

119077-02

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

농축산물안전유통소비기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003667-01

기능성 강화 흰개미버섯(흑계종)의
인공재배 및 신제품 개발

기능성 강화 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신제품 개발

2021. 09. 10.

주관연구기관 / 농업회사(주)힘찬
협동연구기관 / 부산대학교
부경대학교

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 강화 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신제품 개발 ” (개발기간 : 2019. 6. ~ 2021. 6.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 09. 10.

주관연구기관명 : 농업회사법인(주)힘찬 (대표자) 신종무 (인)



협동연구기관명 : 부산대학교산학협력단 (대표자) 최경민 (인)



협동연구기관명 : 부경대학교산학협력단 (대표자) 오정환 (인)



주관연구책임자 : 신평균

연 구 원 : 남윤걸, 강원율, 신종무

협동연구책임자 : 김근기

연 구 원 : 김문호, 이재은, 황현정

협동연구책임자 : 김군도

연 구 원 : 강민재, 황덕현, 김홍택,

박정은, 이상현, Dilinaer Ainiwaer

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급					
							일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]					
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명							
전문기관명	농림식품기술기획평가원				내역사업명							
공고번호				총괄연구개발 식별번호								
				연구개발과제번호	119077-02							
기술분류	국가과학기술 표준분류	LBY01	40%	LB0202	30%	LB0203	30%					
	농림식품과학기술분류	AAc6	40%	AA0301	30%	c601999	30%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문											
	영문											
연구개발과제명	국문	기능성강화 흰개미버섯(혹계종)의 인공재배 및 신제품 개발										
	영문	Development of artificial cultivation and breeding for functionally enhanced <i>Termitomyces albuminosus</i>										
주관연구개발기관	기관명	농업회사법인(주)힘찬		사업자등록번호	303-81-77654							
	주소 (우)			법인등록번호								
연구책임자	성명	신평균		직위	이사							
	연락처	직장전화	043-750-7121		휴대전화	010-5243-1829						
		전자우편	shinsun@naver.com		국가연구자번호	1049 6808						
연구개발기간	전체	2019. 06. 20 - 2021. 06. 19 (2년 개월)										
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2019. 06. 20 - 2021. 06. 19 (2년 개월)									
		n단계										
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금			
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금		현물	합계	
	총계	360,000	360,000					720,000		720,000		
	1단계	1년차	180,000	180,000						360,000	360,000	
		2년차	180,000	180,000						360,000	360,000	
n단계	1년차											
	n년차											
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고						
						역할	기관유형					
	공동연구개발기관	부산대학교 산학협력단	김근기	교수	010-987 5-5483	kkkim@pkn u.ac.kr	공동	대학				
	부경대학교 산학협력단	김군도	교수	010-281 9-2560	gundokim@pknu.ac.kr	공동	대학					
연구개발담당자 실무담당자	성명	강원율		직위	부장							
	연락처	직장전화	043-750-7121		휴대전화	010-5458-2599						
		전자우편	popoplo@naver.com		국가연구자번호							

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021년 9월 10일

연구책임자: 신평균

주관연구개발기관의 장: 농업회사법인(주)힘찬

공동연구개발기관의 장: 부산대학교 산학협력단

위탁연구개발기관의 장: 부경대학교 산학협력단

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약서 >

사업명				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호			
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0201	40%	LB0202	30%	LB0203	30%
	농림식품 과학기술분류	AAc6	40%	AA0301	30%	c601999	30%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		기능성강화 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신품종 개발					
전체 연구개발기간		2019. 06. 20 - 2021. 06. 19 (2년 개월)					
총 연구개발비		총 720,000천원 (정부지원연구개발비:360,000천원, 기관부담연구개발비 :360,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		○ 기능성 강화 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신품종 개발 - 흰개미버섯(흑계종)의 국산화 및 자동화시설 재배화 - 기능성 강화 흰개미버섯(흑계종) 개발				
	전체 내용		1. 국내외 유전자원의 탐색과 특성 평가 1) 흰개미버섯(흑계종)의 유전자원 수집 2) 수집 유전자원의 특성평가 2. 흰개미버섯(흑계종)의 인공 재배기술 개발 1) 흰개미버섯(흑계종)의 상자재배 기술 개발 2) 흰개미버섯(흑계종)의 병재배 기술 개발 3. 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성 물질의 분석 1) 흰개미버섯의 추출 및 분획 2) 흰개미버섯 내 기능성 단일 물질의 분석 4. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 효능 평가 1) 흰개미버섯 추출 및 분획물의 항염증 효능 평가 2) 흰개미버섯 내 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 억제 효과 3) 흰개미버섯 유래 코엔자임Q9의 기도 폐쇄에 대한 보호 효과 5. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성강화 신품종 개발 1) 흑계종의 교잡주 선발 2) 교배체의 인공재배 3) 기능성강화 신품종 개발 4) 돌연변이 처리에 의한 Termitomyces sp. JCM 종의 품종 개발				
	1단계 (해당 시 작성)	목표	제3장 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 참조				
		내용					
	n단계 (해당 시 작성)	목표					
	내용						

연구개발성과	① 인공재배되는 중국에서 수집한 흰개미버섯(흑계종 : <i>Termitomyces albuminosus</i>)의 분자유전학적 분석에 의해 흑피계종(<i>Oudemansiella raphanipes</i>)로 확인하고 우리나라에서 자생하는 3균주를 채집함 ② 흑계종을 액체배양 및 복토를 통한 병재배 방법으로 자실체 형성에 성공하여 대량생산 가능성을 입증 ③ 흰개미버섯 추출 및 분획물의 항염증 효과 ④ 흰개미버섯(흑계종) 내 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 억제 효과 ⑤ 흰개미버섯(흑계종) 유래 코엔자임Q9의 기도 폐쇄에 대한 보호 효과 ⑥ 흰개미버섯(흑계종)의 교잡하여 교배체를 선발하여 균사생장이 모본보다 빠른 신품종 선발 ⑦ <i>Termitomyces</i> sp. JCM 균주에 γ -선 조사에 의해 균사생장 속도를 증진시켜 균사체를 이용한 아미노산이 풍부한 균주 개발												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	○ 인공재배가 불가능한 다른 공생균의 인공재배 기술 적용 ○ 흑계종의 대량생산 판매로 소비자의 다양한 먹거리 제공												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
	Y	Y						생명 정보	생물 자원		정보	실물	
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	흰개미버섯 (흑계종)		인공재배		신품종		기능성		흑피계종				
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Termitomyces albuminosus</i>		Artificial cultivation		New cultiva		Functionality		<i>Oudemansiella raphanipes</i>				

요 약 문

I 제목

기능성 강화 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신품종 개발

II 연구개발의 목적 및 필요성

1) 연구개발의 목적

중국에서 흰개미버섯(흑계종)을 지면재배 방법으로 대량생산하여 판매하고 있어 조만간에 한국을 공략할 거라 보고 있으며, 이에 대비하여 인공재배 방법을 연구하고 신품종을 개발하고자 한다.

2) 연구개발의 필요성

흰개미버섯은 지구상에서 동물이 키운 최초의 버섯으로 흰개미들이 흰개미집에서 키워 영양분을 섭취하는 버섯으로서 그 맛과 영양이 탁월하여 중국에서는 최고의 버섯으로 평가하고 있다. 흰개미집없이 흰개미버섯이 지면재배로 인공재배에 성공하여 ‘삼팔고’ 나 ‘흑계종’이라는 상표로 판매하고 있다. 지면재배된 흑계종의 문제점으로는 요리하였을 때 재배시 모래가 함유되어 지글거리는 맛이 나며, 지면재배 대량생산 시 오염되었을 때는 대면적이 오염되어 지속가능한 공급이 어렵다. 이러한 배양된 배지가 허가없이 중국에서 수입되고 있어, 상기 문제점의 대책으로는 병재배 방법으로 모래가 지글거리는 맛을 해소하며, 세포질전환 육종이나 원형질체 융합을 통한 새균주의 육성으로 중국으로부터 종균수입을 억제할 수 있으며, 생리활성물질 분석을 통해 흑계종이 가지고 있는 기능성을 강화한 우리균주로 만들어 역수출을 하고자 한다.

중국은 지면재배로 인한 대면적 재배시 오염(감염)이나 자연재해의 피해를 보고 있어 봉지재배로의 전환을 위해 대단위 생산공장을 설립하고 있으나 우리는 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 배양기간 단축을 위한 액체배양 공정과 발이를 위한 복토과정을 생략할 수 있는 재배법이 개발되어야 병재배 자동화시스템에 도입이 가능하다. 기존에 새송이나 팽이버섯의 병재배 자동화시스템을 도입하면 흑계종의 문제점을 해결되리라 본다.

흑계종의 성분 분석을 통한 막연하게 추출물로 기능성을 평가하기 보다 기능성 물질을 분리 정제 및 구조분석하여 어떤 물질이 생리활성을 나타내는지 평가가 필요하며 어떤 물질이 기능성을 나타내는지 밝히고자 한다.

야생에 나는 버섯의 특징은 기존에 재배가 확립되지 않은 균의 노화나 쇠퇴 등으로 인해 재배가 어려워 길들이지 않으면 활용하기가 어렵다. 야생 균주는 교잡이나 원형질체 융합으로 지속적으로 대량생산이 가능한 균주로 성능을 부여하여야 하여 상용적으로 재배가 가능한 균주로 만들어야 한다.

따라서 자연에서 분리한 균주에 기능성을 가진 기존의 대량생산 시스템에 적용할 수 있는 균주를 육성하기 위해서는 상기의 문제점을 보완하고, 균주의 다양성-재배시스템-육종시스템이 삼위일체가 되어 하나같이 움직여야 가능하리라 본다.

III 연구개발 내용 및 범위

흰개미버섯(흑계종)은 그 맛과 영양이 탁월하여 중국에서는 최고의 버섯으로 평가하고 있어 흰개미집없이 흰개미버섯의 지면재배로 인공재배에 성공하여 대량생산하고 있으며 조만간에 우리나라에도 물량공세를 할거라 보고 이에 대한 대비책으로 인공재배와 신품종 개발이 필요하다. 또한 기존에 추출물의 효능평가를 좀 더 분획하여 생리활성 물질의 기능성을 밝히기 위해 분획물의 효능 평가가 요구되었다. 본과제에서는 일단 자실체가 필요로 하기 때문에 1절에서는 국내의 유전자원을 수집하고 이에 대해 형태학적 특성과 분자 유전학적 특성을 평가하고 PCR을 이용한 유전분석이나 유전체 분석을 하였고, 2절에서는 자실체를 인공적으로 대량생산하기 위한 연구가 수행되었고, 3절에서는 수집균주의 추출물을 분획하여 생리활성 효과를 검증하였으며 아미노산 함량도 분석하였고, 4절에서는 분획된 물질에 대한 항산화, 항염증 효능을 평가하였고, 5절에서는 수집한 균주에 대한 교배나 돌연변이를 처리하여 균주를 육성하였다. 또한 이러한 신품종에 대한 대량생산과 기능성을 부여하고자 한다. 본 연구를 수행하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 국내의 유전자원의 탐색과 특성 평가

1) 흰개미버섯(흑계종)의 유전자원 수집

흰개미버섯(흑계종)의 유전자원 수집은 중국에서 북경과 하북성 일대에서 인공재배되는 *Termitomyces albuminosus* 2균주를 수집하였고, 일본 RIKEN BRC에서 JCM (Japan Collection of Microorganisms) 균주 *Termitomyces* sp. 17점을 분양받았으며, 우리나라에서는 인천 및 김천에서 *Oudemansiella radicata* 3점을 채집하였다.

2) 수집 유전자원의 특성평가

중국에서 인공재배되어 대량생산되고 있는 *Termitomyces albuminosus* 2균주에 대한 클램프, 포자 지문, 갓의 주름, 갓의 모양, 대 등의 형태학적 특성을 관찰하였고, STR 및 ITS 분석을 통해 흑계종 (*Termitomyces albuminosus*)이 아니라 흑피계종 (*Oudemansiella raphanipes*)으로 확인되었고, 두 균의 유사도를 분석하기 위해 유전체 분석을 한 결과 같은 종의 다른계통으로 유추할 수 있었다. 일본에서 분양받은 *Termitomyces* sp. 17균주에 대한 ITS 분석한 결과 *Termitomyces microcarpus*의 유사종임을 확인하였다. 우리나라에서 채집한 균주를 ITS 분석한 결과 *Oudemansiella raphanipes*로 확인되었다.

2. 흰개미버섯(흑계종)의 인공 재배기술 개발

1) 흰개미버섯(흑계종)의 상자재배 기술 개발

중국에서 인공재배되는 흑계종 (*Termitomyces albuminosus*)이라는 균주중 하나를 인공재배를 하기 전에 전통적인 방식으로 시험관 및 삼각플라스크에서 자실체가 형성되는 것을 실험하였고, 소농가가 재배하기 쉬운 방법인 상자재배를 시도하였다. 방법으로는 병재배 대량생산을 목표로 하기 때문에 배지는 새송이버섯을 그대로 사용하여 상자재배를 한 결과 자실체가 형성되었으나 일시 수확이 안되고 장기간동안 수확되었고, 재배기간도 복토를 한 방법으로 인한 장시간 소요되었다. 상자재배방법으로는 중국의 지면재배방법과 마찬가지로 재배는 성공할 수 있으나 오염문제가 대두되는 등 경제성이 없다고 판단하였다.

2) 흰개미버섯(흑계종)의 병재배 기술 개발

흑계종의 병재배를 위해서는 중국의 지면재배 방법에서 고체 군사배양을 액체배양을 통한 배양기간 단축과 생육시 복토재배를 무복토 재배가 되어야만 병재배자동화시스템을 활용하여 병재배 대량생산시스템을 확립할 수 있다. 따라서 1차적으로 군사 배양시 액체배양을 하고 생

육시에는 복토재배를 하였다. 그 결과 자실체가 형성되었으나 수확기간이 길고 수량이 일정치 않아 복토 종류별로 처리하여 재배한 결과 황토와 논모래 재배시 자실체 가장 많이 형성되었다. 여기서 가장 중요한 점은 복토한 후 복토와 배지사이에 갈색선을 형성하였을 때 복토를 제거한 후 발이수를 보면 10~30개의 발이수가 보이고 있어 여기부터 환경을 재설정하여 재배하면 다발성 자실체 재배가 가능하리라 본다.

3. 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성 물질의 분석

1) 흰개미버섯의 추출 및 분획

중국에서 입수한 흰개미버섯과 (주)힘찬에서 공급받은 흰개미버섯은 클로로폼과 메탄올을 이용하여 추출을 하였고, 다양한 용매의 용해도에 의해 분획을 실시하였다. 용해도에 의해 분획한 물질은 항산화능 및 항염증 검정을 통하여 유효한 분획물을 선별하였으며, 선별된 분획물을 다시 TLC법과 column chromatography법을 통하여 다시 분획하였다. 분획된 물질은 항염증 검증을 통하여 생리활성을 분석하였다

2) 흰개미버섯 내 기능성 단일 물질의 분석

흰개미버섯 내부의 기능성 물질인 겐티스산이 흰개미버섯에 존재하는 것을 확인하였으며, 이의 기능성 검증을 위하여 비만 유래 만성 염증에 대한 효능을 확인하였다. 또한 흰개미버섯 추출물에서의 분획 및 구조분석을 통하여 코엔자임Q9을 분리하였으며, 이의 기능성 검증을 위하여 기도 폐쇄에 대한 보호 효과를 확인하였다.

4. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 효능 평가

1) 흰개미버섯 추출 및 분획물의 항염증 효능 평가

흰개미버섯의 추출물 중 가장 항염증 활성이 높았던 EtOAc 분획물(TA1)을 분획하여 획득한 분획물의 항염증 활성을 검증하였다. TA1의 2nd TLC 분획물인 C7-(2)-5 분획물 7종의 항염증 활성을 검증하였을 때, C7-(2)-5-5, C7-(2)-5-6, C7-(2)-5-7 분획물에서 뚜렷한 NO 생성 억제능을 확인할 수 있었으며, 특히 C7-(2)-5-6 분획물이 가장 높은 NO 생성 억제능을 나타내었다. 또한 TA1 유래 C12 분획물 9종의 항염증 효능을 확인하였을 때, C12-1 ~ C12-5의 분획물들이 높은 항염증 활성이 나타났으며, 세포 독성을 고려했을 시 C12-5가 안전하며 높은 항염증 활성을 지니는 것을 확인하였다. 또한 TA1-5-7-5 분획물 6종의 항염증 활성을 확인하였을 시, 전체적으로 높은 항염증 활성을 나타내었다. 특히, TA1575-4의 경우 10 μ g/mL의 낮은 농도에서도 높은 항염증 활성을 가지는 것을 확인하였다. 따라서 흰개미버섯이 높은 항염증 기능성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

2) 흰개미버섯 내 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 억제 효과

흰개미버섯에 존재하는 단일물질인 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 효과를 확인하였다. 먼저 겐티스산의 항염증 효능을 확인하을 때, 염증 유발 효소들과 효소들이 생성하는 염증 매개 물질 및 주요 염증성 사이토카인들의 발현량 역시 억제시키는 것을 확인하였다. 또한 염증반응에 관여하는 전사인자와 상위 인자들의 활성을 억제하였다. 이 결과들에 따라 겐티스산이 염증 반응을 억제하는 것을 확인하였다. 다음으로, 겐티스산의 항비만 효과를 확인하였을 때, 지질과 중성지방의 축적이 억제되었고 분화 과정의 주요 전사인자들의 발현 상위 조절 인자들의 활성이 억제되고, 지질 합성에 관여하는 인자들의 발현이 겐티스산 처리에 따라 감소하였다. 따라서 겐티스산이 지방세포 분화 과정을 억제하는 것을 확인하였다. 마지막으로 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 효능을 확인하였을 때, 대식세포와 지방세포의 상호작용에 의해 생성되어 비만 유래 염증 반응에 주요하게 관여하는 인자들의 발현을 억제하였다. 또한 항염증 인자들의 발현은 증가시키고, 염증성 인자들의 발현은 감소시켰다. 추가적으로 대식세

포의 염증성 상태로의 변환을 억제하였다. 따라서 젠티스산이 비만 유래 만성 염증에 대한 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

3) 흰개미버섯 유래 코엔자임Q9의 기도 폐쇄에 대한 보호 효과

코엔자임Q9의 기도 폐쇄에 대한 보호 효과를 알아보기 위하여, 피오사이아닌에 의해 유도되는 인간 기관지 표피 세포에서의 점액 과생산에 대한 효과를 확인하였다. 코엔자임Q9은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며, 피오사이아닌에 의해 생성된 세포 내 활성산소를 감소시키는 항산화능을 확인하였다. 점액의 구성 성분인 두 종류의 뮤신인 MUC5AC와 MUC5B는 코엔자임Q9 처리에 따라 RNA와 단백질 발현량이 감소하였으며, 반대로 뮤신 생성의 억제자인 FOXA2의 경우 발현이 증가하였다. 또한 뮤신 생산에 관여하는 EGFR 신호전달 체계의 구성 단백질인 EGFR, Akt, ERK의 인산화를 억제하였다. 따라서 코엔자임Q9이 피오사이아닌에 의해 유도되는 기도 폐쇄를 억제하는 것을 확인하였다.

5. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성강화 신품종 개발

1) 흑계종의 교잡주 선발

흑계종 (*T. albuminosus*)의 두 균주 [MKCC04978(수고) 및 Hago(하고)]간에 대치배양을 통해 대선형성 여부를 관찰하여 대치선은 형성하지 않으나 성장속도와 자라는 형태가 차이나서 유전체 분석을 의뢰한 결과 같은 종의 지리적으로 다른 계통임을 판단하여 단포자를 받아 교배를 실행하였다. 그 결과 23점의 교배체를 선발하였다. 23점의 교배체와 대치배양을 수행하여 대치선을 뚜렷하게 형성하는 교배체 10균주를 유전체 분석을 의뢰하였다. 또한 유전적 검정을 통해 유전적 패턴이 차이나는 교배체를 최종적으로 선발하였다.

2) 교배체의 인공재배

인공재배를 위해서는 최대한 생장이 빠른 균주를 선발하기 위해 군사생장율을 조사하여 23균주 중에서 10균주를 선발하였고, 모본과 형태학적 변화 양상을 보이면서 성장속도가 빠른 균주를 선발하였으며 그 중에서 삼가플라스크 재배를 위해 집중한 결과 모본보다 생장이 빠른 균주가 관찰되어 이것을 위주로 인공재배 중이다.

3) 기능성강화 신품종 개발

협동과제에서 분석한 항산화, 항염증 효과와 아미노산 함량 분석을 이용하여 교배체에 적용하여 기능이 높게 나오는 균주를 선발하고자 한다.

4) 돌연변이 처리에 의한 *Termitomyces* sp. JCM 종의 품종 개발

일본에서 분양받은 *Termitomyces* sp. JCM 종은 ITS 분석을 통해 분석하여 *Termitomyces microcarpus* 종과 유사성이 높게 나오는데 군사생장이 상당히 느리게 자라 γ -선 (^{60}Co)을 500효를 조사하여 2차 군사 생장을 보이는 균주를 배양함으로서 모본보다 2배로 빠른 성장을 보여 이 돌연변이 균주를 이용하여 아미노산 함량을 조사하고자 한다. 기존 보고에 의하면 *Termitomyces microcarpus* 균주가 버섯 중에서 아미노산 함량이 가장 높게 나타내어 인공재배 보다는 군사배양에 의한 아미노산 함량이 높게 생산된다면 이것을 산업으로 이용 가능하리라 사료된다.

IV 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 국내의 수집 유전자원의 평가

본 연구에서 수집한 인공재배되는 중국 균주의 분자유전학적 진단으로 *Termitomyces albuminosus* (흑계종)로 알려져 있던 균주가 *Oudemansiella raphanipes* (흑피계종)임을 확인되어 우리나라에서 자생하는 흑피계종을 인천 및 김천에서 채집되어 육종을 위한 모본으로 활용하고자 한다.

2. 흰개미버섯(흑계종)의 병재배 기술 개발

본 연구에서 새송이 및 팽이버섯과 같이 병재배 자동화시스템에 도입할 수 있도록 흑계종을 액체배양을 통한 자실체 형성에 성공하여 대량생산 가능성을 입증하였다. 따라서 본 연구결과에 대한 활용방안은 다음과 같다.

가. 개발된 버섯재배기술의 소개

- 1) 버섯재배에 관련된 리플렛 발간, homepage 소개 및 버섯전문신문 등에 개발된 재배법 소개 및 수록

나. 개발된 재배기술의 보급

- 1) 버섯종균 생산회사 및 재배농가에 재배기술을 보급하여 새로운 버섯의 재배로 인한 새로운 소득의 창출
- 2) 자실체가 기능성 식·약품으로 개발되어 대량소비될 경우 이미 검증된 생산시스템으로 대량 공급이 가능

3. 흰개미버섯(흑계종) 유래 기능성 물질의 이용

- 1) 최근 우리나라에서는 기능성 물질을 이용한 대체 의약품이거나 건강기능식품으로 개발되고 있다. 본 연구를 통해 항산화 및 항염증에 효과를 나타내는 물질을 분석하고 효능을 평가함으로써 흑계종을 이용한 생활습관병 예방에 효과가 있을거라 판단하여 이들 버섯 자실체에서 추출 분획한 성분을 항산화 및 항염증에 대한 효능을 평가하여 대체 의약품으로 개발할 수 있을 것이라고 사료된다.
- 2) 현재 흰개미버섯(흑계종) 내 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 억제 효과 및 흰개미버섯(흑계종) 유래 코엔자임Q9의 기도 폐쇄에 대한 보호 효과 등을 이용한 의약품 개발이 가능하리라고 사료된다.

4. 버섯의 자실체와 균사체를 이용한 기능성 식품의 개발

아미노산이 풍부한 *Termitomyces* sp. JCM 균주에 γ -선 조사에 의해 균사성장 속도를 증진시켜 균사체를 이용한 기능성 버섯곡물을 제조 및 생산하여 판매하는 업체에 보급하여 새로운 소득원의 창출을 지원할 수 있다.

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

제 2 절 연구개발의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

제 2 절 국내 기술개발 현황

제 3 장 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

제 4 장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

제 1 절 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신품종 개발

제 2 절 계종버섯의 유전자원 탐색 평가 및 신품종 개발

제 3 절 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성 물질의 분석

제 4 절 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 효능 평가

제 5 절 흑피계종(긴꼬리버섯) 자생균주의 탐색과 신품종 개발

제 6 절 연구개발과제의 목표 달성 정도

4. 목표 미달 시 원인분석

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 목적

중국에서 흰개미버섯(흑계종)을 지면재배 방법으로 대량생산하여 판매하고 있어 조만간에 한국을 공략할 거라 보고 있으며, 이에 대비하여 인공재배 방법을 연구하고 신품종을 개발하고자 한다.

2. 흰개미버섯의 현황 및 대책

가. ‘흰개미버섯’은 지구상에서 동물이 키운 최초의 버섯으로 흰개미들이 흰개미집에서 키워 영양분을 섭취하는 버섯으로서 그 맛과 영양이 탁월하여 중국에서는 최고의 버섯으로 평가나. 흰개미집없이 흰개미버섯이 지면재배로 인공재배에 성공하여 ‘삼팔고’나 ‘흑계종’이라는 상표로 판매하고 있다.(이하 흑계종이라 한다)

1)

다. 지면재배된 흑계종의 문제점으로는

1) 요리하였을 때 재배시 모래가 함유되어 지글거리는 맛이 난다.

2) 지면재배 대량생산 시 오염되었을 때는 대면적이 오염되어 지속가능한 공급이 어렵다.

다. 중국에서 배양된 배지가 허가없이 수입되고 있음

라. 상기 문제점의 대책으로는

1) 병재배 방법으로 모래가 지글거리는 맛을 해소한다.

2) 세포질전환 육종이나 원형질체 융합을 통한 새균주의 육성으로 중국으로부터 종균수입을 억제할 수 있음

3) 생리활성물질 분석을 통해 흑계종이 가지고 있는 기능성을 강화한 우리균주로 만들어 역수출하고자 함

마. 중국은 지면재배로 인한 대면적 재배시 오염(감염)이나 자연재해의 피해를 보고 있어 봉지재배로의 전환을 위해 대단위 생산공장을 설립하고 있음

바. 우리는 기존에 새송이이나 팽이버섯의 병재배 자동화시스템을 도입하면 흑계종의 문제점을 해결되리라 본다.

사. 단, 배양기간 단축을 위한 액체배양 공정과 발이를 위한 복토과정을 생략할 수 있는 재배법이 개발되어야 한다.

아. 흑계종의 성분 분석을 통한 막연하게 추출물로 기능성을 평가하기 보다 기능성 물질을 분리 정제 및 구조분석하여 어떤 물질이 생리활성을 나타내는지 평가가 필요함

자. 기존에 재배가 확립되지 않은 균의 노화나 쇠퇴 등으로 재배가 어려운 균주는 교잡이나 원형질체 융합으로 지속적으로 대량생산이 가능한 균주로 성능을 부여하여야 함

차. 따라서 자연에서 분리한 균주에 기능성을 가진 기존의 대량생산 시스템에 적용할 수 있는 균주를 육성하기 위해서는 상기의 문제점을 보완하고, 균주의 다양성-재배시스템-육종시스템이 삼위일체가 되어 하나같이 움직여야 가능하리라 본다.

제 2 절 연구개발의 범위

1. 1차년도 (2019)

가. 국내의 유전자원의 수집 및 특성평가

- 1) 국내의 흰개미버섯(흑계종)의 탐색
- 2) 수집균주의 특성평가
 - 가) 수집균주의 형태학적 특성
 - 나) 수집균주의 분자 유전학적 특성

나. 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 기술 개발

- 1) 선발균주의 최적 배양특성 규명
- 2) 선발균주의 배지혼합 비율별 특성 규명
- 3) 선발균주의 자실체 발생 조건 규명

다. 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성 물질의 분석

- 1) 수집균주로부터 물질 추출
- 2) 수집균주 추출물의 분획화와 생리활성 검증

라. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 효능 평가

- 1) 수집균주 추출물 및 각 fraction별 항산화/항염 활성 분석
- 2) 기능성 함유 fraction의 세분화에 따른 활성 분석

2. 2차년도 (2020)

가. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 강화 신제품 개발

- 1) 교잡을 위한 모본 선발 및 특성 검정
- 2) 교잡주의 자실체 특성 및 검정
- 3) 선발된 신제품의 기능성 강화 분석

나. 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 기술 개발

- 1) 선발균주의 액체배양 최적화 조건 규명
- 2) 교잡주의 자실체 발생 조건 규명

다. 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성 물질의 분석

- 1) 수집균주로부터 아미노산 분석
- 2) 수집균주 추출물의 분획화와 생리활성 검증

라. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 효능 평가

- 1) 수집균주 추출물 및 각 fraction별 항산화/항염 활성 분석
- 2) 추출물 및 분리 정제된 기능성 물질의 활성 분석과 유효 작용인자 규명
- 3) 분리 정제된 기능성 물질의 기전 보완 연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

1. 중국의 흑계종 생산 현황

가. 야생 계종버섯이 중국 운남성의 한 지역에서 지역 농부들이 인공재배를 시작함

나. 중국 후베이성에서 농촌의 빈곤퇴치사업으로 5,000만 CYN (약 85억원) 이상이 투자되어 2006년에 인공재배가 성공하여 연간 계종버섯 배지의 생산량은 1,400만 봉지에 이른다 함



다. 천진시 만강회사는 계종버섯을 매년 수확하여 북경, 천진 및 기타 도시에 도매가로 kg당 약 12 CYN (약 2,000원) 판매하고 있음



라. 산둥성에서는 2017년에 계종버섯 배지 16,000개를 120,000 CYN(약 2천만원)에 한국으로 수출하였음

제 2 절 국내 기술개발 현황

1. ㈜ 티애파트너스

가. 인공재배가 매우 까다로운 흑계종을 중국과 합작하여 국내 최초로 흰개미없이 인공재배에 성공



<포천재배사의 재배전경>

나. 인공재배기술을 특허 출원하였고, 1년간의 독성안전성검사를 거쳐 식약처의 한시적 식품원료로 등록 인정 받음

1) 흰개미 버섯 재배용 배지 제조방법(10-162927, 2016)

다. 흑계종 및 가공식품을 ‘천수고’ 란 브랜드로 국내 유통시킬 계획이며, 재래김, 감자반세트 등을 판매 예정

1) 천수고에서 나온 신물질(Termitomycesphins A~H)을 활용하여 기능성 식품원료 개발 계획

2) 농가수익창출을 위해 소규모의 재배농가에 100% 수매조건부로 재배 기술이전 및 배지를 공급할 계획



<상표 ‘천수고’ 와 계종버섯 김>

3) 생산된 계종버섯은 백화점에서 판매 행사



<생산된 계종버섯 및 백화점 판매대 전시 판매>

제 3 장 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

구분 (년도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1 차년도 (2019)	가. 국내외 유전자원 수집 및 특성평가	1) 국내외 흰개미버섯(흑계종)의 탐색	- 중국 북경 및 하북성 일대에서 흑계종의 수집 : 2 균주 - 일본 RIKEN BRC로부터 계종버섯 20균주 수집하여 17균주 분리
		2) 수집균주의 특성평가 가) 수집균주의 형태학적 특성 나) 수집균주의 분자 유전학적 특성	- 흑계종 2균주의 형태학적 특성 실험 - STR 및 ITS 영역의 유전분석 ① 계종버섯 17균주
	나. 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 기술 개발	1) 선발균주의 최적 배양특성 규명	- 흑계종의 인공재배 기술확립 지향성 ① 중국 : 지면재배 및 봉지재배 ② 한국 : 상자재배 및 병재배
		2) 선발균주의 배지혼합 비율별 특성 규명	- 흑계종의 인공재배과정의 차이점 ① 접종원 배지 (고체/액체) ② 종균배지 (자체 혼합물/ 혼합사료 제품) ③ 종균배양기간 단축
		3) 선발균주의 자실체 발생 조건 규명	- 흑계종의 인공재배과정의 액체 배양 및 복토 조건 - 흑계종의 인공재배 과정의 발이과정
	다. 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성물질의 특성 분석	1) 수집균주로부터 물질 추출	- 흰개미버섯(흑계종)에서의 물질 추출
		2) 수집균주 추출물의 분획화와 생리활성 검증	- 추출물의 TLC에 의한 분획
	라. 흰개미버섯(흑계종)의 효능 평가	1) 수집균주 추출물 및 각 fraction별 항산화/항염 활성 분석	- TA1의 2 nd TLC 분획물의 세포 독성 실험 - TA1의 2 nd TLC 분획물의 항염증 활성 실험
		2) 기능성 함유 fraction의 세분화에 따른 활성 분석	- TA1 유래 C12 분획물 9종의 세포 독성 실험 - TA1 유래 C12 분획물 9종의 항염증 실험
	2 차년도 (2020)	가. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 강화 신제품 개발	1) 교잡을 위한 모본 선발 및 특성 검정
2) 교잡주의 자실체 특성 및 검정			- 선발된 교잡주의 자실체 생산
3) 선발된 신제품의 기능성 강화 분석			- 선발된 신제품의 기능성 강화 분석
나. 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 기술 개발		1) 선발균주의 액체배양 최적화 조건 규명	- 병재배 자동화를 위한 액체배양 방법 기술 확립
		2) 교잡주의 자실체 발생 조건 규명	- 국내 자생하는 흑계종의 채집 및 분리
다. 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성물질의 특성 분석		1) 수집균주로부터 아미노산 분석	- 수집균주로부터 구성 및 유리 아미노산 분석
		2) 수집균주 추출물의 분획화와 생리활성 검증	- TA1의 1 st column 분획물의 항산화 활성
라. 흰개미버섯(흑계종)의 효능 평가		1) 수집균주 추출물 및 각 fraction별 항산화/항염 활성 분석	- TA1유래 TA1-5-7-5 분획물 6종의 세포 독성 실험 - TA1유래 TA1-5-7-5 분획물 6종의 항염증 실험
	2) 추출물 및 분리 정제된 기능성 물질의 활성 분석과 유효작용인자 규명	- 분리 정제된 기능성 물질의 유효작용인자의 구조 분석	
	3) 분리 정제된 기능성 물질의 기전 보완 연구	- 분리 정제된 기능성 물질의 항비만 효과 실험	

제 4 장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

제 1 절 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신제품 개발

1. 흰개미버섯(흑계종)의 유전자원 수집 및 특성 평가

가. 국내의 유전자원 수집

1) 흰개미(계종)버섯의 분류학적 위치

흰개미버섯은 매우 보기드문 희귀한 버섯으로서 반드시 흰개미집과 같이 공생(obligate symbiosis)해야 하기 때문에 ‘흰개미버섯’이라고 불린다. 흰개미집은 땅속에 묻혀져 있으며 우기때 잠시 빗물이 흰개미집 주위의 토양에 침투해야만 흰개미버섯의 균사체가 밖으로 나와 버섯형태로 성장할 수 있다고 한다(Fig. 1-1). 이러한 흰개미버섯을 중국에서는 계종(鸡枞)버섯이라 불리며 중국 황실 진상품으로 유명하다. 또한 인체에 필요한 필수아미노산을 함유하고 있을 뿐만아니라 영양가치가 뛰어나 명/청 황제들이 즐겨 먹었다고 기록되어 있으며 지금도 중국 최고의 특급호텔에서만 제한적으로 맛볼 수 있는 식재료라고 할 수 있다. 우리나라에서는 볼 수 없는 희귀한 버섯인 계종버섯은 버섯 자체의 깊은 향과 씹히는 아삭함이 있어 한번 맛보면 잊을 수 없는 독특한 풍미를 가진 버섯입니다.

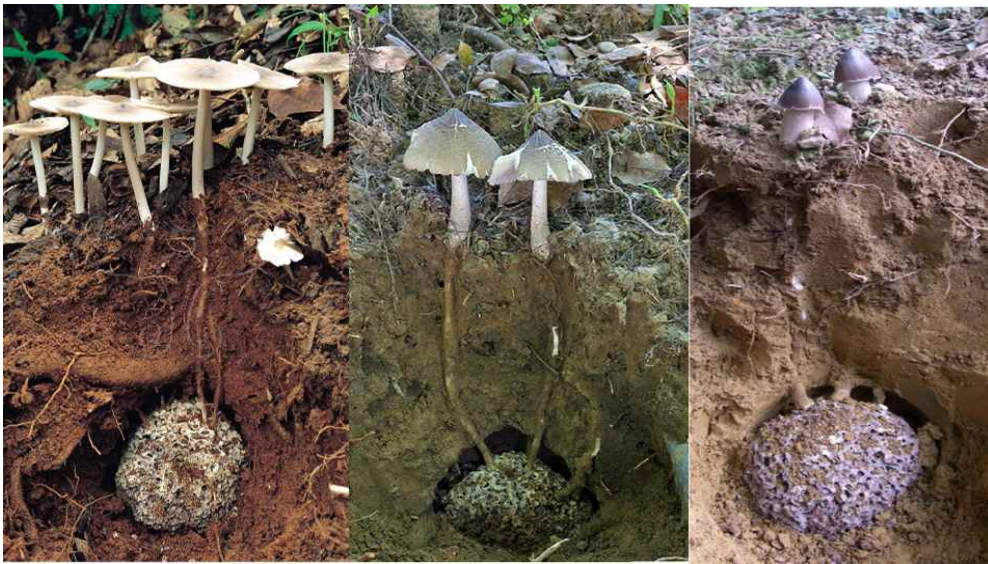


Fig. 1-1. 자연상태에서의 흰개미와 흰개미버섯의 공생관계. 「인터넷 사진」.

중국의 계종버섯이 지역에 따라 다양하게 부르고 있는 데 그것을 살펴보면 광둥에서는 계종(초산 : 계육고), 복건에서는 계각고, 사천에서는 투계고, 계육고, 산파고(의빈 : 삼탐균), 귀주에서는 삼팔고, 삼단고, 삼포고, 대만에서는 계육사고, 일본에서는 백의고, 기타 지역에서는 계종화, 여지균, 육월균, 탁균, 백의균, 계유균, 그리고 명시대에는 계균, 계사, 계종 등으로 불려졌다. 특히 귀주에서 ‘삼팔고’라 부르는 것은 명/청시대에 황실에 진상한 계종버섯임을 유추할 수 있으리라 본다(Fig. 1-2).

계종버섯의 유래는 중국 명나라 반지항(潘之恒)이 편찬한 버섯에 관한 책『반지항광균보(潘之恒廣菌譜)』에 계종심(鷄枞蕈 : 정심(丁蕈), 의종(蟻宗), 또는 의탈(蟻奪)이라 하였고, 열대성 버섯인 *Termitomyces eurhizus* (Berk) Heim (일본명 : オオシロアリタケ '큰흰개미버섯'이란

뜻)으로 추정된다고 기록되어 있으며, 한국의 『임원경제지』에 계종(鷄糞 : 열대성버섯인 *Termitomyce eurhizus* (Berk) Heim (일본명 : オオシロアリタケ '큰흰개미버섯'이란 뜻)으로 추정으로 기록되어 있다.



Fig. 1-2. 인공재배가 가능한 중국의 흑계종(*Termitomyces albuminosus*) 분포도. 「인터넷 사진」.

흰개미버섯의 분류는 전세계 열대지방에 81개의 이름, 68개로 분류되어 분포하고 있었던 것을 40종으로 정리하였고, 최근에는 총 32종(인도 22종, 중국 11종, 태국 20종)이 적도, 남부아프리카, 마다가스카르, 남부아시아, 네팔을 포함한 동남아시아 등에 분포한다고 보고하였다(Fig. 1-3).

