, USA)로 분석하였다.

(2) rat의 혈전형성에 미치는 효과 규명

(가) 대동맥운 준비

몸무게 300-450g의 Sprague-Dawley Rat에서 경추탈골로 희생시킨 후 흉부대동맥을 잘라내고 혈관주위의 결합조직을 제거하였다. 혈관을 3mm길이를 잘라서 내피세포가 손상되지 않도록 조심하면서 두 개의 삼각 tissue holder를 이용하여 organ bath에 고정하였다.

(나) Organ bath system

한쪽 삼각 tissue holder는 bath 안에 있는 holder에 고정시키고, 다른 삼각 tissue holder는 force transducer에 연결한 다음 10ml 용량의 organ bath에서 등척성 장력(isometric tension)을 측정하였다. Organ bath에는 지속적으로 혼합가스(95% 산소 + 5% 이산화탄소)를 공급하고, 온도는 $37.0 \pm 0.1^\circ C$ 로 일정하게 유지시켰다. 처음 한 시간의 안정화 기간 동안은 15분 간

격으로 Krebs soln. 을 교환해 주었다. 기초 장력은 1g을 가하였고, 전수축 제재로는 thromboxane receptor agonist인 U-46619 (100nM)를 이용하였으며 수축이 plateau를 이루면 각 약물들을 투여하였다. 이 실험에서 사용된 Krebs solution의 조성(mM)은 다음과 같다. 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂ and 11 glucose.

3. 결과 및 고찰

가. 느티만가닥버섯의 식품성분 분석

(1) 느티만가닥버섯 자실체의 일반성분 조사

느티만가닥버섯 자실체의 영양가치를 평가하기 위하여 AOAC 방법 및 식품공전 방법에 따라 일반 영양성분, 무기질 및 비타민을 분석한 결과는 Table 3-1과 같다.

공시한 느티만가닥버섯은 백색자실체(HYM-055)와 갈색자실체(HYM-056)를 사용하였으며 자실체의 일반 성분을 분석한 결과 느타리와 비교하여 에너지, 탄수화물, 회분, 나트륨, 칼륨 등이 높은 것으로 밝혀졌고, 인은 느타리버섯의 73~83%, 철은 33%정도를 함유하고 있었다. 느티만가닥버섯은 느타리버섯류에 비해 칼륨 함유량이 1.6배정도 높았다.

Table 3-1. 느티만가닥버섯 및 몇몇 식용버섯의 영양성분

	Per 100g of edible portion											
	Energy (kcal)	Water content (%)	Protein (g)	Fat (g)	Carbohydrate		Ash (g)	Minerals(mg)				
					Non-fibrous(g)	Fiber (g)		Calcium	Phosphorus	Iron	Sodium	Potassium
<i>H. marmoreus</i> HYM-056(Brown)	33	89.1	2.6	0	7.5	-	0.8	2	88	0.4	3	419
<i>H. marmoreus</i> HYM-055(White)	27	91.0	2.0	0.1	6.0	-	0.9	2	78	0.4	26	453
<i>L. ulmarium</i>	36	87.8	2.3	0.1	8.3	0.6	0.9	2	110	1.9	-	-
<i>P. ostreatus</i>	25	91.3	2.7	0.2	4.6	0.6	0.6	3	107	1.2	2	270
<i>A. bisporus</i>	23	90.8	3.5	0.1	3.8	1.0	0.8	7	102	1.5	8	535
<i>G. frondosa</i>	30	88.2	3.6	0.5	4.6	2.0	1.1	1	113	2.3	-	-
<i>P. eryngii</i>	35	87.8	2.5	0.1	8.0	0.9	0.7	0	45	0.4	8	289
<i>F. velutipes</i>	29	89.8	2.7	0.3	5.5	0.9	0.8	2	89	1.2	9	368
<i>L. edodes</i>	27	90.8	2.0	0.3	5.4	0.7	0.8	6	28	0.6	5	180
	Per 100g of edible portion											Refuse %
	Vitamins											
	A			B ₁ Thiamin(mg)	B ₂ Riboflavin(mg)	Niacin(mg)	C Ascorbic Acid(mg)					
	Retinol Equivalent RE	Retinol (μg)	β-Carotene(μg)									
<i>H. marmoreus</i> HYM-056(Brown)	0	0	0	-	-	-	-	0				
<i>H. marmoreus</i> HYM-055(White)	0	0	0	-	-	-	-	0				
<i>L. ulmarium</i>	0	0	0	0.17	0.52	4.3	0	0				
<i>P. ostreatus</i>	0	0	0	0.38	0.32	5.2	3	0				
<i>A. bisporus</i>	0	0	0	0.07	0.53	4.0	0	0				
<i>G. frondosa</i>	0	0	0	0.21	0.49	4.0	0	0				
<i>P. eryngii</i>	0	0	0	0.12	0.22	2.3	3	0				
<i>F. velutipes</i>	0	0	0	0.24	0.34	5.2	12	20				
<i>L. edodes</i>	0	0	0	0.08	0.23	4.0	0	0				

- * Vit A- R.E는 β-Carotene를 환산한 수치임
- * 탄수화물값 = 100 - (수분+단백질+지질+회분)
- * 섬유소 = 조섬유
- * 에너지환산지수 : 단백질 2.62, 지질 8.37, 탄수화물 3.48

(2) 느티만가닥버섯 열수추출물의 GC mass 분석

HYM-055 열수추출물의 GC mass 분석결과 acid와 sugar가 각각 59.55%, 20.63%로 대부분을 차지하고, phenol과 sterol 등이 함유된 것으로 보이며, HYM-056 열수추출물의 GC mass 분석결과는 acid와 sugar가 각각 33.02%, 43.74%로 대부분을 차지하고, phenol과 sterol 등이 함유된 것으로 나타났다(Table 3-2).

Table 3-2. Phytochemicals identified in the water extract of HYM-055 and HYM-056 by GC-mass. GC mass analysis was carried out by on an Agilent Technology 7890A-GC system (Agilent Technologies, Santa Clara,CA, USA) coupled to XLMSD-5975C equipment operating in electrospray ionisation (EI) mode.

Contents	Amounts(%)	
	HYM-055	HYM-056
Acid	59.55	43.74
Sugar	20.63	33.02
Solvent	4.45	6.2
Amine (Amide)	2.96	2.88
Acridine	0.14	0.59
Benzenediol	0.33	0.35
Cyclohexanediol	0.34	0.27
Dehydroxypyrimidine	0.65	0.23
Dimethylnaphthalenol	0.32	0.39
Ergostadieol	0.38	0.49
Ergostenol	0.23	0.32
Furanone	1.09	0.06
Glycine	0.39	1.38
Imidazole	0.78	0.54
Indole	0.75	0.2
Neoergosterol	0.25	1.21
Octadecane	0.44	1.54
Phenol	2.46	0.71
Pyridine	0.40	0.24
Pyrrolidinone	0.26	0.58
Quinolinol	0.37	2.53
Succinimide	0.68	0.39
Tirieol	2.00	0.49
Tirimethylsilylmethanol	0.01	0.6
Trigonelline	0.15	1.08

나. 시험관내 방법에 의한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석

(1) 느티만가닥버섯의 면역활성

(가) LPS (0.1 μ g/ml)-유도 NO 생성에 미치는 느티만가닥버섯의 효과

LPS-유도 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 느티만가닥버섯의 효과 즉, in vitro 항염증작용을 알아보기 위하여 우리는 RAW264.7 세포주에서 lipopolysaccharide (LPS)-유도 NO 생성에 미치는 효과를 확인하였다.

먼저 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에 LPS (0.1 μ g/ml)를 사용하여 자극하여 NO 생

성을 유도하였다. 이들 LPS-유도 NO 생성에 대한 느티만가닥버섯 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7 (A) 과 HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM 1-1 (C)의 억제효과를 확인한 결과 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 그러나 이들 효과가 세포독성에 의한 인위적인 효과인지를 확인하기위해 우리는 MTT assay를 사용하여 RAW264.7 세포주 활성화에 미치는 HM0-7 (B) 과 HM1-1 (D) 의 효과를 확인하였다. 아래 Fig.에서와 같이 LPS-유도 NO 생성을 억제하는 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 강력한 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그러므로 이들 농도에서의 NO 생성에 대한 억제효과는 세포 독성에 의한 인위적인 효과인 것으로 판명되었다.

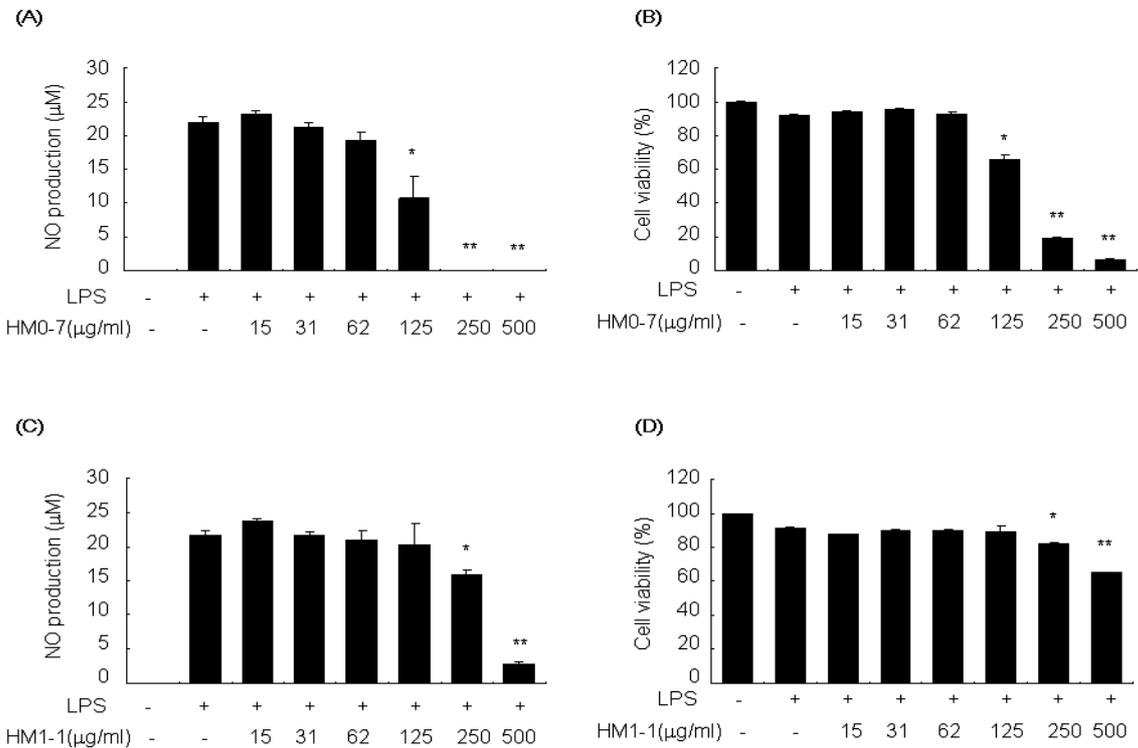


Fig. 3-1. The effect of HM0-7(HYM-055) and HM1-1(HYM-056) on the cell viability and NO production in LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) activated RAW264.7 cells. The cells were preincubated with HM0-7, HM1-1 or vehicle for 30 min and were treated with LPS for 18 hr. The cell viability and NO production were determined with using MTT assay and Griess reagent, respectively. Results are expressed as means \pm SEM from five or seven independent experiments.