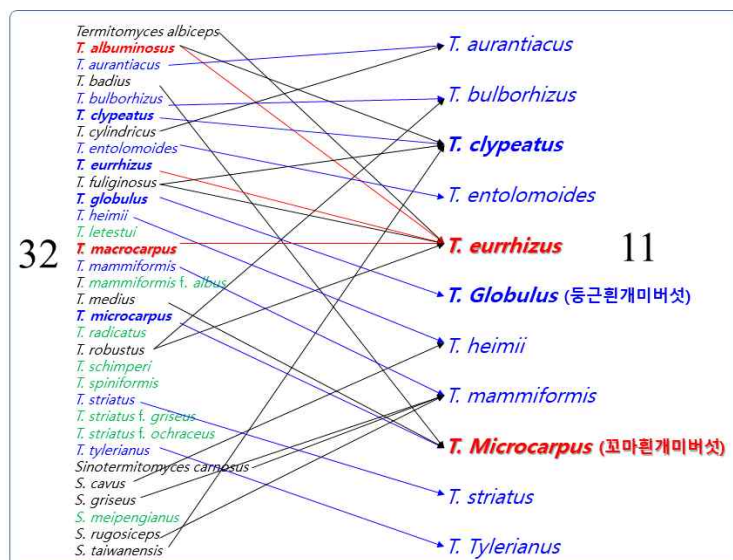


Fig. 1-3. *Termitomyces*의 분류학적 정리(32종 → 11종(중국)).

중국에서는 외관상으로 와계종, 독계종, 화파계종, 화피계종, 산두계종, 대계종 및 두퇴계종으로, 색깔에 따라 청계종(흑계종), 백계종 및 황계종으로, 산지에 따라 여지균, 소통계종, 등층계종, 창녕계종으로, 근연종으로는 초계종, 청계종, 고아균, 흑피계종으로 분류하였다.

흑계종 (*Termitomyces albuminosus*)은 최근 중국에서 11종으로 정리하면서 *Termitomyces eurhizus*나 *Termitomyces clypeatus*종의 유사종으로 분류하였다.

최근에 이러한 흑계종은 지금 인공재배를 시도하여 대량생산에 성공한 균주가 흑계종 (*T. albuminosus*)이 아니라 근연종인 흑피계종으로 분류하고 있다. 흑피계종은 *Oudemansiella* 속의 일종이며 *Oudemansiella raphanipes*의 상표명으로 알려져 있어 분류학적 측면에서 재조사 즉, 분자유전학적 동정이 필요함을 알 수 있다 (Fig. 1-4).



Fig. 1-4. 중국에서 자라는 야생 흑계종 (A : *T. albuminosus*)과 인공재배된 흑계종(B) 「인터넷 사진」.

2) 유전자원의 수집

흰개미버섯 중에서 중국에서 인공재배된 흑계종(상표명 : 흑피계종)은 현재 우리나라에서는 발견되지 않고 있다. 따라서 연구를 위해서는 외국 균주를 수집하지 않을 수 없어 세계 각국의 유전자원을 수집하였다. 흰개미버섯은 2016년 북경시장과 하북성에서 수집하여 인공균상 재배를 시도하여 Fig.1-5와 같이 성공하여 북경에서 수집한 균주를 *Termitomyces albuminosus* 수고로 명명하였다가 농촌진흥청 버섯과에 *Termitomyces albuminosus* MKCC 04879로 명명하여 등록되었다. 하북성에서 수집된 균주는 *Termitomyces albuminosus* 하고로 명명하여 사용하고 있다.



Fig. 1-5. 인공재배되는 흑계종(흑피계종)의 균상재배. A ; 베드재배, B : 상자재배.

나. 수집 유전자원의 특성 평가

1) 수집균주의 형태학적 분석

흑피계종과 흰개미버섯과의 뚜렷한 차이는 균사 상태에서 클램프를 가지고 있느냐에 따라 구분할 수 있기 때문에 광학현미경을 이용하여 클램프를 관찰하였다. 그리고 균주를 배양하여 자실체를 형성한 다음 형태학적으로 담자포자의 지문, 갓의 주름, 갓의 방사형 모양, 줄기의 강력한 뒤틀림 현상 및 횡단면을 관찰하였는데 관찰 결과 Fig. 1-6과 같다. 이러한 특징들은 흑피계종 중에서 *Oudemansiella raphanipes*의 주요 형태적 특성으로 판단된다.

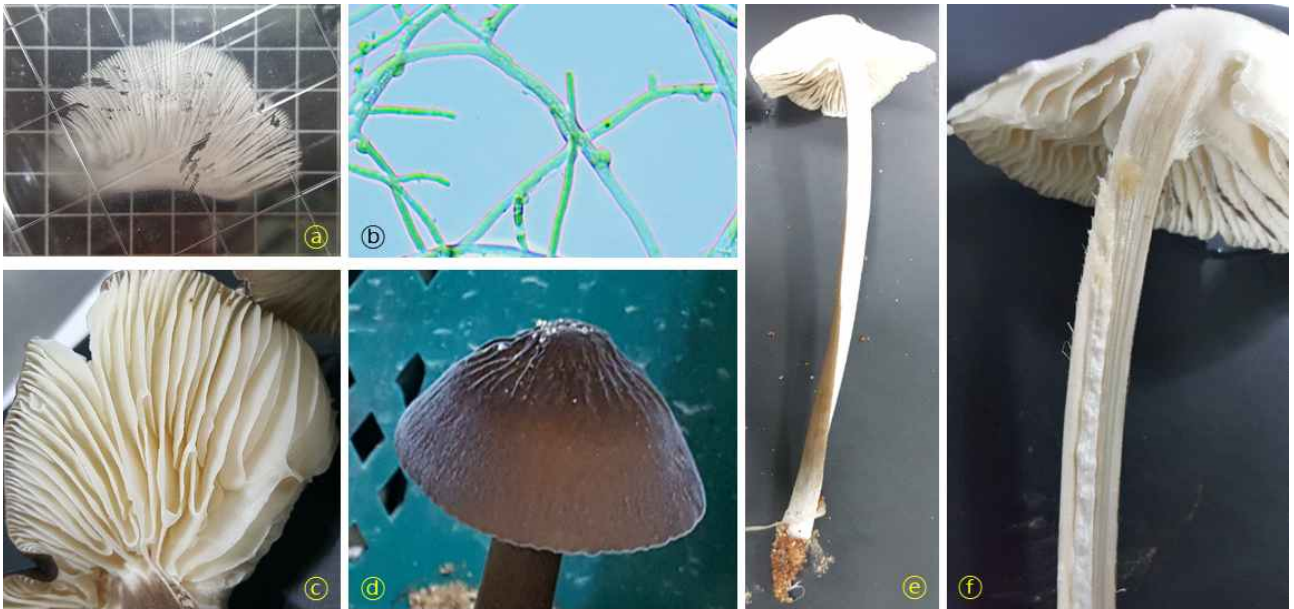


Fig. 1-6. Biological characteristics of *Oudemansiella raphanipes* MKCC04978. (a) Spore print, (b) Clamp connection, (c) Lamellulae of pileus, (d) Radial wrinkle of pileus, (e) Warping of stipe, (f) Cross-section shape of stipe.

3) ITS 영역을 이용한 유연관계 분석

가) 흑계종(*Termitomyces albuminosus*)의 유사도 분석

계놈 DNA는 High Efficient Plant Genomic DNA purification Kit(Toyobo Co., LTD)을 사용하여 추출하였습니다. 5.8S rDNA (ITS) 영역의 내부 전사된 스페이서 1 및 2를 포함하는 뉴클레오티드 rDNA 영역이 계통발생 분석을 위해 선택하였다. 범용프라이머 쌍 ITS1/ITS4 (White et al. 1990)는 ITS 증폭한 결과 Fig 1-7과 같다.

<p>><i>Termitomyces albuminosus</i> MKCC04978</p> <pre> AGCTCACTTGAAGTGGATTTTGAAGGGTTTGCTTGCGCTCCCTTTGTCCGGCCAGGTCTATGCTTCACA TCATCTCTTTGTATGTTTAGAATGTCTTGTATTGGACTTGACCGTCCTTTAAAAAACTTAATACAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCC TGTTTGAGTGTCAGTAAATTCTCAACCTTCTTACTTTGTTGTTAAGGATGGGATTGGATGGTGGAGGC TTGCTGGATGTTCAACGTTTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGTACAACCATTTACTTGAGCTTACGC TAAGCTGTGATAATATCTAAGCTAGCTGGTTCAGAGTGTGGCAGAGTTCGGGTTTTTGAAGGGTTTTG CTTCGCGGCTCCCTTTGTGTTCTCTCTTCTTAGGGGAGAGGGATACATATGCGACTCTGTGAAAGAGTGG TGTTGCCGCTTCCACGCTCTCTTGACACTGAGACACACATTTTAATGTGAATATGTGATCTCATATC </pre>

Fig. 1-7. ITS sequences of artificial cultivated *Termitomyces albuminosus* MKCC04978.

PCR 반응은 Thermocycler (BioRad Co., LTD)에서 수행되었으며 PCR 프로그램은 다음과 같다. 94°C에서 5분 동안 사전 변성; 이어 94°C에서 50초 동안 변성, 50°C에서 50초 동안 어닐링, 72°C에서 60초 동안 신장하여 35사이클로 반복하였다. 그 후 72°C에서 10분 동안의 최종 신장을 포함시켰다. PCR 산물은 Macrogen사에 의뢰하여 시퀀싱했습니다. 증폭에 사용된 것과 동일한 프라이머를 사용하였다. “흰개미버섯(흑계종)”과 *Oudemansiella*의 동종 종과의 관계를 이해하기 위해 NCBI/GenBank에서 해당 종의 ITS 서열을 검색한 다음 새로 생성된 서열과 비교하였다. ITS 시퀀스는 MEGA v6.0 program으로 정렬하였고 phylogenetic tree를 작성하였으며 분석결과 Fig. 1-8과 같다. 이 결과에서는 *Hymenopellis raphanipes*로 확인되었으나 *Hymenopellis raphanipes* (Petersen, 2010)는 최근에 붙여진 이름이라 중국에서는 이전의 이름인 *Oudemansiella raphanipes* (Pegler & Young, 1987)를 사용하고 있어 우리도 *Oudemansiella raphanipes* KMCC04978로 명명(이하 사용)하였다.

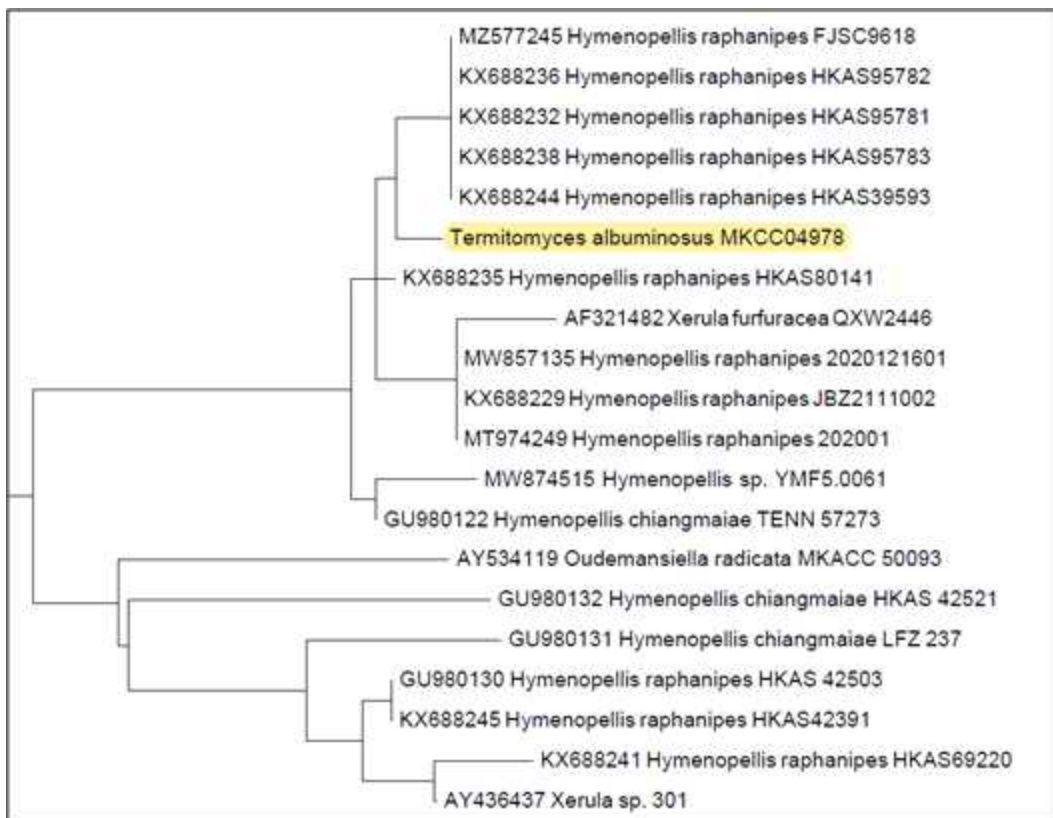


Fig. 1-8. Phylogenetic tree of *Oudemansiella raphanipes* MKCC04978.

4) 유전체 분석

현재 수집된 균주로는 *Termitomyces albuminosus* 2균주, *Termitomyces* sp. JCM 17균주, *T. aurantiacus* ATCC58865 등을 수집하였다. 이중에 유전체 분석은 *Termitomyces albuminosus* MKCC04978, Hago 및 *Termitomyces* sp. JCM 11157 등 4균주를 마크로젠사에 의뢰하여 유전체를 분석하였다. 시퀀싱 결과는 Table 1-1 및 1-2와 같으며, 여기서 인공재배가 가능한 균주는 *T. albuminosus* MKCC04978 및 *T. albuminosus* Hago이며 두 균주간에는 차이를 보여 같은 균주이나 계통이 다른 균주라고 판단되며 두 균주간 종내교배가 가능하다고

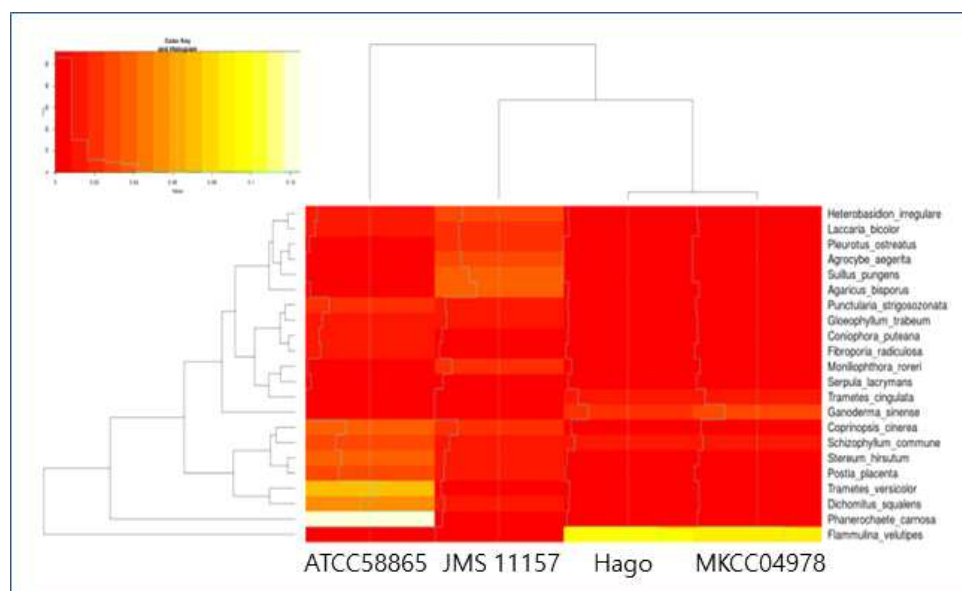
사료된다(Fig. 1-9, Fig. 1-10).

Table 1-1. Whole genome assembly results of collected *Termitomyces* sp.

Names	Scaffolds	No.of bases	Longest	Shortest	N50	N90	Re-cover reads (%)
<i>T. albuminosus</i> MKCC04978	38,299	76,039,601	68,106	100	3,761	823	99.69
<i>T. albuminosus</i> Hago	39,189	75,384,006	65,225	100	3,523	803	99.64
<i>Termitomyces</i> sp. JCM 11157	13,648	41,635,292	263,825	100	12,927	1,125	99.76
<i>T. cartilagineus</i> ATCC58865	2,852	36,139,053	335,384	100	64,229	7,891	99.62

Table 1-2. Comparison of *Termitomyces albuminosus* MKCC04978 and Hago from whole genome

Names	MKCC04978	Hago	JCM 11157	ATCC58865
MKCC04978		(98.52,99.30)	(0.07, 0.04)	(0.07, 0.04)
Hago	96.36			(0.07, 0.04)
JCM 11157	95.44	94.97		(0.06, 0.06)
ATCC58865	94.34	94.13	93.57	



ig. 1-9. Comparison analysis by barplot of *Termitomyces albuminosus* MKCC04978 and Hago.

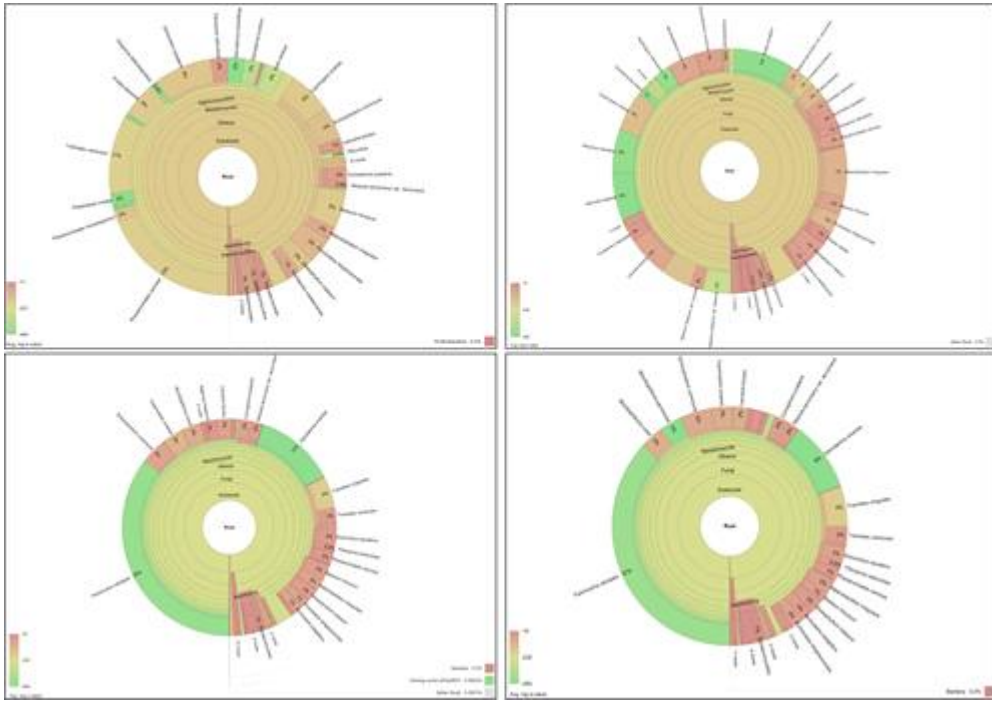


Fig. 1-10. Diagram of *Termitomyces albuminosus* MK04978 and Hago.

2. 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 기술 개발

1. 흰개미버섯(흑계종)의 상자재배 기술 개발

가. 시험관 및 삼각플라스크 배양

Oudemansiella raphanipes MKCC04978 균주를 PDA 플레이트에 옮겨 완전히 성장할 때까지 25℃에서 배양한 후 추가 사용을 위해 4℃에서 보관하면서 사용하였다. 액상 배양액을 준비하기 위해 100ml의 PDB를 삼각 플라스크 (250ml)에 분주하여 121℃에서 15분간 고압 멸균하였다. 7일된 PDA 플레이트에서 5mm 균사조각 5개를 코르크 보어로 픽업하여 삼각 플라스크 (250 ml)의 PDB에 접종한 후 진탕배양기 (150rpm)에서 25℃에서 10일간 배양하였다. 시험관 배양은 종균배지[혼합사료(대두박 15%, 옥배아박 12%, 비트펄프 19%, 소맥피 36%, 아몬드박 4%, 파쇄 옥수수 10%, 대두피 4%) 58.34%, 땅콩피 17.5%, 콘코브 17.5%, 콩펠렛 5%, 폐화석 1.67%]에 접종하여 실험실내에 장기간 보관하였다. 삼각플라스크에 종균배지를 첨가하여 MKCC04978 균주를 접종한 후 실험실내에서 배양하다가 균사가 만연하면 논모래 및 황토로 배지 표면을 덮도록 2~3cm로 복토하여 실험실내에서 장기간 보관하였다. 그 결과 Fig. 1-11과 같이 시험관에서의 자실체는 실험실 조건이 온도 23℃, 광조건(8h:명, 16h :암)으로 210일 만에 자실체가 형성되었다.



Fig. 1-11. Features of fruiting body in the test tube and Δ flask.

나. 흑계종의 상자배양 기술 개발

현재까지 균상베드재배로 흑계종을 인공재배하였지만 소량재배나 농가에서 재배하기 쉬운 상자재배 기술 개발이 필요함으로써 상자재배를 시도한 방법으로 아래와 같다.

- ① 원균 배양은 PDA 배지에 원균을 접종하여 22℃에서 12일동안 원균을 배양한 후, PDB에 펩톤을 첨가한 배지에 접종하여 22℃에서 14일동안 액체 배양하였다.
- ② 접종원 배양은 액체배양 탱크에 l 당 액체배지(설탕+대두분+1인산칼륨+황산마그네슘+소포제)를 만들어 22℃에서 10일동안 액체 배양하였다.
- ③ 종균배양은 병당 종균배지를 혼합하여 수분이 69%로 조절한 후 입병하였다. 입병은 살균하여 액체 접종하여 20℃에서 30일간 배양하였다.
- ④ 생육은 배양된 종균을 균긋기 후 상자(35x50x22cm)에 넣은 후 논모래를 복토하여 생육하였다. 생육초기에는 온도 25~35℃, 습도 95%~에서 8일간 생육하였고, 생육후기에는 온도 30℃, 습도 92~90%에서 생육하여 43일경 자실체가 형성되어 수확하였다.

이상과 같이 Fig. 2-2와 같이 복토 발이 방법으로 자실체를 수확하였지만, 재배기간이나 수확기간도 길어 대량생산할 수 있는 방법으로는 경제성이 없다고 판단하였다. 그 결과는 Fig. 1-12와 같이 수확시기가 다르게 수확되었다. 상자재배를 8차례 재배하여 4번 성공하였는데 그에 대한 자실체 특성을 Table 1-3과 같다. 이 중에서 7차 재배때 가장 수량이 많이 생산되었다.

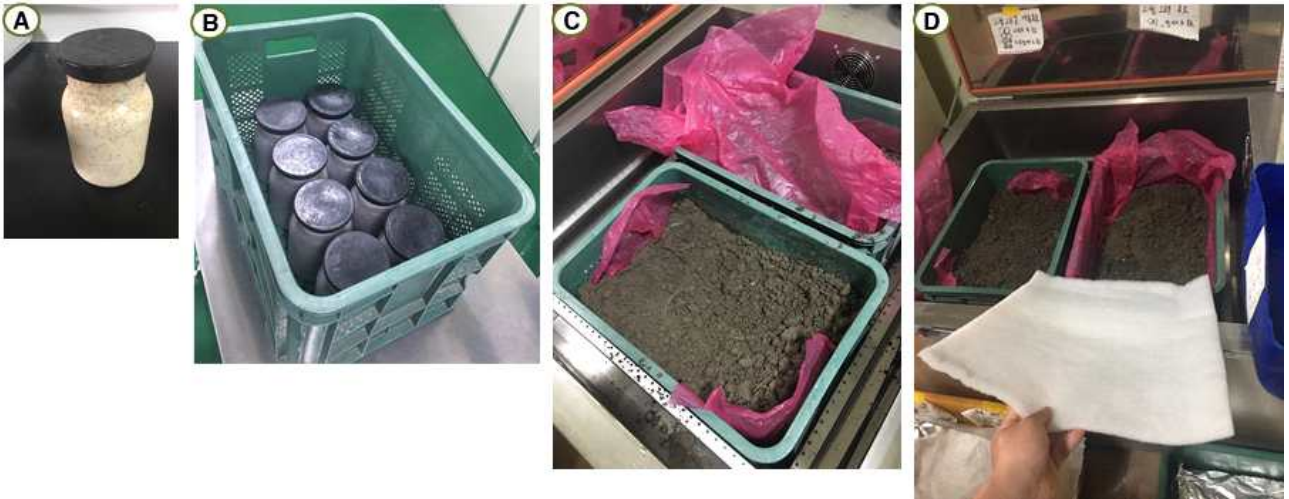


Fig. 1-12. Box cultivation Processing of *Termitomyces albuminosus* MKCC04978. A : Bottle cultivation of mycelia, B : Input box of cultivated mycelia, C : Soil covering, D : Incubation.



Fig. 1-13. Formation of fruiting bodies on the dates from *Termitomyces albuminosus* MKCC04978.

Table 1-3. 인공재배된 흑계종의 자실체 특성

구분	유효경수(개)	갓직경(mm)	갓두께(mm)	대길이(mm)	대굵기(mm)	무게(g)	개체중(g)
1차	43	34.1±14.53	12.6±4.92	104.5±37.70	7.0±3.00	398.66	9.27
3차	15	35.9±17.77	10.9±3.68	94.7±52.80	6.9±1.50	148.89	9.93
7차	59	30.7±14.19	9.9±2.95	69.3±28.11	6.2±2.34	906.42	15.36
8차	2	39.0±22.07	18.0±7.01	81.6±54.50	6.6±0.85	23.07	11.54

2. 흰개미버섯(흑계종)의 병재배 기술 개발

○ 중국에서 처음 재배에 성공하여 최근까지 재배하고 있는 균주는 분자 유전학적 분석에 의해 흑계종 (*Collybia albuminosa*)이 아니라 흑피계종 (*Oudemansiella raphanipes*)임을 알 수 있었고, 재배방법으로는 지면재배를 계속해오고 있었는데 최근에 대면적이 오염되거나 자연재해의 피해를 입어 봉지재배 [梁 등(2019), 谢 등(2020)]로 전환하고 있는 실정이다. 莫 등(2020)은 병재배까지 시도하였음을 특허로 보고하고 있으며, 상기 재배과정의 모식도는 Fig. 1-14와 같다. 이러한 이유는 지면재배는 1년에 1번 정도의 과정을 거치면서 대면적 오염이나 자연재해에 취약하고, 그 다음 베드재배를 하면서 여러번의 수확과정을 거쳐 지면재배의 약점을 보완하였으나 여전히 경제적인 측면에서 불리하였다. 따라서 다수의 수확과정을 활용할 수 있는 봉지재배나 병재배 방법이 요구된다. 하지만 이것을 만족할 수 있는 있으려면 두가지 측면이 만족되어야 하는데 ① 종균배양 시 접종원의 액체배양이고, ② 생육 시 복토 배양의 긴 배양기간의 단축방법이나 무복토로 인한 자실체의 수량 감소를 막아야만 가능하다고 본다. 본 실험에서는 액체배양의 최적화 방법과 복토 종류별 자실체 수량 확보에 대한 내용을 기술하고자 한다.

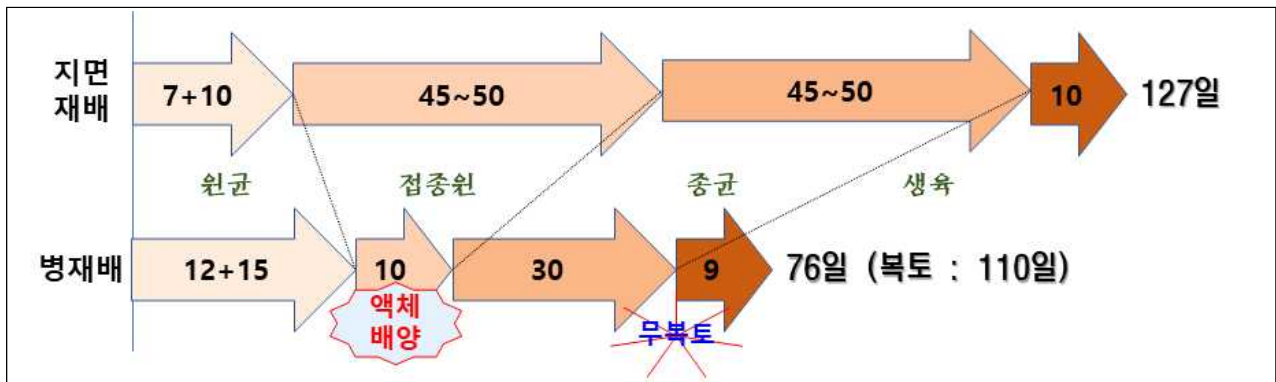


Fig. 1-14. Schematic diagram of cultivation processing in the *Oudemansiella raphanipes*.

가. 흑피계종의 액체배양 최적화

○ 중국에서 액체배양은 먼저 계종균 및 흑피계종 배양 기술을 도입하여 그 변화 양상을 살펴보면

- 1) Hu Zhongce 와 Zheng Xiaodong (2002)은 계종균의 발효배지를 최적화했으며, 그 결과 배지조성이 쌀 가수분해당 4.29%, KH_2PO_4 0.31%, 효모 분말 0.53%, pH4.5일 때 28℃, 150 r/min의 조건에서 5일간 배양한 계종균의 바이오매스는 19.8 g/l에 달했습니다.
- 2) Hu Shangqin 등 (2008)은 탄소(C) 공급원이 포도당이고 질소(N) 공급원이 아미노산인 경우 C의 균사체에 가장 적합한 C:N은 12~14:1임을 발견했습니다.
- 3) Luo Xiaomiao (2010)의 연구에 따르면 균사체 계종균의 성장에 더 적합한 웨이크플라스크 배지 공식을 선별하기 위해 천연 영양배지를 사용하는 것은 옥수수 가루 20 g/l + 밀기울 10 g/l + 소량의 비타민 B1 (VB1)입니다. 그리고 비타민 C (Vc), 이 배지를 기준으로 한 배양조건은 pH 4.5, 온도 27℃, 회전속도 90 r/min이다.

- 4) Zeng Xianfu 등 (2012)은 포도당을 C 공급원으로 효모 추출물을 N 공급원으로하는 배지에서 25~33°C, pH6~7에서 균사가 빠르게 성장하고 균사밀도가 두껍고 흰색임을 발견했습니다.
- 5) Xiong Ya와 Li Minjie (2013)는 C 소스, N 소스 및 성장 인자가 계종균의 균사체 수율에 미치는 영향을 연구하기 위해 반응표면 실험을 사용했습니다. 균사체의 건조중량은 20.233 g/L 포도당, 2.146 g/L 펩톤 및 0.149 g/L 비타민 B6가 보충된 배지에서 가장 무겁습니다.
- 6) Xue Linhao 등 (2013)은 pH, 밀기울, 옥수수 가루, 대두박, K₂HPO₄ 및 MgSO₄가 액체발효 흑피계종의 바이오매스 및 형태에 상당한 영향을 미친다는 것을 발견했습니다.
- 7) Xu Bing 등 (2017)은 흑피계종 균주의 플라스크 액상발효에 가장 적합한 조건은 배양온도 26°C, 회전속도 175 r/min, pH7.6, 발효기간 25일이라고 연구했다.
- 8) Li Yanli (2018)는 Qinling 지역에서 야생 계종균 균사체의 액체배양을 위한 최적의 영양 조건이 2.15% 포도당, 0.22% 효모 추출물, 20.00% 감자, 0.27% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O 및 0.015% 비타민B1임을 발견했습니다. 균사체 진탕플라스크의 액체배양 환경조건은 pH6.0, 충전량은 300ml (500ml 삼각플라스크), 온도는 26°C, 회전속도는 140 r/min입니다.

이상과 같이 이러한 연구를 계속하였으나 상용화하지 못하고 고체배양을 고집해오다가 지면재배의 대면적 오염과 자연재해 등의 피해가 두드러지게 나타나자 지면재배에서 봉지재배로 전환됨으로써 집중적으로 연구되어 최근에는 봉지재배의 대량생산에 적용하여 생산하고 있다. 그 방법으로는 발효기 15ℓ 액상배지 최적화 및 발효공정 최적화를 통해 흑피계종 액체발효에 가장 적합한 배지는 「포도당 20g + 수수가루 4g + 3g K₂HPO₄ + 1g MgSO₄ + 비타민 B1 2정 + 증류수 1,000ml, pH6.5, 발효공정 : 액량 12ℓ, 접종량 12%, 배양온도 25°C, 회전속도 90 r/min, 배양시간 100h, 탱크압력 0.3MPa, 환기량 0.9 m³/h」으로 최적화된 배지와 발효과정에서 흑피계종 액체균주를 배양백에 접종하여 생물학적 전환율이 78%에 도달하였다고 한다.

나. 흑피계종의 복토 병재배 방법

○ 흑피계종의 병재배 방법은 국내에서는 아직 재배방법이 없으며 중국에서 복토 병재배에서 무복토 병재배 방법으로 이동해가는 실정이나 무복토 병재배에서 병재배 대량생산했다는 보고는 없다. 본 실험에서는 복토 병재배 방법을 시도하였으며 그 방법은 다음과 같다.



Fig. 1-15. Spawn cultivation of *Oudemansiella raphanipes* by liquid culture.

- ① 균사배양을 위한 기본배지(액배양) : 액체 삼각플라스크 배양을 위해 성분조성(g/L)은 PDB 2.4, 설탕 24, 대두박 1.2, 1인산 0.125, 황산마그네슘 0.125, 펩톤 0.4로 혼합하여 121℃, 40 min동안 오토클레이브로 고압멸균하여 냉각 후 크린벤치에서 PDA의 흑계종 균사체 직경 8mm 블록 8개를 접종하여 23℃에서 100 rpm에서 15일 동안 배양하였다.
- ② 탱크배양을 위한 액체배지 : 850 l의 액체 탱크배양의 성분조성은 PDB 2 kg, 설탕 13.5 kg, 대두박 1 kg, 1인산 250 g, 황산마그네슘 320 g, 소포제 600 ml로 혼합하여 멸균하고 냉각한 후 공기압 2 Mpa에서 15일동안 24℃에서 배양하였다.
- ③ 종균배양 : 종균배양은 병당 혼합사료(대두박 15%, 옥배아박 12%, 비트펄프 19%, 소맥피 36%, 아몬드박 4%, 파쇄옥수수 10%, 대두피 4%) 58.34%, 땅콩피 17.5%, 콘코브 17.5%, 콩펠렛 5%, 폐화석 1.67%를 첨가 혼합하여 수분을 69%로 조절한 후 333g를 입병하였다. 입병은 살균하여 액체 접종하여 24℃에서 30일간 배양하였다.
- ④ 생육 및 수확 : 생육은 배양된 종균을 균긋기 후 약 1cm를 복토하여 생육하였다. 생육초기에는 온도 25℃, 습도 95%~에서 30일간 생육하였고, 생육후기에는 온도 32℃, 습도 92~90%에서 15일간 생육하여 나온 자실체를 수확하였다.

이상과 같이 Fig. 1-14의 복토 병재배를 실시하여 자실체 형성에 성공하였다. 여기에서 가장 중요한 요인은 액체배양을 통해서 배양기간을 단축하였다 (Fig. 1-15). 또한 복토 병재배 방법으로 다양한 복토를 이용하여 Fig. 1-16과 같이 생육을 하였다. 여러가지 복토 재료를 가지고 자실체 형성 능력을 Fig. 1-17과 같이 황토와 질석에서 가장 많이 나왔다.

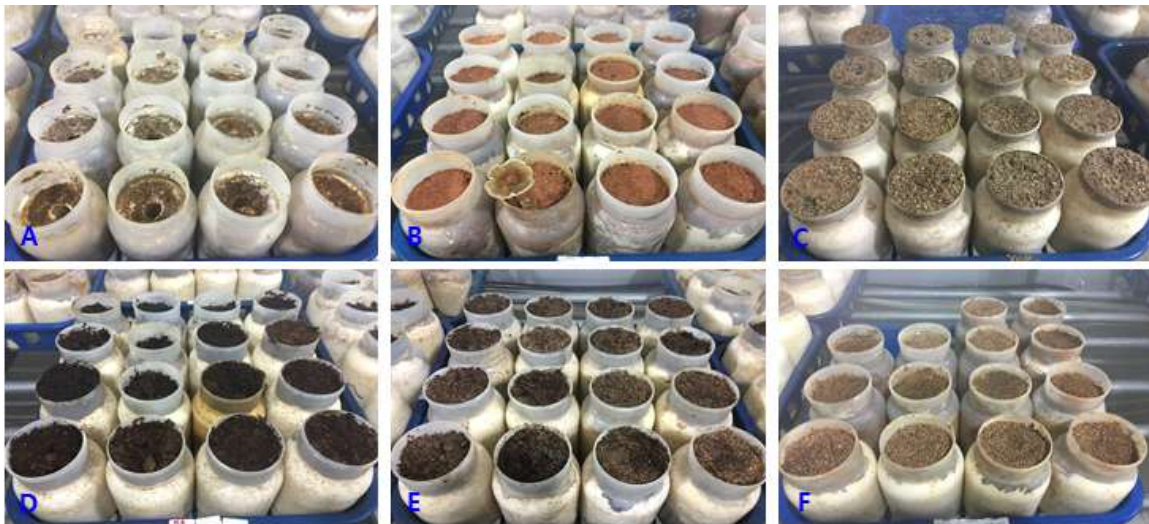


Fig. 1-16. Cultivation for fruiting body of *Oudemansiella raphanipes* on the various soils. A ; Soiless, B : Ocher, C : Sand, D : Peatmoss, E : Peatmoss + Vermiculite, F : Vermiculite.



Fig. 1-17. Formation of fruiting bodies with ocher and vermiculite covering.

이 때 가장 중요한 조건은 복토한 흙을 언제 제거하느냐에 따라 자실체가 형성되거나 아니면 모두 죽는 경우가 나오거나 하여 복토 제거 기준이 필요한 데 그 기준은 Fig. 1-18㉔처럼 복토 부분과 종균부분 사이에 갈색 테두리를 형성할 때 제거하면 Fig. 1-18㉕와 같이 발이체가 형성되어 있어 하루가 지나면 어린 자실체 형태를 띠다가 Fig. 1-18㉖와 같은 성숙 자실체를 형성하였다. 이것을 복토 종류별 자실체 형성을 Table 1-4와 같이 논모래일 경우 개체수는 많이 나오나 개체중이 낮고, 황토+질석일 경우 개체중이 높게 나왔다. 병재배를 10차례를 통해 재배를 시도하여 Table 1-5와 같이 3번만 성공하였다. 이러한 결과는 좀 더 미세환경을 조절해야 되지 않을까 사료된다. 또한 자실체 형성의 대표적 성숙 자실체는 Fig. 1-19와 같이 다발성을 띄고 있음을 볼 수 있어 미세 재배환경 조건만 갖추면 Fig. 1-18㉕처럼 죽지 않고 다발성을 띤 자실체를 재배할 수 있으리라 기대된다.



Fig. 1-18. Changes of growth stages in artificial bottle cultivation of *Oudemansiella raphanipes* KMCC04978. ㉔~㉖ : Formation of fruiting bodies, ㉗~㉚ : Non-formation of fruiting bodies. ㉔ Soil top-dressing, ㉕, ㉗ and ㉘ : Primordial formation after soil removal, ㉖ and ㉙ : Early fruiting body, ㉚ and ㉚ : Mature fruiting body.