(2) 느티만가닥버섯의 항산화능

본 실험에 사용한 느티만가닥버섯 자실체는 한국농수산대학에서 공급받아 사용하였으며 공시한 균주 중 HYM-055 균주는 백색자실체를 형성하는 느티만가닥버섯이고, HYM-055 균주는 갈색자실체를 형성하는 느티만가닥버섯으로 각각 인공재배하여 신선한 재료를 본 실험에 공시하였다. 메탄올 추출물의 수율은 백색(HYM-055)과 갈색느티만가닥버섯(HYM-056)이 각각 3.1% 및 1.9%이었으며 열수 추출물은 백색(HYM-055)과 갈색느티만가닥버섯(HYM-056)이 각각 4.4% 및 1.9%의 수율을 보였다. 항산화제는 심혈관계 질병을 예방하는 역할을 한다고 여

러 질병역학 연구자들이 보고한바 있으며, 혈장의 항산화 물질 수치는 협심증 발병과 반비례관계에 있고, 식이 항산화제의 섭취는 관상동맥 질환의 발생과 역시 반비례하는 것으로 보고되어 있다. 항산화제는 활성산소를 제거하는 기능을 갖는데 많은 식품에 포함된 생리활성 물질은 산화성 스트레스(oxidative stress)와 같은 다양한 세포기능을 수정하는데 성공적으로, 그리고 안전하게 쓰일 수 있을 것으로 사료된다. 특히 식물에서 추출한 물질들은 훌륭한 치료제 개발에 있어 좋은 재료가 될 것으로 판단되고 있다. 각 시료의 항산화능을 알아보기 위하여 본 연구에서는 DPPH를 사용하여 radical scavenger activity를 비교하였다. HYM-056 자실체 메탄올 추출물은 2mg/ml 농도에서 electron donating activity가 26% 정도였으며 HYM-055 자실체 메탄올 추출물은 2mg/ml 농도에서 29%로서 유의할만한 차이가 인정되지 않았다.

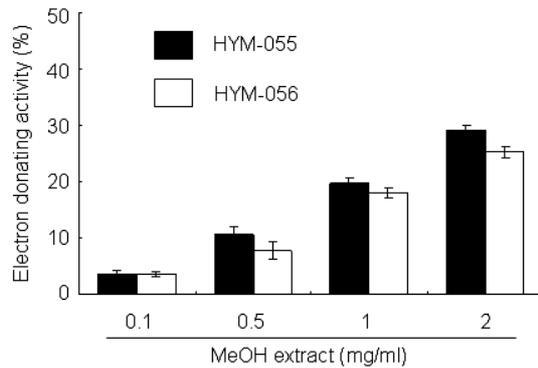


Fig. 3-2. HYM-055 및 HYM-056 자실체에서 분리한 메탄올 추출물의 항산화능

한편 HYM-056 및 HYM-055 자실체 열수추출물의 electron donating activity를 비교해본 결과 사용된 2mg/ml 농도에서 HYM-056 자실체 열수추출물이 HYM-055에 비해 우수한 항산화 효과를 나타내었다(Fig. 3-3).

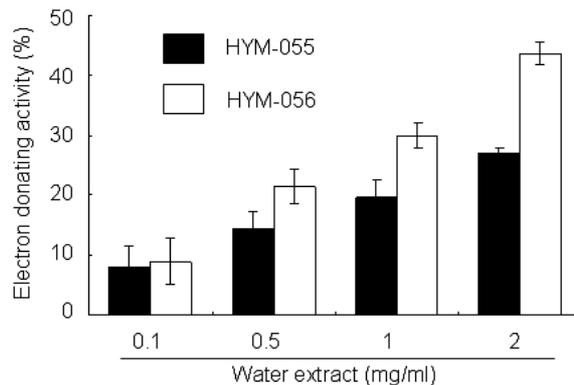


Fig. 3-3. HYM-055 및 HYM-056 자실체에서 분리한 열수 추출물의 항산화능

(3) 느티만가닥 버섯의 항암활성

느티만가닥버섯 열수추출물은 대장암(HCT116), 유방암(MCF7) 및 위암(MKN45) 세포주에 독성효과가 있다는 보고가 있으며(최등, 2008), 또한 만가닥버섯에서 분리한 hypsiziprenol A9 등이 결장암(HT29), 유방암(MCF7) 및 간암(HepG-2) 세포주에 독성을 갖는 것으로 보고된바

있다(Xu 등, 2007). 따라서 본 연구에서는 각각 느티만가닥버섯 자실체의 메탄올 추출물과 열수추출물의 sarcoma 180 세포주에 대한 세포독성을 평가하였다.

아래 Fig. 3-4에서와 같이 HYM-055 및 HYM-056의 메탄올 추출물은 사용된 최저농도 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 최대 암세포 증식 억제능을 보였으며 열수추출물은 약 125 $\mu\text{g/ml}$ 의 IC_{50} 를 보였다. 본 실험결과 느티만가닥버섯의 메탄올 추출물은 강력한 항암활성을 보일 것으로 판단된다.

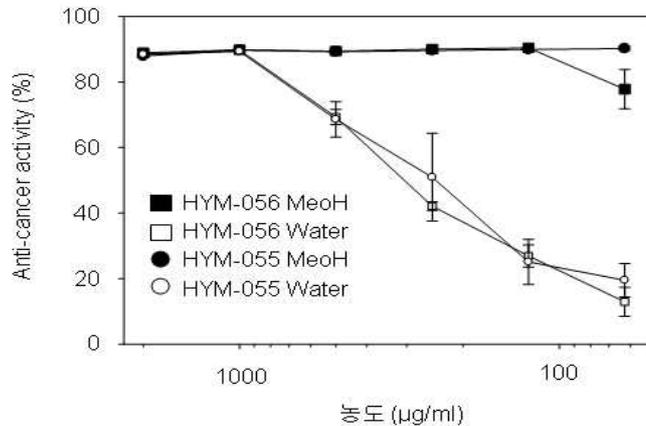


Fig. 3-4. HYM-056와 HYM-055 자실체 메탄올 추출물 및 열수추출물의 Sarcoma 180 세포주에 대한 독성효과.

(4) 느티만가닥버섯 열수 추출물의 혈소판응집반응 억제능

(가) 콜라겐 유도 혈소판 응집반응에 미치는 효과

혈소판의 과도한 활성화에 의해 발생하는 혈소판 응집반응은 혈전형성 및 동맥경화반 형성에 의한 동맥경화증의 발생등을 초래한다. 그러므로 혈소판 응집반응을 억제하는 천연물의 확보는 이들 질환의 예방 및 치료에 있어서 필수적이다. 콜라겐은 혈관 내피세포 하조직에 존재하는 분자로서 혈소판에 존재하는 수용체인 glycoprotein VI 및 인테그린 $\alpha_2\beta_1$ 과 결합할 수 있는 라이겐드이며 콜라겐과 결합한 혈소판은 과도하게 활성화되어 혈소판내에 분포하는 응집반응 유도물질의 분비반응(secretion)이 일어난다. 계속하여 이들 응집반응유도물질이 자체의 혈소판을 활성화시키는 autacoid 작용에 의해 혈소판 응집반응이 일어난다.

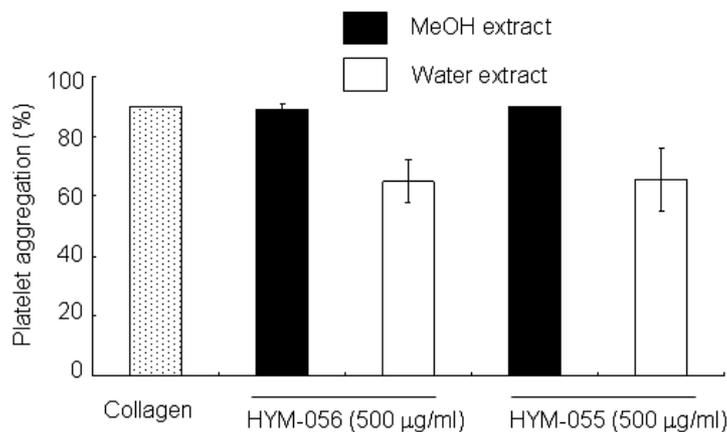


Fig. 3-5. 콜라겐-유도 혈소판응집반응에 미치는 HYM-056과 HYM-055(500 $\mu\text{g/ml}$) 자실체 추

출물의 효과.

본 연구에서는 먼저 느티만가닥버섯의 분획별 혈소판 응집반응에 대한 억제정도를 관찰하였으며 collagen($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$) 유도 혈소판응집반응에 미치는 HYM-055와 HYM-056 균주 자실체의 메탄올 및 열수 추출물의 효과를 조사하였다. 아래 Fig. 3-6에서와 같이 HYM-056과 HYM-055 자실체의 열수추출물은 혈소판 응집반응을 억제함을 발견하였으므로 일련의 실험을 수행하였다.

갈색 느티만가닥버섯(HYM-056) 자실체의 열수추출물은 농도 의존적으로 콜라겐유도 혈소판 응집반응을 억제하였으며 IC_{50} 는 약 $450\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, HYM-055 자실체 열수 추출물은 collagen-유도 혈소판응집반응을 농도 의존적으로 억제하였으며 IC_{50} 는 $440\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다(Fig. 3-6).