Table 1-4. Fruiting body characteristics of bottle cultivation in the *T. albuminosus* MKCC04978

구분	유효경수(개)	갓직경(mm)	갓두께(mm)	대길이(mm)	대굵기(mm)	무게(g)	개체중(g)
1차	5	38.3±9.18	12.3±1.70	131.1±45.52	6.2±1.33	61.39	12.28
7차	48	29.0±15.65	12.2±4.85	99.7±45.61	4.9±1.53	276.22	5.75
10차	38	30.1±17.39	10.6±3.54	120.9±51.83	6.6±2.57	343.30	9.03

Table 1-5. Fruiting body characteristics of bottle cultivation in Top-dressing soil of the *T. albuminosus* MKCC04978

구분	유효경수(개)	갓직경(mm)	갓두께(mm)	대길이(mm)	대굵기(mm)	무게(g)	개체중(g)
황토	9	28.4±14.68	7.8±1.84	71.8±55.94	6.6±3.27	52.2	5.8
황토+질석	18	32.1±16.19	11.1±3.59	127.3±47.02	7.2±2.54	197.2	11.0
황토+논모래	1	81.8	20.1	115.7	10.9	26.1	26.1
논모래	10	22.9±13.86	11.3±2.32	154.2±18.85	5.2±0.61	67.8	6.78

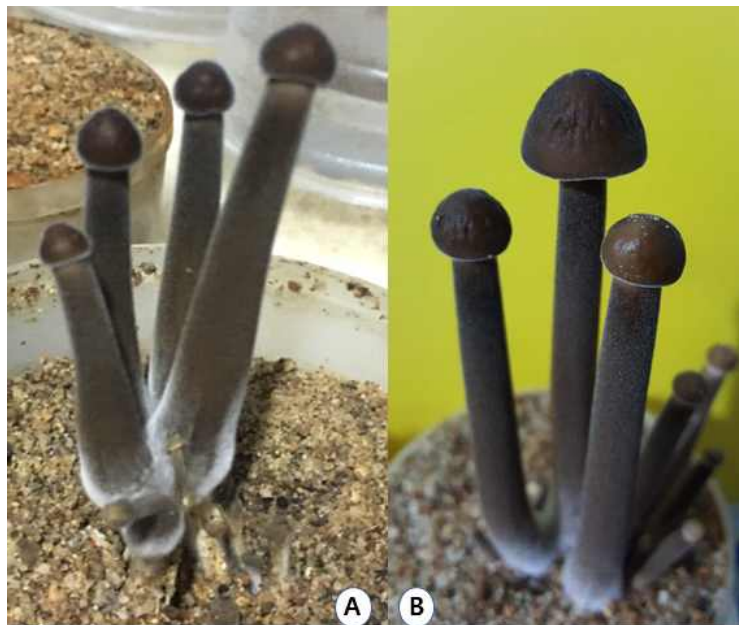


Fig. 1-19. Features of fruiting bodies on the *Oudemansiella raphanipes* MKCC04978(A) and Hago(B).

3. 흰개미버섯(흑계종)의 기능성강화 신품종 개발

가. 흑계종의 교잡을 위한 모본 선발

1). 대선형성 검정

본 실험에서 인공재배에 성공한 균주 *T. albuminosus* MKCC04978 (수고)와 *T. albuminosus* Hago(하고)를 교잡 모본으로 사용하기 위해 두 균주간 대치배양을 한 결과 Fig. 1-20과 같이 대선을 형성하지 않았지만 균사생장 상태를 살펴보면 MKCC04978는 Hago보다 빨리 자라면서 매끈하게 성장한 반면 Hago는 균사 표면이 부풀어 오르면서 성장하였다.



Fig. 1-20. 교잡 모본의 대치배양

2). ITS 영역을 이용한 유연관계 분석

교잡 모본 선발을 위해 이미 *T. albuminosus* MKCC04978의 ITS 분석되어 있고 상대 모본 선발을 위해 *T. albuminosus* Hago의 ITS1 alc ITS4 프라이머를 이용하여 염기서열을 결정 한 결과 Fig. 2-21과 같으며 이것을 가지고 MAGA6 프로그램을 이용하여 유연관계를 분석한 결과 Fig. 1-22와 같이 *T. albuminosus* MKCC04978와 *T. albuminosus* Hago의 유사도가 가장 높게 나왔다. 또한 *T. albuminosus* MKCC04978와 *T. albuminosus* Hago간의 유사도를 분석하였다. Fig. 1-23과 같이 99%를 보였으나 약간의 차이를 보여 산지가 다르거나 같은 품종안에서 계통이 다른 균주임이 판단된다.

>*Termitomyces albuminosus* Hago

```
CTGAACGCTTGCGGCTTCCTTCTGTTGCTGACTTTCCTTAGGGGAAGTATGTGCACGTTTGAACTC
GCTCGCCTCTTCTTTGTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGATCTGGTTGGGAAGCTCACTTGAAGTGG
ATTTTGAAGGGTTTGCTTGCCTCCCTTTGTCCGGCCAGGTCTATGCTTCACATCATCTCTTTGTA
TGTTTAGAATGTCTTGTTTATTGGACTTGACCGTCCTTTAAAAAACTTAATACAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGT
TTGAGTGTGAGTAAATTCTCAACCCTTCTTACTTTGTTGTTAAGGATGGGATTGGATGGTGGAGGC
TTGCTGGATGTTCAACGTTCAAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGTACAACCATTTACTTGAGCTTA
CGCTAAGCTGTGATAATATCTAAGCTAGCTGGTTCAGAGTGTGGCAGAGTTCGGGTTTTTGAAGG
GTTTTGCTTTCGCGGCTCCCTTTGTGTTCTCTCTTTAGGGGAGAGGGATACATATGCCACTCTGTG
AAAAAGTGGTGTGGCCGCTTCAAAGTGTCTTTGACTGTGAGACACACATTTTAATGTGAATATGT
GAGCTC
```

Fig. 1-22. ITS sequences of artificial cultivated *Termitomyces albuminosus* Hago.

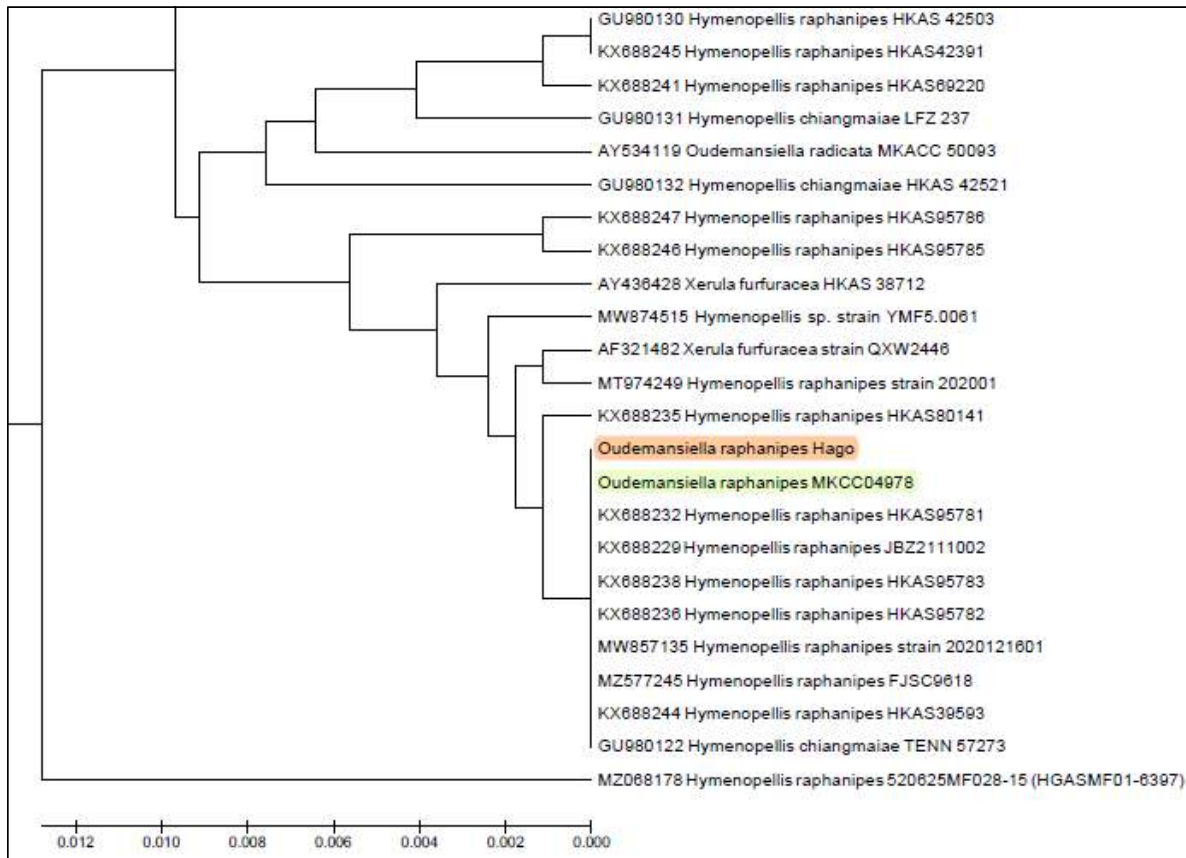


Fig. 1-23. Phylogenetic tree of *T. albuminosus* MKCC04978 and Hago by UPGMA.

MKCC04978	4	ACGCTTGC	CGGCTTCACTTCTGTTGCTGACTTTCCTTAGGGGAAGTATGTGCACGTTTGA	ACTCGCTCGCCTCTTCTTTGTCCACCTGTGC	93
Hago	5	93
MKCC04978	94	ACCTTTGT	TAGATCTGGTTGGGAAGCTCACITGAAGTGGATTTTGAAGGGTTT	GCTTGGCTCCCTTTGTCCGCCAGGCTATGCTTCA	183
Hago	94	183
MKCC04978	184	CATCATCT	CTTTGTATGTTTAGAATGCTTGTTTATTGGACTTGACCGTCCCTTnnnnnn	CTTAATACAACCTTCAACAACGGATCTCT	273
Hago	184	273
MKCC04978	274	TGGCTCTC	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGA	ATTCAGTGAATCATCGAGCTTTTGAACGCACCT	363
Hago	274	363
MKCC04978	364	TGCGCCCT	TTGGTATCCGAAGGCGATGCCTGTTTGTAGTGTGAGTAAATCTCAAC	CCCTTCTTACTTTGTTGTTAAGGATGGGATTGGAT	453
Hago	364	453
MKCC04978	454	GGTGGAGG	CTTGTGGATGTTCAACGTTGAGTCTCTGAAATGCATTAGCGGTACAAC	CATTTACTTGAGCTTACGCTAAGCTGTGATA	543
Hago	454	543
MKCC04978	544	ATATCTA	AGCTAGCTGGTTCAGAGTGTGGCAGAGTTGGGTTTGAAGGGTTT	GCTTCCGCGCTCCCTTTGTGTTCTCTCTTAGG	633
Hago	544	633
MKCC04978	634	GGAGAGG	GATACATATGCGACTCTGTGAAAGAGTGGTGTGCGGCTTCCAGCGT	CTCTTGACACTGAGACACACATTTTAATGTGAATA	723
Hago	634 C..... A..... A. A. T..... TG.....	723
MKCC04978	724	TGTGATCTC			732
Hago	724 G... ..			732

Fig. 1-24. Alignment of *T. albuminosus* MKCC04978 and Hago by NCBI/BLAST.

3). 유전체 분석

T. albuminosus MKCC04978와 *T. albuminosus* Hago의 두 균주간의 차이점을 비교하기 위해 유전체 분석을 실시하여 MKCC04978와 Hago간의 유사성이 Table 1-6과 같이 96.36%로 나타나 ITS 분석과 같이 다른 계통이거나 산지가 다른 균주임을 보여주어 두 균주를 모본으로 선택하였다.

Table 1-6. 흑계종 교잡 모본의 유전체 분석

균주명	ATCC 58865	하고	JCM 11157	수고
ATCC 58865		94.13%	93.57%	94.34%
하고	(0.07% 0.04%)		94.97%	96.36%
JCM 11157	(0.06% 0.06%)	(0.03% 0.06%)		95.44%
수고	(0.07% 0.04%)	(98.52% 99.30%)	(0.07% 0.04%)	

Similarity(%)
Coverage(%) (A, B)

나. 교잡육종을 위한 모본의 생리적 특성 분석

T. albuminosus MKCC04978와 *T. albuminosus* Hago간의 교배를 위해 클램프를 관찰한 결과 Fig. 1-25와 같이 두 균주 모두 클램프를 가지고 있어 교배가 가능하다고 보고 1차적으로 상자 재배로 인공재배하여 수확한 자실체를 가지고 단포자를 분리하였다 (Fig. 1-26).

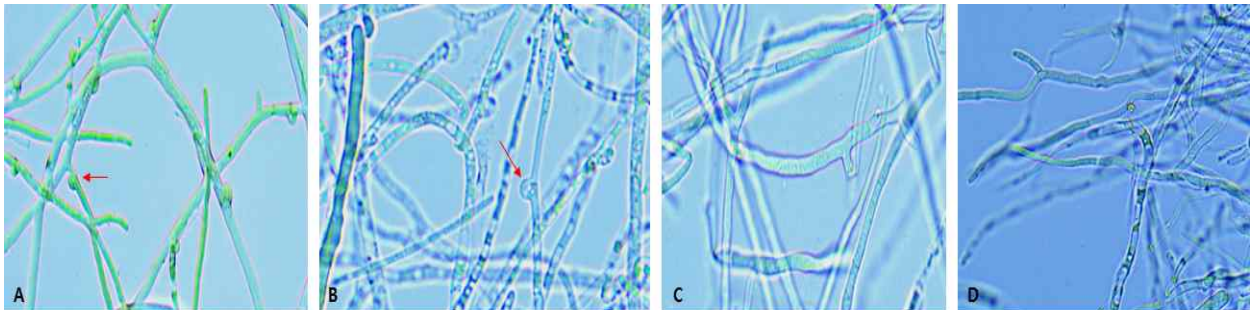


그림 1-25. 유전자원의 클램프 관찰. A: *T. albuminosus* 수고, B: *T. albuminosus* 하고, C: *T. cartilagineus* ATCC 58865, D: *T. microcarpus* JCM 1157.

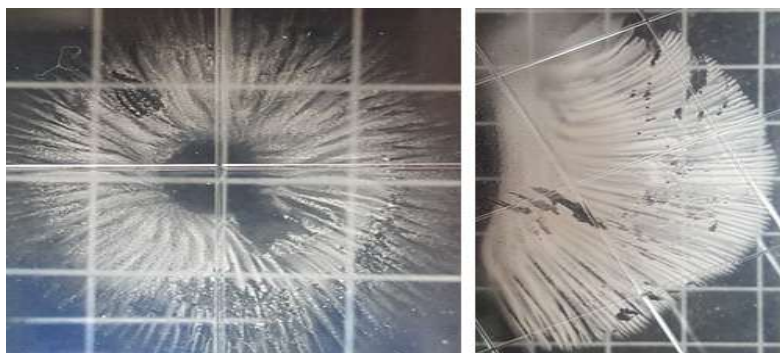


그림 1-26. 흑계종의 포자문. 왼쪽 : 수고, 오른쪽 : 하고

다. 흑계종의 종내 교잡 및 교잡주 선발

1). 교배를 위한 모본의 단핵균주 분리 : 상자재배에 의해 수확한 자실체 *T. albuminosus* MKCC04978 및 *T. albuminosus* Hago의 단포자를 분리하기 위해 광학현미경으로 클램프가 없는 균주를 분리하였다. *T. albuminosus* MKCC04978는 23점, *T. albuminosus* Hago 14점을 분리되었다. 2차 선발은 두 균주의

2). 흑계종 종내 교잡 및 교잡주 선발

선발된 단포자 *T. albuminosus* MKCC04978 23점, *T. albuminosus* Hago 14점을 각각 교배하여 클램프를 가지면서 군사생장이 빠른 교잡주 23점을 Table 1-7과 같이 23점을 1차 선발하여 계통명을 부여하였다. 선발된 교잡주가 모본과의 대치배양을 통해 대치선이 형성되는 균주를 2차로 선발하였다. 따라서 교배를 통하여 뚜렷한 대치선을 형성하는 균주를 우선적으로 선발하였다. 3차 선발은 프라이머를 이용하여 모본과 차이를 보이는 Hybrid나 다른 밴드를 형성하는 균주를 선발하였다. 또한 선발된 교잡주 중에서 군사생장이 빠른 균주를 우선적으로 선발하였다. 선발된 균주의 배지에 다른 군사생장율을 측정된 결과 Table1-8과 같이 PDA 배지에서 모본인 수고 및 하고보다 빠른 생장을 보인 계통은 7계통이며, MS 배지에서 모본인 수고 및 하고보다 빠른 생장을 보인 계통은 5계통이며 양 배지에서 빠른 생장을 보인 계통은 2계통이었다(Fig 1-29). 이상의 선발과정을 거쳐 건발된 교잡주를 유전체 분석의를 의뢰하였다.

Table 1-7. 흑계종 종내 교잡주 선발 및 우량균주 계통 명명

교잡	계통명	교잡	계통명
수포 001 x 하포 011	TAS001	수포 009 x 하포 006	TAS013
수포 002 x 하포 003	TAS002	수포 010 x 하포 003	TAS014
수포 003 x 하포 001	TAS003	수포 010 x 하포 007	TAS015
수포 003 x 하포 012	TAS004	수포 012 x 하포 003	TAS016
수포 004 x 하포 008	TAS005	수포 012 x 하포 005	TAS017
수포 004 x 하포 009	TAS006	수포 013 x 하포 013	TAS018
수포 006 x 하포 003	TAS007	수포 016 x 하포 003	TAS019
수포 006 x 하포 005	TAS008	수포 018 x 하포 003	TAS020
수포 006 x 하포 007	TAS009	수포 018 x 하포 005	TAS021
수포 007 x 하포 006	TAS010	수포 021 x 하포 003	TAS022
수포 007 x 하포 013	TAS011	수포 022 x 하포 007	TAS023
수포 008 x 하포 005	TAS012	합계	23점

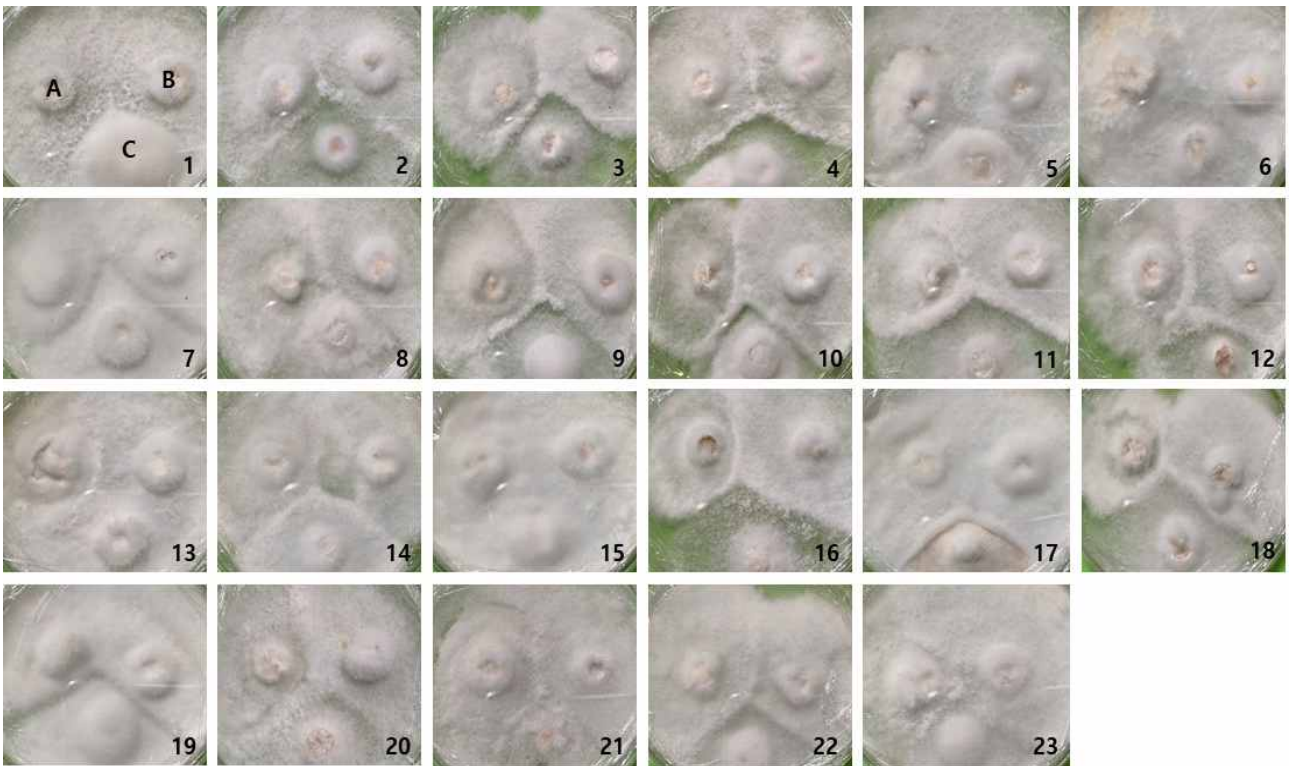


그림 1-27. 교잡주의 대선형성 유무. A : *T. albuminosus* MKCC04978(수고), B : *T. albuminosus* Hago(하교), C : *T. albuminosus* 수고 x 하교 TAS001~TAS23.

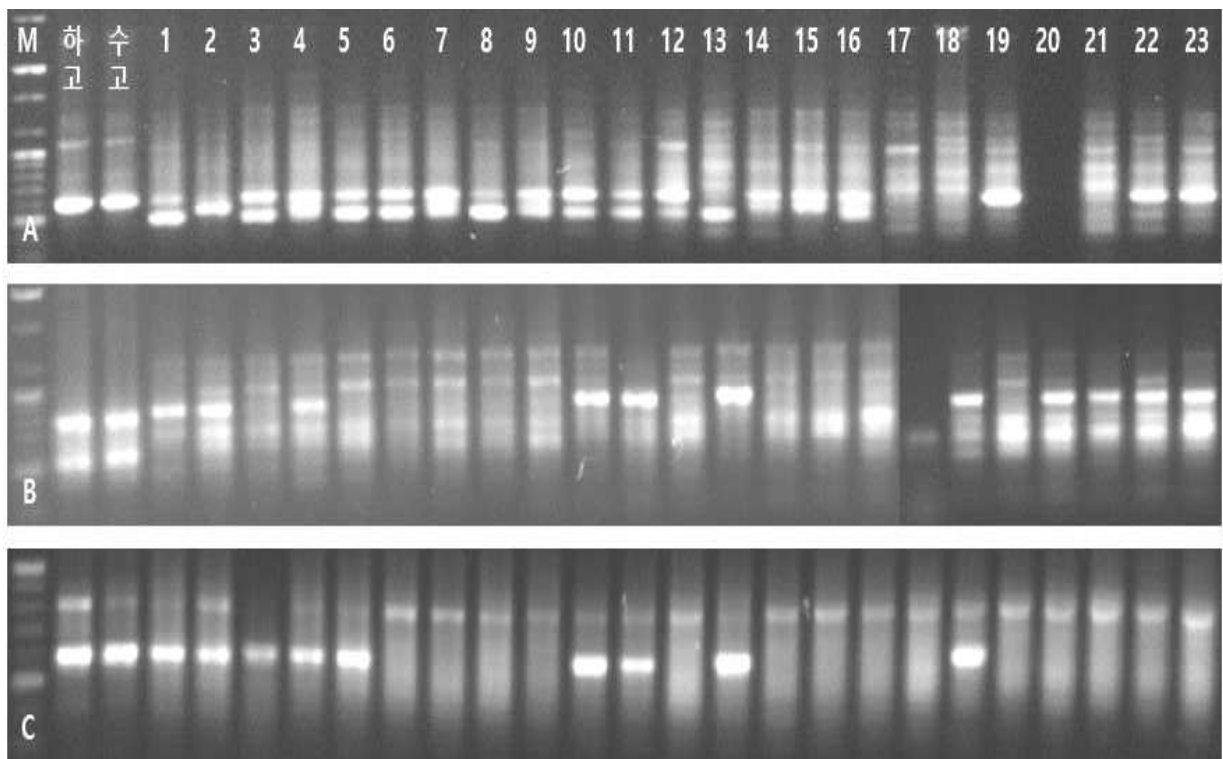


그림 1-28. 흑계종 교잡주의 유전적 pattern 분석. A : Primer URP5, B : Primer URP6, C : Primer URP7, M : 100bp marker, 1~23 : 교잡주

Table 1-8. 선발된 균주의 배지에 따른 균사생장율(mm/day)

지계통	배		지계통	배	
	PDA	MS		PDA	MS
수고	2.33	2.11	TAS012	1.78	1.89
하고	2.44	2.28	TAS013	2.28	2.44
TAS002	2.28	2.67	TAS014	3.22	1.89
TAS002	1.61	1.17	TAS015	2.28	1.56
TAS003	1.56	1.61	TAS016	1.89	1.72
TAS004	2.39	2.44	TAS017	1.56	1.28
TAS005	3.28	2.83	TAS018	2.94	1.89
TAS006	2.72	1.72	TAS019	2.94	1.94
TAS007	2.44	2.22	TAS020	1.72	1.28
TAS008	2.50	1.17	TAS021	1.62	1.61
TAS009	2.78	1.61	TAS022	2.56	2.06
TAS010	2.83	2.50	TAS023	1.78	1.89
TAS011	2.28	2.22	합계	23점	

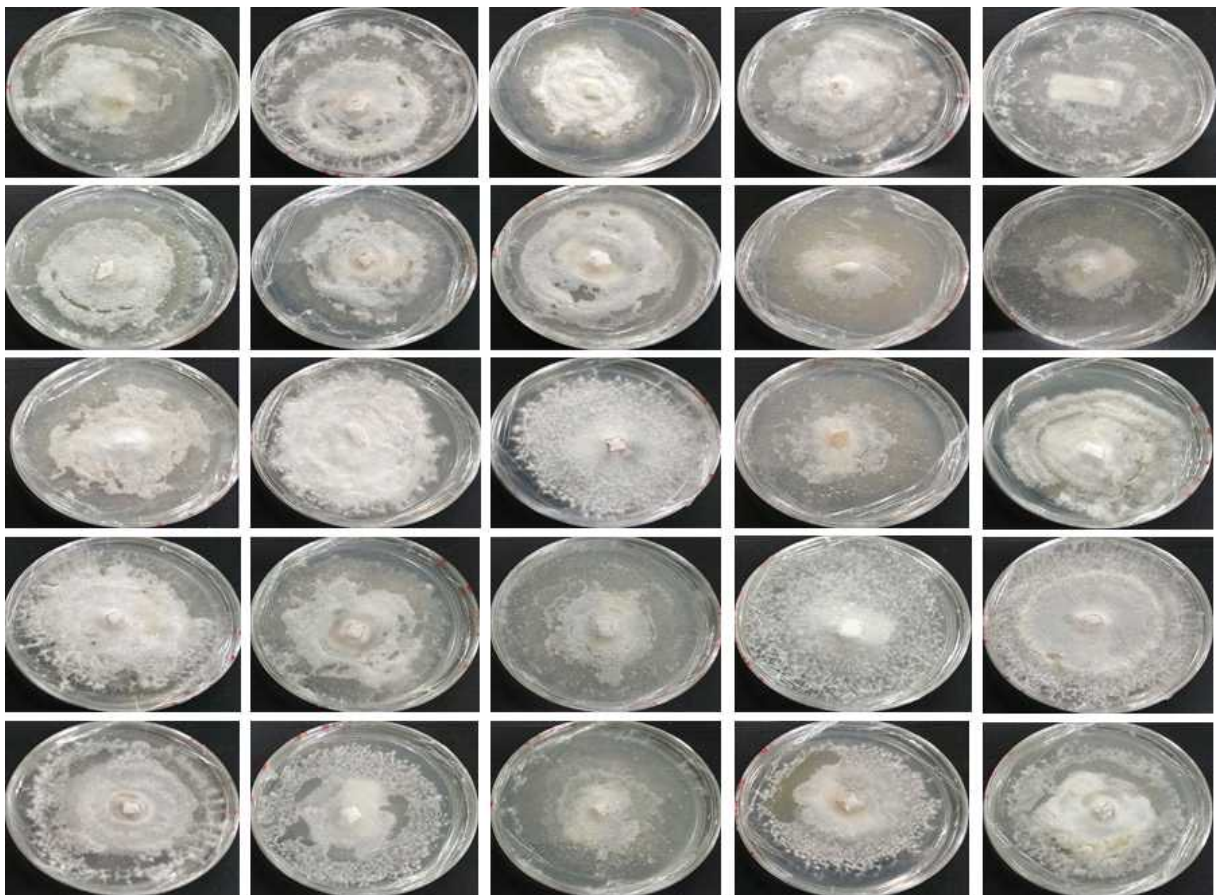


그림 1-29. 선발균주의 균사생장 특성. 좌우상하로 수고, 하고, TAS001~23.

라. 선발균주의 삼각플라스크 배양 특성

선발된 균주를 재배하기 위해 1차로 삼각플라스크에서 균사생장을 한 결과 Fig. 1-30과 같이 TAS018 균주가 모본보다 생장이 빨라 이 균주를 중심으로 재배시험 중에 있다.



그림 1-30. 선발균주의 삼각플라스크 배양 특성. 하고 : 모본, TAS005, TAS018 and TAS019 : 교잡주.

마. 선발된 신품종의 병재배 기술 개발

흑피계종의 신품종 선발은 MKCC04978과 Hago를 교배하여 복토 및 무복토 병재배 방법으로 하여 Fig. 1-31과 같이 병재배를 수행하였다. 그 결과 아직까지 자실체를 형성하지 못하였다. 병재배를 8차에 걸쳐 재배하였으나 실패하였다. 문제는 액체배양에 있어 탱크의 오염이나 병재배 시 생육기간이 길어짐에 따라 여러가지 오염이 발생하는 것이 실패의 원인으로 생각되어 미세환경(온도, 습도, 복토 등)을 계속 바꿔가면서 재배를 계속 수행하고 있다.



Fig. 1-31. Bottle cultivation of bred cultivars on the *Oudemansiella raphanipes* MKCC04978 x Hago. Left: Soiless, Right : Sand covering after scraping, Left : *T. albuminosus* Hago, Breeds : TAS 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 23.

참고문헌

- Cai Q, Tulloss RE, Tang LP, Tolgor B, Zhang P, Chen ZH, Yang ZL. 2014. Multi-locus phylogeny of lethal amanitas: Implications for species diversity and historical biogeography. *BMC Evolutionary Biology* 14: 143.
- Gong M, Guan Q. 2020. Growth conditions of *Termitomyces albuminosus* under artificial cultivation conditions. *Intl J Agric Biol.* 23: 135-141.
- Hao YJ, Zhao Q, Wang SX, Yang ZL. 2016. What is the radicate *Oudemansiella* cultivated in China? *Phytotaxa* 286: 1-12.
- Iqbal Z, Han LC, Soares-Sello AM, Nofiani R, Thormann G, Zeeck A, Cox RJ, Willis CL, Simpson TJ. 2018. Investigations into the biosynthesis of the antifungal strobilurins. *Org Biomol Chem* 16: 5524-5532.
- Ji DG, Li DF, Song MJ. 1982. Cultivation of *Oudemansiella radicata*. *Edible Fungi* 4: 11-12.
- Lee GW, Jaysinghe C, Imtiaj A, Shim MJ, Hur H, Lee MW, Lee KR, Kim SH, Kim HY, Lee UY, Lee TS. 2007. The artificial cultivation of *Oudemansiella mucida* on the oak sawdust medium. *Mycobiology* 35: 226-229.
- Li Y, Wang XD, Fu QF, Liu Q, Wei W, Liu J. 2012. Cultivation techniques of *Termitomyces fuliginosus*. *Edible Fungi* 1: 37-39
- Niego AG, Raspé O, Thongklang N, Charoensup R, Lumyong S, Stadler M, Hyde KD. 2021. Taxonomy, Diversity and Cultivation of the Oudemansielloid/Xeruloid Taxa *Hymenopellis*, *Mucidula*, *Oudemansiella*, and *Xerula* with Respect to Their Bioactivities: A Review. *J Fungi* 7: 51. <https://doi.org/10.3390/jof7010051>
- Pegler DN, Young TWK. 1987. Classification of *Oudemansiella* (Basidiomycota: Tricholomataceae), with special reference to spore structure. *Transactions of the British Mycological Society* 87: 583-602.
- Petersen RH, Hughes KW. 2010. The *Xerula/Oudemansiella* Complex (Agaricales). *Nova Hedwigia Beiheft* 137: 1-625.
- Petersen RH, Nagasawa E. 2006. The genus *Xerula* in temperate east Asia. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 43: 1-49.
- Qin J, Fen, B, Yang Z.L, Li YC, Ratkowsky D, Gates G, Takahashi H, Rexer KH, Kost GW, Karunarathna SC. 2014a. The taxonomic foundation, species circumscription and continental endemisms of *Singerocybe*: evidence from morphological and molecular data. *Mycologia* 106: 1015-1026.
- Redhead SA, Ginns J, Shoemaker RA. 1987. The *Xerula* (*Collybia*, *Oudemansiella*) *radicata* complex in Canada. *Mycotaxon* 30: 357-405.

- Ruegger MJS, Tornisielo SMT, Bononi VLR, Capelari M. 2001. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Hohn. in lignocellulosic substrates. *Braz J Microbiol* 32: 211-214.
- Shim JO, Chang KJ, Kim TH, Lee YS, Lee UY, Lee TS, Lee MW. 2006. The fruiting body formation of *Oudemansiella radicata* in the saw dust oak (*Quercus variabilis*) mixed with rice bran. *Mycobiology* 34: 30-33.
- White TJ, Bruns TD, Lee SH, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds.) *PCR protocols: A guide to methods and Application*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wu CL, Gan QJ, Bao WH, Huang WH, Chen L. 2013. Management techniques of high-yield bionics wild cultivation of *Oudemansiella radicata*. *Edible and medicinal mushrooms* 21: 120-121.
- Xu F, Li Z, Liu Y, Rong C, Wang S. 2016. Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates. *Saudi J Biol Sci* 23: 607-613.
- Xu N, Feng LG, Wang CH, Deng ZL, Zou SC, Lu H. 2019. Optimization of culture conditions of fermentation technology for *Oudemansiella raphanipes* liquid strain fermenter. *J South Agric* 50: 344-349.
- Yang ZL, Zang M. 1993. Classification of the genus *Oudemansiella* Speg. in Southwest China. *Acta Mycologia Sinica* 12: 16-27.
- Yu FQ, Ji DG, Shong MJ, Liu PG. 2002. Comparative cultivation of two varieties in *Oudemansiella furfuracea*. *Edible Fungi of China* 21: 13-15.
- Zeng NK, Tang LP, Li YC, Tolgor B, Zhu XT, Zhao Q, Yang ZL. 2013. The genus *Phylloporus* (Boletaceae, Boletales) from China: morphological and multilocus DNA sequence analyses. *Fungal Diversity* 58: 73-101.
- Zhao Q, Feng B, Yang ZL, Dai YC, Wang Z, Tolgor B. 2013. New species and distinctive geographical divergences of the genus *Sparassis* (Basidiomycota): evidence from morphological and molecular data. *Mycological Progress* 12: 445-454.
- 郭兴, 杜帛霖, 王刚. 2019. 一种利用黑木耳菌糠栽培黑皮鸡枞的生产. Patent No. CN110100653A.
- 金耀辉, 曲淑敏, 金艳丽. 2018. 以巨君草为主料的黑鸡枞菌培养基及其制. Patent No. CN108401782A.
- 金耀辉, 曲淑敏, 金艳丽. 2018. 黑鸡枞菌培养基及其制备方法与应用. Patent No. CN108522136A.
- 邓军. 2019. 一种黑皮鸡枞的培养基,制备方法及其黑皮鸡. Patent No. CN109384479A.
- 梁晓薇, 杜娜, 胡惠萍, 吴清平, 谢意珍, 刘远超, 卓丽君. 2020. 卵孢小奥德蘑白色变种及其人工栽培方法. Patent No. CN110754292A.

- 赖洪焕, 欧洋锋, 谢锐芸, 方丹妮, 朱德森, 简建锋, 伍梓洋, 钟红伟, 郭艳峰, 郑立野. 2020. Patent No. CN112106597A.
- 李晓博, 王治, 高霞, 王宝印, 李长田. 2018. 一种黑皮鸡枞菌培养方法. Patent No. CN107646515A.
- 别平, 于建军. 2020. 一种黑皮鸡枞菌的仿野生种植方法及其应用. Patent No. CN112042462A.
- 别平, 周自珍, 朱吉权, 周礼兵. 2020. 一种黑皮鸡枞菌培养方法及其应用. Patent No. CN112042463A.
- 谢意珍, 杜娜, 胡惠萍, 雍天乔, 吴清平, 张智. 2020. 一种卵孢小奥德蘑新菌种及其人工栽培方. Patent No. CN111937680A.
- 谢意珍, 杜娜, 胡惠萍, 雍天乔, 吴清平, 张智. 2020. 一种卵孢小奥德蘑新菌种及其人工栽培方法和用途. Patent No. CN111937680A.
- 徐宁, 陆欢, 冯立国, 黄晓辉, 邓召利. 2020. 一种黑皮鸡枞可食用纸及其制备方法与应. Patent No. CN111728191A.
- 徐宁, 冯立国, 王春晖, 邓召利, 邹世成, 陆欢. 2019. 黑皮鸡枞液体菌种发酵罐培养条件的优化. 南方农业学报. 50(2): 344-349.
- 首安发, 张得平, 吴健, 袁维, 肖光雄, 卢化新, 董义庆, 沈求陵, 石保峰, 黎锋, 李元科, 唐志友, 盘维权, 刘慧生, 李俊生. 2019. Patent No. CN109348988A.
- 羊桂英, 郭梅霞, 于保庭, 胡寅, 莫建初. 2019. 白蚁共生真菌—蚁巢伞属研究概况. *Mycosystema* 38(11): 1747-1759.
- 吴玲, 周善龙. 2018. 一种黑皮鸡枞菌立体层架的培养方法. Patent No. CN108094055A.
- 吴玲, 周善龙. 2018. 一种黑皮鸡枞菌母种的液体培养基及其制. Patent No. CN108102927A.
- 吴玲, 周善龙. 2018. 一种黑皮鸡枞菌液体菌种的制备方法. Patent No. CN108029458A.
- 吴玲, 周善龙. 2018. 一种黑皮鸡枞菌的培养方法. Patent No. CN107896824A.
- 吴玲, 周善龙. 2018. 一种黑皮鸡枞菌的原种培养料及其制备方. Patent No. CN108064634A.
- 王守现, 陈杰, 牛玉蓉, 赵爽, 刘宇, 许峰, 荣成博, 宋爽. 2016. 一株淡褐奥德蘑及其应用. Patent No. CN105769938A.
- 王振利, 王琦, 高霞, 赵敬聪, 马世玉. 2018. 一种黑皮鸡枞菌液体菌种及其培养方法. Patent No. CN107646515A.
- 田果廷, 肖燕, 钱赟, 李本春, 李先. 2017. 红土鸡枞液体菌种培养基及其制备方法. Patent No. CN106316654A.
- 周从刚, 周锋, 欧阳仪, 袁永飞, 周睿. 2019. 一种黑皮鸡枞菌栽培方法. Patent No. CN110583362A.