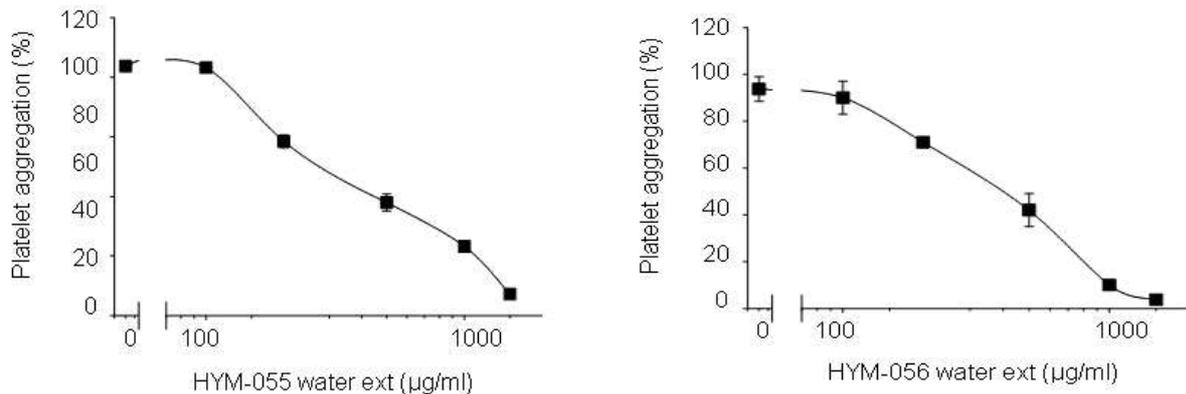


Fig. 3-6. 콜라겐-유도 혈소판 응집반응에 대한 HYM-055와 HYM-056 자실체 열수추출물의 억제적 효과

(나) ADP 유도 혈소판 응집반응에 미치는 효과

혈소판의 dense granule에서 분비되는 ADP는 positive feedback 기전에 의해 혈소판의 세포막에 존재하는 P2Y1 수용체(G_q 수용체)와 P2Y12 수용체(G_i 수용체)와 결합하여 혈소판내 칼슘농도($[\text{Ca}^{2+}]_i$)를 증가시키거나 혈소판 응집반응을 억제하는 2차 신호전달물질인 cAMP의 생성을 억제하므로 혈소판 응집반응을 유발한다. 본 연구에서는 ADP 유도 혈소판응집반응에 미치는 HYM-056 및 HYM-055 자실체의 메탄올 추출물과 열수 추출물이 영향을 조사하였다. 콜라겐 유도 혈소판 응집반응에 대한 억제 정도와 유사하게 각각의 메탄올 추출물은 ADP-유도 혈소판 응집반응을 억제시키지 못하였지만 열수 추출물은 각각 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 혈소판 응집반응을 억제하였다(Fig. 3-7).

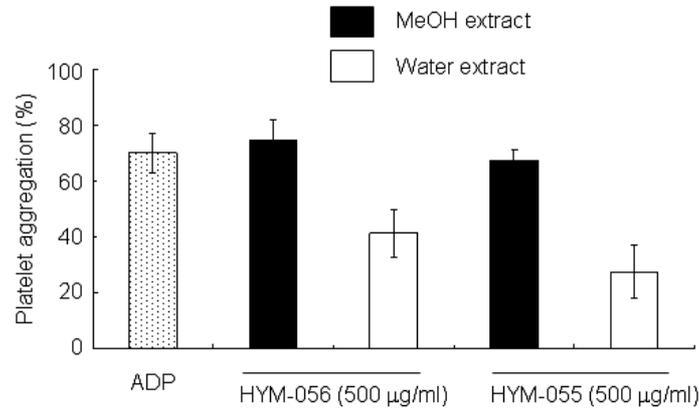


Fig. 3-7. HYM-056 과 HYM-055 자실체 추출물(500µg/ml)이 ADP-유도 혈소판응집반응에 미치는 효과

한편, ADP(1uM)-유도 혈소판 응집반응에 미치는 갈색 느티만가닥버섯(HYM-056)의 억제효과를 확인한 결과 아래 Fig.과 같이 HYM-056 자실체 열수 추출물은 농도의존적으로 ADP-유도 혈소판 응집반응을 억제하였으며 IC₅₀은 약 290µg/ml이었고, 백색 느티만가닥버섯(HYM-055) 자실체의 열수추출물도 ADP-유도 혈소판 응집반응을 농도 의존적으로 억제하였으며 HYM-055 자실체 열수추출물의 IC₅₀는 약 290µg/ml이었다. 이들 결과에서 느티만가닥버섯(HYM-056 및 HYM-055 균주의 자실체)의 열수추출물은 미지의 항 혈소판 성분을 함유하고 있는 것으로 판단된다.

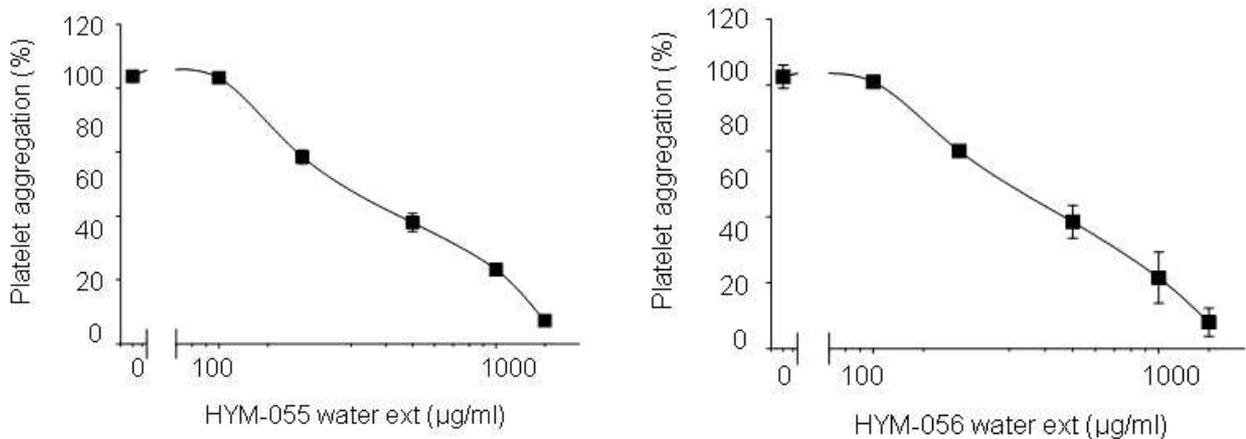


Fig. 3-8. HYM-055와 HYM-056 자실체 열수 추출물이 ADP-유도 혈소판 응집반응에 미치는 억제효과

(다) 혈행개선에 미치는 효과

HYM-055 및 HYM-056 균주 자실체의 열수추출물이 혈소판 응집반응에 대한 억제능을 보였으므로 rat의 혈전형성에 대한 HYM-055 자실체 열수추출물의 억제정도를 확인한 결과 아래 Fig. 3-9에서와 같이 HYM-055 자실체 열수추출물(500mg/kg body weight)은 vehicle control 에 비해 통계적인 유의성이 있게 thrombus 형성을 억제하였다.

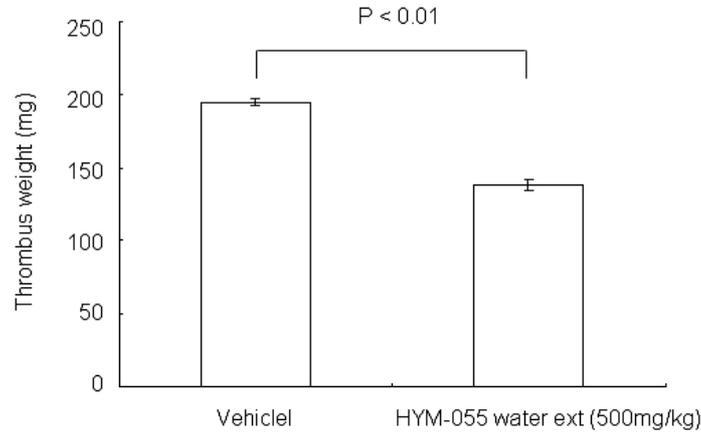


Fig. 3-9. HYM-055 자실체 열수추출물의 혈전형성에 대한 억제적 효과

(5) 느티만가닥버섯 메탄올 추출물의 혈소판응집반응 억제능

(가) 콜라겐에 의해 유도된 혈소판 응집반응에 미치는 메탄올 추출물의 효과

저농도의 collagen ($1.0\mu\text{g/ml}$)에 의해 유도된 혈소판 응집 반응은 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7과 HYM-056 균주 자실체에서 추출한 HM1-1에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. HM0-7은 $400\mu\text{g/ml}$ 농도에서 혈소판 응집률이 9%, HM1-1은 $400\mu\text{g/ml}$ 농도에서 응집률이 40%인 바, HM0-7이 HM1-1에 비해 우수한 혈소판 응집반응 억제효과를 가진 것으로 나타났다.

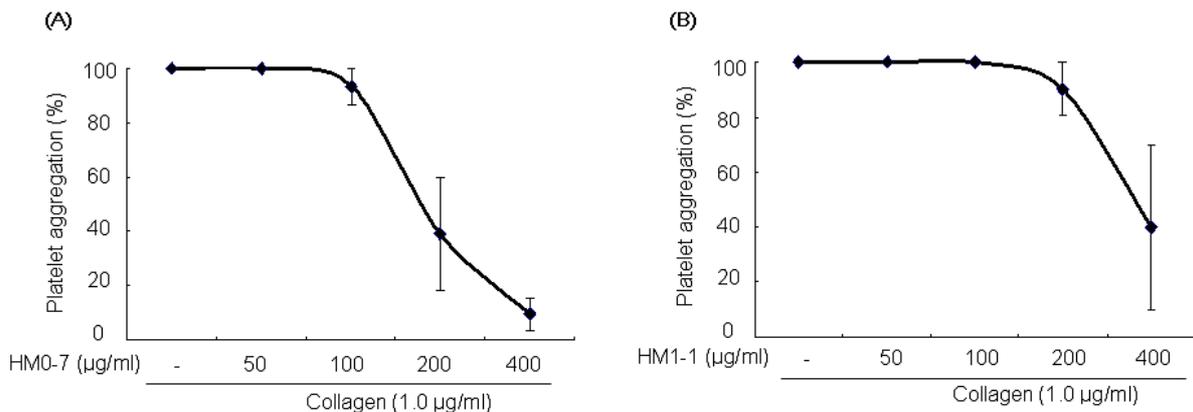


Fig. 3-10. The inhibitory effects of HYM-055 extracts HM0-7 (A) and HYM-056 extracts HM1-1 (B) on collagen ($1.0\mu\text{g/ml}$)-induced platelet aggregation. The preincubation of indicated concentration of HM0-7 and HM1-1 was performed for 2 min and the platelets were stimulated by $1.0\mu\text{g/ml}$ of collagen. After 5 min incubation, the reaction was terminated and the aggregatory extent was determined. The data are shown from four individual experiments and represented as mean \pm SEM.