제 2 절 계종버섯의 유전자원 탐색, 평가 및 신제품 개발

1. 계종버섯의 유전자원 수집 및 특성 평가

가. 국외 유전자원 수집

Termitomyces microcarpus 유전자원을 구입하고자 하였으나 구하기 어려웠다. *Termitomyces* sp. 중에서 태국에서 분리된 일본 RIKEN BRC의 JCM (Japan Collection of Microorganisms) 균주 20점을 구입하여 생장한 결과 JCM 11086, 11154, 13351 등 3균주를 제외하고 17균주가 Table 2-1과 같이 수집되었다.

Table 2-1. Identification of *Termitomyces* strains collected from JCM .

Strain No.	History	Group	Isolation	Host termite	Identity	
					Phenotype	Accession No.
JCM 11084	M. Ohkuma KU 408		Saraburi	Odontotermes logignathus	<i>Termitomyces</i> sp.	
JCM 11086	M. Ohkuma KU 410	2	Prachinburi	Microtermes sp.	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073502/AB073543
JCM 11091	M. Ohkuma KU 423	4	Saraburi	Odontotermes logignathus	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073521/AB073539
JCM 11092	M. Ohkuma KU 424	4	Saraburi	Odontotermes logignathus	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073522
JCM 11093	M. Ohkuma KU 425	4	Saraburi	Odontotermes logignathus	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073523/AB073540
JCM 11094	M. Ohkuma KU 426	4	Saraburi	Odontotermes logignathus	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073524
JCM 11095	M. Ohkuma KU 427	4	Saraburi	Odontotermes logignathus	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073525
JCM 11096	M. Ohkuma KU 428	3	Saraburi	Hypotermes sp.	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073517/AB073538
JCM 11097	M. Ohkuma KU 429	3	Saraburi	Hypotermes sp.	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073518
JCM 11110	M. Ohkuma KU 444	3	Saraburi	Hypotermes sp.	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073519
JCM 11154	M. Ohkuma KU 420	8	Khao Kitchagoot	Macrotermes annandalei	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073529/AB073537
JCM 11155	M. Ohkuma KU 422	4	Saraburi	Odontotermes logignathus	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073520
JCM 11157	M. Ohkuma KU 434	5	Prachinburi	Odontotermes sp.	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073511
JCM 11158	M. Ohkuma KU 454	1	Saraburi	Macrotermes carbonarius	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073512
JCM 11159	M. Ohkuma KU 455	1	Saraburi	Macrotermes carbonarius	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073513
JCM 11161	M. Ohkuma KU 457	1	Saraburi	Macrotermes carbonarius	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073515
JCM 11162	M. Ohkuma KU 458	1	Saraburi	Macrotermes carbonarius	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073516
JCM 11163	M. Ohkuma KU 460	4	Saraburi	Odontotermes sp.	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073526
JCM 11164	M. Ohkuma KU 461	4	Saraburi	Odontotermes sp.	<i>Termitomyces</i> sp.	AB073527
JCM 13351	M. Ohkuma NS/Mg			Macrotermes gilvus	<i>Termitomyces</i> sp.	AB202123

2) 수집균주의 STR 유전분석

가) STR 염기서열 분석

세포질전환 균주를 육성하기 위해서는 미토콘드리아 DNA (MtDNA)의 유전분석이 우선 되어야 한다. 1차적으로 NCBI (National Center for Biotechnology information)를 통해 *Termitomyces* 관련 미토콘드리아 DNA 등록자료를 살펴보면 *Termitomyces* sp. strain DKA19,

~6, 9, 15, 16이 속해 있으나 1~6, 9는 숙주가 *Odentotermes logignathus*이며 15와 16은 *Odentotermes* sp.으로 밴드 크기가 약간 작다. 7과 8은 3그룹에 속하며 숙주가 *Hypotermes* sp.에 속하고, 11~14는 1그룹에 속하며 숙주는 *Macrotermes carbonarius*에 속한다. 또한 NCBI에 등록된 유전자를 이용한 유전분석을 하였을 때 1그룹은 *Termitomyces microcarpus*가 아니고 *Termitomyces aurantiacus*에 유사성이 높게 나와 이 계통으로 추정된다. 따라서 이 밴드들은 염기서열 분석을 의뢰하였다. *Termitomyces albuminosus* 하고 및 수고, 그리고 *Termitomyces cartilagineus* ATCC58865는 별다른 특징을 찾을 수 없었다. 하고와 수고를 배양하였을 때 하고가 좀 더 빨리 성장하였으나 대치대양할 때는 대치선이 나타나지 않았다. 그렇지만 여기서는 밴드의 있고 없고의 차이를 보여져 좋은 세포질전환 마커로 사용할 수 있을 것이라 사료된다 (Fig. 2-2).

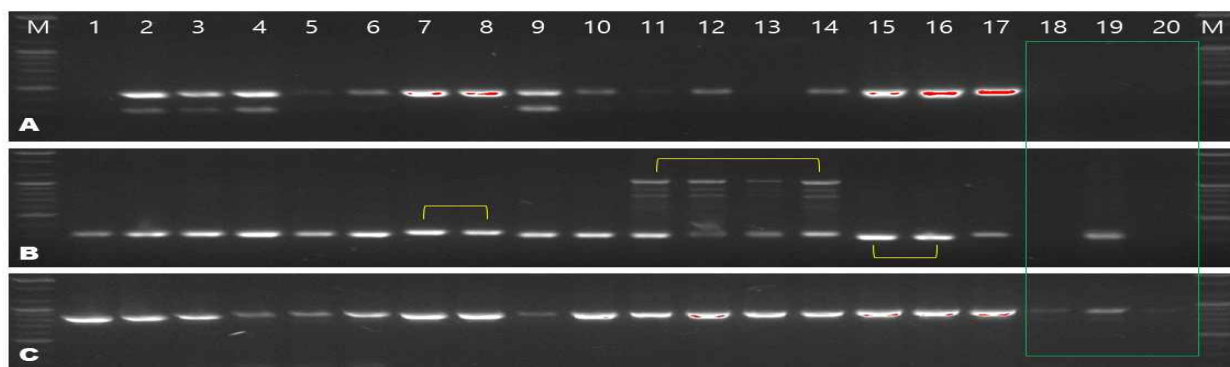


Fig. 2-2. *Termitomyces* MtDNA endonuclease의 STR 분석. A: Ta-1F/Ta-1R, B: Ta-2F/Ta-2R, C: Ta-3F/Ta-3R. M: 100bp marker, 1~17: *Termitomyces* sp. JCM 11084, 11091, 11092, 11093, 11094, 11095, 11096, 11097, 11155, 11157, 11158, 11159, 11162, 11163, 11164, 11110, 18: *Termitomyces cartilagineus* ATCC 58865, 19: *Termitomyces albuminosus* 하북, 20: *Termitomyces albuminosus* 수고.

3) ITS 영역을 이용한 유연관계 분석

가) 흑계종(*Termitomyces albuminosus*)의 유사도 분석

계놈 DNA는 High Efficient Plant Genomic DNA purification Kit(Toyobo Co., LTD)을 사용하여 추출하였습니다. 5.8S rDNA (ITS) 영역의 내부 전사된 스페이서 1 및 2를 포함하는 뉴클레오티드 rDNA 영역이 계통발생 분석을 위해 선택하였다. 범용프라이머 쌍 ITS1/ITS4 (White et al. 1990)는 ITS 증폭한 결과 Fig 1-13과 같다.

PCR 반응은 Thermocycler (BioRad Co., LTD)에서 수행되었으며 PCR 프로그램은 다음과 같다. 94°C에서 5분 동안 사전 변성; 이어 94°C에서 50초 동안 변성, 50°C에서 50초 동안 어닐링, 72°C에서 60초 동안 신장하여 35사이클로 반복하였다. 그 후 72°C에서 10분 동안의 최종 신장을 포함시켰다. PCR 산물은 Macrogen사에 의뢰하여 시퀀싱했습니다. 증폭에 사용된 것과 동일한 프라이머를 사용하였다. “흰개미버섯(흑계종)“과 *Oudemansiella*의 동종 종과의 관계를 이해하기 위해 NCBI/GenBank에서 해당 종의 ITS 서열을 검색한 다음 새로 생성된 서열과 비교하였다. ITS 시퀀스는 MEGA v6.0 program으로 정렬하였고 phylogenetic tree를 작성하였으며 분석결과 Fig. 1-14와 같다. 이 결과에서는 *Hymenopellis raphanipes*로 확인되었으나 *Hymenopellis raphanipes* (Petersen, 2010)는 최근에 붙여진 이름이라 중국에서는 이전의 이름인 *Oudemansiella raphanipes* (Pegler & Young, 1987)를 사용하고 있어 우리도 *Oudemansiella raphanipes* KMCC04978로 명명(이하 사용)하였다.

나) 수집된 계종버섯 종(*Termitomyces* sp.)의 유사도 검정

*Termitomyces microcarpus*은 아미노산 함량이 높아 육종재료로 활용하기 위해 *Termitomyces* sp. 중에서 태국에서 분리하여 일본 RIKEN BRC에서 JCM (Japan Collection of Microorganisms)에서 분양받아 17개 균주를 성장시켜 이에 대한 유연관계를 살펴보기 위해 ITS 영역을 이용하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱 data는 Fig. 2-3와 같으며 유사도는 Fig. 2-4와 같다. 또한 기존에 알려진 유전자와 유연관계를 살펴보기 위해 genbank를 이용하여 유사도를 보고 매우 높은 유사성을 보이는 유전자 위주로 data를 수집하여 MEGA6를 이용하여 유전적 연관성 분석을 한 결과 Fig. 2-5과 같다.

> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11084
ATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAATTCC TGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGTATTGG CCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATCTGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATAAATCTCAACCTAACCCAGC TTTTGCGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGGCTTTGCGGGCTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAAATGCATTAGTGGAAACCCCTTTGTTGACCT GTTCCCTGGTGTGATAAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTTAATGGGCTTTTTCTGCTTCTAACCTTGTGTCCACCCTGTACGGGGTGAACGC TTTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGT
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11091
ATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAATTCC TGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGTATTGG CCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATCTGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATAAATCTCAACCTAACCCAGC TTTTGCGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGGCTTTGCGGGCTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAAATGCATTAGTGGAAACCCCTTTGTTGACCT GTTCCCTGGTGTGATAAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTTAATGGGCTTTTTCTGCTTCTAACCTTGTGTCCACCCTGTACGGGGTGAACGC TTTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGC
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11092
ATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAATTCC TGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGTATTGG CCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATCTGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATAAATCTCAACCTAACCCAGC TTTTGCGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGGCTTTGCGGGCTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAAATGCATTAGTGGAAACCCCTTTGTTGACCT GTTCCCTGGTGTGATAAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTTAATGGGCTTTTTCTGCTTCTAACCTTGTGTCCACCCTGTACGGGGTGAACGC TTTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACC
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11093
ATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAATTCC TGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGTATTGG CCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATCTGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATAAATCTCAACCTAACCCAGC TTTTGCGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGGCTTTGCGGGCTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAAATGCATTAGTGGAAACCCCTTTGTTGACCT GTTCCCTGGTGTGATAAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTTAATGGGCTTTTTCTGCTTCTAACCTTGTGTCCACCCTGTACGGGGTGAACGC TTTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACC
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11094
ATTGATTATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCT GAATTCCTGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGG TTATTGGCCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG AATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATCTGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATAAATCTCAACCT AACCCAGCTTTTGGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGGCTTTGCGGGCTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAAATGCATTAGTGGAAACCCCTTTG TTGACCTGTTCTGGTGTGATAAATTATCTACATCGCGTG
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11095
ATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAATTCC TGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGTATTGG CCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATCTGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATAAATCTCAACCTAACCCAGC TTTTGCGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGGCTTTGCGGGCTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAAATGCATTAGTGGAAACCCCTTTGTTGACCT GTTCCCTGGTGTGATAAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTTAATGGGCTTTTTCTGCTTCTAACCTTGTGTCCACCCTGTACGGGGTGAACGC TTTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGG
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11096
CCTGGTGGGTTGTTGCTGGCCTTAGAGGCATGTGCACGCTGCGCATGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTGGATACCTCCCGAGGGGC AATGACCTCCCGGTTTGGGGGTTGGTGGCCTGGCCAAAGCCGGGTTTTCTGGATTTTCCGGCCATGCATTTTAAACCCCGGAAAAAAGGATTA ATGGTTTTTATTGGCCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGATTTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGGTGTCAATAAAT

CTCAACCTAACCCAGCTTTTGTGAGCTTGGATAGGCTTGGATGTGGGGTTTTGCGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAATGCATTAGTGAACC CTTTGTTGACTTGTCTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTCTAATGGGCCTTTCTGCTTCTAACTCGTATCATCTTTTATAAG GAGGAACGCTTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAG
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11097
CCTGGTGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCTGCCATCGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTGAAAACCTCTCGAGGGGC AATGACCTCTCGGTTTGGGGGTTGCTGCCCTGGCCAAAGCCGGCTTCCCTGGATTTCGGGCTATGCATTTATTATACCCCGAAAGAAAGGATTTAAA AAGGTTTGTATTGGCCTTTGGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAAATGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTAAT CTCAACCTAACCCAGCTTTTGTGAGCTTGGATAGGCTTGGATGTGGGGTTTTGCGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAATGCATTAGTGAACC CTTTGTTGACTTGTCTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTCTAATGGGCCTTTCTGCTTCTAACTCGTATCATCTTTTATAAG GAGGAACGCTTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAGGA
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11110
CCTGGTGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCTGCCATCGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTGGGATACTCTCGAGGG TCAATAACCTCTCGGTTTGGGGGTTGCTGCCCTGTCAAAGCCGGCTTCCCTGCATTTCCGGTCTATGCATTTATTATACCCCGTAAAAAGGATTTA AAAGGCTTTTATTGGCCTTTGGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AGTAATGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTAAT TCTCAACCTAACCCAGCTTTTGTGAGCTTGGATAGGCTTGGATGTGGGGTTTTGCGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAATGCATTAGTGAAC CCTTTGTTGACTTGTCTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTCTAATGGGCCTTTCTGCTTCTAACTCGTATCATCTTTTATAA GGAGGAACGCTTTGACCATTGACCTCAAATCAG
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11155
ATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTTGTGCACGCCCCACCAGCTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAATCC TGCGTGTGCTGCGTGCCTAACCCAGCCAGCTTCCCTGTAATTCGGGCTATGCGGCTTTATTATACCCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGTATTGG CCTTTGGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTAATTCACCTAACCCAGC TTTTGCGAGCTTGGTGGGCTTGGACTGTGGGGCTTTTGGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAATGCATTAGTGAACCCCTTTGTTGACCT GTTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTCTAATGGGCCTTTTCTGCTTCTAAACCTTGTGTTCCACCCTGTACGGGGTGAACGC TTTTTGACCATTGACCTCAA
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11157
ATCAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGCCTCTTATAAGAGGCATTTGTGCACGCCCCACCAGCTTTTACAACCACCTGTGCACCTCATGTATAGACTCTGAA TTCTGGTGTGCTGCGTGCCTAACCCAGCCAGCTTCCCTGTAATTCGGGCTATGCGGCTTTATTATACCCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTTTTGTTA TTGGCCTTTGGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT TGAGAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGAAATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTAATTCACCTAACCCAGC CAGCTTTTGGAGCTTGGTGGGCTTGGACTGTGGGGCTTTTGGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTAAATGCATTAGTGAACCCCTTTGTTGACCT ACCTGTTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTCTAATGGGCCTTTTCTGCTTCTAAACCTTGTGTTCCACCCTGTACGGGGG AACGCTTTTGGACCATTGACCTCAAATCAGGTAG
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11158
CTACTGATTTGAGGTCATTTGTCAAGTGTCTGAGGACGAGTTATAAGAAGCAAACCCATTAATGATCACTAACTGCCCGCAGTGTAGATAATTATCA CACTAGGAACAAAGTCAGCAAAAAGGTCGGCTAATGCATTTAAGGAGAGCCGACTTCTTTGTTGTGAAGCCGCAAAACCCCAAGTCCAGCCTATCCA CCAAAAAATGGATAAGTTGAGAATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTGATGATTAC TGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCGAGAGCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTTGATTAAGGCA CTGAAGGCCACTTAACAACATTCTAATACATTGGTTACGGGGTATATAAGAATGCATAGACCGAAATGAAGGAAAGCTGACTCCAAGAGCACACAGC AGTCCCAGACCGAGGCTCTTTTACTTTTAAAAACCAAAAAAAGAACCTCCAAAAATTAACCCAGCCCAAAAAAGGGGCAAGGTGGTGAIAAAC ATGGCCAGGCTGGACCTTGGCCCTGAAGGCCACCACCACCGAACAAGGTTAATTCATAATGGATCTCCGAGTCCCT
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11159
CAGTGGGTGTCTACCTGATTTGAGGTCATTTGTCAAGTGTCTGAGGACGAGTTATAAGAAGCAAACCCATTAATGATCACTAACTGCCCGCAGTGTGA GATAATTATCACTAGGAACAAAGTCAGCAAAAAGGTCCTCAATGCATTTAAGGAGAGCCGACTTCTTTGTTGTGAAGCCCGCAAAACCCCAAGTCC AAGCCTATCCACCACAAAATGGATAAGTTGAGAATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATT CGATGATTCAGTGAATTCGCAATTCACATTAATCGCATTTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCGAGAGCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTT GATTAAGGCACTGAAGGCCACTTAACAACATTCTAATACATTGGTTACGGGGTATATAAGAATGCATAGACCGAAATGAAGGAAAGCTGACTCCAA GAGCACACAGCAGTCCCAGACCGAGGCTCTTTTACTTTTAAAAATCAAAAAAAGGAACCCCAAAAGTGAACCAACCAAAAGGGGACACAGG TGGTAAAAACCAAGGGCAGGCTGGCCCTTGGCCCTGAAGGCCACCACCAACCAAGGTTAATTCATTAAGGATCCTTCGAG
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11161
CCTGGTGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCAACGTGCACGCTGCCATGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGGCTTGGATCACTCTCGAGGT TCCTTTTTCTTTGATTTTAAAGTAAAAAAGACCCCGGCTGGAACTGCTGTGTCCTTTGGAGTACCTTTCTTACATTTCCGGTCTATGCATT CTTATATACCCGTAACCAAGGATTAAGAGGTTTGTAAAGGGGCTTCAATGCCTTTAATCAAATACAACCTTCAGCACCGGATCTCTTGGCTCTCGCA TCGTTAAAAAACCACCAAAATGCGATAAGTGAATGTGAATGCAAAATTCATGAAATCACCGAAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCTTGGAAATCCAA AAGCAGGCTGTTGAGTGCATTAATAATCCCACTTATCCATTTTGTGGGAAAGGCTTGAACCTGGGGGTTCCGGCTCCACAAACAAAAAATTCG CCCTCTTAAAGGCTTTTATGGGACCTTTTGTGACTTGTCTTAACTGTGATAATTATCTACACTGCGGGCAGTTAGTATCATTAAAGGGTTTTG CTTCTTATAACTCGTCCCAGGAACACTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11162
CCTGGTGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCAACGTGCACGCTGCCATGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGGCTTGGATAACTCTCGAGGT TCCTTTTTCTTTGATTTTAAAAATAAAAAAAGACTCCGCTGGGGAATGGCGGGTGTCTTGGAAATCCGCTTTCCTTACCTTTCCCGTCTATGGCTTC CTATATACCCGTAACCAAGGATTAAGAGGTTTGTAAAGGGGCTTCAATGCCTTTAATCAAATACAACCTTCAGCACCGGATCTCTTGGCTCTCGCA TCGTTAAAAAACCACCAAAATGCGATAAGTGAATGTGAATGCAAAATTCATGAAATCACCGAAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCTTGGAAATCCAA AAGCAGGCTGTTGAGTGCATTAATAATCCCACTTATCCATTTTGTGGGAAAGGCTTGAACCTGGGGGTTCCGGCTCCACAAACAAAAAATTCG CCCTCTTAAAGGCTTTTATGGGACCTTTTGTGACTTGTCTTAACTGTGATAATTATCTACACTGCGGGCAGTTAGTATCATTAAAGGGTTTTG CTTCTTATAACTCGTCCCAGGAACACTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
> <i>Termitomyces</i> sp. JCM 11163

```

ATTATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAAT
TCCTGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTGTTGTTAT
TGGCCTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGAATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTCAATAAATCTCAACCTAACC
AGCTTTTGGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGCTTTTGGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCTAAAATGCATTAATGGAAAACCTTTGTTGA
CTGTTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTGGCTGTTAATGGGCTTTTCTGCTCTAACCTTGTGTTCCACCCTGTTACGGGGTGAA
CGCTTTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAG
>Termitomyces sp. JCM 11164
ATAGTTGGTTGAGCTGTTGCTGGTCTCTTAATAAGAGGCATTGTGCACGCCCCACCACTGTTTTCAACCACCTGTGCACCTCATGTAGACTCTGAATCC
TGGCGTTGCTGCGCTGCCAAGCCAGCCTTCCCTGTAATTCGGGTCTATGCGCTTTTATTATACCCTGTAATGAATGTATCAGAGTGTGTTGTTATTGG
CCTTTGGTGCCTTAAATCAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTAATTGCA
GAATTCAGTGAATCATCGAACCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGAATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTCAATAAATCTCAACCTAACCAGC
TTTTGGAGCTTGGTCGGGCTTGGACTGTGGGGCTTTTGGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCTAAAATGCATTAATGGAAAACCTTTGTTGACCT
GTTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTGGCTGTTAATGGGCTTTTCTGCTCTAACCTTGTGTTCCACCCTGTTACGGGGTGAACGC
TTTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAG

```

Fig. 2-3. ITS sequences of *Termitomyces* sp. JCM series.

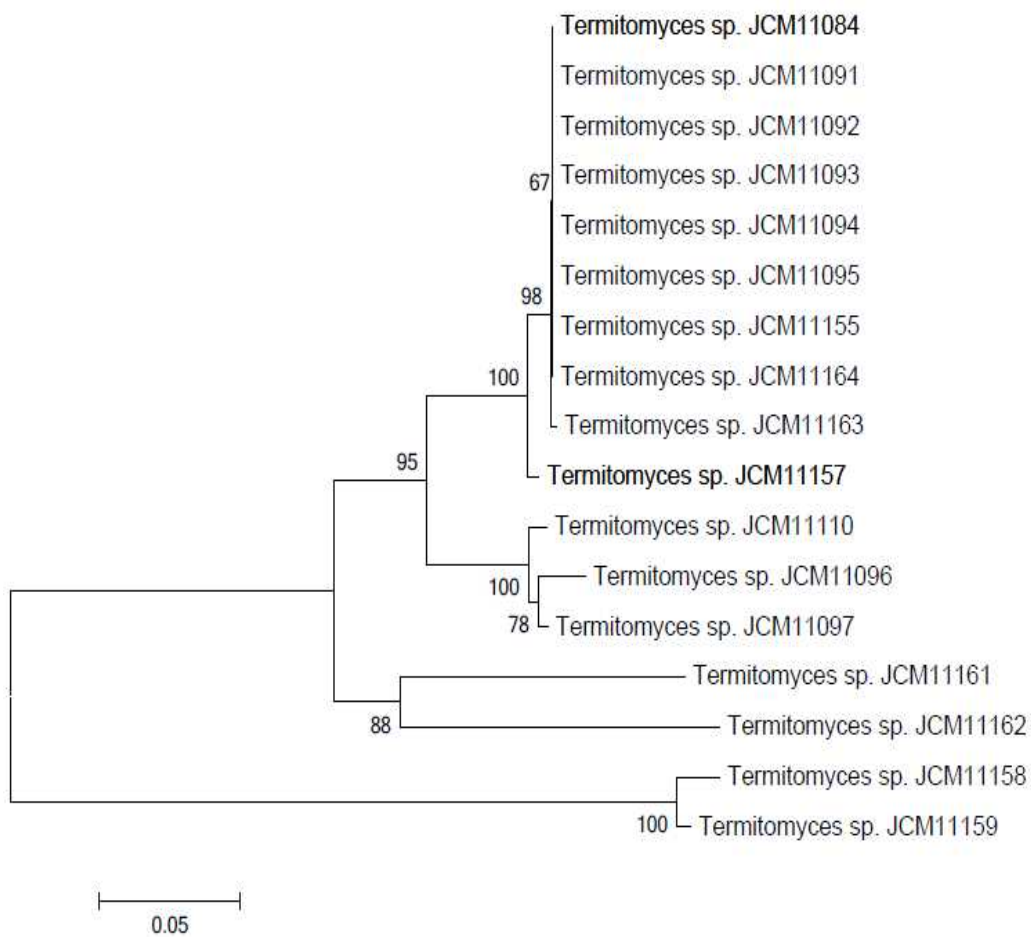


Fig. 2-4. Phylogenetic tree by ITS sequences of 17 *Termitomyces* sp. JCM strains.

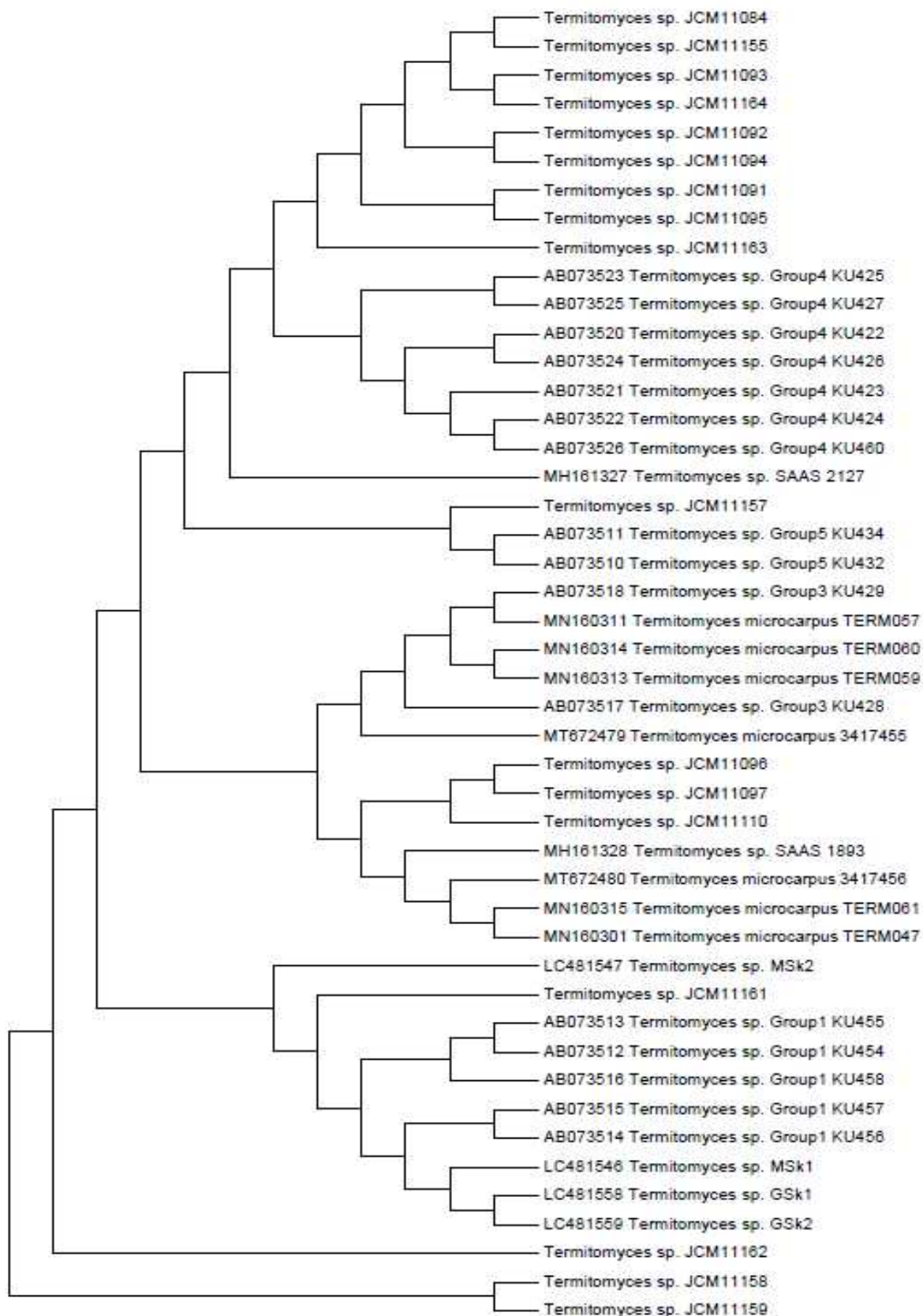


Fig. 2-5. Phylogenetic tree of 17 *Termitomyces* sp. JCM strains and genbank homology genes.

2. 돌연변이 처리에 의한 *Termitomyces* sp. JCM 종의 신품종 개발

돌연변이 처리 방법에는 돌연변이 물질, UV, γ -선 등이 있으며, 대표적으로 UV처리에 의한 품종으로는 새송이(, 이 등,)가 있으며 γ -선 처리는 느티만가닥버섯, 송이 (Murata 등, 2017, 2019, 2020) 등이 있다. 본 실험에서도 γ -선 조사를 통한 균사생장 속도, 효소 가수분해 능력, 자실체 형성 등의 변화 등을 살펴보고자 한다.

가. γ -선 처리에 의한 *Termitomyces* sp. JCM 종의 품종 개발

1) γ -선 조사

버섯은 단포자를 분리하여 교배를 하거나 원형질체를 분리하여 융합함으로써 새로운 균주를 얻고자 노력해 왔다. 이러한 경우는 자실체를 형성하여 단포자를 쉽게 얻을 수 있어야 하거나, 균사가 용이하게 생장이 가능한 경우이다. 그러나 *Termitomyces* sp. JCM 12 균주들은 균사생장이 매우 느려 위의 방법으로 새로운 균주 창출이 어렵다. 따라서 돌연변이 처리에 의해 균사생장이 빠른 균주를 선발함에 있다. PDA 배지에 페트리디쉬 ϕ 90 및 ϕ 60에 접종하여 25°C에서 21일 동안 배양한 후 Table 2-3과 같이 619개의 페트리디쉬에 ^{60}Co 를 방사성 핵종으로 사용하여 500Gy의 선량으로 조사하기 위해 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에 의뢰하여 조사하였다.

2) 균사생장 속도 조사

γ -선이 조사된 균사체는 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 28일간 배양하였다. Fig. 2-6과 같이 배양된 균사체 중에서 2차 생장이 보이는 균사체를 선발하여 재배양하였다. 그 결과 Fig. 2-7처럼 본래의 균주보다 성장속도가 빠른 균주를 선발하였고 균사 성장 속도를 조사한 결과 Table 2-4와 같이 본래의 균주보다 빠른 성장을 보여 이것을 이용하여 최대 성장을 관찰하고 효소 활성, 자실체 형성 등을 연구하기 위해 균사배양 중에 있다.

Table 2-3. Strain list of *Termitomyces* sp. JCM series by γ -ray treatment

균주명	ϕ 90	ϕ 60	균주명	ϕ 90	ϕ 60	균주명	ϕ 90	ϕ 60
JCM 11084	3	35	JCM 11096	4	33	JCM 11159	1	35
JCM 11091	4	30	JCM 11097	4	34	JCM 11161	3	38
JCM 11092	4	33	JCM 11110	3	34	JCM 11162	3	32
JCM 11093	4	35	JCM 11155	4	38	JCM 11163	4	32
JCM 11094	4	33	JCM 11157	4	28	JCM 11164	4	30
JCM 11095	3	30	JCM 11158	4	29	합계	60	559

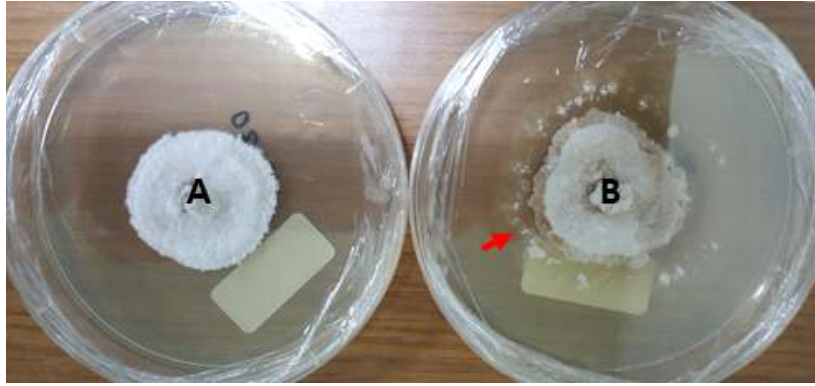


Fig. 2-6. Mycelium induction of *Termitomyces* sp. JCM strains by γ -ray treatment

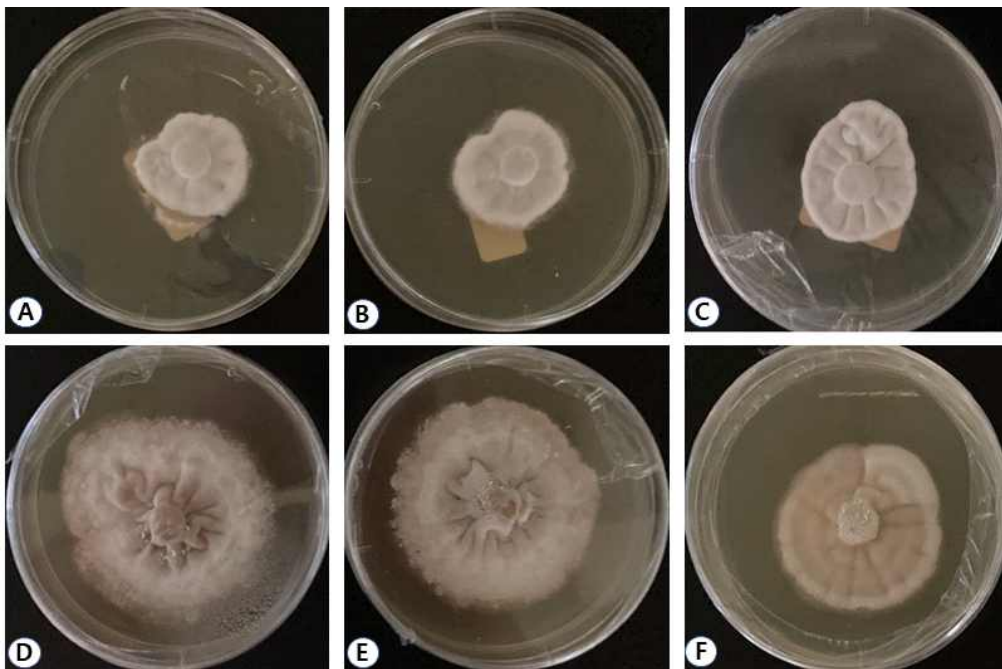


Fig. 2-7. Growth characteristics of *Termitomyces* sp. mycelium in the 25°C, 28 day. A and B : *Termitomyces* sp. JCM 11091, C : *Termitomyces* sp. JCM 11094, D and F : γ -ray treatment of 500 grey, D : *Termitomyces* sp. JCM 11091-20-1, E : *Termitomyces* sp. JCM 11091-29-9, F : *Termitomyces* sp. JCM 11094

Table 2-4. Growth characteristics of *Termitomyces* sp. JCM strains by γ -ray treatment

균주명 \ 균사생장	21일 배양 (mm)		28일 배양 (mm)	
	Control	γ -ray treatment	Control	γ -ray treatment
JCM 11091-20-1	15.3±.058	21.3±1.15	20.3±3.21	30.7±3.21
JCM 11091-29-9	15.3±0.58	25.0±1.00	20.3±3.21	29.6±2.08
JCM 11094-9-8	14.3±0.58	15.6±1.15	20.0±0.00	21.0±1.00

3. 기능성강화 신제품 개발

기능성이란? “인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것” 이라고 말하고 있다. 영양소의 기능은 아미노산 및 단백질을 생리학적 기능은 2차 대사물질 페놀류 등의 생활습관병(대사증후군)으로 면역기능에 관여하는 항산화, 항염증, 항비만을 말하고 있어 이에 대한 기능성을 높이는 데 중요하다.

현재 모본의 아미노산을 분석하여 이것보다 높은 교잡 계통을 선발하고자 한다. 또한 *Termitomyces* sp. JCM 종의 돌연변이에 의한 고 아미노산 함량을 가진 계통을 선발하며, 원형 질체 융합을 통한 *Termitomyces* sp. JCM 종의 면역기능이 증가한 계통의 선발하고자 한다.

참고문헌

- Abe T, Kazama Y, Hirano T. 2015. Ion beam breeding and gene discovery for function analyses using mutants. *Nucl. Physics News*, 25, 30-34.
- Das SK, Mandal A, Datta AK, Gupta S, Paul R, Saha A, Sengupta S and Dubey PK. 2013. Nucleotide Sequencing and Identification of Some Wild Mushrooms. *Scientific World J.* <https://doi.org/10.1155/2013/403191>.
- Frøstlev TG, Aanen DK, Laessøe T, Rosendahl S. 2003. Phylogenetic relationships of *Termitomyces* and related taxa. *Mycol Res.* 107(Pt 11): 1277-86.
- Murata H, Abe T, Ichida H, Hayashi Y, Yamanaka T, Shimokawa T, Tahara K. 2018. Heavy-ion beam mutagenesis of the ectomycorrhizal agaricomycete *Tricholoma matsutake* that produces the prized mushroom “*matsutake*” in conifer forests. *Mycorrhiza*, 28(2): 171-177. DOI10.1007/s00572-017-0810-z.
- Murata H, Nakano S, Yamanaka T, Shimokawa T, Abe T, Ichida H, Hayashi Y, Tahara K, Ohta A. 2019. Conversion from mutualism to parasitism: a mutant of the ectomycorrhizal agaricomycete *Tricholoma matsutake* that induces stunting, wilting and root degeneration in seedlings of its symbiotic partner *Pinus densiflora in vitro*. *Botany*, 97, 463-474.
- Murata H, Yamanaka T, Shimokawa T, Ohta A. 2020. Morphological changes in a γ -ray irradiation-induced mutant of the ectomycorrhizal agaricomycete *Tricholoma matsutake* during *in vitro* spawning on barley-based substrates. *Bulletin of FFPRI*. 19(2) : 153-157.
- Oyetayo VO and Bernard Paul B. 2012. Wild *Termitomyces* Species Collected from Ondo and Ekiti States Are More Related to African Species as Revealed by ITS Region of rDNA. *Scientific World J.* <https://doi.org/10.1100/2012/689296>.
- Sathesh-Prabu C, Lee YK. 2011. Mutation Breeding of Mushroom by Radiation. *Journal of Radiation Industry* 5(4): 285~295.
- Sun L, Liu Q, Bao C, Fan J. 2017. Comparison of Free Total Amino Acid Compositions and Their Functional Classifications in 13 Wild Edible Mushrooms. *Molecules*. 22, 350, DOI:

10.3390/molecules22030350.

Tappab Y, Ohkuma M, Johjima T, Maeda Y, Moriya S, Inoue T, Suwanarit P, Noparatnaraporn N, and Kudo T, 2002. Molecular Phylogeny of Symbiotic Basidiomycetes of Fungus-growing Termites in Thailand and Their Relationship with the Host. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66(5): 1159–1163.