(나) 트롬빈에 의해 유도된 혈소판 응집반응에 미치는 메탄올 추출물의 효과

트롬빈은 혈소판 막에 존재하는 protease activated receptor subtype 4에 결합하여 혈소판 응집반응을 유발하는 라이젠드로 알려져 있다. 저농도의 트롬빈 (0.05 U/ml)에 의해 유도된 혈

소판 응집 반응에 미치는 효과를 확인해본 결과, 아래 Fig.에서와 같이 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7은 트롬빈 유도 혈소판 응집반응을 억제 시키지 못했다. 한편 HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM1-1은 사용된 최고농도인 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 의해 60% 정도의 응집반응 억제 효과를 보였다.

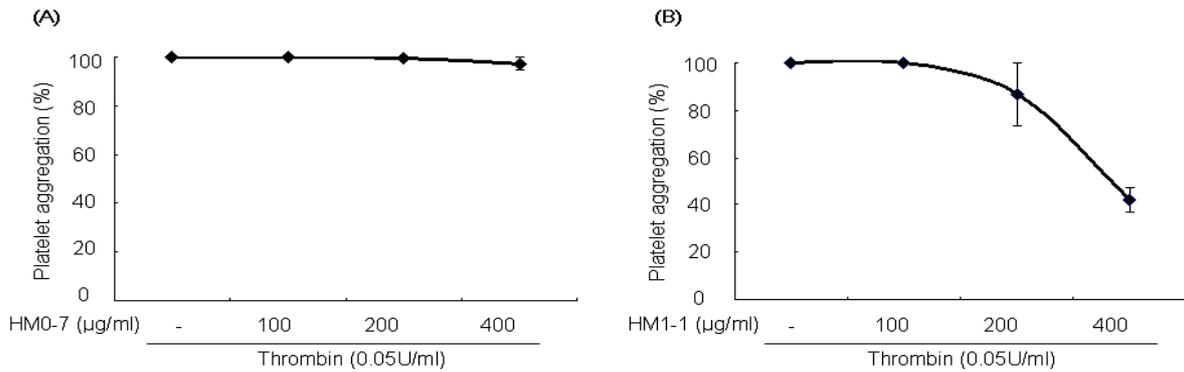


Fig. 3-11. The effects of HM0-7(HYM-055) (A) and HM1-1(HYM-056) (B) on thrombin (0.05U/ml) induced platelet aggregation. The preincubation of indicated concentration of HM0-7 and HM1-1 was performed for 2 min and the platelets were stimulated by 0.05 U/ml of thrombin. After 5 min incubation, the reaction was terminated and the aggregatory extent was determined. The data are shown from four individual experiments and represented as mean \pm SEM.

(다) ATP에 의해 유도된 혈소판 응집반응에 미치는 메탄올 추출물의 효과

5 μM 의 ADP에 의해 유도된 응집 반응을 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7과 HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM1-1은 사용된 최고농도인 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 37%와 36%까지 억제시켜 유사한 정도의 약한 응집억제능을 가진 것으로 나타났다.

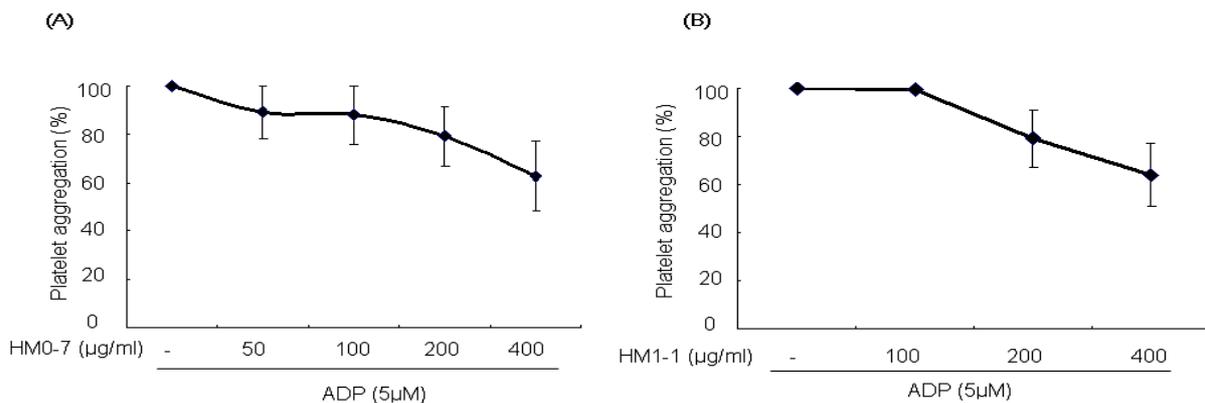


Fig. 3-12. The effects of HM0-7(HYM-055) (A) and HM1-1(HYM-056) (B) on ADP (5 μM)-induced platelet aggregation. The preincubation of indicated concentration of HM0-7 and HM1-1 was performed for 2 min and the platelets were stimulated by 5 μM of ADP. After 5min incubation, the reaction was terminated and the aggregatory extent was determined. The data are shown from four individual

experiments and represented as mean \pm SEM.

(라) 세포내 칼슘농도에 미치는 느티만가닥버섯 메탄올 추출물의 효과

라이겐드의 결합으로 유도된 증가된 세포내 calcium 농도는 혈소판 응집과 활성화에 중추적인 역할을 하는 것으로 보고되었다. 그러므로 우리는 느티만가닥버섯의 메탄올 추출물이 세포내 calcium 농도에 미치는 영향을 조사하였다. 랫트의 혈소판에 느티만가닥버섯의 추출물을 preincubation한 결과 collagen에 의해 유도된 칼슘의 증가는 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7과 HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM1-1에 있어서 비교적 저농도인 25 μ g/ml과 100 μ g/ml에서도 현저하게 억제하였다. 이는 곧 혈소판 응집 저해가 세포내 칼슘 농도 억제에 의한 것임을 암시한다.

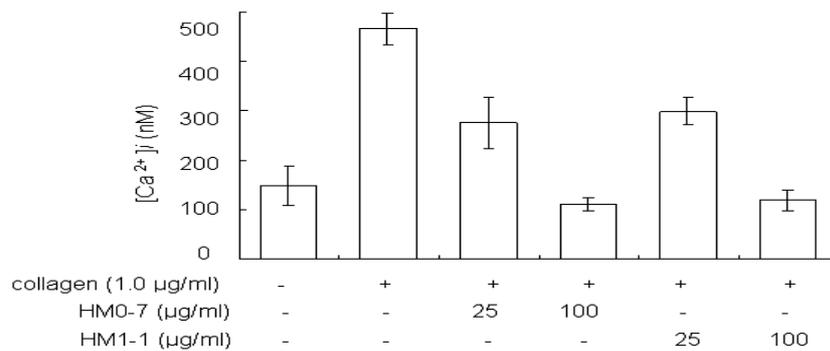


Fig. 3-13. Effect of HM1-1(HYM-056) or HM0-7(HYM-055) on collagen-activated platelet intracellular Ca²⁺ concentration [Ca²⁺]_i. Washed platelet were loaded with Fura-2/AM and stimulated by collagen and intracellular calcium concentration was determined as described in the Materials and Methods. Quantitative data obtained from at least four separate experiments performed and bar graphs presented as mean \pm SEM

(마) ATP 분비반응에 미치는 느티만가닥버섯 메탄올 추출물의 효과

ATP와 같은 Dense granule의 분비는 혈소판 응집 반응에 있어서 혈소판 활성화의 결정적인 지표이므로, 느티만가닥버섯 추출물이 collagen에 의해 유도된 ATP release에 미치는 영향을 조사하였다. 아래Fig.에서와 같이 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7과 HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM1-1은 농도 의존적으로 1.0 μ g/ml의 collagen에 의해 유도된 ATP 분비 반응을 억제시켰다.

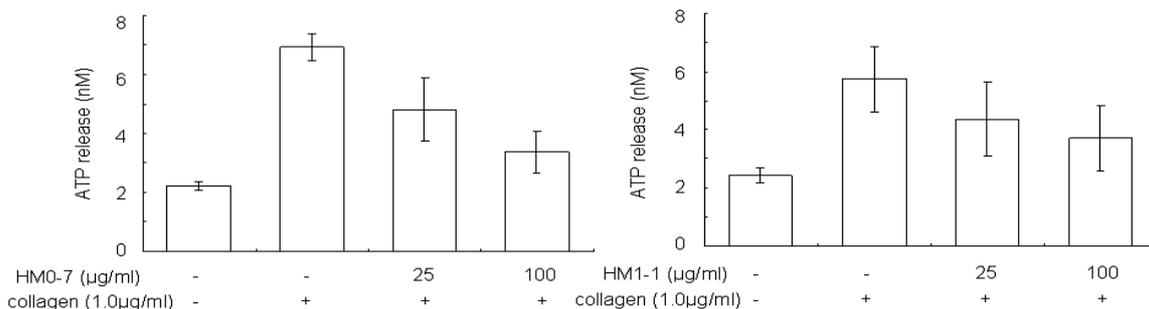


Fig. 3-14. Effects of HM0-7(HYM-055) (A) or HM1-1(HYM-056) (B) on collagen-activated platelet ATP release. Washed platelets were pre-incubated with indicated-concentrations of HM0-7 or HM1-1 for 2 min, and then collagen stimulation was performed for 5 min. The reactions were terminated followed by ATP release assay. Bar graphs shown mean \pm SEM of at least 4 independent experiments performed.

(바) Extracellular-regulated kinase (ERK) 인산화에 미치는 영향

혈소판에는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 하나인 Erk2가 존재하며 여러 가지 agonist에 의해 활성화된다고 보고되어 있다. Erk2의 인산화가 느티만가닥버섯에 의한 혈소판 활성 억제의 신호전달 기전으로써 작용하는 것인가를 실험하였다. HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM1-1과 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7 둘 다 전 농도에 걸쳐 Erk2의 인산화에 별 영향을 미치지 못하는 것으로 밝혀짐. 이 결과는 느티만가닥버섯의 추출물은 Erk에 독립적으로 혈소판 활성을 억제하는 것을 보여주었다.