제 3 절 흰개미버섯(흑계종)의 생리활성 물질 분석

1. 흰개미버섯 자실체로부터 물질추출과 분획

가. 용매추출과 분획

흰개미버섯(흑계종)으로부터 생리활성 물질을 추출하기 위하여 혼합용매로 1차추출물을 얻고, 물질의 용해도를 이용하여 분획을 실시했다. Ethylacetate, methanol 그리고 H₂O를 사용하여 각각 TA1, TA2, TA3로 명명하여 회수하고, 용매추출 이후의 버섯 잔유물을 열수 추출하여 열수추출물 TA4를 얻었다(Fig. 3-1). 극성을 높여가며 용해물을 이용하여 에 따른 과 열수추출을 실시하였다. 유기용매 추출은 계종버섯 25 g에 CH₂Cl₂와 MeOH 혼합용매 250 mL를 넣고, 초음파 추출법으로 3회 반복 추출을 실시하였다. 유기용매 추출 후에 열수추출을 위하여 버섯자실체를 완전 건조한 다음, H₂O 300mL를 넣고 열수환류추출을 반복 실시하여 열수추출물을 얻었다 (Fig. 3-1).

각 분획물과 열수 추출물은 냉장 보관하면서 물질 분리와 assay의 시료로 사용하였다.

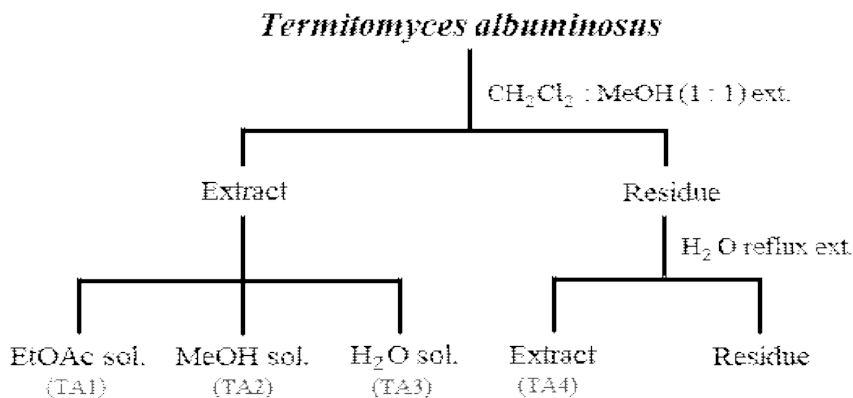


Fig. 3-1. 흰개미버섯(흑계종) 자실체로부터 용매추출과 용해도에 따른 물질 분획

2. 자실체 추출물 용매 분획물의 항산화활성 측정

흰개미버섯 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 양성대조군은 ascorbic acid를 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 농도로 처리하여 표준곡선을 작성하고, 계종버섯 추출물의 라디칼 소거능을 비교하였다. MeOH에 용해시킨 102 μM DPPH 90 μL 와 농도별(10 μg , 30 μg , 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)로 준비한 시료를 10 μL 넣고 충분히 혼합한 후 Epoch Microplate Spectrophotometer(BioTek Instruments Inc.)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래 식을 이용하여 백분율로 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = (1 - \text{absorbance of sample} / \text{absorbance of control}) \times 100$$

가. TA1, TA2, TA3, TA4의 항산화활성

1) DPPH radical scavenging activity 측정

용매분획물과 열수 추출물 각각의 항산화활성을 DPPH radical scavenging activity로 측정하였다. EtOAc 분획물(TA1)과 H₂O분획물(TA3)의 DPPH 라디칼 소거능 IC₅₀값은 각각 2.36 mg/mL과 6.14 mg/mL로 다소 낮게 나타났으나, MeOH 분획물(TA2)과 열수 추출물(TA4)의

IC₅₀값은 각각 1.93 mg/mL, 1.5 mg/mL로 나타났다. 이는 상황버섯과는 비슷한 활성값이며, 느타리버섯류보다는 높은 항산화 활성을 나타내었다(Table 3-1).

Table 3-1. DPPH free radical scavenging activity by the solvent soluble fractions of the extract from *T. albuminosus*

		DPPH radical scavenging (IC ₅₀ ¹⁾)
Ascorbic acid		0.1 mg/mL
<i>T. albuminosus</i>	TA1	2.36 mg/mL
	TA2	1.93 mg/mL
	TA3	6.14 mg/mL
	TA4	1.5 mg/mL

* TA1: Ethylacetate soluble fraction, TA2: methanol soluble fraction, TA3: H₂O soluble fraction, TA4: Hot water extract. nd: notdetection.¹⁾ Inhibition concentration for 50% free radical scavenging.

2) ABTS radical scavenging activity 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 자유 라디칼이 추출물에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 측정하였다. 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 16~24시간 동안 반응시켰다. 반응물을 PBS를 이용해서 ABTS solution의 흡광도가 734 nm에서 0.7이 되게 희석하였다. 계종버섯 추출물 10 μL를 희석한 ABTS 용액 90 μL에 혼합하여 암실에서 1분간 반응시키고, Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc.)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ascorbic acid를 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 μg/μL 농도로 처리하여 측정한 후 표준곡선을 작성하고 추출물의 라디칼 소거능과 비교하였다. ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 산출되었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = (1 - \text{absorbance of sample} / \text{absorbance of control}) \times 100$$

용매분획물과 열수 추출물 각각의 항산화활성을 ABTS radical scavenging activity를 측정하여 확인하였다. ABTS 라디칼 소거능 측정에서는 MeOH 분획물(TA2)과 열수 추출물(TA4) 모두 1 μg/μL 농도에서 양성대조군과 비교했을 때 90%정도 소거능을 나타냈다(Table 3-2). EtOAc 분획물(TA1) 과 H₂O분획물(TA3)의 ABTS 라디칼 소거능은 약 0.9 mg/mL로 나타났다. 같은 시료임에도 측정법에 따라 항산화 활성 결과 값이 다르게 나타나는 이유는 DPPH는 자유 라디칼이고, ABTS는 양이온 라디칼이라는 것과 함유되어 있는 페놀물질의 종류도 다르기 때문에 기질에 결합하는 정도의 차이에 의해 결과 값이 다른 것으로 판단된다.

Table 3-2. ABTS cation radical scavenging activity by the solvent soluble fractions of the extract from *T. albuminosus*

		ABTS radical scavenging (IC ₅₀ ¹⁾)
Ascorbic acid		0.23 mg/mL
<i>T. albuminosus</i>	TA1	0.9 mg/mL
	TA2	ND
	TA3	0.99 mg/mL
	TA4	ND

*TA1: Ethylacetate soluble fraction, TA2: methanol soluble fraction, TA3: H₂O soluble fraction, TA4: Hot water extract. nd: notdetection.¹⁾ Inhibition concentration for 50% free radical scavenging.

3. 용매분획물로부터 생리활성 물질 분리

추출물을 ethylacetate, methanol 그리고 물을 이용해 용해도에 따라 분획한 다음, 항산화 활성 물질과 항염증 활성 물질을 분리하기 위하여 각종 크로마토그래피법을 실시하였다. 물질 분리 각 단계별 분리된 물질은 항산화활성과 항염증활성을 측정하여 귀속시켜가며 분리를 진행하였고, 항염증활성은 부경대학교 협동과제팀에서 실시하였다. Ethylacetate 용해물, TA1과 methanol 용해물 TA2 물질의 분리도는 Fig. 3-2와 Fig. 3-15에 나타났다.

가. TA1으로부터 항염증 활성물질 분리

1) 1차 column chromatography

버섯 용매추출물의 EtOAc 용해물 TA1을 column chromatography를 실시하여 74개 fraction을 얻었다. 얻어진 fraction은 TLC를 실시하여 R_f 값이 비슷한 물질을 그룹으로 하여 12개의 그룹으로 회수하고(Fig. 3-3), 세포 실험과 항산화 활성검증을 실시하였다.

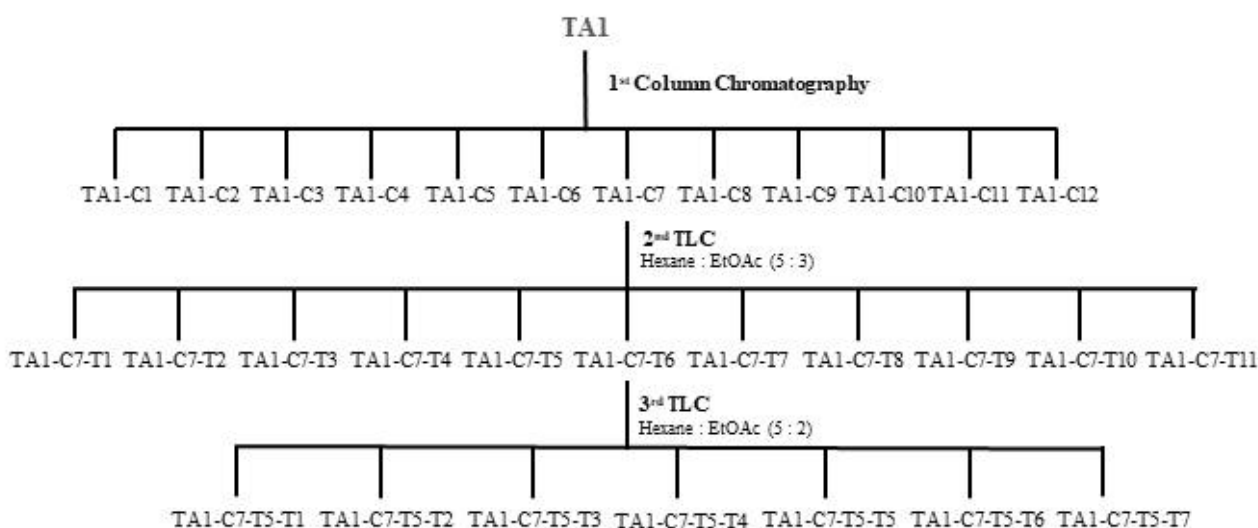


Fig. 3-2. Schematic diagram of separation of anti-inflammatory active substances from EtOAc solubles.

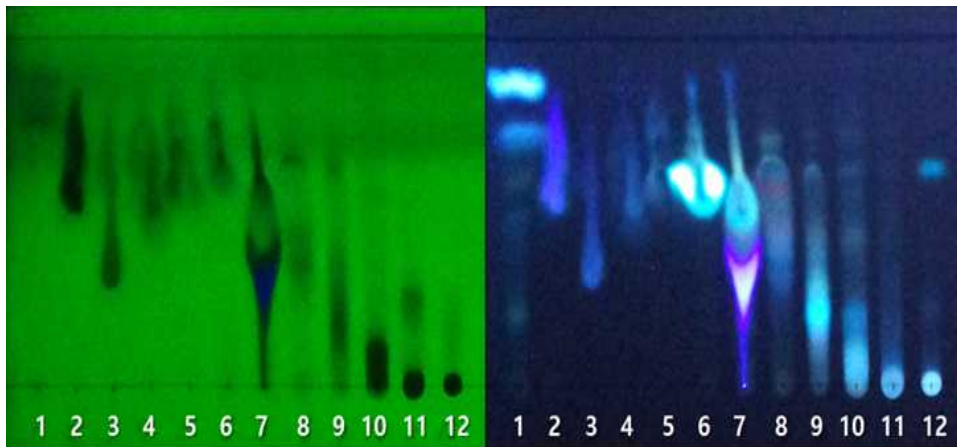


Fig. 3-3. Separation diagram after the 1st column chromatography of TA1.

ethylacetate 용해물을 1차 column을 실시한 후 얻은 12개 분획물 중 TA1-C7 분획물에서 항염증활성이 가장 높게 나타났다. TA1-C7 분획물을 다음 분리과정에 이용하였다.

2) 2차 TLC 분리

Column chromatography법으로 분리된 물질 중 항염증활성이 확인된 물질(TA1-C7)을 TLC법으로 2차 분리를 실시하였다. Short wave(254 nm)와 long wave(365 nm)에 흡광하는 특성에 따라 10개 밴드로 분리하였으며(Fig. 3-4), 각 밴드의 물질을 회수하여 항염증활성을 조사한 결과 No 5번과 No 6번 물질에서 활성이 높게 나타났다(Fig. 3-5. 3-6).

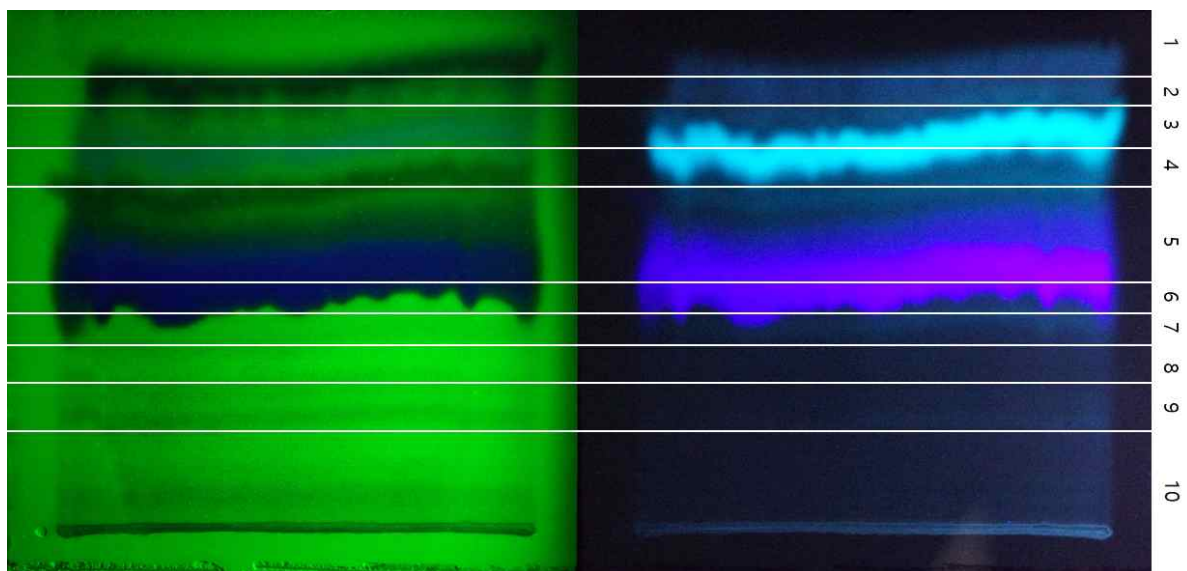


Fig. 3-4. Material separation diagram after 2nd TLC of TA1-C7.

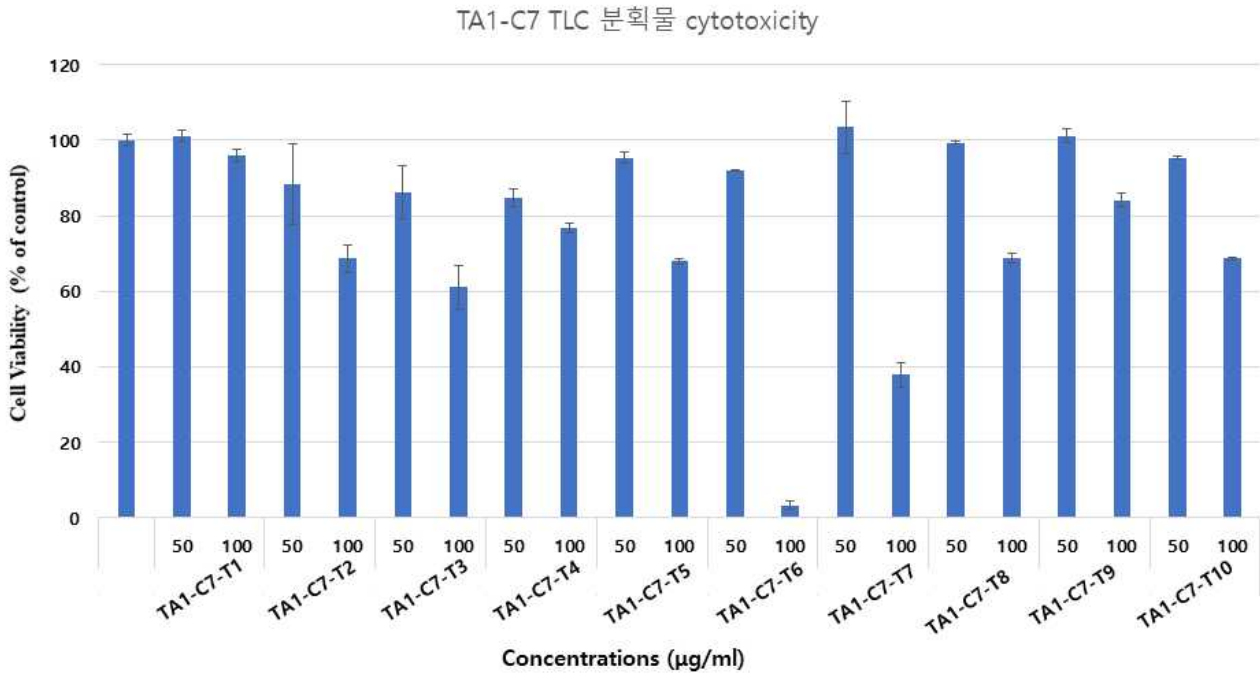


Fig. 3-5. Cytotoxicity of 2nd TLC fractions of TA1-C7 on RAW 264.7 cells.

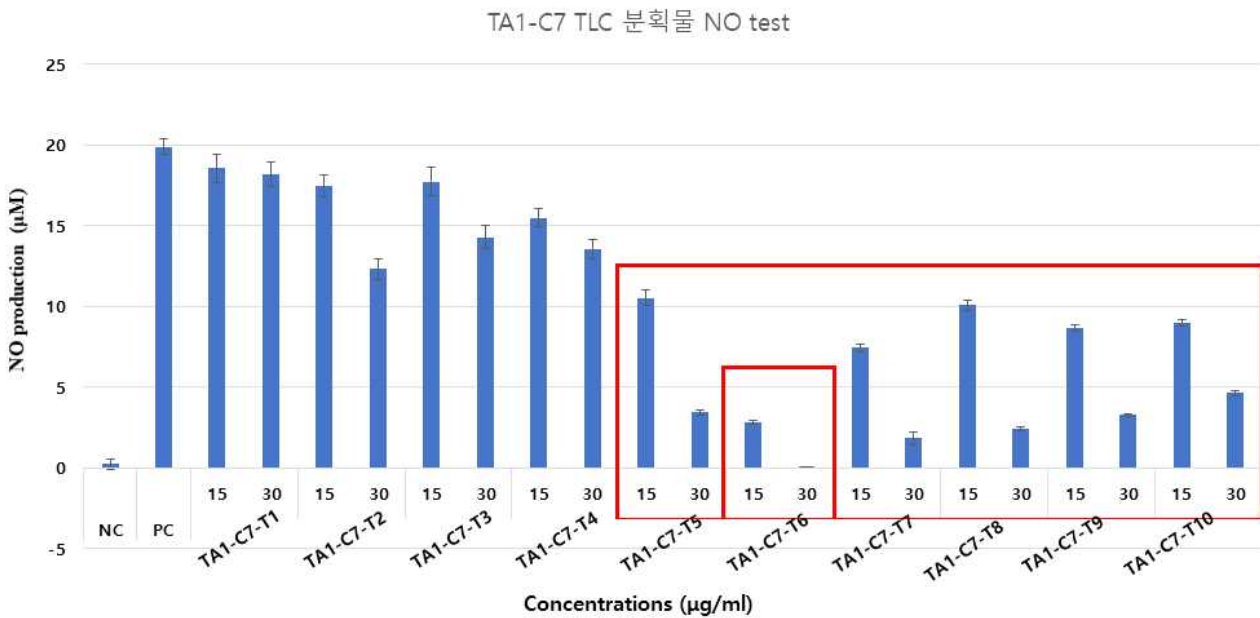


Fig. 3-6. Inhibitory capacity for nitric oxide production of 2nd TLC fractions of TA1-C7 on RAW 264.7 cells.

3) 3차 TLC 분리

2차 TLC에서 활성이 확인된 물질 중 TA1-C7-T6은 3차 TLC를 실시하였다. 2차 TLC에서도 1차 TLC와 같은 방법으로 물질을 확인한 후 6개의 밴드로 물질을 분리하여 항염증 활성을 조사하였다(Fig. 3-7).

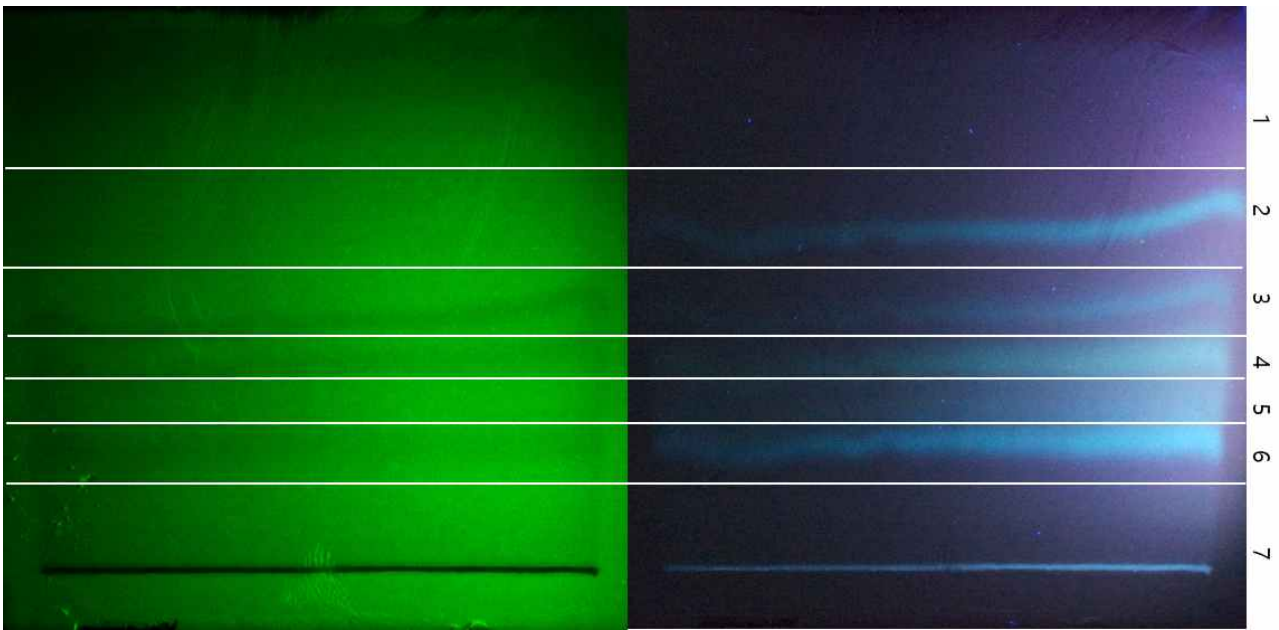


Fig. 3-7. Material separation diagram after 3rd TLC.

TA1의 3rd TLC 분획물 7종에 대하여 세포 독성 및 항염증 활성을 확인한 결과 Fig. 3-8과 Fig. 3-9에 나타났다. 분획물 모두 DMSO에 용해시키고, RAW 264.7 macrophage cell에 처리하여 세포 독성 및 항염증 활성을 확인하였다.

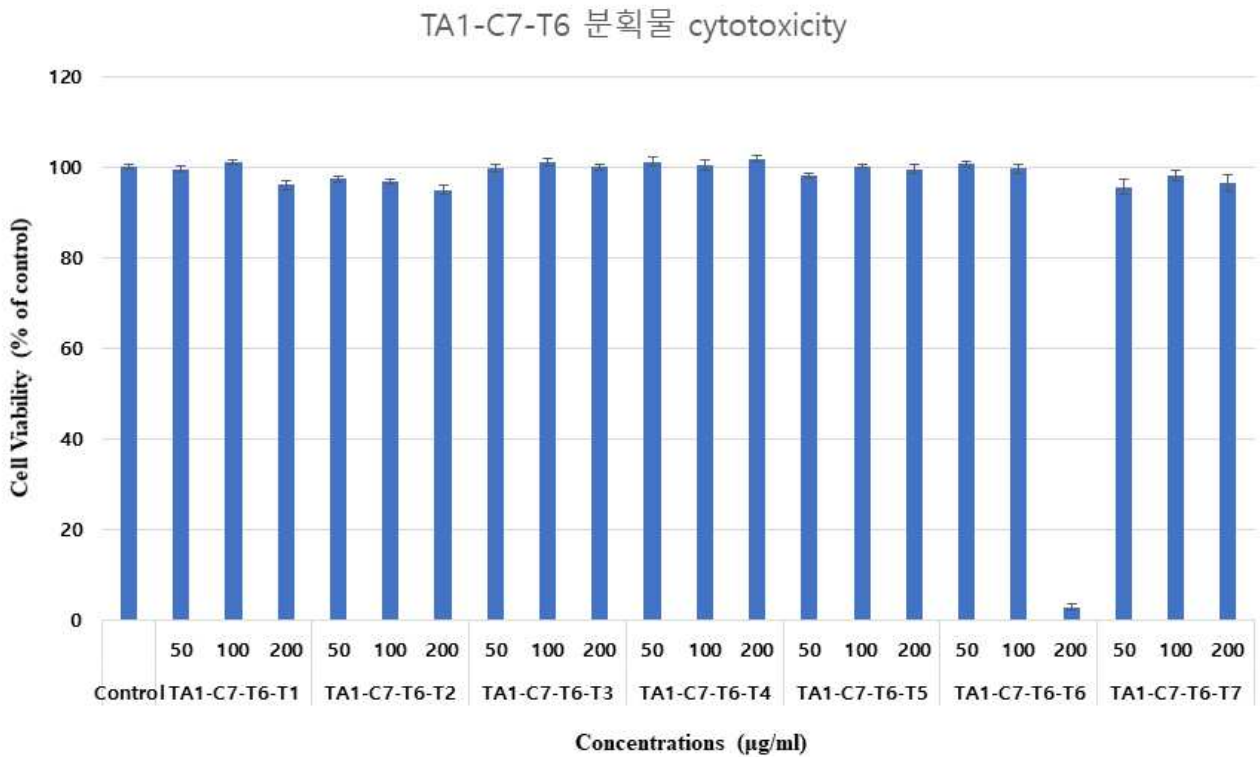


Fig. 3-8. Cytotoxicity of 3rd TLC fractions of TA1-C7-T6 on RAW 264.7 cells.

세포 독성 확인 결과 TA1-C7-T5-T6이 200 µg/ml의 농도에서 독성을 나타냈으나, 전

체적으로는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 독성이 없음을 확인하였다. 세포 독성 결과를 바탕으로 항염증 실험은 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 진행하였다. 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 독성이 높게 나타났던 TA1-C7-T5-T6 분획물의 경우, 안전성 확인을 위하여 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 다시 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, TA1-C7-T5-T6 분획물도 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 세포 독성이 없는 것을 확인하였다.

염증 반응의 marker인 nitric oxide 생성 억제능을 확인하여 각 분획물의 항염증 활성도를 확인한 결과, TA1-C7-T5-T5, TA1-C7-T5-T6, TA1-C7-T5-T7 분획물에서 뚜렷한 항염증 활성을 확인할 수 있었다. TA1-C7-T5-T6 분획물의 경우 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 독성을 보였으므로 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 농도를 낮추어 다시 항염증 활성을 확인하였다.

그 결과 TA1-C7-T5-T6 분획물의 경우 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서도 뚜렷하게 항염증 활성을 보였으며, 이번 분획물 중 가장 뛰어난 항염증 효과를 세포 독성이 없는 저농도에서도 보였으므로 다음 분리 과정의 시료로 사용하였다.

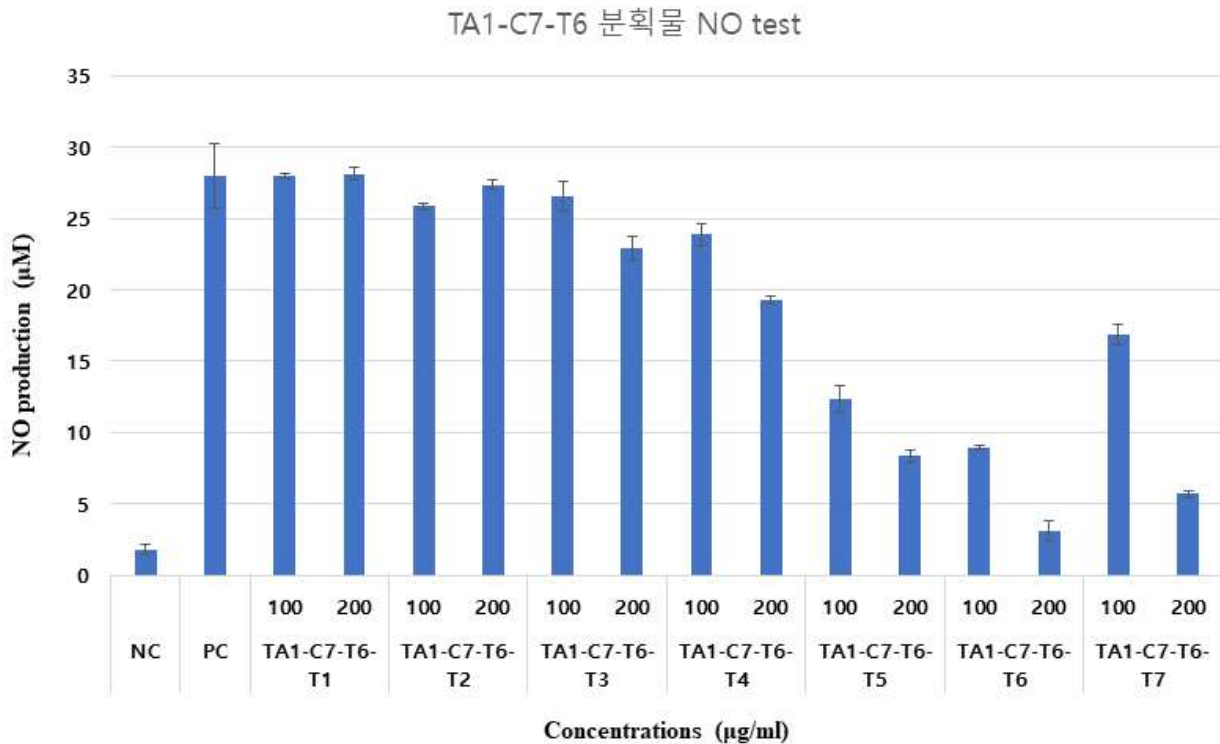


Fig. 3-9. Inhibitory capacity for nitric oxide production of 3rd TLC fractions of TA1-C7-T6 on RAW 264.7 cells.

4) 4차 TLC 분리

3차 TLC에서 활성이 확인된 물질 TA1-C7-T6-T6 물질을 4차 TLC로 물질을 분리했다. 4차 TLC에서도 이전의 TLC와 같은 방법으로 물질을 확인한 후 6개의 밴드로 물질을 분리하여 항염증 활성을 조사하였다(Fig. 3-10).

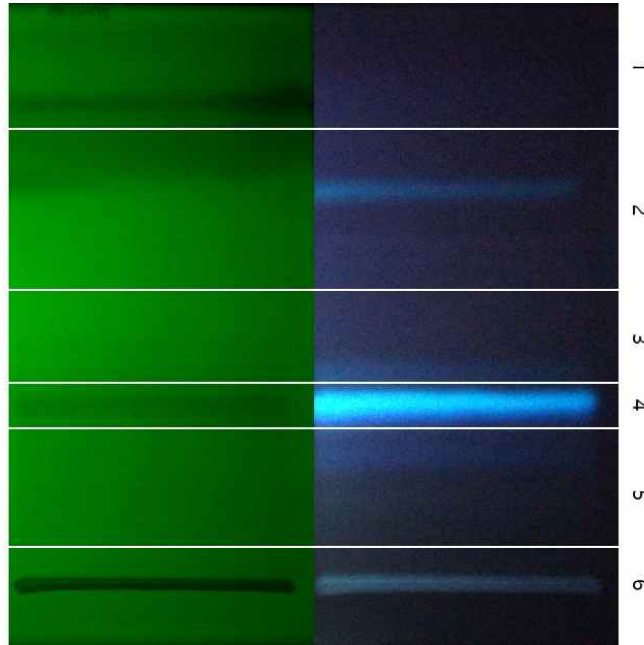


Fig. 3-10. Material separation diagram after 4th TLC.

4th TLC에서 분획한 물질을 TA1766-1에서부터 TA1766-6까지 명명하고 세포독성과 항염증활성을 측정하였다.

세포 독성을 확인 결과 TA1755-4를 제외한 나머지 5종의 fraction의 경우 30 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 농도에서는 큰 독성을 보이지 않고 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 일부 약간의 독성이 나타났다. TA1766-4의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 높은 독성이 나타나 항염증 실험 시에 TA1766-4는 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 실험을 진행하고, 나머지 fraction의 경우 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 실험을 진행하였다.

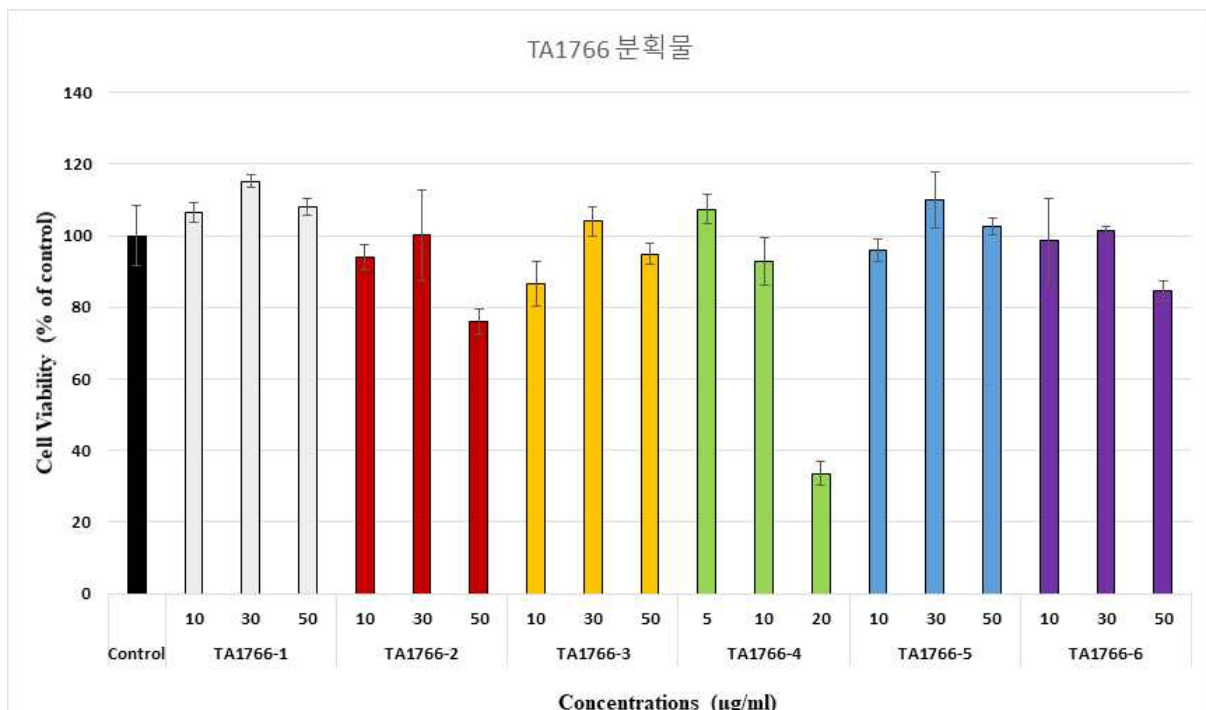


Fig. 3-11. Cytotoxicity of 4th TLC fractions of TA1C766 on RAW 264.7 cells.

TA1766-6을 제외하고는 전체적으로 항염증 효과가 나타나는 것을 확인하였으며, TA1766-4는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 높은 항염증 효과를 나타내지만 독성에 대한 우려가 다소 있다. TA1766-6을 제외하고는 전체적으로 비슷한 항염증 효과를 보이거나 TA1766-3이 그 중 우수한 항염증 효과를 나타냈다(Fig. 3-11, 3-12).

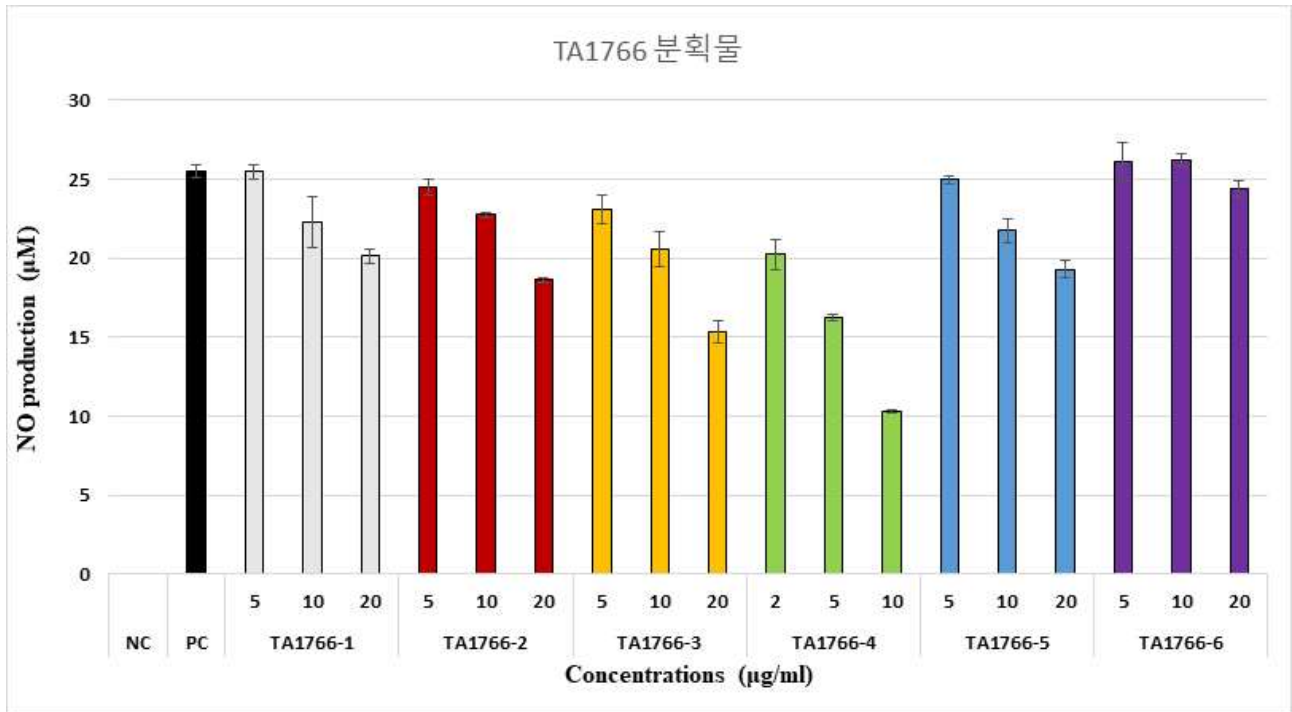


Fig. 3-12. Inhibitory capacity for nitric oxide production of 3rd TLC fractions of TA1766 on RAW 264.7 cells.

나. TA1로부터 항산화 활성물질 분리

1) Triangular fractional crystallization method

Ethylacetate 용해물을 1차 column chromatography와 2차 TLC를 실시한 다음 항산화활성이 나타난 TA1-C7-T5물질을 이용하여 triangular fractional crystallization 방법으로 항산화활성물질을 결정을 생성시켜 순수분리하였다(Fig. 3-13). Hexane과 EtOAc 혼합용매를 이용하여 저온처리와 침전법으로 순수한 결정이 얻어질 때까지 결정화를 실시하였다(Fig. 3-14). 삼각분별결정법으로 얻어진 결정체를 TA1-C7-T5-C로 명명하였다.