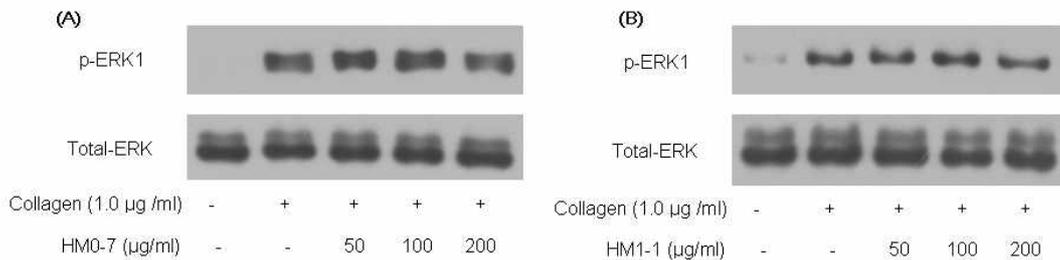


Fig. 3-15. Determination of total-Erk and phospho-Erk. Washed platelets were stimulated with collagen (1.0µg/ml) in the absence or the presence of HM1-1(HYM-056) or HM0-7(HYM-055) (50-200µg/ml) under stirring condition. Samples were blotted onto a PVDF membrane and stained using antibody against Erk1/2 or phospho-Erk1/2.

(사) Integrin αIIbβ3 활성화에 미치는 느티만가닥버섯 추출물의 효과

피브리노겐은 대표적인 혈소판의 integrin인 αIIbβ3 (GP IIb/IIIa)의 라이젠드이며 이들 인테그린이 활성화되어야만 피브리노겐에 결합하는 것으로 알려져 있다. 우리는 느티만가닥버섯의 추출물이 fibrinogen binding을 얼마나 억제하는지 실험하였다. HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM1-1은 fibrinogen binding에 미치는 별다른 효과가 없었으며 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7은 200µg/ml 농도에서 fibrinogen binding을 억제하였다.

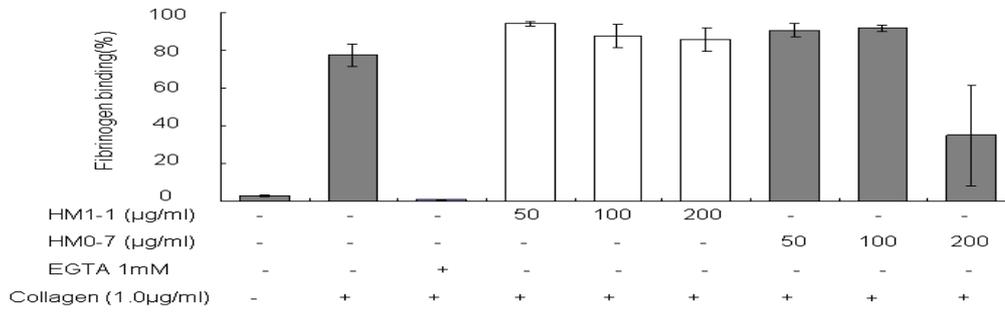


Fig. 3-16. Effect of HM1-1(HYM-056) and HM0-7(HYM-055) on fibrinogen binding in collagen-activated platelets. The effect of HM1-1 or HM0-7 on fibrinogen binding to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in collagen-stimulated platelets was examined by flow cytometric analysis. Washed platelets were pre-treated with HM1-1 or HM0-7 and then collagen (1.0µg/ml) was added together with Alexa Fluor 488-human fibrinogen (200µg/ml), and the sample was incubated at 37°C for 15 min. To examine unspecific binding of fibrinogen, 1mM EGTA were treated. Bar graph represents summary of inhibitory effect of HM1-1 and HM0-7 on fibrinogen.

수컷 SD rat에서 분리된 혈소판으로 한 일련의 실험에서 느티만가닥버섯 HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM1-1은 collagen, thrombin, ADP에 의해 유도된 혈소판 응집 반응을 농도 의존적으로 억제시켰으며, HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7은 thrombin을 제외한 collagen과 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집 반응을 농도 의존적으로 억제시켰다. 또한 HM1-1(HYM-056)과 HM0-7(HYM-055)은 1.0µg/ml 농도의 collagen에 의해 유도된 세포내 calcium 증가를 감소시켰고, collagen에 의해 유도된 ATP release 또한 억제시켰다. 하지만, HM1-1과 HM0-7 모두 MAPK의 하나인 Erk2의 인산화에는 별다른 영향이 없었다. 또한 HM1-1은 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 대표적인 ligand인 fibrinogen binding에 별다른 영향을 주지 못하였으나 HM0-7은 200µg/ml 농도에서 binding을 억제하였다.

이는 느티만가닥버섯의 메탄올 추출물이 세포내 calcium 농도를 감소시키거나, dense granule의 분비를 억제함으로써, 혈소판 응집 반응을 저해한다고 생각할 수 있다. 무엇보다도 느티만가닥버섯이 collagen 의한 혈소판 응집 반응을 억제하는 것은 MAPK의 하나인 Erk의 활성화를 억제시키지는 못하였으며 또한 outside-in signaling를 구성하는 중요한 integrin인 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 활성화도 강력히 억제하지는 못하는 것으로 판명되었다.

다. 동물실험을 통한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석

(1) 느티만가닥버섯 추출물이 랫트 흉대동맥윤에 미치는 영향

(가) Rat 흉대동맥윤에 대한 느티만가닥버섯 추출물의 효능

두 종류의 느티만가닥버섯 70% 에탄올 추출물은 모두 U-46619 (100mM)으로 전수축된 랫트 흉대동맥윤을 농도 의존적으로 이완시켰다. 두 종류 HM 0-7, HM 1-1의 에탄올 추출물은 고농도인 100µg/ml을 투여하였을 때 각각 31.7±4.9, 28.7±7.8 %의 이완반응을 보였으며, 두 에탄올 추출물 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다. 그러나 두 종류의 느티만가닥버섯의 증류수 추출물은 고농도(100µg/ml)에서 각각의 메탄올 추출물보다 유의성 있게 작은 이완반응을 나타내었다 (Fig. 3-17).

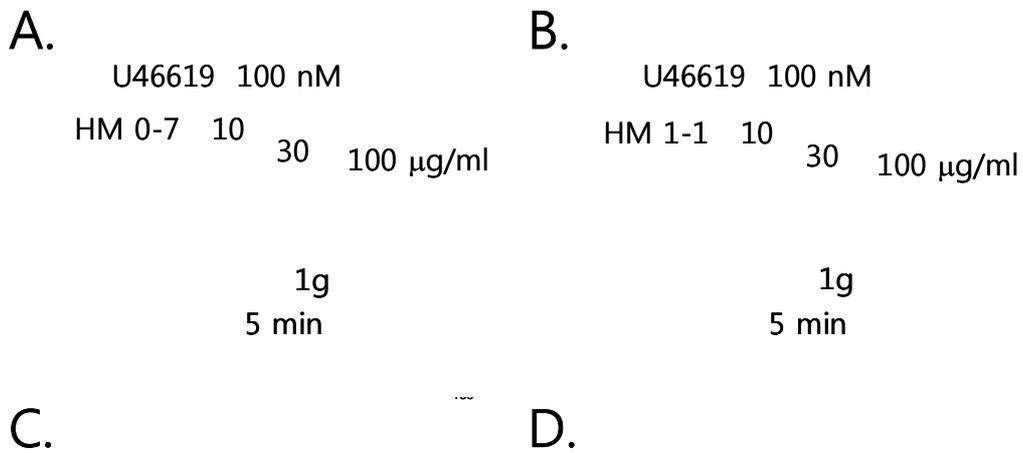


Fig. 3-17. 랫트 흉대동맥윤에 대한 느티만가닥버섯 추출물의 이완효과 (n=6)

(나) 느티만가닥버섯 추출물의 작용기전

느티만가닥버섯 추출물의 작용기전을 확인하기 위해 고농도 (100µg/ml) HM 0-7 에탄올추출물을 사용하였다. 혈관평활근이완에 관여하는 주된 신경전달물질인 nitric oxide (NO)가 관여하는가를 알아보기 위해 NO synthase(NOS)의 억제제인 L-NAME (100uM)을 전처리한 상태에서 HM 0-7 에탄올추출물을 투여하였다. L-NAME은 느티만가닥버섯 추출물의 이완반응을 억제하는 것으로 보인다 (Fig. 3-18).

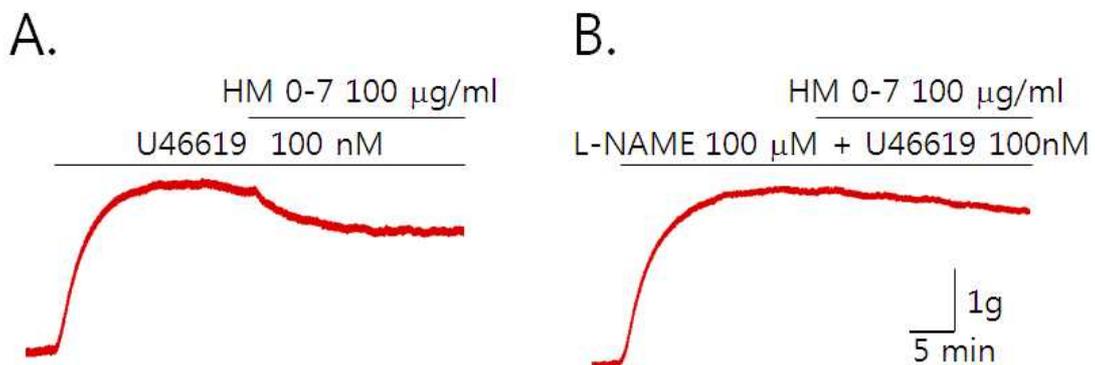


Fig. 3-18. 느티만가닥버섯 추출물의 이완반응에 대한 L-NAME의 효과

한편, NO는 일반적으로 혈관내피세포에서 생성되어 혈관평활근으로 가서 *guanylyl cyclase*를 활성화시켜 cGMP의 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 NO-GMP의 기전이 느티만가닥버섯 추출물의 이완 기전인가를 확인하기 위해 *guanylyl cyclase*의 억제제인 ODQ (10 μ M)을 전처리한 후 느티만가닥버섯 추출물을 투여하였다. 느티만가닥버섯 추출물의 이완작용은 ODQ에 의해 거의 차단되는 것을 확인하였다 (Fig. 3-19).