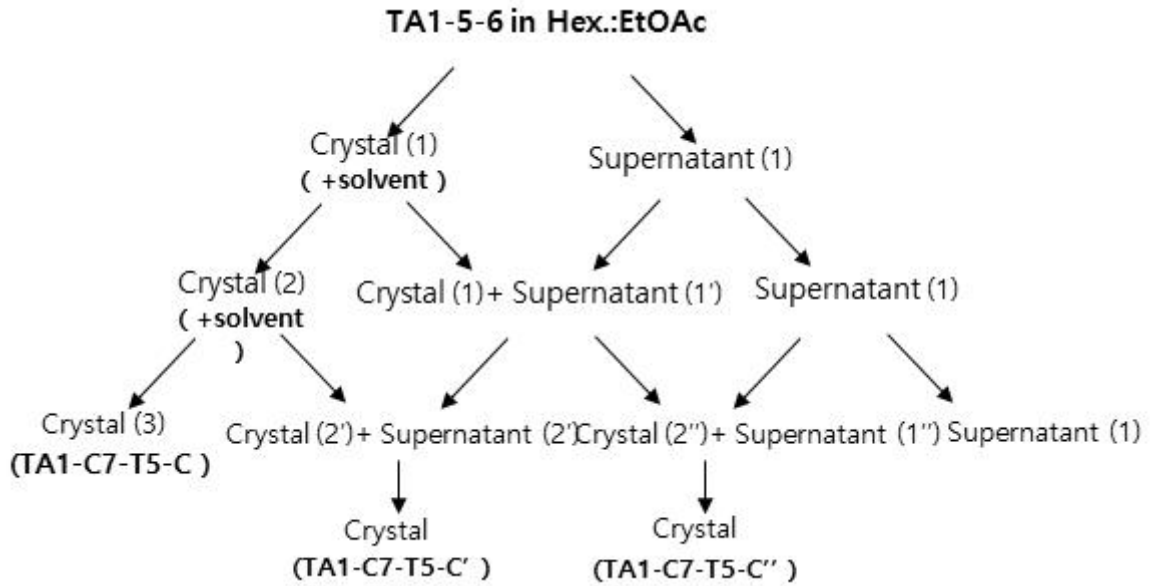


Fig. 3-13. Separation of antioxidant from TA1-C7-T5 fraction by triangular fractional crystallization method.

2) TA1-C7-T5-C 순수도 확인

삼각분별결정법으로 얻은 결정(TA1-C7-T5-C)을 EtOAc에 다시 용해시킨 다음 물질의 순수도를 확인하기 위하여 TLC와 GC/MS분석을 실시하였다. TA1-C7-T5-C의 순수도를 확인하기 위하여 Al-TLC를 Hex.:EtOAc(5:3)으로 전개시킨 결과, R_f 0.5에서 single spot을 확인할 수 있었다.(Fig. 13)

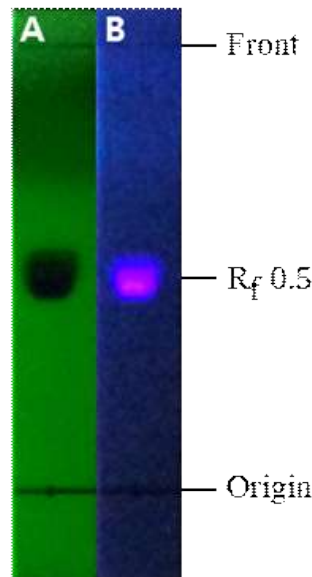


Fig. 3-14. Confirmation of purity of TA1-C7-T5-C by Al-TLC.

3) TA1-C7-T5-C GC-MS 분석

삼각결정법으로 얻은 TA1-C7-T5-C를 GC-MS 분석한 결과, R_t 19.34 min에서 single peak를

확인할 수 있었으며, MS 분석 결과 분자량 396으로 확인이 되었고, ergosterol로 동정되었다(Fig. 3-15).

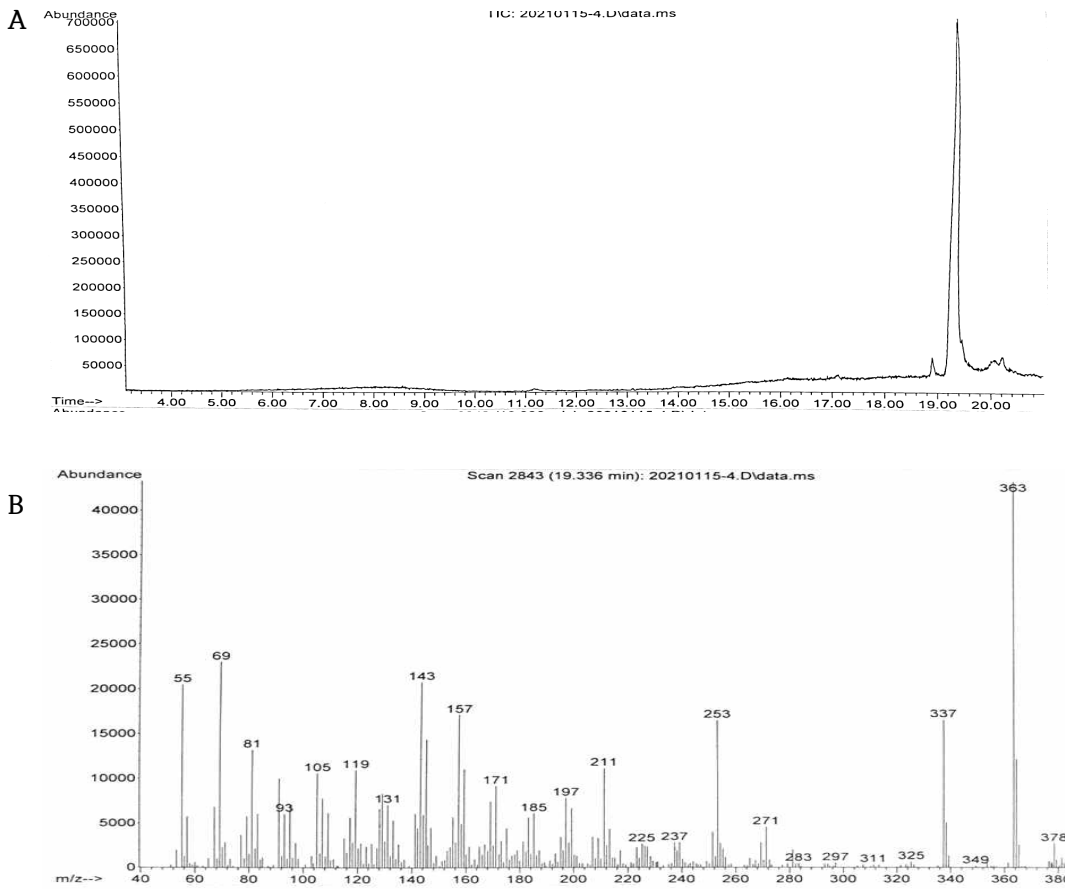


Fig. 3-15. GC/MS analysis of TA1-C7-T5-C.

A: GC chromatogram, B: EI-MS spectrum

4) TA1-C7-T5-C radical scavenging activity

삼각분별결정법으로 순수분리한 TA1-C7-T5-C(ergosterol) 물질의 항산화활성을 DPPH radical scavenging activity로 조사하였다. Negative control은 시료를 용해시킬 때 사용한 DMSO로 하고, positive control은 ascorbic acid를 사용하였으며, ethylacetate 용해물(TA1)로부터 분리과정 중의 물질들을 이용하여 라디칼소거능을 조사하였다. 그 결과 불순물이 제거되고, 분리단계를 거칠수록 항산화 활성도 증가하였으며, ergosterol (TA1-C7-T5-C)는 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 32%로 높은 라디칼 소거활성이 나타났다(Fig. 3-16).

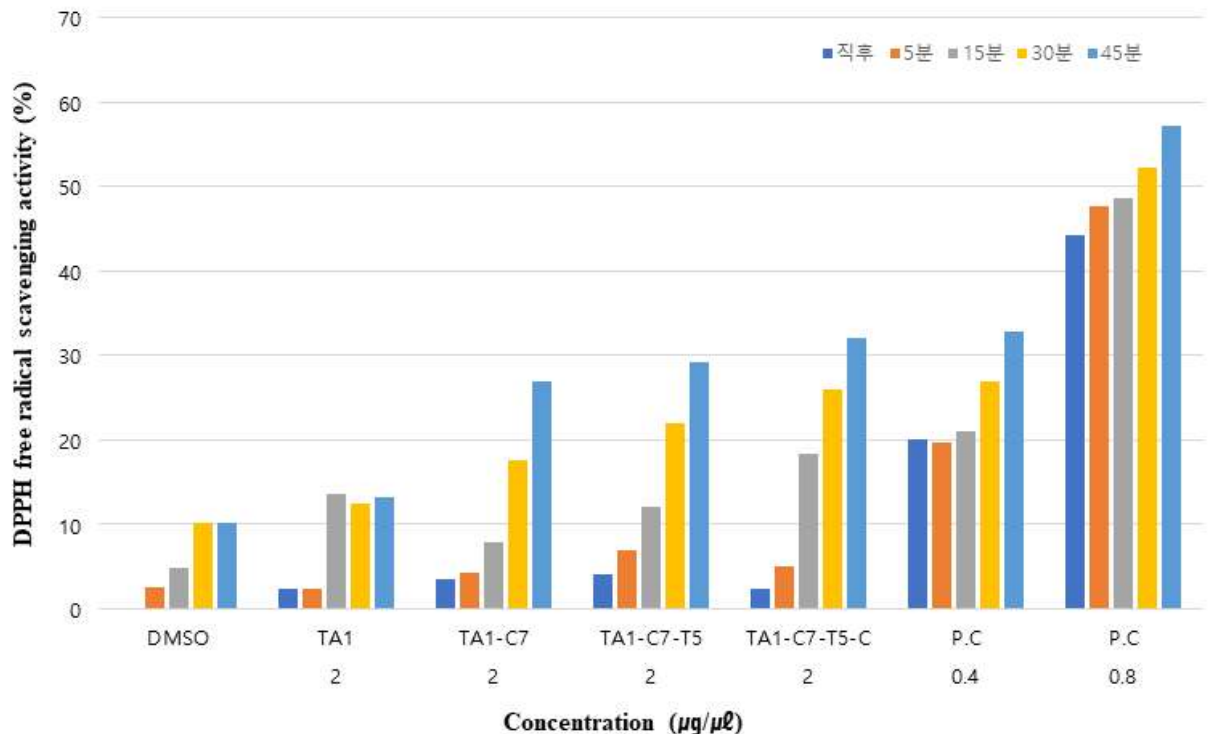


Fig. 3-16. DPPH radical scavenging activity of TA1, TA1-C7, TA1-C7-T5, and TA1-C7-T5-C.

다. Methanol 용해물로부터 생리활성물질 분리

흰개미버섯 자실체를 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 혼합용매로 추출한 다음 농축하고, ethylacetate 용해물을 분획하여 회수한 다음, methanol로 용해시켜 얻은 물질(TA2)을 이용하여 항산화활성물질과 항염증 물질을 분리하였다(Fig. 3-17).

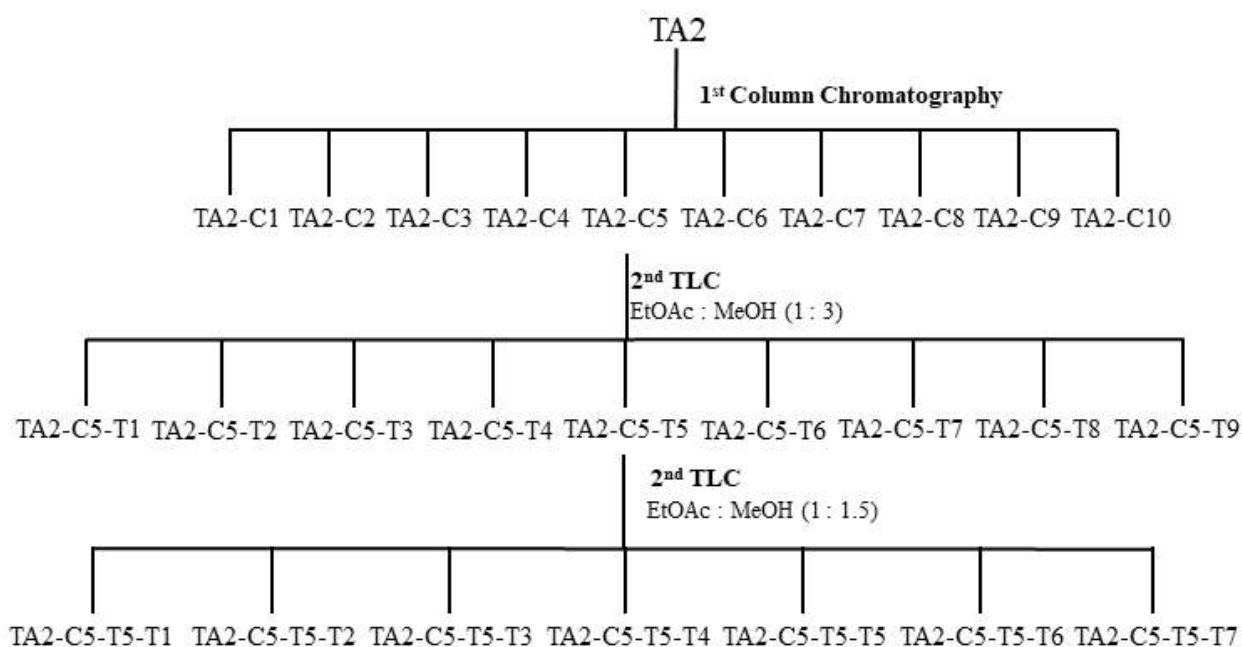


Fig. 3-17. Schematic diagram of separation of anti-inflammatory active substances and anti-oxidants from MeOH solubles.

1) 1차 column chromatography

TA2 물질을 silica column chromatography법으로 1차 분리를 실시하였다. 용출 용매는 EtOAc와 MeOH 혼합용매로서 순차적으로 극성을 높여가며 58개의 fraction을 얻었다. 얻어진 fraction의 분리 패턴을 알아보기 위하여 TLC를 실시하여 R_f 값이 비슷한 물질을 그룹으로 하여 11개의 그룹으로 나뉘 회수하고, TLC로 물질의 pattern을 알아보았다(Fig. 3-18). 회수한 11개 분획물은 세포 실험과 항산화 활성실험을 실시하였다.

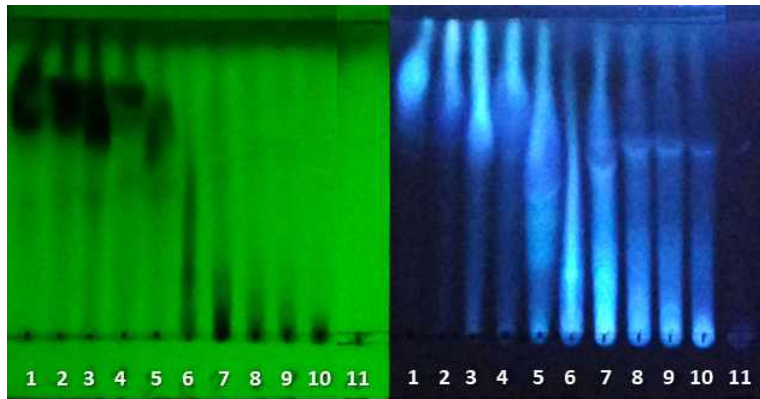


Fig. 3-18. Separation diagram after the 1st column chromatography of TA2.

2) TA2-C5 물질의 DPPH 라디칼 소거활성

Methanol 용해물 TA2를 1차로 column chromatography를 실시한 다음 얻은 분획물 TA2-C1 ~ TA2-C11 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 조사했다. Positive control(P.C)는 ascorbic acid, negative control은 시료녹일 때 사용한 DMSO를 사용했다. 소거능을 측정할 결과 TA2-C5, TA2-C11에서 DPPH radical scavenging 활성이 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 각각 63%, 48%로 높게 나왔다(Fig. 3-19). 또한 TA2-C5 radical scavenging IC₅₀값은 4.31 mg/mL, TA2-C11의 DPPH radical scavenging IC₅₀값은 9.06 mg/mL로 나타났다(Table. 3-3).

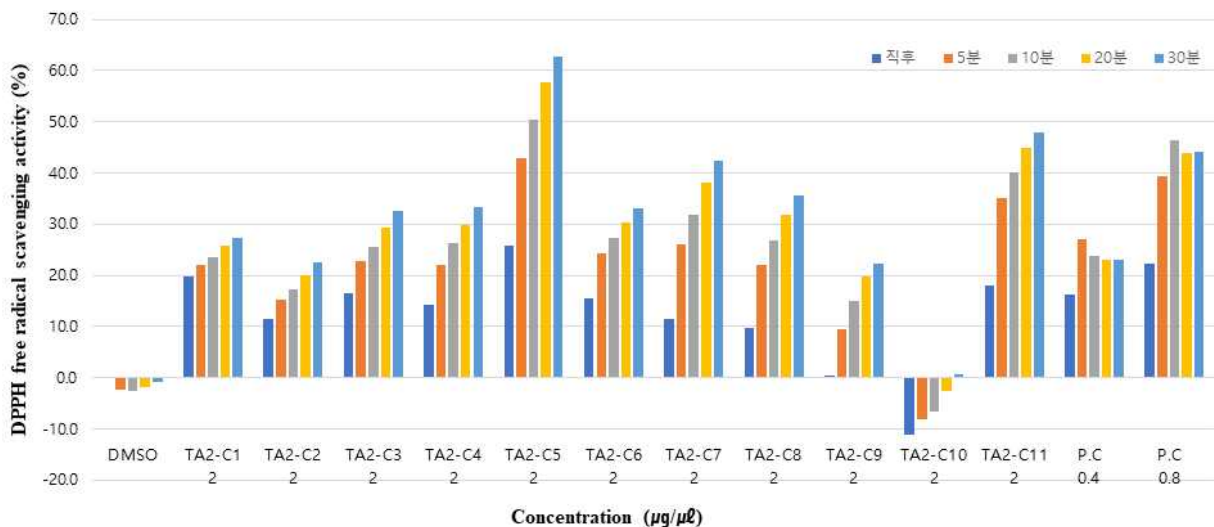


Fig. 3-19. DPPH radical scavenging activity of TA2 column fractions.

Table 3-3. DPPH free radical scavenging activity by the solvent soluble fractions of the extract from *T. albuminosus*

		DPPH radical scavenging (IC50 ¹⁾)
Ascorbic acid		0.96 mg/mL
<i>T. albuminosus</i>	TA2-5	4.31 mg/mL
	TA2-11	9.06 mg/mL

¹⁾ Inhibition concentration for 50% free radical scavenging.

3) 2차 TLC 분리

1차 column에서 얻은 11개 그룹 물질 중에 TA2-C5번 그룹 회수물에서 항산화 활성이 나타나 물질 분리를 위하여 NP-TLC를 실시하였다. EtOAc와 MeOH 혼합 용매로 전개를 실시한 다음 TA1 물질을 분리하는 법과 동일하게 실시하여 9개 밴드로 분리해 항산화 활성을 확인하였다(Fig. 3-20).

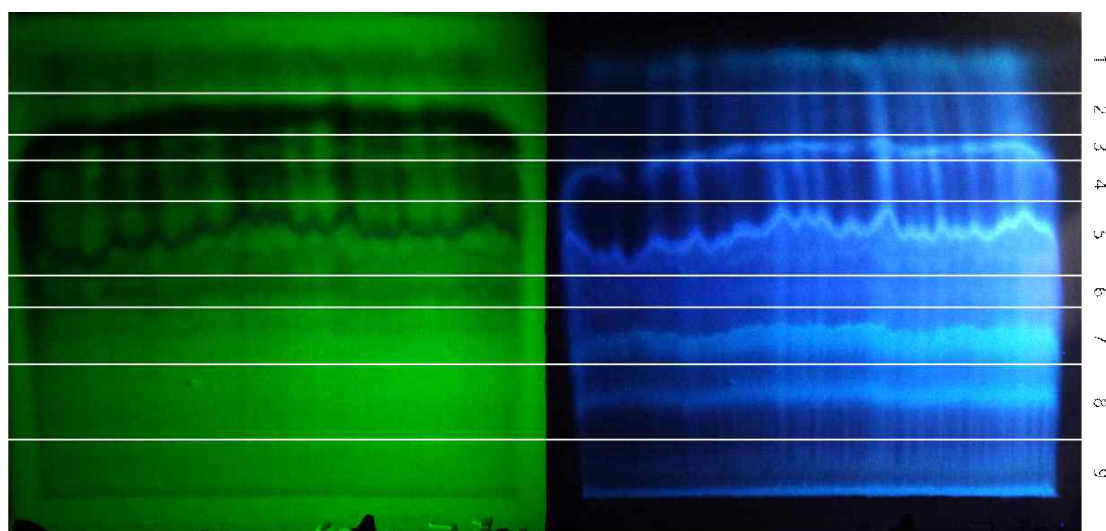


Fig. 3-20. Material separation diagram after 2nd TLC of TA2-C5.

4) 2차 TLC 분획물의 항산화활성

항산화능이 높았던 TA2-5를 2차로 TLC를 실시하여 얻어낸 분획물 TA2-C5-T1부터 TA2-C5-T9까지의 물질을 2 µg/µl 농도로 처리하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 조사하였다. 그 결과 TA2-C5-T5 분획물에서 활성이 가장 높았고, 2 µg/µl 농도에서 60% radical이 제거되는 활성을 확인했다(Fig. 3-21). TA2-C5-T5 물질을 다음 분리단계의 시료로 사용하였다.

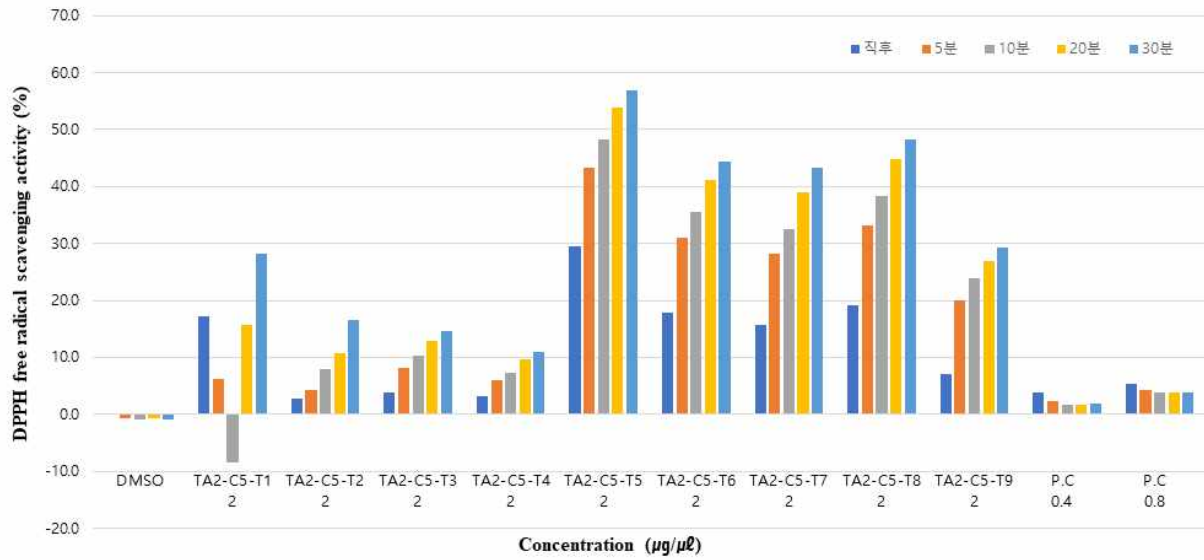


Fig. 3-21. DPPH radical scavenging activity of TLC fractions of TA2-C5.

5) 3차 TLC 분리

2차 TLC에서 항산화 활성이 나타난 물질인 TA2-C5-T5를 이용해 3차로 TLC를 실시하였다. 3차 TLC에서도 2차 TLC와 같은 방법으로 물질을 확인한 후 8개의 밴드로 물질을 분리하였으며(Fig. 3-22), 향후 항산화 활성을 조사할 계획이다.

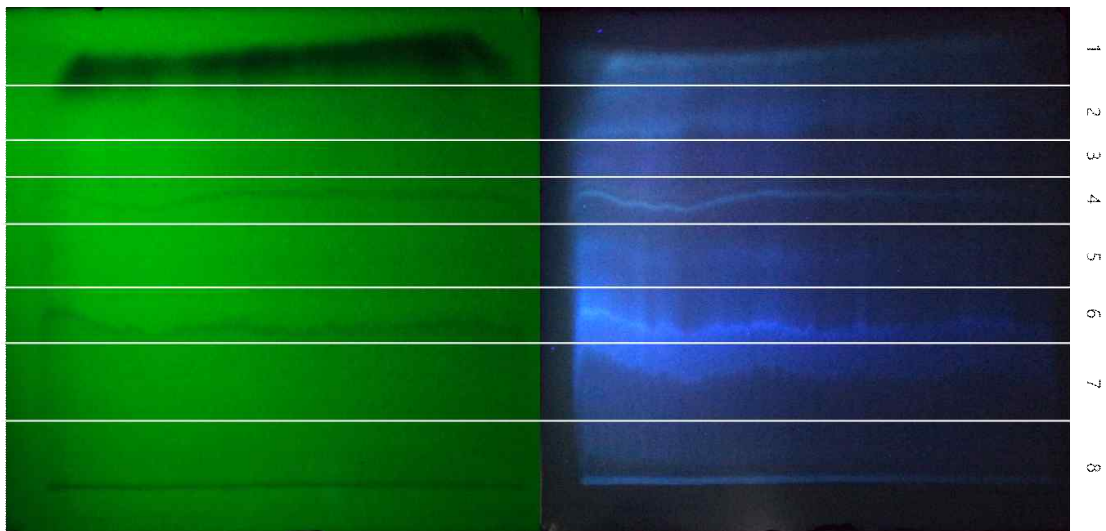


Fig. 3-22. Material separation diagram after 3rd TLC of TA2-C5-T5.

4. 흰개미버섯(흑계종)의 아미노산 분석

아미노산 분석에 사용한 버섯은 주관연구기관인 (주)힘찬에서 생산한 것과 중국길림성에서 구매한 버섯 그리고 버섯종균을 액체배양한 다음 균사체를 시료로 하여 아미노산 분석을 실시하였다. 아미노산은 구성아미노산과 유리아미노산을 분석하였다. 코로나19 때문에 해외에 출장

이 어려워 다양한 곳에서 버섯을 확보할 수 없었고, 재배법이 아직 구축되어있지 않아 시료 확보에 어려움이 있었다.

가. 구성아미노산 분석

시료 1 g을 시험관에 넣고 6 N HCl 용액을 15 mL 가하여 감압밀봉한 후 110°C 온도로 24 시간 가수분해 시켰다. 가수분해시킨 분해액은 원심분리하여 상등액을 취하고, 염산과 물을 완전히 증발시키기 위해 55°C 에서 감압농축하였다. 농축된 시료를 sodium citrate buffer (pH 2.2) 로 용해시키고, 5 mL로 정용하여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후, 아미노산 자동분석기를 이용하여 구성아미노산 함량을 구하였다.

구성아미노산의 분석결과는 Table 3-4에 나타냈다. 감칠맛을 나타내는 glutamic acid와 aspartic acid 함량은 주관연구기관에서 생산한 흰개미버섯에서 중국산 보다 glutamic acid는 약 163% 높게 나타났으며, aspartic acid는 129% 높게 나타났다.

Table 3-4. Compositions of protein bound amino acids of *T. albuminosus*

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	Sample		
	한국 흰개미버섯	중국 흰개미버섯	흰개미버섯 균사체
<i>General amino acids</i>			
<i>Proline</i>	568.89	556.64	741.88
<i>Aspartic acid</i>	1,545.02	1,197.72	1,421.70
<i>Serine</i>	717.82	680.19	796.04
<i>Glutamic acid</i>	2,553.45	1,564.70	1,977.23
<i>Glycine</i>	649.88	684.46	776.38
<i>Alanine</i>	831.70	933.37	944.14
<i>Cystine</i>	172.40	187.47	237.46
<i>Tyrosine</i>	588.48	435.91	472.35
<i>Arginine</i>	921.30	666.70	1,264.13
<i>Totals</i>	8,548.94	6,907.16	8,631.31
<i>Essential amino acids</i>			
<i>Threonine</i>	680.73	669.71	851.62
<i>Valine</i>	1,635.19	1,721.36	2,173.56
<i>Methionine</i>	611.32	559.96	660.03
<i>Isoleucine</i>	552.65	601.45	819.67
<i>Leucine</i>	1,029.62	1,036.98	1,326.63
<i>Phenylalanine</i>	669.48	657.40	838.41
<i>Lysine</i>	834.36	644.42	1,046.17
<i>Histidine</i>	548.47	287.39	410.54
<i>Total</i>	6,561.82	6,178.67	8,126.63
<i>Total amino acids</i>	15,110.76	13,186.83	16,757.94
<i>Ammonia</i>	267.51	261.65	302.09

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

나. 유리아미노산 분석

시료를 6.0% (v/v) perchloric acid로 분쇄한 후 2,000 g에서 15분간 원심분리하고 침전물은 다시 perchloric acid로 재추출 하여 같은 조건으로 원심분리하였다. 상등액을 여과지로 여과하여 33% (w/v) KOH solution을 이용하여 pH 7.0로 조정 한 후, 2,000 g에서 10분간 원심분리하여 potassium perchlorate를 제거하였다. 상등액은 10 M HCl을 이용하여 pH 2.2로 산성화한 후 0.2 M lithium citrate buffer (pH 2.2)로 희석하였다. 유리아미노산 분석을 실시하였다.

유리아미노산의 분석결과는 Table 3-5에 나타냈다. 감칠맛을 나타내는 glutamic acid와 aspartic acid 함량은 주관연구기관에서 생산한 흰개미버섯에서 중국산 보다 glutamic acid는 약 2,159.0% 높게 나타났으며, aspartic acid는 397.1% 높게 나타났다. 구성아미노산과 같이 유리아미노산의 함량에 국내생산 버섯에서 중국산 버섯보다 월등히 높게 나타났다. 흰개미버섯 종균 액체배양의 균사체에서는 국내산보다 감칠맛을 나타내는 아미노산의 함량이 적었다. 다양한 곳에서 시료를 확보해서 아미노산 함량분석과 균의 특성을 조사해볼 필요성이 있는 것으로 사료된다.

Table 3-5. Compositions of free amino acids of *T. albuminosus*

Contents ^D (mg/100 g)	Sample		
	한국 흰개미버섯	중국 흰개미버섯	흰개미버섯 균사체
<i>General amino acids</i>			
<i>Proline</i>	19.24	43.56	76.69
<i>Aspartic acid</i>	244.13	61.48	52.19
<i>Serine</i>	113.43	92.73	116.23
<i>Glutamic acid</i>	929.22	43.04	200.89
<i>Glycine</i>	37.45	43.09	59.06
<i>Alanine</i>	128.79	237.65	176.16
<i>Cystine</i>	55.42	13.38	84.74
<i>Tyrosine</i>	81.28	25.484	49.74
<i>Arginine</i>	190.08	50.28	556.79
<i>Totals</i>	1,799.04	610.694	1,372.49
<i>Essential amino acids</i>			
<i>Threonine</i>	88.51	90.77	125.82
<i>Valine</i>	76.25	124.76	114.91
<i>Methionine</i>	26.97	29.36	12.93
<i>Isoleucine</i>	40.29	86.69	111.62
<i>Leucine</i>	101.37	152.33	155.25
<i>Phenylalanine</i>	63.03	134.49	117.22
<i>Lysine</i>	105.55	90.40	362.41
<i>Histidine</i>	143.63	7.83	53.99
<i>Total</i>	645.6	716.63	1,054.15
<i>Total amino acids</i>	15,110.76	13,186.83	16,757.94
<i>Ammonia</i>	267.51	261.65	302.09

^DAll values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

제 4 절 흰개미버섯(흑계종)의 기능성 효능 평가

1. 계종버섯 내 겐티스산의 비만 유래 염증에 대한 효과 분석

가. 겐티스산의 항염증 효과 확인

겐티스산의 비만 유래 염증에 대한 효과를 확인하기 위하여 LPS로 인해 자극된 RAW 264.7 쥐 유래 대식세포에 대한 항염증 효과를 먼저 확인하였다.

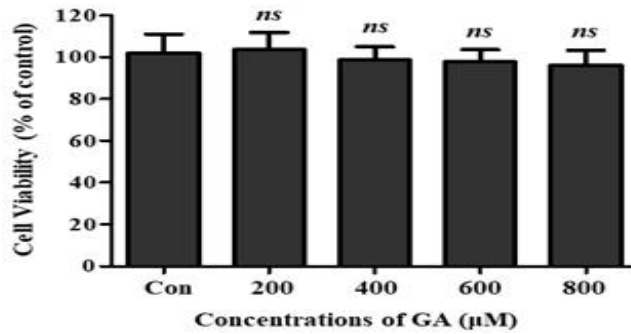


Fig. 4-1. Effects of GA treatment on cell viability in RAW 264.7 cells

겐티스산의 세포에 대한 독성을 WST-1 실험 방법을 이용하여 확인하였다. 겐티스산은 다양한 농도로 24시간 RAW 264.7 세포에 처리하였으며, 이때 800 μM의 농도까지 독성을 보이지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 4-1). 따라서 추후 항염증 활성 확인에는 300, 600 μM의 겐티스산을 처리하여 항염증 활성을 확인하였다.

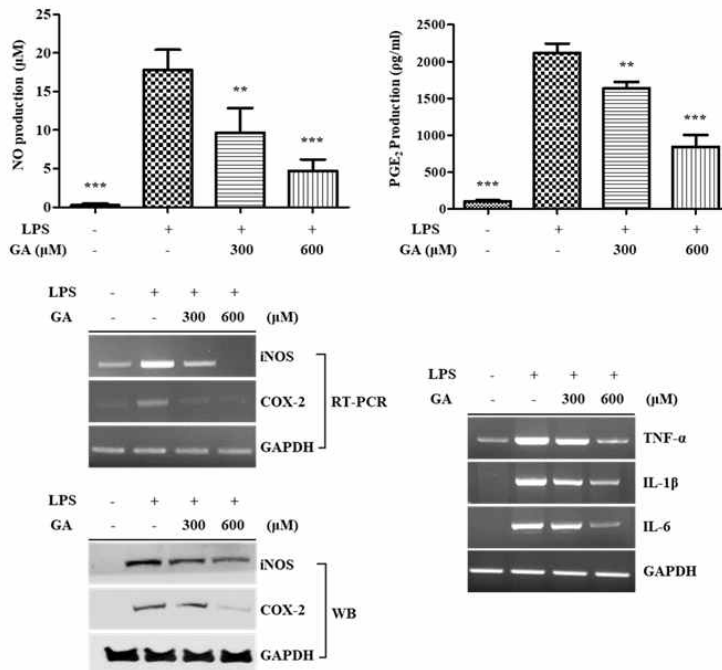


Fig. 4-2. Effects of GA treatment on the production of major inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

이후 LPS로 자극된 RAW 264.7의 염증 반응에 대한 억제능을 확인하기 위하여 먼저 염증 반응의 지표인 산화 질소(nitric oxide; NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 발현량을 각각 확인하였다. NO는 주요한 염증의 매개 물질로서 외부에서 유래된 병원체인 세균, 기생충, 바이러스에 대한 독성 물질로 작용하지만, 과생산된 NO는 조직에 손상을 주어 염증 관련 질병을 유발할 수 있는 것으로 알려져있다 [Moilanen & Vappatalo, 1995; Sharma et al, 2007; Tripathi et al, 2007]. PGE₂ 역시 염증 반응의 주요한 역할을 담당하며, 혈관 투과성이나 혈소판의 응집, 사이토카인 생성과 같은 주요한 과정을 조절한다. 하지만 이러한 현상에 의해 염증 반응과 함께 일어나는 부종, 통증과 같은 현상을 일으키며, PGE₂의 과분비는 다양한 염증성 질환에서 보고되고 있다 [Kawahara et al, 2015; Gomez et al, 2013; Nakanishi, 2013]. NO와 PGE₂ 인자의 발현이 모두 겐티스산 처리에 따라 농도의존적으로 감소하여 겐티스산이 항염증 효과가 있다는 것을 확인하였다 (Fig. 4-2). 이러한 NO와 PGE₂ 생성은 각각 iNOS와 COX-2라는 효소가 관여하며 따라서 이 두 효소는 항염증 제제의 주요 타겟으로 많이 이용되고 있다 [Aktan, 2004; Murakami, 2000]. 이 두 효소의 RNA와 단백질 수준에서의 발현을 RT-PCR과 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였을 시, 발현량이 겐티스산 처리에 따라 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 또한 염증 반응을 유발하는 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 RNA 수준에서의 발현량을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다 [Walsh et al, 1991; Contassot et al, 2012; Gabay, 2006]. 이러한 염증성 사이토카인의 RNA 수준에서의 발현 역시 겐티스산 처리에 의하여 억제되는 것이 확인되었다 (Fig. 4-2).

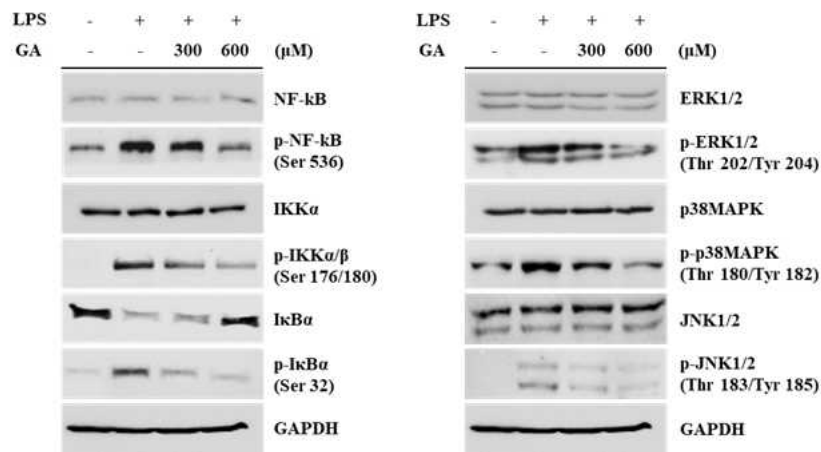


Fig. 4-3. Effects of GA treatment on inflammation-related signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

염증 반응에 직접적으로 작용하는 매개 물질들의 발현량을 확인하였으므로, 겐티스산 처리에 따른 염증 반응을 일으키는 상위 인자들의 활성 변화를 단백질 수준에서 웨스턴 블랏을 통하여 확인하였다. NF- κ B의 경우 염증 반응에서 가장 주요하게 작동하는 전사인자로 알려져 있으며, 염증 반응이 일어나지 않은 상황에서는 억제자인 I κ B와 결합하여 핵 내로 이동을 못하는 상태로 존재한다. 하지만 염증 반응을 자극하는 신호가 전달되면 IKK가 인산화되고, 이에 따라 I κ B가 인산화되며 분해되면서 NF- κ B가 인산화되게 된다. 이렇게 인산화된 NF- κ B는

핵으로 이동하여 염증 반응과 관련된 다양한 유전자의 전사를 유도하게 된다 [Kim et al, 2019; Christian et al, 2016]. 겐티스산을 처리하였을 때, LPS만 처리한 대조군과는 반대로 NF- κ B의 인산화가 억제되어 활성이 억제되는 것을 확인하였고, NF- κ B의 활성을 억제하는 I κ B의 경우 인산화에 의한 분해가 억제되어 총발현량 역시 증가하는 것을 확인하였다. 마찬가지로 I κ B의 분해를 유도하는 IKK의 인산화가 억제되어 I κ B의 분해가 줄어드는 것을 확인하였다 (Fig. 4-3). 또한 NF- κ B의 상위 인자인 MAPK (ERK, p38MAPK, JNK)의 인산화에 따른 활성 정도를 확인하였다. MAPK의 경우 다양한 생체 작용을 조절하며, 염증 반응에서는 다양한 염증 관련 효소나 사이토카인의 발현 및 NF- κ B의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다 [Kaminska, 2005; Kim & Choi, 2010; Coskun et al, 2011]. 이러한 MAPK의 인산화에 따른 활성 또한 겐티스산 처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 4-3). 따라서 겐티스산이 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 MAPK 및 NF- κ B의 활성 억제에 따른 다양한 염증 매개 물질의 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 지니는 것을 확인할 수 있었다.