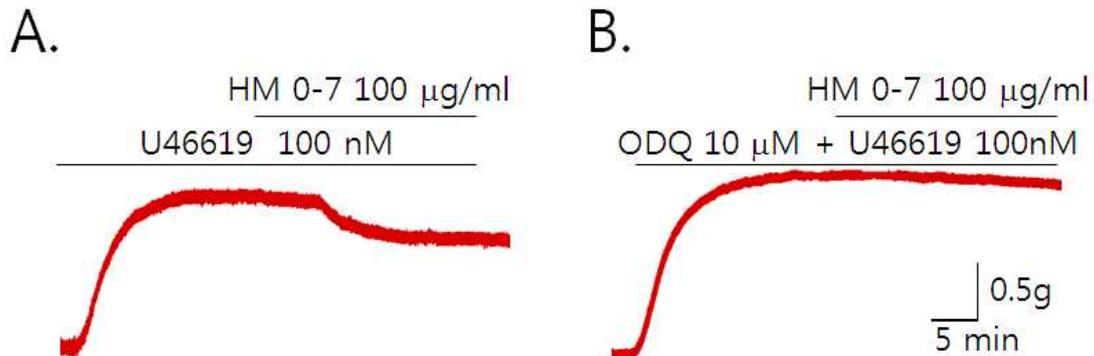


Fig. 3-19. 느티만가닥버섯 추출물의 이완반응에 대한 ODQ의 효과

그러나 작용기전에 대한 실험은 통계적의미를 갖기 위해서 몇 번의 반복실험이 더 필요하며, 그 외에도 혈관내피세포의 관여여부 등 몇 가지 실험이 더 필요할 것으로 생각된다.

4. 요약

LPS-유도 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 느티만가닥버섯의 효과 즉, *in vitro* 항염증작용을 알아보기 위하여 우리는 RAW264.7 세포주에서 lipopolysaccharide (LPS)-유도 NO 생성에 미치는 효과를 확인하였음. LPS-유도 NO 생성에 대한 느티만가닥버섯 HYM-055 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM0-7과 HYM-056 균주 자실체에서 메탄올 추출한 HM 1-1의 억제효과를 확인한 결과 농도의존적으로 NO 생성을 억제하는 것으로 확인되었음. 그러나 이들의 효과는 MTT assay를 통한 RAW264.7 세포의 생존률 조사에서 나타난 바와 같이 NO 생성을 억제하는 125, 250, 500 μ g/ml 농도에서 강력한 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었음. 그러므로 이들 농도에서의 NO 생성에 대한 억제효과는 세포독성에 의한 인위적인 효과인 것으로 판명되었음.

각 시료의 항산화능을 알아보기 위하여 우리는 DPPH를 사용하여 radical scavenger activity를 비교하였음. HM 0-7 메탄올 추출물은 2mg/ml 농도에서 electron donating activity가 26% 정도였으며 HM 1-1 메탄올 추출물은 2mg/ml 농도에서 29%로서 유의할만한 차이가 인정되지 않았음.

각 각 느티만가닥버섯 메탄올 추출물과 열수추출물의 sarcoma 180 세포주에 대한 세포독성을 평가하였음. HYM 05 및 056의 메탄올 추출물은 사용된 최저농도 62.5 μ g/ml에서도 최대 암세포 증식 억제능을 보였으며 열수추출물은 약 125 μ g/ml의 IC₅₀를 보였음. 본 실험결과 느티만가닥 버섯의 메탄올 추출물은 강력한 항암활성을 보일 것으로 판단됨.

느티만가닥 버섯의 메탄올 추출물은 농도의존적으로 콜라겐에 유도된 혈소판 응집반응을 억제하였으나 ADP나 트롬빈에 유도된 혈소판 응집반응에는 효과를 보이지 않았음. 추출물은 콜라겐에 유도된 혈소판의 세포내 칼슘농도의 증가와 ATP 분비를 감소시켰음. 또한 추출물은 콜라겐에 유도된 fibrinogen의 integrin 결합을 억제시켰음. 하지만 ERK의 인산화에는 아무런 효과도 보이지 않았음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

구분	연구개발의 목표	달성내용	달성도	
1차년도 (2008-2009)	제1세부	○ 유전자원 확보 (30균주 이상)	- 국내외 야생 및 시판 유전자원 수집 : 110균주	100
		○ 확보유전자원의 재배생리학적 특성 분석	- 기 확보된 유전자원을 이용하여 균사 특성과 인공재배로 통한 재배생리학적 특징 조사	100
		○ LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발	- 인공재배에 최적의 광원과 광질 조사	100
	제1협동	○ 느티만가닥버섯의 방사선 돌연변이 유기 조건 확립	- 느티만가닥 균사체로 protoplast를 활용한 감마선 100Gy부터 2.6kGy를 조사하여 50%이상 치사율 상에서 고 변이율조건 조사	100
		○ 확보 유전자원의 분자유전학적 특성 분석	- RAPD-PCR를 이용하여 느티만가닥 유전자원의 유전적 다양성 조사	100
	제2협동	○ 식품성분 분석	- 일반성분 조사	100
○ 시험관내 방법에 의한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석		- 항산화, 항암, 면역 활성 비교분석 - 혈소판응집반응 억제효능 비교분석	100	
2차년도 (2009-2010)	제1세부	○ LED 광원을 이용한 에너지 절감형 재배기술 개발	- 생육기간별 LED 광원의 최적 광질, 최적 광량, 최적 조사시간을 구명	100
		○ 저비용 속성재배용 배지 개발	- 최적 주재료와 첨가제(영양제) 선발 - 액체종균용 염가배지 개발	100
	제1협동	○ 돌연변이집단 M1세대의 육성 및 자실체 특성 조사	- 방사선돌연변이체를 순수분리 하여 균사성장능과 형태적 특성을 관찰	100
		○ M1의 고 생산성 형태적 변이체를 선발 하여 M2로 육성 및 변이체의 유전적 변이부위 분석	- 특성을 보인 변이 개체를 선발 자실체로 육성: 형태적, 생리적, 생산적 특성을 조사 - M2세대의 자실체 특성조사 및 Database화 - UPF-PCR 법에 의한 변이부위 검정	100
	제2협동	○ 기능성 물질 분리계 확립	- 열수추출 및 용매 추출	100
		○ 동물실험을 통한 배양균사체 및 자실체의 기능성 분석	- 면역 활성 비교분석 - 혈전형성 억제효능 비교분석	100
3차년도 (2010-2011)	제1세부	○ 저비용 속성재배용 배지 개발	- 최적 주재료와 첨가제(영양제) 선발 - 주재료 및 첨가제의 최적 혼합비율 구명 - 최적 배양기간, 자실체 수량, 품질 조사 - 배지 재료 가격, 자실체 수량, 품질, 재배기간 등에서 원가 분석	100
		○ 안정적 재배법 확립	- 농가실증시험	100
	제1협동	○ M3, M4 육성균주 및 교배균주의 유전적 특성조사	- 특성을 보인 변이 개체를 선발 자실체로 육성: 형태적, 생리적, 생산적 특성을 조사 - M세대의 자실체 특성조사 및 Database화 - UPF-PCR 법에 의한 변이부위 검정	100
		○ 신규품종 선발	- 농가실증시험 및 품종등록 - 종균산업화 및 농가보급	90
	제2협동	○ 시험관내 및 동물실험을 통한 신규 육성품종의 기능성 분석	- 항산화, 항암, 면역 활성 비교분석 - 혈소판응집반응 억제효능 비교분석	100

2. 관련분야에의 기여도

- 가. LED를 활용한 버섯 재배 기술 : 식용버섯류의 병재배 시설에서 활용할 수 있음
- 나. 유전자원 확보 및 재배 생리학적 분석 : 수입 개방에 따른 로열티 문제 해결
- 다. 버섯 분야에서 새로운 돌연 변이 육종법 제시
- 라. 식품 및 기능성 성분의 효능을 밝히어 소비 촉진에 기여
- 마. 기능성 성분의 연구 모델 제시

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 본 연구를 통하여 느티만가닥버섯 유전자원 110균주를 확보하였으며 이는 육종 소재로 활용할 계획이며 신제품 등록 예정 임
- 품종의 지적재산권 확보 및 신규 품종등록으로 새로운 종균의 산업화에 기여
- LED 광원을 이용한 고품질 버섯 생산기술 개발 및 최적 재배환경 구명하여 에너지 절감형 재배기술을 확보하고 이를 식용버섯류의 재배에 응용하여 버섯산업의 발전을 도모할 수 있음. 이 결과는 재배 농가에 기술을 보급하여 생산성 향상과 생산비 절감에 기여 할 수 있음
- 고품질버섯 생산과 배양기간 단축을 위한 첨가제 및 저비용 배지재료 개발로 생산비 절감을 가져와 느티만가닥버섯의 국내 재배 보급에 기여할 것임
- 고품질버섯 생산을 위한 최적 온습도 조건 구명으로 버섯생산의 안정화를 꾀할 수 있었으며 이 결과는 재배 농가에 기술을 보급하여 생산성 향상에 기여 할 수 있음
- 방사선 돌연변이체를 이용한 버섯 품종 육종법을 개발, 보급하여 국내 버섯류의 품종 육성에 신기술을 제공할 것임. 이 결과는 식용버섯류의 육종에 활용할 수 있음
- 방사선 돌연변이체 집단을 확보함으로써 육종 모본체로서의 활용
- 방사선을 이용한 만가닥버섯 자원개발과 국내 유전자원의 확보는 UPOV 협약에 따른 품종 로얄티 지불에 대응하여 국내외 경쟁력 및 지적재산권제고에 기여
- 느티만가닥 버섯의 자실체와 균사체의 식품영양성분 및 기능성성분을 탐색하고 in vivo 효능분석을 통하여 산업화 소재로 개발하고 여기에서 얻어지는 성과를 적극 홍보하여 버섯의 소비 확대에 기여
- 느티만가닥버섯의 재배 안정화와 대량생산으로 먹거리의 다양화와 외국 바이어의 다양한 요구에 부응하여 수출증대에 기여할 것으로 기대

1. 실용화 및 산업화 계획 :

- 가. 육성품종의 농가 보급 : 기술 실시 등
- 나. LED를 활용한 버섯 재배 기술 : 농가 보급 및 교육 자료 활용, 논문 게재, 타 연구에 활용
- 다. 느티만가닥버섯의 종균 및 배지 조성 : 농가 보급 및 교육 자료 활용, 논문 게재, 타 연구에 활용
- 라. 돌연변이를 이용한 버섯의 신제품 육종 기술 : 타 연구에 활용
- 마. 수집 유전 자원 : 육종 모본으로 활용하고 균주 보존 기관에 기탁
- 바. 기능성 성분의 효능 구명으로 소비 촉진에 기여
- 사. 안정적 재배 기술 확립으로 안정적 생산과 수출 확대에 기여

2. 연구 개발 성과

(단위 : 건수)

		목 표	달성치
특허	출원	2	(2)
	등록	1	(1)
신품종	품종명칭등록		(3)
	품종생산수입판매신고		(2)
	품종보호	출원	(1)
		등록	0
유전자원등록		(6)	
논문	SCI	3	3
	비SCI	6	2(4)
학술발표			8

() 안의 성과는 연구 종료 후 1년 이내 달성 계획

나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	2	1	1	5	5	

<학회발표>

발표년도	발 표 논 문 제 목	발표자	발표학회명
2010. 5. 13.	Molecular and Morphological Analysis of <i>Hypsizygus ulmarium</i> strains Mutated by Gamma Ray Radiation.	김진희 서건식 김종균 강희완	2010. 춘계 한국균학회 학술대회
2010. 5. 13.	Effect of Light on the Mycelial Growth and Fruit Body Development of <i>Hypsizygus marmoreus</i>	김민경 김정미 서건식	2010. 춘계 한국균학회 학술대회
2010. 10. 14	Morphological Analysis of Fruiting Bodies of <i>Hypsizygus marmoreus</i> strains Mutated by Gamma Ray Radiation.	김진희 서건식 김종균 강희완	2010. 추계 한국균학회 학술대회
2010	Anti-platelet activity of <i>Hypsizygus marmoreus</i> methanol extract: inhibition of agonist-induced intracellular calcium mobilization and ATP release.	박지영 오원준 윤봉식 서건식 김태완 박승춘 이만휘	2010 대한수의학회 추계국제학술대회
2011. 8. 10.	The anti-platelet activity of <i>Hypsizygus marmoreus</i> extract is involved in the suppression of intracellular calcium mobilization and integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation	박지영 오원준 곽동미 김민경 서건식 황성복 이만휘	Asian Mycological Congress 2011 & the 12 th International Marine and Freshwater Mycology Symposium
2011. 8. 10.	Genetic Diversity of <i>Hypsizygus marmoreus</i> Strains Based on Morphological Characteristics and PCR Polymorphism	김민경 김종균 강희완 서건식	Asian Mycological Congress 2011 & the 12 th International Marine and Freshwater Mycology Symposium
2011. 10. 13	Morphological Analysis of Fruiting Bodies of <i>Hypsizygus marmoreus</i> Brown Strains Mutated by Gamma Ray Irradiation	김종균 문덕훈 서건식 강희완	2011. 한국미생물연합 학술대회
2011	The effect of <i>Hypsizygus marmoreus</i> extract on the rat thoracic aorta	전진홍 박지영 이만휘 김태완	2011대한수의학회 추계국제학술대회

<논문게재>

게재 연도	논문명	저자	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
2010	Xylarinic acid A inhibits nitric oxide production and mRNA expressions of proinflammatory mediators in RAW 264.7 cells.	김창건, 이만휘, 메하리, 타다쎬, 김태완, 서건식, 조재열, 박화진, 김상근, 이인경, 윤봉식	Journal of Medicinal Plant Research		국외	SCIE
2011	The anti-platelet activity of <i>Hypsizygus marmoreus</i> extract is involved in the suppression of intracellular calcium mobilization and integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation	Ji Young Park, Won-Jun Oh, Dong-Mi Kwak, Min-Kyung Kim, Geon-Sik Seo, Seung-Bok Hong and Man Hee Rhee	Journal of Medicinal Plants Research	5(11)	국외	SCIE
2011	감마방사선 조사에 의한 느티만가닥버섯의 변이	김종근, 문덕훈, 서건식, 강희완	한국 균학회지	39(3)	국내	비 SCI
2011	백색느티만가닥버섯 자실체의 생리기능성 탐색	Zanabaatar Bolormaa, 김민경, 서건식, 이영욱, 이종수	한국 균학회지	39(3)	국내	비 SCI
2012	Mechanism of anti-platelet activity of <i>Oligoporus tephroleucus</i> oligoporus A: involvement of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and cyclic nucleotide elevation	박지영, 오원준, 김명진, 김태환, 조재열, 박화진, 이인경, 김석, 김근섭, 김상근, 서건식, 윤봉식, 이만휘	Platelets	인쇄중	국외	SCI

<기타: 특허 출원 준비 중>

<제 1 협동과제: 느티만가닥버섯의 신품종 육성>

감마 방사선조사에 의한 느티만가닥버섯의 변이체 유기조건이 확립됨으로서 다양한 육종소재가 창출 될 것으로 기대되고 우리 느티만가닥버섯 품종개발에 유용하게 사용하여 이를 이용한 신규 품종 등록과 농가보급이 가능하고 UPOV에 대한 품종 차별성을 짧은 시간 내에 실현 가능 할 수 있다. 본 과제는 2008년도 12월에서 2011년 12월까지로 된 과제로서 본 연구로 감마방사선 변이체의 다량선발이 된 것으로 사료됨으로 후속연구로 신 기능성 자실체 육성으로 변이 체의 버섯의 형태적 특성의 조사 및 유전적 고정 등의 확인을 통해 신규품종으로의 등록 및 특허 등에 사용할수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제 수행을 목적으로 해외 출장을 수행하지 않았으나 일본의 재배기술, 시장 현황 등 정보를 수집하였으며 과제 수행에 활용하였음

제 7 장 참고문헌

- 김종근, 김진희, 공원식, 강희완. 2010. 버섯류의 원형질체 나출을 위한 고효율 효소 선발. 한국균학회지 38(1): 21-24.
- 김현수, 하효철, 김태석. 2003. 새로운 기능성 버섯의 연구현황 및 전망 - 흰목이, 잎새, 느티만가닥. 식품과학과 산업 12월호.
- 이균, 김공환, 김현구. 2002. 팽이 및 만가닥버섯에서 추출한 peroxidase의 열 불활성화 특성. 한국식품과학회지 34(6):1067-1072.
- 이란숙, 차환수, 박종대, 장대자, 김상희. 2008. Physicochemical Properties of Mushroom (*Flammulina velutipes*) Cultivated with Green Tea. 한국식품영양과학회지 37(2):190-194.
- 임윤정, 이창운, 박정은, 김상우, 이현숙, 노현수. 2010. 느티만가닥버섯의 분자유전학적 분류 및 품종특이적 DNA 마커 탐색. 한국균학회지 385(1): 34-39.
- 정은봉, 조진호, 조승목. 2008. Nutritional Component and Anticancer Properties of Various Extracts from Haesongi Mushroom (*Hypsizygus marmoreus*). 한국식품영양과학회지 37(11):1395-1400.
- 정해영, 김계령. 2010. 이온빔을 이용한 미생물 균주 개량. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38(3): 235 - 243.
- 최용민, 장후봉, 최성렬, 최재선, 노재관, 송인규, 민경범, 이준수. 2008. Biological activities of *Lyophyllum ulmarium* extracts. 농업생명과학연구지 42(1):35-41.
- 최혜진, 김병각, 현진원. 2003. Studies on Protoplast Isolation and Regeneration of *Lyophyllum ulmarium*. 생명과학회지 13(2):143-149.
- Akavia, E., Beharav, A., Wasser, S. P. and Nevo, E. 2009. Disposal of agro-industrial by-products by organic cultivation of the culinary and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Waste Manag.* 29(5): 1622-1627.
- Akihisa, T., Franzblau, S. G., Tokuda, H., Tagata, M., Ukiya, M., Matsuzawa, T., Metori, K., Kimura, Y., Suzuki, T. and Yasukawa, K. 2005. Antitubercular activity and inhibitory effect on Epstein-Barr virus activation of sterols and polyisoprenepolyols

- from an edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*. Biol Pharm Bull. 28(6):1117–1119.
- Akira Ohta. 1994. Some cultural characteristics of mycelia of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*. Mycoscience 35: 83–87.
- Bradley, J. T., Jennifer, C., Thomas, H. T., Peter, C., Elizabeth, A. G., Steven, H. and Luca, C. 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BMC Plant Biology 7:19.
- Chandra P. Pokhrel and Shoji Ohga. 2007. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. Food chemistry 105(2):641–646.
- Chang Qing Hu, Sadatoshi Meguro, Shinsaku Kawachi. 2004. Effects of physical properties of wood on the water activity of wood meal media for the cultivation of edible mushrooms. Journal of Wood Science, Japan. 50:365–370.
- Chang, J. S., Son, J. K., Li, G., Oh, E. J., Kim, J. Y., Park, S. H., Bae, J. T., Kim, H. J., Lee, I. S., Kim, O. M., Kozukue, N., Han, J. S., Hirose, M. and Lee, K. R. 2004. Inhibition of cell cycle progression on HepG2 cells by hypsiziprenol A9, isolated from *Hypsizygus marmoreus*. Cancer Lett. 212(1):7–14.
- David S. Hibbett and Michael J. Donoghue. 2001. Analysis of Character Correlations among Wood Decay Mechanisms, Mating Systems, and Substrate Ranges in Homobasidiomycetes. Society of Systematic Biologists 50(2): 215–242.
- Djajanegara, I. and Harsoyo. 2008. White oyster mushroom (*Pleurotus florida*) mutant with altered antioxidant contents. *Biotropia* 15(1): 65–73.
- E. Akavia, A. Beharav, S. P. Wasser and E. Nevo. 2009. Disposal of agro-industrial by-products by organic cultivation of the culinary and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*. Waste Management 29:1622–1627.
- Ellen Larsson and Henrik Sundberg. 2011. *Lyophyllum shimeji*, a species associated with lichen pine forest in northern Fennoscandia. Mycoscience 52:289 - 295.
- Fangkun Zhu, Li Qu, Wenxiu Fan, Meiyong Qiao, Hailing Hao and Xuejing Wang. 2011. Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. Environ Monit Assess. 179(1–4):191–199.
- Guan, G. P., Wang, H. X. and Ng, T. B. 2007. A novel ribonuclease with antiproliferative

activity from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. Biochim Biophys Acta. 770(12):1593-1597.

H. Akira, Seiki Gisusi, Shozo Yoneyama and Masakazu Aoyama. 2004. Effects of strain and cultivation medium on the chemical composition of the taste components in fruit-body of *Hypsizygus marmoreus*. Food Chemistry 84:265-270.

H. Akira, Shozo Yoneyama, Shuichi Doi, Masakazu Aoyama. 2003. Changes in contents of free amino acids and soluble carbohydrates during fruit-body development of *Hypsizygus marmoreus*. Food Chemistry 83:343-347.

Hiroshi Tanaka, Hiroyuki Sugawara, Toyohiro Saikai, Kazunori Tsunematsu, Hiroki Takahashi and Shosaku Abe. 2000. Mushroom Worker's Lung Caused by Spores of *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji): elevated serum surfactant protein D levels. CHEST 118(5):1506-1509.