나. 겐티스산의 항비만 효과 확인

다음으로는 겐티스산의 항비만 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 쥐 유래 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제능을 확인하였다.

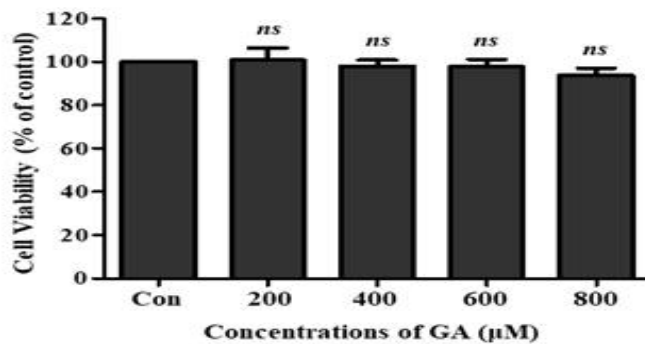


Fig. 4-4. Effects of GA treatment on cell viability in 3T3-L1 cells

마찬가지로 3T3-L1 세포에 겐티스산을 처리하고 24시간 후의 WST-1 실험 방법을 이용한 세포 생존률 측정으로 세포 독성을 확인하였을 때, 800 μ M의 농도까지는 독성이 없는 것을 확인하였고 (Fig. 4-4), 이후 항비만 활성 실험에 300, 600 μ M의 겐티스산을 사용하였다.

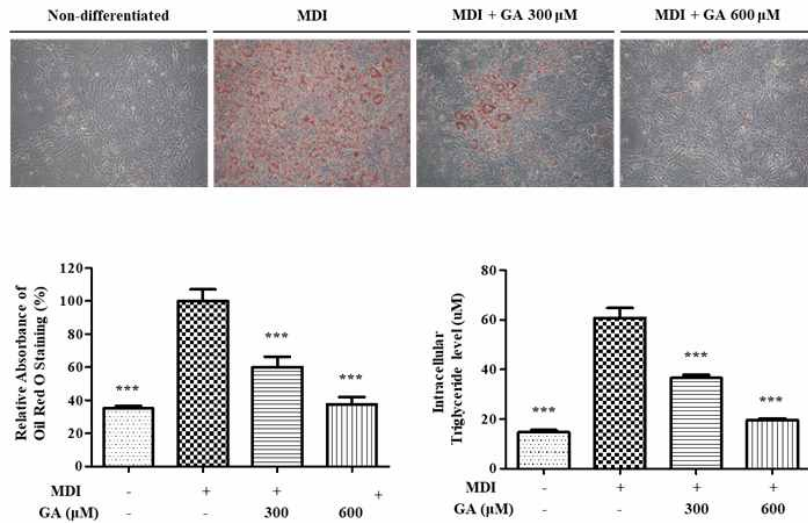


Fig. 4-5. Effects of GA on lipid accumulation during adipogenesis in 3T3-L1 cells

실제 지방세포 분화 과정에 따른 지질 및 중성지방 함량의 증가에 대한 겐티스산의 억제능을 Oil Red O 염색과 중성지방 측정을 통해서 확인하였다. 이러한 지질 및 중성지방의 증가는 지방세포 분화 과정의 주요한 결과로서 비만을 유발하게 된다 [Hsu et al, 2012]. 현미경 및 실제 측정을 통해 확인하였을 때, 겐티스산 처리에 따라서 지방세포 분화 과정에 의해 생성되는 지질과 중성지방의 함량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-5)

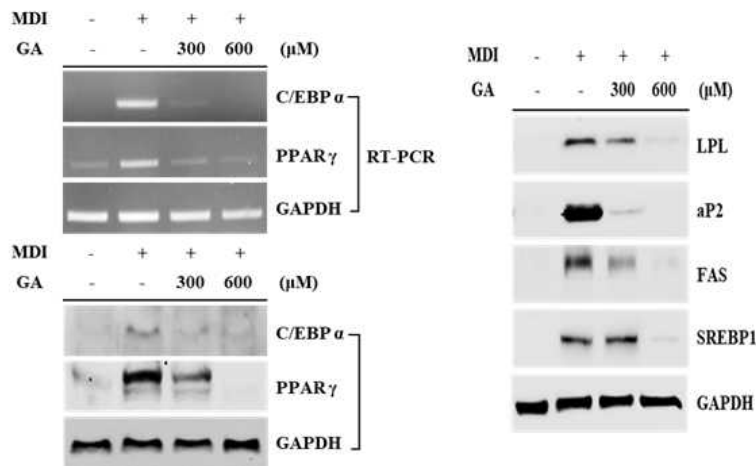


Fig. 4-6. Effects of GA on the expression of adipogenic and lipogenic factors in 3T3-L1 cells

겐티스산에 의한 항비만 효과를 확인하였고, 기작을 확인하기 위하여 먼저 지방세포 분화 과정에서 가장 중요하게 작동하는 주요 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 RNA 및 단백질 발현량을 RT-PCR과 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다. C/EBP α 와 PPAR γ 는 지방세포 분화 과정 후기에 발현되어 분화와 관련된 다양한 유전자를 전사하는 것으로 알려져 있으며, 서로간의 자극을 통해 전사인자로서의 활성을 더욱 증가시키는 것으로 알려져있다 [Cao et al, 1991; Lefterova et al, 2014; Wu et al, 1999]. C/EBP α 와 PPAR γ 의 두 인자 모두 RNA와 단백질 수

준에서의 발현이 겐티스산 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-6). 또한 지방세포 분화 과정 중 필수적으로 동반되어야 하는 과정인 지질합성에 관여하는 인자들인 LPL, aP2, FAS, SREBP1의 단백질 수준에서의 발현량을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. LPL, aP2, FAS의 경우 지방 세포에서 이용할 수 있게 외부에 존재하는 유리 지방산을 세포 내로 이동시키고 합성하는 과정을 수행하며, SREBP1의 경우 이러한 지질 합성 과정에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 유도하여 지질 합성 과정을 돕는 것으로 보고되고 있다 [Loftus & Lane, 1997; Skat-Rørdam et al, 2019; Mead et al, 2002; Shan et al, 2013; Eberlé et al, 2004]. 겐티스산 처리에 따라 지질 합성 과정에 관여하는 인자들의 단백질 발현량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-6).

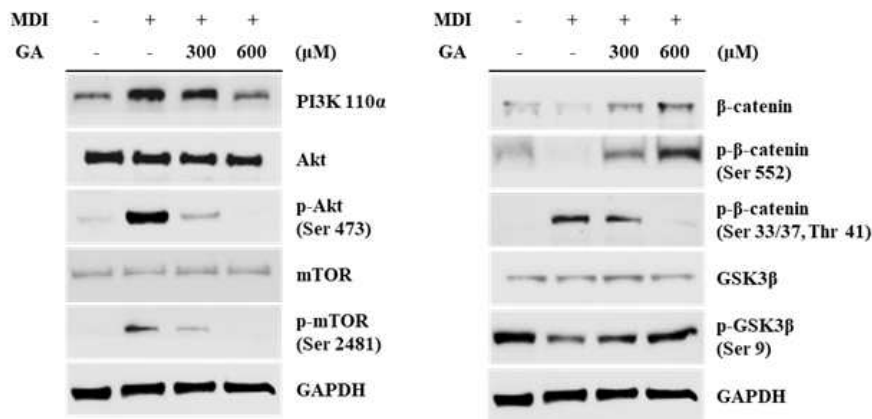


Fig. 4-7. Effects of GA treatment on adipogenesis-related signaling pathways in 3T3-L1 cells

다음으로 지방세포 분화 과정에 관여하는 상위 인자들의 발현 및 활성을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. PI3K-Akt-mTOR로 이루어지는 신호전달 경로의 경우, 일반적으로 많은 대사 과정에 관여하며, 지방세포 분화 과정에서는 인슐린 등의 자극에 의하여 활성화되어 PI3K-Akt-mTOR로 인산기를 이어지게 제공하며 활성화된다. 활성화된 Akt는 PPAR γ 의 발현을 유도하며, mTOR의 경우 PPAR γ 와 SREBP1의 발현을 유도하여 지방세포 분화 과정을 촉진한다 [Chen et al, 2013; Yu et al, 2008; Park et al, 2014]. 겐티스산 처리에 따라서 PI3K의 활성화 부분인 PI3K 110 α 의 발현량이 감소하였고, Akt와 mTOR의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-7). 또한 β -catenin의 경우 지방세포 분화 신호가 없을 시에는 serine 552 잔기가 인산화된 활성화 형태로 존재하며 C/EBP α 과 PPAR γ 의 발현을 억제하여 지방세포 분화 과정을 억제하고, 이때 β -catenin의 억제자인 GSK3 β 는 인산화되어 활성을 잃은 상태로 존재하게 된다. 지방세포 분화 자극이 들어오게 되면, β -catenin의 억제자인 GSK3 β 가 활성화되어 β -catenin의 serine 33/37번 잔기와 threonine 41번 잔기를 인산화시킴으로써 β -catenin이 분해가 되게 유도하여 지방세포 분화 과정이 진행되게 된다. 겐티스산 처리 시에 β -catenin의 분해가 유도되는 인산화가 감소하여 전체 발현량이 지방세포 분화 과정만 유도한 대조군보다 증가하였고, 활성화 타입의 인산화 형태가 증가하였다. 또한 GSK3 β 의 인산화가 증가하여 GSK3 β 가 β -catenin의 분해를 유도하지 못하게 되는 것을 확인하였다 (Fig. 4-7). 따라서 겐티스산이 3T3-L1 세포에서 지방세포 분화 과정을 촉진하는 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로를 억제하

고, 지방세포 분화 과정을 억제하는 β -catenin 신호전달 경로를 촉진시킴으로서, 분화 과정의 주요 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현 및 지질 합성과 관련된 단백질의 발현을 억제하게 되어 항비만 효과를 가지는 것을 확인하였다.

다. 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 효능 확인

마지막으로 항염증과 항비만 효능이 확인된 겐티스산이 비만 유래 만성 염증에 대한 활성이 있는지를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포와 3T3-L1의 공동 배양을 통하여 다양한 염증 관련 인자들의 발현을 확인하였다.

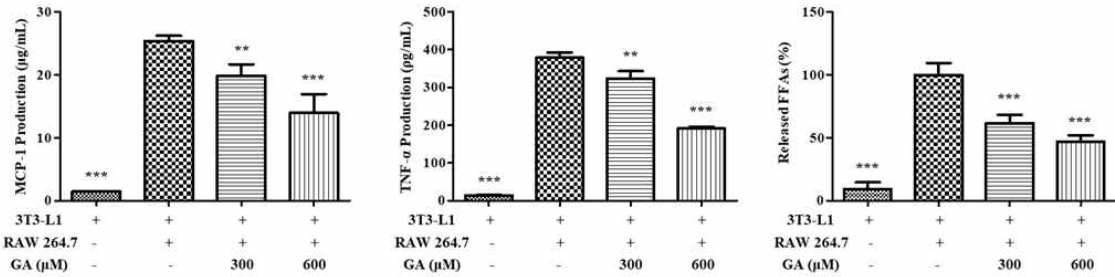


Fig. 4-8. Effects of GA treatment on MCP-1, TNF- α , FFAs secretion in a macrophage-adipocyte contact co-culture model

먼저 비만 유래 염증 반응에서 주요한 세 인자인 MCP-1, TNF- α , 유리지방산의 발현량에 대한 겐티스산의 효과를 RAW 264.7과 3T3-L1 세포의 직접적 공배양 방식을 통해 확인하였다. MCP-1의 경우 비만인 상태의 지방 세포에서 발현이 되며, 이는 지방 조직 근처로의 대식세포의 결집을 유도하게 되고 주요 염증성 인자인 TNF- α 를 비롯한 염증성 사이토카인을 생성하게 되어 염증을 유발한다. 이후 이러한 염증성 인자들에 의해 지방세포에서는 지질분해에 의한 유리지방산이 생성되며 이는 다시 대식세포에 자극을 가하여 더 많은 염증 반응을 일으키게 된다 [Christiansen et al, 2005; Suganami et al, 2005; Weisberg, 2003]. 겐티스산 처리시 공배양에 비하여 농도의존적으로 MCP-1, TNF- α , 유리지방산의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-8).

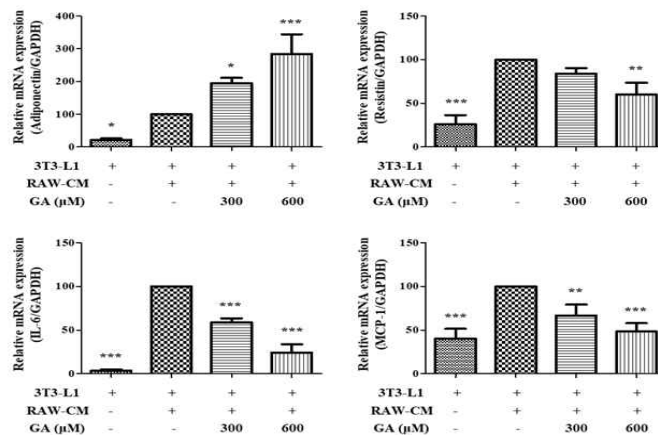


Fig. 9. Effects of GA treatment on adipokine expression in RAW-CM-cultured 3T3-L1 cells

이러한 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 효능을 지방세포와 대식세포 각각에서 확인하기 위하여 대식세포와 지방세포 각각의 세포에서 자극을 준 뒤 회수한 조건부 배지 (conditioned medium)를 다른 세포에 처리하는 공배양 실험을 수행하였다. 먼저 3T3-L1 세포에서 LPS로 의해 자극된 RAW 264.7 세포의 조건부 배지를 이용하여 염증 반응 상태를 유발한 뒤, 겐티스산이 주요 염증 관련 아디포카인인 아디포넥틴, 레지스틴, IL-6, MCP-1의 RNA 발현량을 RT-qPCR로 확인하였다. 아디포넥틴은 항염증 아디포카인으로 알려져 있으며 TNF- α 의 발현을 억제하고 인슐린 민감성을 증가시켜 염증 반응을 억제한다. 레지스틴, IL-6, MCP-1의 경우 염증 유발 아디포카인으로 알려져 있다. 레지스틴은 인슐린 저항성의 증가에 따른 제 2형 당뇨병 발현에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, IL-6의 경우 유리지방산의 방출을 증가시켜 인슐린 저항성을 증가시킨다. MCP-1의 경우 대식세포의 유도를 통하여 염증 반응이 유발될 수 있게 한다 [Conde et al, 2011; Yokota et al, 2000; Bokarewa et al, 2005; Mauer et al, 2015; Han et al, 2020; Cranford et al, 2016]. 겐티스산 처리시에 항염증 아디포카인인 아디포넥틴의 RNA 발현량은 증가하고, 염증성 아디포카인인 레지스틴, IL-6, MCP-1의 발현량은 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-9)

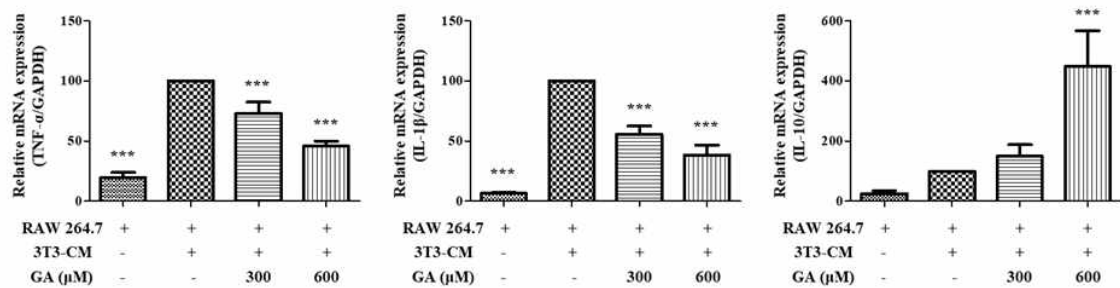


Fig. 4-10. Effects of GA treatment on cytokine expression in 3T3-CM-cultured RAW 264.7 cells

마찬가지로 RAW 264.7 세포에 분화가 완료된 3T3-L1 세포에서 획득한 조건부 배지를 처리하여 반응을 유발한 뒤, 주요 염증 관련 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-10의 RNA 발현에 대한 겐티스산의 효과를 RT-qPCR로 확인하였다. TNF- α 의 경우 비만인 지방 조직으로 유입된 대식세포에서 발현되어 지방세포의 지질분해를 유도하여 유리지방산을 생성하고 인슐린 저항성을 증가시킨다. IL-1 β 는 주요 염증성 사이토카인의 하나로서, 지방세포의 인슐린 유래 신호전달 경로를 억제함으로써 인슐린 저항성을 증가시킨다. 반대로 IL-10의 경우 항염증 사이토카인으로 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현을 억제하여 염증반응을 억제하고 인슐린 감수성을 증가시킨다 [Cawthron & Sethi, 2015; Bing, 2015; Gao et al, 2013; Kim et al, 2004]. 겐티스산 처리 시 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 의 발현량은 감소하고, 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현량은 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-10).

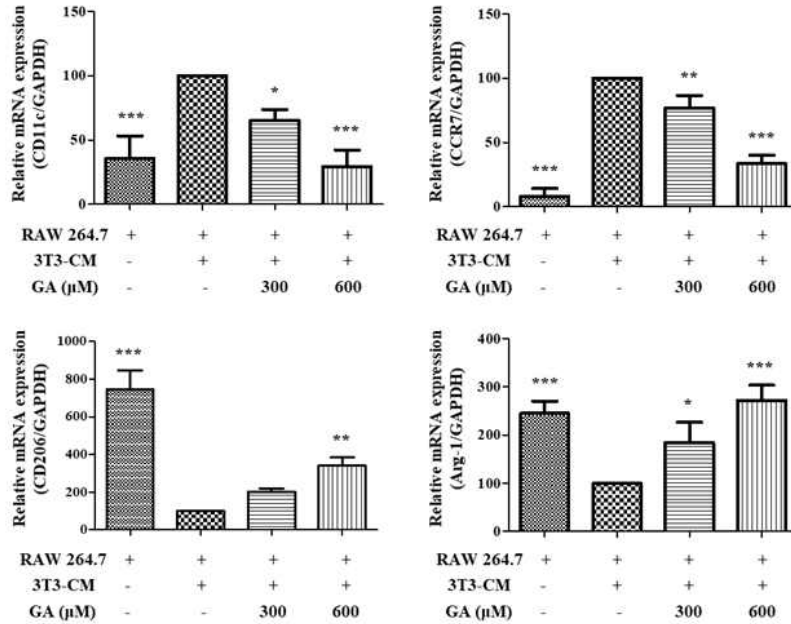


Fig. 4-11. Effects of GA treatment on M1/M2 polarization in 3T3-CM-cultured RAW 264.7 cells

마지막으로 비만 상태에 따른 대식세포의 M1/M2 상태 변화를 확인하기 위하여 분화가 완료된 3T3-L1 세포의 조건부배지로 배양된 RAW 264.7 세포의 M1, M2 관련 인자들의 RNA 발현량 변화에 대한 겐티스산의 효과를 확인하였다. 대식세포는 M1, M2 상태로 극성화가 변하며, M1의 경우 염증성 대식세포로 알려져 있고 CD11c와 CCR7의 발현이 증가한다. 반대로 M2 상태의 경우 항염증성 대식세포로 알려져 있으며, CD206과 Arg-1의 발현량이 증가한다 [Chinetti-Gbaguidi & Skaels, 2011; Xie et al, 2014; Appari et al, 2018]. 겐티스산 처리에 따라 염증성 상태를 나타내는 M1 상태의 유전자인 CD11c와 CCR7의 RNA 발현량이 감소하였고, 반대로 항염증 상태를 나타내는 M2 상태의 유전자인 CD206과 Arg-1의 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-11).

따라서 겐티스산이 항염증 및 항비만 효과를 지니고 있을 뿐 아니라, 비만 유래 염증에 관련된 인자들의 발현을 억제하고 대식세포의 염증성 상태로의 변화를 억제함으로써 비만 유래 염증에 대한 억제효과 또한 가지는 것을 확인하였다.

2. 코엔자임Q9의 피오사이아닌 유래 기도 폐쇄에 대한 효과 확인

코엔자임Q9의 피오사이아닌 유래 기도 폐쇄에 대한 효과를 확인하기 위하여 인간 기관지 표피 세포인 NHBE 세포를 이용하여 실험을 진행하였다.

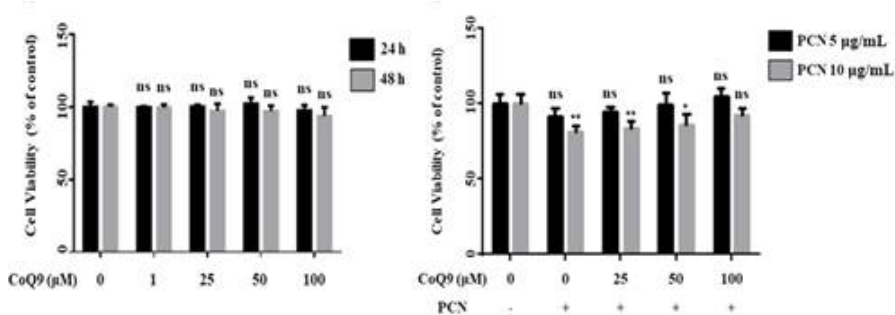


Fig. 4-12. Cell viability of NHBE cells in the presence of CoQ and PCN

먼저 NHBE 세포에 대한 코엔자임Q9의 독성을 확인하기 위하여 WST-1 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 다양한 농도의 코엔자임Q9을 처리한 후 24, 48시간 반응 후에 세포의 생존률을 측정함으로써 코엔자임Q9의 독성을 확인하였다. 코엔자임Q9를 처리 시에 100 μM까지의 농도에서 48시간까지 NHBE 세포에 대하여 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 12). 또한 피오사이아닌 처리에 따른 독성에 대한 코엔자임Q9 보호 효과를 확인하였을 때, 코엔자임Q9이 피오사이아닌에 대한 독성에 약간의 보호 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-12).

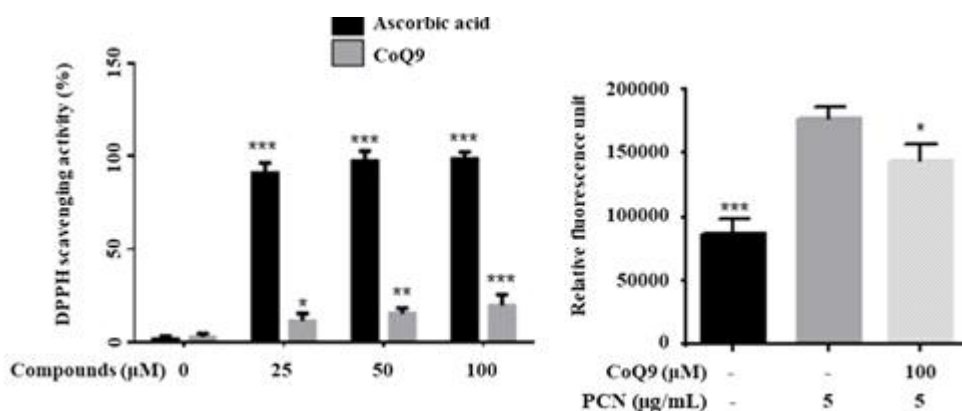


Fig. 13. Radical scavenging and antioxidant activities of CoQ9

또한 코엔자임Q9의 항산화 효과를 확인하기 위하여 가장 대표적인 라디칼 소거능 실험인 DPPH 라디칼 소거능 확인 실험을 진행하였다 [Marinova & Batchvarov, 2011]. DPPH 실험 결과에서 코엔자임Q9은 100 μM 농도에서 동량의 아스코르브산보다 20% 정도의 라디칼 소거능을 지니는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 13). 또한 피오사이아닌 처리에 따른 NHBE 세포에서의 활성산소종 생성량에 대한 코엔자임Q9의 효과를 확인하였을 때, 코엔자임Q9이 활성산소종 생성에도 억제 효과를 나타냄으로써 항산화 효과를 가지는 것을 확인하였다 (Fig. 4-13) [Yu et al, 2012].

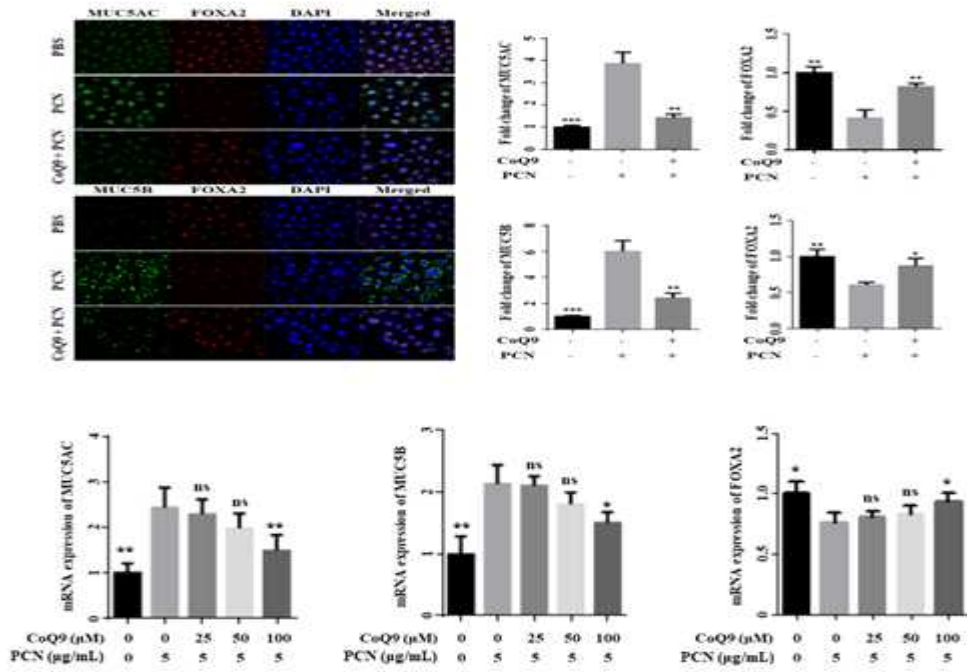


Fig. 4-14. Effects of CoQ9 treatment on the expression of mucin and FOXA2 in NHBE cells

다음으로 피오사이아닌에 의한 점액 과다 분비에 대한 억제 효과를 확인하기 위하여 점액의 주요 구성 성분인 뮤신의 두 종류 MUC5AC와 MUC5B, 이들의 발현을 조절하는 전사인자인 FOXA2의 단백질 및 RNA 발현을 면역형광법 및 RT-qPCR 실험을 통하여 확인하였다. 피오사이아닌에 의해 인간 기관지 세포가 자극을 받게 되면 정상적인 상태에서는 뮤신의 발현을 억제하는 전사인자인 FOXA2가 작동을 하지 못하게 되고, 따라서 뮤신 MUC5AC와 MUC5B의 발현이 증가되어 점액이 과도하게 생성이 되게 되면서 기도가 폐쇄되게 된다 [Voynow & Rubin, 2009; Okuda et al, 2019; Wan et al, 2004; van der Sluis et al, 2008]. 코엔자임Q9을 처리하였을 때, 뮤신의 두 종류 MUC5AC와 MUC5B의 단백질 및 RNA 발현량은 감소하는 것을 확인할 수 있고, 반대로 FOXA2의 경우 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-14).

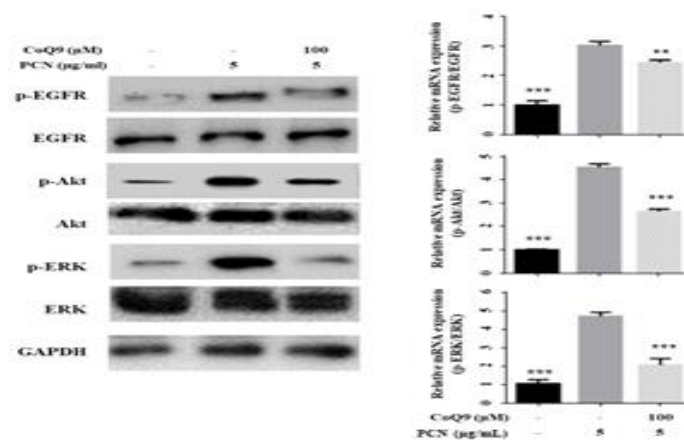


Fig. 4-15. Regulatory effects of CoQ9 on EGFR signaling in NHBE cells treated with CoQ9 and/or PCN

뮤신 생성에 관여하는 상위 인자들의 활성화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. EGFR부터 시작하여 Akt 혹은 ERK로 이어지는 신호전달 경로는 피오사이아닌에 의해 자극되며, 인산화에 의하여 활성화되어 뮤신의 생성을 증가시켜 기도 폐쇄를 유발한다 [Choi et al, 2020; Rada et al, 2011]. 코엔자임Q9 처리 시에 피오사이아닌에 의해 활성화 되는 EGFR, Akt, ERK의 인산화를 억제하여 뮤신 생성을 억제하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-15)

따라서 코엔자임Q9이 항산화 활성을 가질뿐만 아니라 뮤신 생성을 억제하는 FOXA2의 발현을 증가시키고, 뮤신 생성을 촉진하는 EGFR 경로의 비활성화를 통하여 점액 과분비에 따른 기도 폐쇄 억제 효과를 보이는 것을 확인하였다.

결론적으로 계종버섯에 존재하는 기능성 물질인 겐티스산과 코엔자임Q9의 비만 유래 만성염증 및 기도 폐쇄에 대한 효과를 증명함으로써 계종버섯의 기능성을 확인하였다.

참고문헌

- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75(6), 639-653.
- Appari, M., Channon, K. M., & McNeill, E. (2018). Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(3), 297-312.
- Bing, C. (2015). Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte*, 4(2), 149-152.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., & Tarkowski, A. (2005). Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *The Journal of Immunology*, 174(9), 5789-5795.
- Cao, Z., Umek, R. M., & McKnight, S. L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes and Development*, 5(9), 1538-1552.
- Cawthorn, W. P., & Sethi, J. K. (2015). TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Letters*, 582(1), 117-131.
- Chen, J., Crawford, R., Chen, C., & Xiao, Y. (2013). The Key Regulatory Roles of the PI3K/Akt Signaling Pathway in the Functionalities of Mesenchymal Stem Cells and Applications in Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 516-528.
- Chinetti-Gbaguidi, G., & Staels, B. (2011). Macrophage polarization in metabolic disorders: Functions and regulation. *Current Opinion in Lipidology*, 22(5), 365-372.
- Choi, W., Choe, S., & Lau, G. W. (2020). Inactivation of FOXA2 by respiratory bacterial pathogens and dysregulation of pulmonary mucus homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 11, 515.
- Christian, F., Smith, E., & Carmody, R. (2016). The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*, 5(1), 12.
- Christiansen, T., Richelsen, B., & Bruun, J. M. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *International Journal of Obesity*, 29(1), 146-150.
- Conde, J., Scotece, M., Gómez, R., López, V., Gómez-Reino, J. J., Lago, F., & Gualillo, O. (2011). Adipokines: Biofactors from white adipose tissue. A complex hub among

- inflammation, metabolism, and immunity. *BioFactors*, 37(6), 413–420.
- Contassot, E., Beer, H. D., & French, L. E. (2012). Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Medical Weekly*, 142(MAY), 1–10.
- Coskun, M., Olsen, J., Seidelin, J. B., & Nielsen, O. H. (2011). MAP kinases in inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(7–8), 513–520.
- Cranford, T. L., Enos, R. T., Velázquez, K. T., McClellan, J. L., Davis, J. M., Singh, U. P., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S., Robinson, C. M., & Murphy, E. A. (2016). Role of MCP-1 on inflammatory processes and metabolic dysfunction following high-fat feedings in the FVB/N strain. *International Journal of Obesity*, 40(5), 844–851.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839–848.
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research and Therapy*, 8(SUPPL. 2), 1–6.
- Gao, M., Zhang, C., Ma, Y., Bu, L., Yan, L., & Liu, D. (2013). Hydrodynamic delivery of mIL10 gene protects mice from high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Molecular Therapy*, 21(10), 1852–1861.
- Gomez, I., Foudi, N., Longrois, D., & Norel, X. (2013). The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89(2–3), 55–63.
- Han, M. S., White, A., Perry, R. J., Camporez, J. P., Hidalgo, J., Shulman, G. I., & Davis, R. J. (2020). Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(6), 2751–2760.
- Hsu, C. L., Lin, Y. J., Ho, C. T., & Yen, G. C. (2012). Inhibitory effects of garcinol and pterostilbene on cell proliferation and adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Food Funct.*, 3(1), 49–57.
- Hulit, J., Wang, C., Li, Z., Albanese, C., Rao, M., Di Vizio, D., Shah, S., Byers, S. W., Mahmood, R., Augenlicht, L. H., Russell, R., & Pestell, R. G. (2004). Cyclin D1 Genetic Heterozygosity Regulates Colonic Epithelial Cell Differentiation and Tumor Number in ApcMin Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7598–7611.
- Kaminska, B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - From molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1754(1–2), 253–262.
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., & Sugimoto, Y. (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 414–421.
- Kim, E. K., & Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*(Vol. 1802, Issue 4, pp. 396–405). Elsevier.
- Kim, H. J., Higashimori, T., Park, S. Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y. J., Noh, H. L., Cho, Y. R., Cline, G., Kim, Y. B., & Kim, J. K. (2004). Differential Effects of Interleukin-6 and -10 on Skeletal Muscle and Liver Insulin Action In Vivo. *Diabetes*, 53(4), 1060–1067.
- Kim, S., Kang, M., Kang, C., Kim, N., Choi, H. W., Jung, H. A., Choi, J. S., & Kim, G. (2019). Anti-inflammatory effects of 6-formyl umbelliferone via the NF- κ B and ERK/MAPK pathway on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(4), 1859–1865.
- Lefterova, M. I., Haakonsson, A. K., Lazar, M. A., & Mandrup, S. (2014). PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(6), 293–302.

- Liu, J., & Farmer, S. R. (2004). Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor γ and β -catenin signaling during adipogenesis: A glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation-defective mutant of β -catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 45020–45027.
- Loftus, T. M., & Lane, M. D. (1997). Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 7(5), 603–608.
- Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1), 11–24.
- Mauer, J., Denson, J. L., & Brüning, J. C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in Immunology*, 36(2), 92–101.
- Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*, 80(12), 753–769.
- Moilanen, E., & Vapaatalo, H. (1995). Nitric oxide in inflammation and immune response. *Annals of Medicine*, 27(3), 359–367.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh-ishi, S., & Kudo, I. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32783–32792.
- Nakanishi, M., & Rosenberg, D. W. (2013). Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in Immunopathology*, 35(2), 123–137.
- Okuda, K., Chen, G., Subramani, D. B., Wolf, M., Gilmore, R. C., Kato, T., & Boucher, R. C. (2019). Localization of secretory mucins MUC5AC and MUC5B in normal/healthy human airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 199(6), 715–727.
- Park, J. Y., Kim, Y., Im, J. A., You, S., & Lee, H. (2014). Inhibition of adipogenesis by oligonol through Akt-mTOR inhibition in 3T3-L1 adipocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–11.
- Rada, B., Gardina, P., Myers, T. G., & Leto, T. L. (2011). Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to Pseudomonas pyocyanin. *Mucosal immunology*, 4(2), 158–171.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71–85.
- Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., & MacDougald, O. A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289(5481), 950–953.
- Shan, T., Liu, W., & Kuang, S. (2013). Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB Journal*, 27(1), 277–287.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Infl Ammopharmacology*, 15, 252–259.
- Skat-Rørdam, J., Højland Ipsen, D., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2019). A role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-alcoholic fatty liver disease. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 124(5), 528–537.
- Suganami, T., Nishida, J., & Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis

- factor α . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(10), 2062–2068.
- Sutherland, C., Leighton, I. A., & Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: New kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochemical Journal*, 296(1), 15–19.
- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L., & Singh, V. (2007). The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(3), 443–452.
- van der Sluis, M., Vincent, A., Bouma, J., Korteland-Van Male, A., van Goudoever, J. B., Renes, I. B., & Van Seuningen, I. (2008). Forkhead box transcription factors Foxa1 and Foxa2 are important regulators of Muc2 mucin expression in intestinal epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(4), 1108–1113.
- Voynow, J. A., & Rubin, B. K. (2009). Mucins, mucus, and sputum. *Chest*, 135(2), 505–512.
- Walsh, L. J., Trinchieri, G., Waldorf, H. A., Whitaker, D., & Murphy, G. F. (1991). Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(10), 4220–4224.
- Wan, H., Kaestner, K. H., Ang, S. L., Ikegami, M., Finkelman, F. D., Stahlman, M. T., & Whitsett, J. A. (2004). Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia. *Development*, 131(4), 953–964.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–1808.
- Wu, Z., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (1999). Transcriptional activation of adipogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 689–694.
- Xie, L., Fu, Q., Ortega, T. M., Zhou, L., Rasmussen, D., O'Keefe, J., Zhang, K. K., & Chapes, S. K. (2014). Overexpression of IL-10 in C2D macrophages promotes a macrophage phenotypic switch in adipose tissue environments. *PLoS ONE*, 9(1).
- Yokota, T., Oritani, K., Takahashi, I., Ishikawa, J., Matsuyama, A., Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Tenner, A. J., Tomiyama, Y., & Matsuzawa, Y. (2000). Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*, 96(5), 1723–1732.
- Yu, H., Zhou, X., Wen, S., & Xiao, Q. (2012). Flagellin/TLR5 responses induce mucus hypersecretion by activating EGFR via an epithelial cell signaling cascades. *Experimental cell research*, 318(6), 723–731.
- Yu, W., Chen, Z., Zhang, J., Zhang, L., Ke, H., Huang, L., Peng, Y., Zhang, X., Li, S., Lahn, B. T., & Xiang, A. P. (2008). Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 310(1–2), 11–18.