Hye Ryoung Kim, Yang Sup Kim, Yong Hwan Park and Mi Ja Shim 1983. Studies on Constituents of Korean Basidiomycetes (L) Antitumor Components Extracted from Cultured Mycelia of Several Basidiomycetes. Arch. Pharm. Res. 6(2), 141-142.

Jean-Marc Moncalvo, Francois M. Lutzoni, Stephen A. Rehner, Jacqui Johnson and Rytas Vilgalys. 2000. Phylogenetic Relationships of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA sequences. Syst. Biol. 49(2): 278-305.

Jeong Hyun Chi, Woo Kill Park and Young Ho Kim. 2000. Studies on improvement of cultural practice for *Lyophyllum ulmarium*. The Korean Journal Of Mycology 28(2):88-92.

Ji-Young Park, Won-Jun Oh, Dong-Mi Kwak, Min-Gyeong Kim, Geon-Sik Seo, Seung-Bok Hong and Man Hee Rhee. 2011. The anti-platelet activity of *Hypsizygus marmoreus* extract is involved in the suppression of intracellular calcium mobilization and integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation. Journal of Medicinal plant research 5(11): 2369 - 2377.

K. Yoshino, Y. Kondou, K. Ishiyama, T. Ikekawa, T. Matsuzawa and M. Sano. 2008. Preventive effects of 80% Ethanol extracts of edible mushroom *Hypsizygus marmoreus* on mouse Type IV allergy. Journal of Health Science 54(1):76-80.

Kamruzzaman, S. M., Endale, M., Oh, W. J., Park, S. C., Kim, K. S., Hong, J. H., Kwak, Y. S., Yun, B. S. and Rhee, M. H. 2010. Inhibitory effects of *Bulnesia sarmienti* aqueous extract on agonist-induced platelet activation and thrombus formation

involves mitogen-activated protein kinases. J. Ethnopharmacol. 130(3): 614-620.

Kim Chang Geon, Tae-Wan Kim, Mehari Endale, Tadesse Yayeh, Gon-Sik Seo, Jae Yeul Cho, Hwa-Jin Park, Sang-Keun Kim, In-Kyoung Lee, Bong-Sik Yun and Man Hee Rhee. 2010. Inhibition of nitric oxide production and mRNA expressions of proinflammatory mediators by xylarinic acid A in RAW 264.7 cells. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(22), 2370-2378.

Kim, S. D., Park, S. K., Cho, J. Y., Park, H. J., Lim, J. H., Yun, H. I., Park, S. C., Lee, K. Y., Kim, S. K. and Rhee, M. H. 2006. Surfactin C inhibits platelet aggregation. J Pharm Pharmacol. 58(6): 867-870.

Kimiyoshi Nakamura. 2006. Bottle Cultivation of Culinary-Medicinal Bunashimeji Mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. (Agaricomycetidae) in Nagano Prefecture (Japan). International Journal of Medicinal Mushrooms 8(2):179-186.

Koichiro Mori, Chinatsu Kobayashi, Takako Tomita, Satoshi Inatomi and Masahiko Ikeda. 2008. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii*(Eringi), *Grifola frondosa*(Maitake), and *Hypsizygus marmoreus*(Bunashimeji) in apolipoprotein E - deficient mice. Nutrition Research 28:335-342.

Lee, Y. K., Chang, H. H., Kim, J. S., Kim, J. K. and Lee, K. S. 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. Radiation Physics and Chemistry 57(2): 145-150.

Lillian Barros, Telma Cruz, Paula Baptista, Letícia M. Estevinho and Isabel C.F.R. Ferreira. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. Food and Chemical Toxicology 46:2742 - 2747.

Lin Wang, Xiaohua Hu, Zhiyong Feng, Yingjie Pan. 2009. Development of AFLP markers and phylogenetic analysis in *H. marmoreus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 55:9-17.

M. L. Lomberh, C. Renker, A. S. Buchalo, E. F. Solomko, B. kirchhoff and F. Buscot. 2003. Micromorphological and molecular biological study of culinary-medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*(Peck) Bigel.(Agaricomycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms 5:307-312.

Matsuzawa, T., Saitoh, H., Sano, M., Tomita, I., Ohkawa, M. and Ikekawa, T. 1998. Studies on antioxidant effects of *Hypsizygus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of tumor-bearing mice. Yakugaku Zasshi. 118(10): 476-481.

- Mayumi Nakamura, Aya Iketani and Yuzo Shioi. 2011. A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. *Mycoscience* 52(4):234-241.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A. and Henikoff, S. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123(2):439-342.
- Mizuho Kusuda, Mitsuhiro Ueda, Yasuhito Konishi, Kazuyuki Matsuzawa, Norifumi Shirasaka, Masami Nakazawa, Kazutaka Miyatake and Takao Terashita. 2004. Characterization of extracellular glucoamylase from the ectomycorrhizal mushroom *Lyophyllum shimeji*. *Mycoscience* 45:383-389.
- Mori, K., Kobayashi, C., Tomita, T., Inatomi, S., and Ikeda, M. 2008. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutr. Res.* 28(5):335-342.
- Mukherjee, M. and Sengupta, S. 1986. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mycelium in the mushroom *Volvariella volvacea*. *Applied and Environmental Microbiology* 52(6):1412-1414.
- Ping Wang, Junling Shi, Yi Zhu, Baowei Yang and Shuangkui Du. 2009. Optimal Conditions For The Growth And Polysaccharide Production By *Hypsizygus Marmoreus* In Submerged Culture. *Journal of Food Processing and Preservation* 33:454 - 472.
- S. K. Lam and T. B. Ng. 2001. First Simultaneous Isolation of a Ribosome Inactivating Protein and an Antifungal Protein from a Mushroom (*Lyophyllum shimeji*) Together with Evidence for Synergism of their Antifungal Effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 393(2):271-280.
- Sadatoshi Meguro, Etsuko Ishii and Shinsaku Kawachi. 2001. Cultivation of shiitake in sugi wood meal II: effects of seasoning treatment for wood meal on mycelial growth. *Journal of Wood Science* 48(6):516-520.
- Shiratori, T., Kakimoto, Y., Matsubara, Y., Nakamura, K. and Miyasaka Y. 1989. Studies on establishment of cultivation methods on Bunashimeji. *Bull. Nagano veg.& Ornam. Crops Exp Sta. Japan* 5:85-94.
- T. Matsumoto, Y. Fukumasa-Nakai and M. Komatsu. 1995. Efficient dikaryotization of

- higher basidiomycetes by the protoplast regeneration method. Rep. Tottori Mycol. Inst. 33:29-33.
- T. Saikai, H. Tanaka, N. Sato, S. Abe and A. Matsuura. 2003. Mushroom plant workers experience a shift towards a T helper type 2 dominant state: contribution of innate immunity to spore antigen. Clin Exp Immunol. 135:119-124.
- T. Tabata and T. Ogura. 2003. Absorption of Calcium and Magnesium by the Fruiting Body of the Cultivated Mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow from Sawdust Culture Media. Journal Of Food Science 68(1):76-79.
- Takao Terashita, Yoko Nakaie, Kentaro Yoshikawa and Jiko Shishiyama. 1998. Purification and some properties of an isoform of metal proteinases from *Hypsizygus marmoreus* grown on sawdust culture. Mycoscience 39: 471-474.
- Takao Terashita, Yoko Nakaie, Takaaki Inoue, Kentaro Yoshikawa and Jiko Shishiyama. 1998. Role of metal proteinases in the fruit-body formation of *Hypsizygus marmoreus*. J. Wood Sci. (The Japan Wood Research Society) 44:379-384.
- Tsushima Kenji, Yasuo Masanori, Tanabe Tsuyoshi, Yoshikawa Sumiko, Yamazaki Yoshitaka and Kubo Keishi. 2008. Airway inflammation in employees involved in cultivating Japanese mushrooms (bunashimeji). Respiriology. 13:546-552.
- Watanabe Tomoko, Tsuchihashi Noboru and Suzuki Akira. 1995. Effects of Ozone Exposure on Chemical Components of Bunashimeji Mushroom (*Hypsizygus marmoreus* Bigelow) during Processes of Suppression and Fruit Body Growing. Bulletin of Chiba College of Health Science. 13(2):11-15.
- Wong, J. H., Wang, H. X. and Ng, T. B. 2008. Marmorin, a new ribosome inactivating protein with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81(4):669-74.
- Xiao-Mei Xu, Joon-Young Jun and In-Hak Jeong. 2007. A Study on the Antioxidant Activity of Hae-Songi Mushroom(*Hypsizygus marmoreus*) Hot Water Extracts. 한국식품영양과학회지 36:1351-1357.
- Xu, M. L., Choi, J. Y., Jeong, B. S., Li, G., Lee, K. R., Lee, C. S., Woo, M. H., Lee, E. S., Jahng, Y., Chang, H. W., Lee, S. H. and Son, J. K. 2007. Cytotoxic constituents isolated from the fruit bodies of *Hypsizygus marmoreus*. Arch Pharm Res. 30(1):28-33.

- Yasumi Akamatsu. 1998. Reutilization of culture wastes of *Pleurotus ostreatus* and *Pholiota nameko* for cultivation of *Lyophyllum decastes*. The Japan Wood Research Society 44:417-420.
- Yoshino, K., Nishimura, M., Watanabe, A., Saito, S. and Sano, M. 2008. Preventive effects of edible mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) on mouse type IV allergy: fluctuations of cytokine levels and antioxidant activities in mouse sera. J Food Sci. 73(3):T21-5.
- Yu-Ling Lee, Shao-Yu Jian and Jeng-Leun Mau. 2009. Composition and non-volatile taste components of *Hypsizigus marmoreus*. LWT-Food Science and Technology 42(2):594-598.
- Yu-Ling Lee, Shao-Yu Jian, Pei-Ying Lian and Jeng-Leun Mau. 2008. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. Journal of Food Composition and Analysis 21(2):116-124.
- Zengtao Xing, Yaosong Wang, Zhiyong Feng, Zihui Zhao and Xinghua Liu. 2007. Effect of ⁶⁰Co-irradiation on Postharvest Quality and Selected Enzyme Activities of *Hypsizygyus marmoreus* Fruit Bodies. J. Agric. Food Chem. 55(20):8126-8132.
- Zolan, M. E., Tremel, C. J. and Pukkila, P. J. 1988. Production and characterization of radiation-sensitive meiotic mutants of *Coprinus cinereus*. Genetics 120(2): 379 - 387.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.