제 5 절 흑피계종(긴꼬리버섯) 자생균주의 탐색과 신품종 개발

1. 흑피계종의 유전자원 수집 및 특성 평가

가. 흑피계종의 자생균주 유전자원 수집

최근에는 흑피계종균(*Oudemansiella raphanipes*)은 우리나라에도 존재한다고 이 등(2014)이 보고하였고, 분양 요청하였으나 시료가 너무 적어 분양을 받지 못했다. Hao 등(2016)은 “검은 흰개미버섯” 또는 “헤이피지종(흑피계종)” 이라고 불리는 방사성 *Oudemansiella* 종은 지난 몇 년 동안 중국에서 널리 재배되고 있으며, 이것을 유럽에서는 *O. radicata*, 북미에서는 *O. furfuracea* 또는 심지어 *Termitomyces* 종으로 간주됨으로써 이 버섯의 분류학적 위치가 혼동되어 많은 연구자들이 형태학적 및 분자 유전학적 data를 분석한 결과 “헤이피지종(흑피계종)” 은 *Oudemansiella raphanipes*로 확인되었다. 또한 Hao 등(2016)이 보고한 한국의 인천에서 채집한 HKAS 93070 균주를 분자 유전학적 분석에 의해 *O. raphanipes*와 유사도가 높게 나와 한국에서도 *O. raphanipes*가 발생한다고 보고하였다 (Fig. 5-1). 따라서 흰개미버섯의 인공재배는 반드시 기주가 존재하여야만 가능하다고 하였으며, 흑계종의 인공재배 품종은 초기에는 *Collybia albuminosa* 라고 불리었다가 계종버섯 분류 재정립에 의해 *Termitomyces albuminosus* 로 분류하였다가 중국 Kunming 연구소 Hao 등(2016)에 의해 분자 유전학적으로 분석한 결과 *Oudemansiella raphanipes*로 정립되었다. 한국에서는 *Oudemansiella* 속의 인공재배는 이 등(2007)이 *Oudemansiella mucida*를, Shim 등(2006)은 *Oudemansiella radicata*의 인공재배에 성공하였다. 최근의 분류학적 재정립에 의하여 *Oudemansiella mucida*는 아시아에서는 존재하지 않는다는 보고가 있었으며, Hao 등(2016)에 의해 한국의 *Oudemansiella radicata*는 2극성을 갖는 *Oudemansiella raphanipes*로 보고하였다. *Oudemansiella radicata*로 보고한 인천대 이태수 명예교수를 초빙하여 세미나를 개최하여 그의 의견을 살펴보면 다음과 같다.



Fig. 5-1. Analysis of phylogenetic tree and fruiting bodies in the native and artificial cultivars. 「Hao 등 (2016), Shim 등 (2006)」.

○ 분류전문가 : 민간뿌리버섯(*Oudemansiella*) 인공재배 기술 (인천대학교 이태수 명예교수)에 대한 발표자료 요약

- 중국에서 재배되는 민긴뿌리버섯(중국과학원 곤명식물연구소의 Yang, Zhu Ling 교수)과 유사한 “Heipijizong” 검은흰개미버섯 (Black Termite Mushroom) 이라 불리는 버섯의 학명이 과거에는 *Termitomyces* sp. (대 형태가 *Oudemansiella* 종과 유사하나 인공재배가 불가능한 버섯)로 불리었으나, 이 버섯은 후에 중국에서 처음으로 *Oudemansiella furfuracea*로 동정되었으나, 전세계에서 민긴뿌리버섯으로 널리 알려진 *Oudemansiella radicata*는 PCR 분석에 의해 유럽에서만 발견되는 종으로 동정되어, 아시아에서 발생하는 민긴뿌리버섯과는 다른 종인 것으로 밝혀졌음
- 현재 중국에서 매년 재배가 확대되고 있는 검은흰개미버섯의 학명은 Yang 교수의 PCR 분석에 의해 *Oudemansiella raphanipes*인 민긴뿌리버섯으로 확인되었다. 이 버섯은 이미 일본, 인도 등 아시아 지역에서 채집된 바 있다. 또한 한국 인천에서 유래한 균주인 *Oudemansiella radicata*도 Yang의 PCR 분석에 의해 *Oudemansiella raphanipes*로 판명되었고 이 버섯의 자실체 담자기는 2개의 포자를 생성한다고 보고하였는데 특이하게도 *O. raphanipes*는 종은 포자를 2개 또는 4개 생성하는 서로 다른 두 종류의 strain이 있다고 보고되었다. 따라서 우리나라에서 채집되는 민긴뿌리버섯의 학명은 앞으로 PCR 분석을 통해 “*Xerula radicata*” 가 아닌 *Oudemansiella raphanipes*로 바뀔 가능성이 높은 것으로 사료된다.
- 민긴뿌리버섯의 자실체 생산 최적조건으로는
 - 1) 톱밥배지의 조성 비율: 참나무 톱밥 : 미강 (90% : 10%)
 - 2) 톱밥배지의 배양조건: 상대습도가 65~75% 유지되는 배양실에서 25℃로 30일 배양
 - 3) 원기형성 조건: 군사배양이 끝난 톱밥배지를 균 굵기를 하지 않고 배지의 상면을 살균한 부엽토나 배양토로 2~3cm 정도 덮은 후 충분히 관수를 하고 상대습도가 85~95% 유지되는 배양실에서 5~16℃로 25~30일 배양하여 원기를 형성하였음
 - 4) 자실체 생산조건: 원기가 형성된 배지를 상대습도가 75~85%로 유지되는 재배실에서 22~23℃로 5일 생육하여 자실체를 생산하였음
 - 5) 자실체 생산 소요기간: 톱밥배지에 군사를 접종해서 자실체를 형성하기까지 총 60~65일이 소요되었음

<Q & A>

Q : 민긴뿌리버섯의 학명은 어떻게 되나요.

A : 학명은 *Oudemansiella radicata*입니다.

Q : 우리나라에도 이 버섯이 자생하나요

A : 무주 덕유산에서 채집하여 유전분석을 통하여 분류학적으로 정리해 학술지에 보고되었습니다.

Q : 민긴뿌리버섯을 배양할 때 배양기간은 어느 정도 소요되었나요.

A : 약 50~60일 정도 소요된 것 같아요.

Q : 이 버섯도 인공재배를 하려면 복토로 피복되어야 합니까?

A : 일반적으로 크게 두 종류로 분류할 수 있는데 목재 즉 죽은 나무등치에 발생하는 버섯은 사물 기생균으로 일반적인 톱밥에서 버섯이 잘 발생하지만, 토양에서 즉 낙엽이나 나무 가지 등이 토양 속에 묻혀 있는 상태에서 발생하는 버섯류는 복토를 필히 해야 버섯이 발생합니다.

Q : 논문 투고 후 재배한 자실체 형태적으로 보면 *Oudemansiella radicata*보다는 *Oudemansiella raphanipes*에 가까워 보이는데 어떻게 판단하시는지?

A : 우리는 *Oudemansiella radicata*로 판단한 것을 중국 양교수가 PCR 분석결과 *Oudemansiella raphanipes*라고 한 것을 보면 *Oudemansiella raphanipes*일 거라는 것을

배제하지 못한다고 생각하며 시료가 존재하면 한번 PCR해보기 바람

Q : *Oudemansiella mucida*도 연구하셨는데 이 균주는 자실체 생산 소요일수가 어떻게 되는지?

A : 이 균주는 느타리버섯 재배와 같이 재배가 쉬우나 맛은 줄기가 좀 질겨 식용으로는 갓만 먹는 것이 좋으며 항균 항충능력을 가지고 있음

Q : 그러면 재배가 쉬운 *O. mucida*와 맛이 좋은 *O. raphanipes*을 중간교잡하여 재배가 쉬우면서 맛이 좋은 중간교잡주의 성공여부는 어떨지 알고 싶은데요?

A : 아주 좋은 아이디어입니다. 샘플을 찾아보고 있으면 분양을 하겠습니다.

세미나 개최 후 인천대학교를 방문하여 가지고 있는 *Oudemansiella mucida* 균주 11점 및 *Oudemansiella canarii* 1점을 Table 5-1과 같이 분양을 받았으며, 또한 인천 대공원 및 구리 동구릉에서 채집한 균주를 Fig. 5-2과 같이 분양받았다.

Table 5-1. List of *Oudemansiella* related species sold out from IUM.

Strain No.	Scientific name	Coleection	Strain No.	Scientific name	Coleection
IUM4252	<i>Oudemansiella canarii</i>	Czech	IUM4694	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan
IUM2548	<i>Oudemansiella mucida</i>	Anguksa	IUM4881	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan
IUM3264	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan	IUM5038	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan
IUM3874	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan	IUM5102	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan
IUM4215	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan	IUM5123	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan
IUM4642	<i>Oudemansiella mucida</i>	Jeoksangsan	IUM5136	<i>Oudemansiella mucida</i>	Deogyusan



Fig. 5-2. Fruiting body features of *Oudemansiella* collected from the natre.

나. 흑피계종의 자생균주 유전자원 특성 평가

분양받은 *Oudemansiella mucida* 균주 11점 및 *Oudemansiella canarii* 1점을 군사배양하여 클램프를 관찰한 결과 클램프가 존재하여 4극성임을 알 수 있었으며, 현재 육종의 모본으로 활용하기 위해 계속하여 계대배양 중에 있다. 또한 인천 대공원에서 채취한 시료 ICTS21761 및 ICTS21783의 형태학적 특성 평가를 Fig. 5-3과 같이 관찰하였다.



Fig. 5-3. Morphological characteristics of *Oudemansiella* collected from the nature. A: ICTS21761, B: ICTS21873.

분자유전학적으로 균주를 동정하기 위해 ITS 영역을 이용하여 Fig. 5-4와 같이 염기서열을 결정하였고 유사성을 분석하기 위해 NCBI/BLAST를 활용하여 해석한 결과 Fig. 5-5처럼 *Hymenopellis raphanipes* (= *Oudemansiella raphanipes*로 이하 표기)로 확인되었다. MEGA Ver.6.06을 이용하여 상동성 분석에서 자생균주 *Oudemansiella raphanipes* ICTS21761 및 ICTS21783은 우리나라에서 중국의 양교수가 수집해 간 *Oudemansiella raphanipes* HKAS93070과는 다른 품종으로 판단되며 또한 Fig. 5-6과 같이 중국 품종 *Oudemansiella raphanipes* KMCC04978과도 다른 품종 즉 새로운 품종으로 확인되었다.

> <i>Oudemansiella raphanipes</i> ICTS21761
ACGCTTGCGGCTTCACTTCTGTTGCTGACTTCCTTAAGGGAGTATGTGCACGTTGAAGTCGCTTGCCTCTTCTTTGTCCACCTGTGCAC CTTTTGTAGATCTGGTTGGGAAAGCTCACTTTCATCGTTAACTCGTTGAAGTGGATTTTGAAGGGTTGCTTGCCTCCCTTTGTCTCC CAGGCTATGCTTCATATCATCTCTTAGTATGTTAGAATGTCTTGTATTGGATTTCAACGACCTTAAAAAGTTATCACAACCTTCT CCACCGGATCTTCTGGTTCTTACATCAATAATGAAGACGGCTGAAAGTTTACAAGACACTGTGAATTGGCATAATTCATCGGAATCATCA AAGGCTTGAGGGGACCTCGCGCACTTGTGATTTCCAGAGTTCTGCCTGTCTGATTGTTTATCGAATTTCCGCTCCTCTTTCATTATG CTAGAGACAAGATATCCTTTGTTGAAAGTTGTATTAAGTTTTAAAGGACGGTGAAGTCCAATAATAACAAGACATTCTACACTTCCATA GATGATATGAAGCAGAGACCTGGTAGGACCAAGGAGCGCAAACTAACCTTCAAATCCACTTCTCGAGTTAACGATGAATGTGAGC TTTCCCAACCTTATCTACCAAGGTGCACAGGTGGACAAAGAAGAGGCGAAGCGACTTCAAACGTGCACATACTCCCTTAAAGGAAAGT CACGCACACAGAAGTGAAGCCGCAAGCGTTTCAAGATTTCAATAAAAGATCC
> <i>Oudemansiella raphanipes</i> ICTS21783
ACGCTTGCGGCTTCACTTCTGTTGCTGACTTCCTTAAGGGAGTATGTGCACGTTGAAGTCGCTTGCCTCTTCTTTGTCCACCTGTGCAC CTTTTGTAGATCTGGTTGGGAAAGCTCACTTTCATCGTTAACTCGTTGAAGTGGATTTTGAAGGGTTGCTTGCCTCCCTTTGTCTCC CAGGTTAATGCTTCATATCGTCTCTTGTATGTTAGAATGTACTGCTTATGGGATTTCAAGGACCCTAAAGTTGACATCAGGCTTCTCC ACCGGATCTTCTGATCCTTAAAAAATAGTAAAGAGGGTTGAGAATTTACTGACACGTGACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAGGGCT TGAGGGCGTTCGAGGACTCTGTGATTCCTGAGTTCTGCCAGTCTGATTGGTTATCGCATTTCCGCTGCGTTCCTCATTATGCGGAGAGC CGAGATATCCGTTGTTGAAAGTTGTATTAAGTTTTAAAGGACGGTGAAGTCCAATAAAACAAGACATTCTAAACATACCATAGATGATAT GAAGCAGAGACCTGGGAGGACAAAGGAGCGCAAACTAACCTTCAAATCCACTTCAACGAGTTAACGATGAAAGTGAGCTTCCCTAC CAGATCTACCAAGGTGCACAGGTGGACAAAGAAGAGGCAAGCGACTTCAAACGTGCACATACTCCCTTAAAGGAGTCAGCAACAGAAGT GAAGCCGCAAGCGTTTCAAGATTTCAATAAAAGATCC

Fig. 5-4. ITS sequences of *Oudemansiella raphanipes* ICTS21761 and ICTS21783.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Hymenopellis raphanipes voucher HKAS93083 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc...	Hymenopellis rap...	370	711	100%	1e-97	82.98%	804	KX688237.1
✓	Hymenopellis raphanipes YLH0185 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	Hymenopellis rap...	366	672	95%	2e-96	83.01%	442	LC512059.1
✓	Hymenopellis raphanipes voucher 520625MF028-15 (HGASMF01-6397) internal transcribed spacer 1, partial sequ...	Hymenopellis rap...	366	668	97%	2e-96	82.78%	789	MZ068178.1
✓	Xerula sp. HKAS 38707 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequ...	Xerula sp. HKAS...	363	683	99%	2e-95	82.74%	739	AY436429.1
✓	Hymenopellis rubrobrunnescens voucher TENN52654 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Hymenopellis rub...	361	703	100%	7e-95	82.74%	757	GQ913372.1
✓	Hymenopellis raphanipes voucher HKAS69220 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc...	Hymenopellis rap...	359	694	100%	3e-94	82.55%	828	KX688241.1
✓	Hymenopellis raphanipes isolate LFZ 220 voucher HKAS 42503 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; interna...	Hymenopellis rap...	359	694	100%	3e-94	82.51%	772	GU980130.1
✓	Hymenopellis Chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 57273 clone c14 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	Hymenopellis chi...	359	689	100%	3e-94	82.55%	767	GU980126.1
✓	Hymenopellis Chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 57273 clone c13 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	Hymenopellis chi...	359	685	100%	3e-94	82.55%	766	GU980125.1
✓	Xerula atrocaerulea strain N.L. Bougher NLB 1530 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Xerula atrocaerulea	357	698	99%	1e-93	82.73%	940	MT537027.1

Fig. 5-5. Sequences producing significant alignments of *Oudemansiella raphanipes* ICTS21761 ITS sequences by NCBI/Blast.

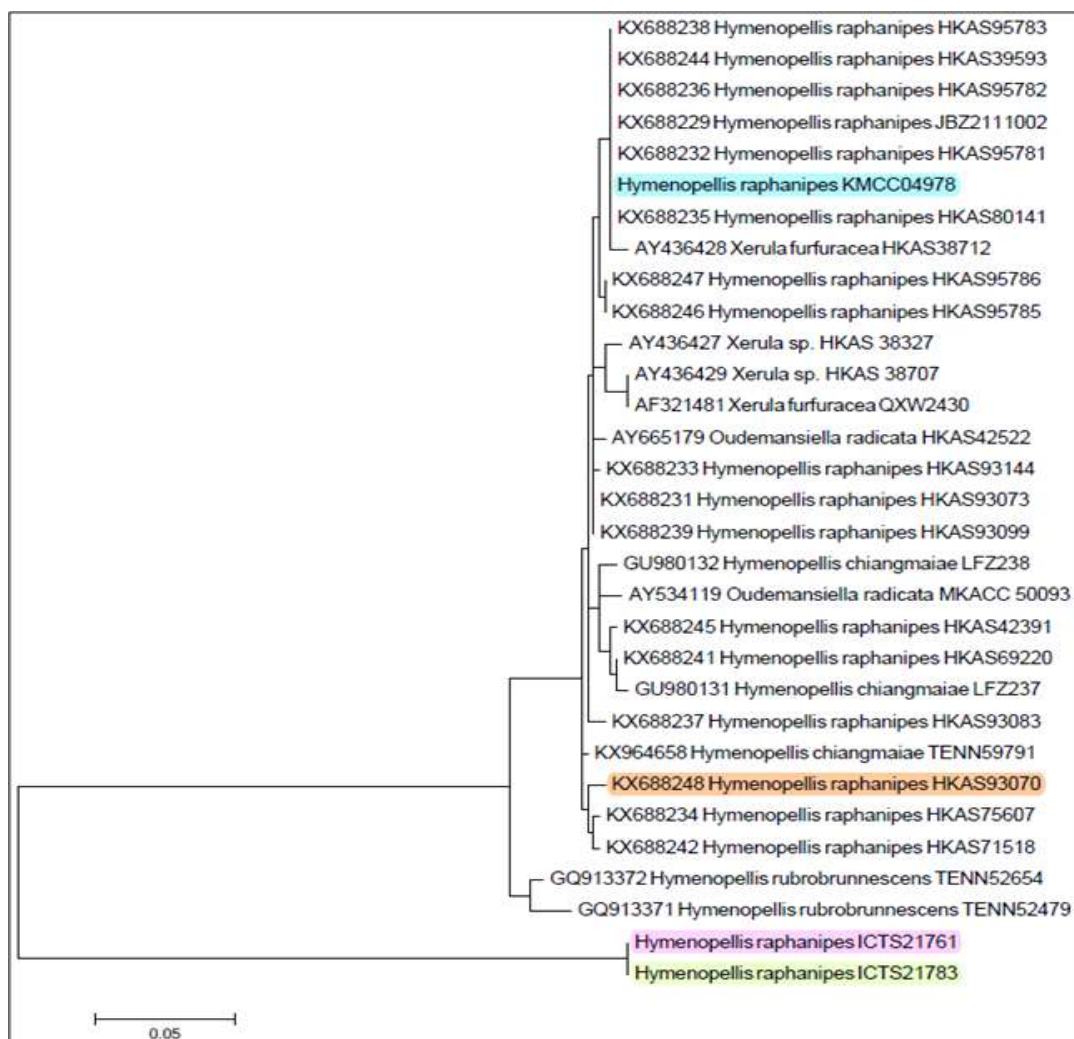


Fig. 5-6. Phylogenetic tree of *Oudemansiella raphanipes* ICTS21761 and ICTS21873 by Likelihood method of MEGA6.

2. 흑피계종 자생균주의 신품종 개발

UPOV에서 인정할 수 있는 품종개발이란 생물다양성 협약과 나고야 의정서에 위반되지 않아야 한다. 생물 다양성 협약은 생물 다양성을 생태계, 종, 유전자 세 가지 수준에서 파악하고 생물 다양성의 보전, 생물 다양성 구성 요소의 지속 가능한 이용, 유전자원의 이용으로부터 발생하는 이익의 공정하고 공평한 배분을 목적으로 하는 국제 조약이다. 생물다양성협약 부속 유전자원에 대한 접근 및 이용으로부터 발생하는 이익의 공정하고 공평한 공유에 관한 나고야의 정서이다. 즉 외국의 유전자원을 함부로 이용할 수 없음을 말하고 있으며 이용시 반드시 이익을 공유하며 이익에는 로열티, 기술이전, 연구 활동 지원 등 금전적 이익과 비금전적 이익을 모두 포함할 수 있다고 되어 있다. 이 내용은 육종가의 입장에서 보면 외국의 균주를 가지고 품종개량을 하더라도 로열티를 지불하도록 되어 있다. 따라서 UPOV에서 인정할 수 있는 품종을 개발하려면 우리나라 고유종이거나 자생균주를 이용하여 품종을 개량하여야만 가능하도록 만들어져 있어 육종가들에겐 다양한 품종의 이용이 어렵게 되었다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 제1절에서 MKCC04978 및 hago 품종을 이용하여 단포자를 분리한 후 교배를 통해 신품종을 선발하여 병재배에 성공하였지만 이 또한 UPOV 입장에서 볼 때 로열티를 지불해야 한다. 따라서 우리나라 자생균주를 인천대 이태수 교수의 도움으로 Fig. 1-17과 같이 *Oudemansiella mucida* 11점 및 *Oudemansiella canarii* 1점을 분양받았고, Fig. 5-2 및 Fig. 5-3과 같이 수집하여 *Oudemansiella raphanipes* ICTS21761 및 ICTS21873로 명명하였다. 분리된 *Oudemansiella raphanipes* ICTS21761 및 ICTS21873은 2극성으로서 클램프를 가지고 있지 않아 자체 원형질체 분리 및 재생으로 단핵균주를 분리하여 교배하여야 가능하다. 원형질체를 분리하기 위해서는 군사배양을 시도한 결과 Fig. 5-7과 같이 군사생장이 빠르고 군사밀도가 치밀한 군사를 선발하였다. 분리된 자생균주와 기존 균주와의 불화합성을 조사하기 위해 Fig. 5-8과 같이 대선행성을 조사하였다. *Oudemansiella mucida*와 원형질체 융합을 통해 병재배 기간 단축 및 대량생산이 가능하도록 새로운 품종을 개발하고자 한다. 그리고 *Oudemansiella mucida*의 항균물질이 고함유된 신품종을 개발함으로써 기능성도 높이고 대량생산 병재배가 가능한 신품종을 개발하기 위해 시도하고 있다.



Fig. 5-7. Mycelia characteristics of *Oudemansiella mucida* (Left) and *Oudemansiella raphanipes* A: KMCC04978, B: Hago, C: ICTS21761 and D: ICTS21783.

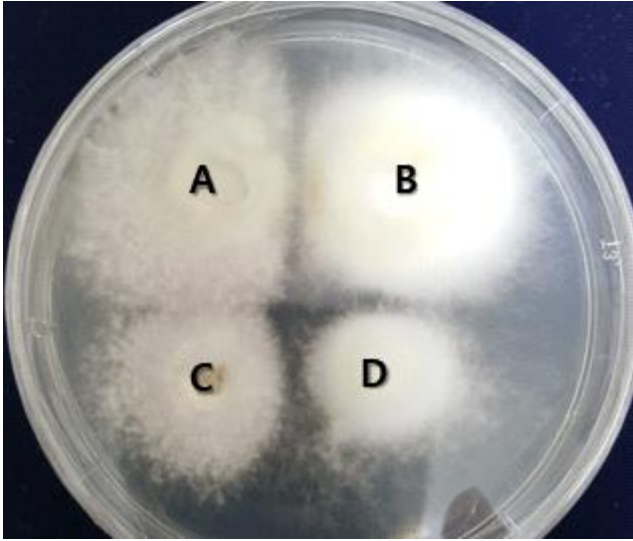


Fig. 5-8. Incompatibility test of isolated *Oudemansiella raphanipes* from the nature. A: MKCC04978, B: ICTS21761, C: Hago, D: ICTS21783.

참고문헌

- Cai Q, Tulloss RE, Tang LP, Tolgor B, Zhang P, Chen ZH, Yang ZL. 2014. Multi-locus phylogeny of lethal amanitas: Implications for species diversity and historical biogeography. *BMC Evolutionary Biology* 14: 143.
- Hao YJ, Zhao Q, Wang SX, Yang ZL. 2016. What is the radicate *Oudemansiella* cultivated in China? *Phytotaxa* 286: 1-12.
- Iqbal Z, Han LC, Soares-Sello AM, Nofiani R, Thormann G, Zeeck A, Cox RJ, Willis CL, Simpson TJ. 2018. Investigations into the biosynthesis of the antifungal strobilurins. *Org Biomol Chem* 16: 5524-5532.
- Ji DG, Li DF, Song MJ. 1982. Cultivation of *Oudemansiella radicata*. *Edible Fungi* 4: 11-12.
- Li Y, Wang XD, Fu QF, Liu Q, Wei W, Liu J. 2012. Cultivation techniques of *Termitomyces fuliginosus*. *Edible Fungi* 1: 37-39
- Niego AG, Raspé O, Thongklang N, Charoensup R, Lumyong S, Stadler M, Hyde KD. 2021. Taxonomy, Diversity and Cultivation of the Oudemansielloid/Xeruloid Taxa *Hymenopellis*, *Mucidula*, *Oudemansiella*, and *Xerula* with Respect to Their Bioactivities: A Review. *J Fungi* 7: 51. <https://doi.org/10.3390/jof7010051>.
- Pegler DN, Young TWK. 1987. Classification of *Oudemansiella* (Basidiomycota: Tricholomataceae), with special reference to spore structure. *Transactions of the British Mycological Society* 87: 583-602.
- Petersen RH. 2010. *Hymenopellis**. *Nova Hedwigia Beiheft* 137: 80-254(213). in Petersen RH, Hughes KW(ed). The *Xerula/Oudemansiella* Complex (Agaricales). *Nova Hedwigia Beiheft* 137: 1-625.

- Petersen RH, Hughes KW. 2010. The *Xerula/Oudemansiella* Complex (Agaricales). *Nova Hedwigia Beiheft* 137: 1-625.
- Petersen RH, Nagasawa E. 2006. The genus *Xerula* in temperate east Asia. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 43: 1-49.
- Qin J, Feng B, Yang ZL, Li YC, Ratkowsky D, Gates G, Takahashi H, Rexer KH, Kost GW, Karunarathna, SC. 2014a. The taxonomic foundation, species circumscription and continental endemisms of *Singerocybe*: evidence from morphological and molecular data. *Mycologia* 106: 1015-1026.
- Redhead SA, Ginns J, Shoemaker RA. 1987. The *Xerula* (*Collybia*, *Oudemansiella*) *radicata* complex in Canada. *Mycotaxon* 30: 357-405.
- Shim JO, Chang KC, Kim TH, Lee YS, Lee UY, Lee TS, Lee MW. 2006. The fruiting body formation of *Oudemansiella radicata* in the sawdust of oak (*Quercus variabilis*) mixed with rice bran. *Mycobiology* 34: 30-33.
- Sun K, Guo XM, Mou DH, Li Y. 2016. Optimization of ethanol leaching-water extraction of *Termitomyces badius* polysaccharides by double orthogonal test. *Food Engineering* 2: 35-38, 41.
- White TJ, Bruns TD, Lee SH, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds.) *PCR protocols: A guide to methods and Application*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wu CL, Gan QJ, Bao WH, Huang WH, Chen L. 2013. Management techniques of high-yield bionics wild cultivation of *Oudemansiella radicata*. *Edible and medicinal mushrooms* 21: 120-121.
- Yang ZL, Zang M. 1993. Classification of the genus *Oudemansiella* Speg. in Southwest China. *Acta Mycologia Sinica* 12: 16-27.
- Yu FQ, Ji DG, Shong MJ, Liu PG. 2002. Comparative cultivation of two varieties in *Oudemansiella furfuracea*. *Edible Fungi of China* 21: 13-15.
- Zeng NK, Tang LP, Li YC, Tolgor B, Zhu XT, Zhao Q, Yang ZL. 2013. The genus *Phylloporus* (Boletaceae, Boletales) from China: morphological and multilocus DNA sequence analyses. *Fungal Diversity* 58: 73-101.
- Zhao Q, Feng B, Yang ZL, Dai YC, Wang Z, Tolgor B. 2013. New species and distinctive geographical divergences of the genus *Sparassis* (Basidiomycota): evidence from morphological and molecular data. *Mycological Progress* 12: 445-454.

제 6 절 연구개발과제의 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- ① 인공재배되는 중국에서 수집한 흰개미버섯(흑계종 : *Termitomyces albuminosus*)의 분자유전학적 분석에 의해 흑피계종(*Oudemansiella raphanipes*)로 확인하고 우리나라에서 자생하는 3균주를 채집함
- ② 흑계종을 액체배양 및 복토를 통한 병재배 방법으로 자실체 형성에 성공하여 대량생산 가능성을 입증
- ③ 흰개미버섯 추출 및 분획물의 항염증 효과
- ④ 흰개미버섯(흑계종) 내 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 억제 효과
- ⑤ 흰개미버섯(흑계종) 유래 코엔자임Q9의 기도 폐쇄에 대한 보호 효과
- ⑥ 흰개미버섯(흑계종)의 교잡하여 교배체를 선발하여 군사생장이 모본보다 빠른 신품종 선발
- ⑦ *Termitomyces* sp. JCM 균주에 γ -선 조사에 의해 군사생장 속도를 증진시켜 군사체를 이용한 아미노산이 풍부한 균주 개발

(2) 정량적 연구개발성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문	SCI	비SCI			논문평균IF	학술발표	
건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	15	15	20	10		10	10							10				10	
최종목표	1	1	1	1		1	50				2	2		3				2	
1차년도	목표											1		1				1	
	실적											1		3				1	
2차년도	목표	1		1	1	1						1	1	2				1	
	실적	1										1		2				1	
소계	목표	1		1	1	1						1	2	3				2	
	실적	1										1	1	5				2	
종료 1차년도	1	1					50				1								
종료 2차년도																			
종료 3차년도																			
종료 4차년도																			
종료 5차년도																			
소계	1	1									1								
합계	2										3	1		5				2	

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	계종버섯 추출물과 분획물의 라디칼 소거 활성과 항염증 활성 분석	한국버섯학회지	강민재	18	대한민국	한국버섯학회	비SCIE (KCI)	2020. 03. 26	1738-0294	
2	Anticancer and Immunomodulatory Effects of Polysaccharides	NUTRITION AND CANCER	Anley Teferra Kiddane	https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1861310	England	Routledge Taylor & Francis Group	SCIE	2020.12.26		
3	Modulation of Inflammatory Pathways and Adipogenesis by the Action of Gentisic acid in RAW 264.7 and 3T3-L1 Cell Lines	Journal of Microbiology and Biotechnology	강민재	31	대한민국	한국미생물·생명공학회	SCIE	2021.08.27	1017-7825	

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2019년도 (사)한국버섯학회 하계학술대회	신평균(특강)	2019. 6. 14	경기친환경농산물유통센터	대한민국
2	2019년도 (사)한국버섯학회 하계학술대회	신중무, 강원율, 신평균(포스터)	2019. 6. 13~14	경기친환경농산물유통센터	대한민국
3	2019년도 (사)한국버섯학회 추계학술대회	김영재, 황현정, 장은진, 강민재, 김군도, 신평균, 김근기(포스터)	2019. 10. 30~31	경남과학기술대학교	대한민국
4	2021년도 (사)한국버섯학회 하계학술대회	황현정, 강민재, 김군도, 신평균, 김근기(포스터)	2021. 06. 04~11	전라남도 농업기술원	대한민국
5	2021년도 (사)한국버섯학회 하계학술대회	남윤걸, 신중무, 강원율, 신평균(포스터)	2021. 06. 04~11	전라남도 농업기술원	대한민국

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	생물자원(<i>Termitomyces albuminosus</i>)	MKCC04978	농촌진흥청 버섯과	2020

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허 (흑피계종의 재배 방법)	대한민국	(주)힘찬	2021. 06.29	10-2021-0084501					활용	
2	특허 (코엔자임 Q9를 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물)	대한민국	부경대학교	2021. 08.13	10-2021-0107483						

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	기능성강화 흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 및 신제품 개발	(주)힘찬	1	1	2
	합계		1	1	2

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료

<p>Journal of Mushrooms 게중버섯 추출물과 분획물의 라디칼 소거 활성과 항염증 활성 분석 Investigation of radical scavenging and anti-inflammatory activity of the extract and fractions of <i>Termitomyces albuminosus</i> Min-Jae Kang, Nae-Jin Kim, Hee-Jong Hwang, Moon-Ho Kim, Jong-Ahn Shin, Young-Cheol Shin, Gwan-Deu Kim, and Nam-Il Kim</p>	<p>Termitomyces albuminosus의 장산과 및 항염증 활성 증진 연구 발표 자료</p>	<p>흰개미버섯(흑계종)의 인공재배 기술 개발 발표 자료</p>	<p>흰개미버섯의 인공재배 및 흑계종의 인공재배 기술 발표 자료</p>
<p><한국버섯학회지18(1):45-52></p> <p>Anticancer and Immunomodulatory Effects of Polysaccharides Aster Tanaka, Kazuhiko Kimura, and Gwan-Deu Kim</p>	<p><2019년 한국버섯학회 학술발표></p> <p>Oudemansiella radicata의 생체활성 특성과 인공재배 기술 개발 발표 자료</p>	<p><2019년 한국버섯학회 학술발표></p> <p>Termitomyces albuminosus의 장산과 및 항염증 활성 증진 연구 발표 자료</p>	<p><2019년 한국버섯학회 학술발표></p> <p>The Korean Society for Microbiology and Biotechnology</p>
<p><2020년 Nutrition and Cancer></p> <p>Nutrition and Cancer</p>	<p><2021년 한국버섯학회 학술발표></p> <p>Termitomyces albuminosus의 장산과 및 항염증 활성 증진 연구 발표 자료</p>	<p><2021년 한국버섯학회 학술발표></p> <p>Termitomyces albuminosus의 장산과 및 항염증 활성 증진 연구 발표 자료</p>	<p><2021년 Journal of Microbiology and Biotechnology></p> <p>Journal of Microbiology and Biotechnology</p>
<p><특허출원_1></p> <p>특허출원증서 1</p>	<p><2021년 하계학술대회 우수발표상></p> <p>2021년 하계학술대회 우수발표상</p>	<p><특허출원_2></p> <p>특허출원증서 2</p>	<p><특허출원_2></p> <p>특허출원증서 2</p>

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 국내외 유전자원 수집 및 평가	○ 흑계종(<i>Termitomyces albuminosus</i>) : 2점 Termitomyces sp. JCM strain : 17점 우리나라 자생균주 채집 : 3점	○ 20
○ 흑계종의 병재배 기술개발	○ 흑계종(<i>Termitomyces albuminosus</i>) 인공재배 : MKCC04978 및 Hago 2점	○ 15
○ 흑계종의 추출 및 분획물의 생리활성 검증	○ 흑계종의 항염증 효과	○ 10
○ 흑계종의 유래물질 효능 평가	○ 겐티스산의 비만 유래 만성 염증에 대한 억제 효과	○ 10
○ 흑계종의 교잡주 선발	○ 코엔자임Q9의 기도 폐쇄에 대한 보호 효과	○ 10
○ 돌연변이 처리에 의한 고아미노산 균주 선발	○ 군사생장이 빠른 균주 선발	○ 20
	○ <i>Termitomyces</i> sp. JCM 균주에 γ -선 조사 : 군사생장 속도가 빠른 균주 선발	○ 15

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 본 과제는 세부과제에서 흑계종의 자실체를 형성하여 1, 2 협동과제에 자실체를 전달하여 기능성 물질 추출 및 분획 그리고 효능평가를 한 후 다시 세부과제에 전달되어 교배체의 자실체를 인공재배하여 1, 2협동과제에서 교배체의 기능성 효능을 평가하여야 하는 데 교배체의 자실체 형성에 8차례 시도하였으나 자실체를 얻지 못하여 이 과제 진도가 지체되어 신제품 등록이나 기술이전 등이 안되어 목표에 미달되었음

2) 자체 보완활동

- 교배체의 자실체 형성이 지지부진하여 γ -선 조사에 의한 군사생장 속도가 빠른 균주를 이용한 군사체를 대량배양하여 아미노산 분석을 통해 고 아미노산을 함유하고 있다면 이 균주를 특허 출원하여 기술이전을 통한 첨가물로 활용하거나 기능성 버섯곡물의 심품으로 개발하고자 한다.

3) 연구개발 과정의 성실성

- 인공재배되는 흰개미버섯(흑계종)의 정확한 학명을 분자유전학적 방법으로 판단하여 흑피계종(*Oudemansiella raphanipes*)로 확인되어 우리나라에 자생하는 균주를 채집함
- 인공재배 전과정인 시험관 → 삼각플라스크 → 상자재배 → 복토 병재배 → 무복토 병재배 등으로 전과정의 재배시스템을 익혀 균주 특성을 숙지하였음
- 흰개미버섯(흑계종)의 여러용매를 통한 추출하고 분획하여 추출물이 아닌 추출 분획물질로 효능 평가를 하였고, 효능이 있는 물질은 구조분석하여 SCI 논문에 기고하였음
- 본과제에서 인공재배된 자실체와 중국재배 자실체를 획득하여 아미노산 함량을 비교 분석하였음

- 인공재배가 안되는 *Termitomyces* sp. JCM strains를 분양받아 균사생장이 느려 활용 가능성이 없는 균주에 돌연변이를 처리(γ -선 조사)하여 균사생장이 빠른 균주를 선발하여 균사체를 대량배양하여 아미노산 분석을 통해 첨가제나 기능성 버섯곡물 식품을 개발하고자 함

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 흰개미버섯(흑계종)의 유전자원 수집에서 흑피계종을 우리나라에서 균주 3점을 수집하고 활용함으로써 중국 의존도에서 탈피
- 흰개미버섯(흑계종)의 병재배를 성공함으로써 중국의 지면재배나 봉지재배보다 깔끔한 대량생산 체계를 구축할 수 있을 것이라 사료됨
- 흑계종의 생리활성 물질의 항산화, 항염증, 항비만 등 효능 평가는 추출물을 분획하여 효능을 나타내는 물질을 구조분석한 경우는 한단계 업그레이드된 효능평가라 할 수 있음
- 인공재배가 불가능한 *Termitomyces* sp. JCM strains를 돌연변이를 처리(γ -선 조사)하여 균사생 속도가 빠른 균주의 선발은 아미노산 함량이 높은 균주로서 활용 가능성을 제시함

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 연구개발성과의 활용분야
 - 특허출원 : 흑피계종의 재배방법, 코엔자임Q9
- 활용방안
 - 중국에서 수입되는 종균배지의 수입 억제를 위해 개발된 신제품의 종균배지 대량생산
 - 계종버섯 대량생산 시스템의 기술이전
- 추가연구의 필요성
 - 흑피계종 자생균주의 재배 및 신제품 개발
 - 무복토 병재배 기술 확립에 의한 대량생산
 - 돌연변이를 처리(γ -선 조사)된 균사체 대량배양 및 아미노산 함량 분석
- 타 연구에의 응용
 - 재배가 어려운 야생버섯의 대량생산
- 기업화 추진방안
 - 현재 지면재배(년 1회)나 봉지재배(년 2회)보다 병재배를 통해 년 재배횟수가 증가되고 대량생산이 가능한 농가에 기술이전하여 대량생산토록 유도
- 기술 이전
 - 자체 기술이전 뿐만아니라 재배를 희망하는 농가에 기술이전할 용의가 있음

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)	연구개발 종료 후 5년 이내(매년 목표치)	
국외논문	SCIE	Coenzyme Q9 from <i>Termitomyces albuminosus</i> Downregulates Mucin Overexpression of Human Bronchial Epithelial Cells by Pyocyanin from

		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 점액 과잉 생산에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물 (1)
	국외	
	계	
특허등록	국내	흑피계종의 재배방법 (1)
	국외	
	계	
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	매출액	특허 출원된 '흑피계종의 재배방법' 을 자체 기술 이전하여 생산 판매 (50백만원)
	기술이전	
	공정개발	
제품개발	시제품개발	
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		
포상 및 수상실적		2021년 하계 학술대회 우수발표상
정성적 성과 주요 내용		

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서
2.	1) 2)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.