

최 종  
연구보고서

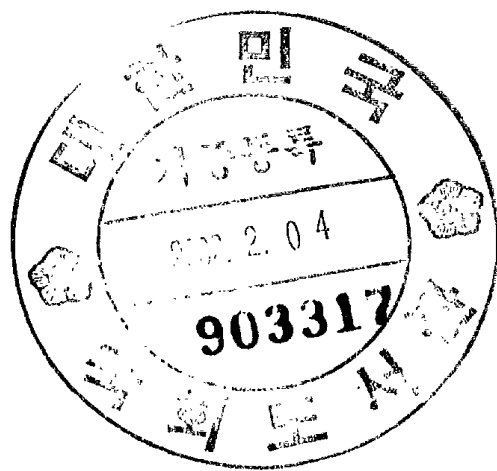
# 유전자 분석과 mating에 의한 임산 버섯의 개량 및 버섯 생산 기질의 다양화

Improvement of *Lentinula edodes* by Genetic Analysis and  
Mating, and Variegation of Mushroom Production Substrate

연구기관

충 북 대 학 교

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전자 분석과 mating에 의한 입산 버섯의 개량 및 버섯 생산 기질의 다양화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 11 월 5 일

주관연구기관명 : 충북대학교  
총괄연구책임자 : 박 재 인  
1년차 총괄책임자 : 민 두 식  
세부연구책임자 : 박 재 인  
연 구 원 : 조 남 석  
연 구 원 : 김 재 수  
연 구 원 : 구 창 덕  
연 구 원 : 임 선 희

협동연구기관명 : 한국교원대학교  
협동연구책임자 : 이 상 선  
연 구 원 : 이 길 재  
연 구 원 : 홍 기 성  
연 구 원 : 홍 성 운  
연 구 원 : 정 홍 채  
연 구 원 : 김 동 훈  
연 구 원 : 이 준 기

위탁연구기관명 : (주)바이오니아  
위탁연구책임자 : 박 한 오  
연 구 원 : 전 진 태  
연 구 원 : 유 재 형  
연 구 원 : 박 종 선  
연 구 원 : 김 승 해  
연 구 원 : 방 영 배  
연 구 원 : 정 허 진  
연 구 원 : 김 현 배  
연 구 원 : 박 수 민

# 요 약 문

## I. 제 목

유전자 분석과 mating에 의한 임신 버섯의 개량 및 버섯 생산 기질의 다양화

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 식용버섯재배 원목으로 쓰이는 참나무류가 부족한 상황이므로 이를 대체할 수 있는 활엽수재 및 침엽수재의 원목을 개발한다.
  - 이는 부족한 버섯재배 원목문제를 해결할 수 있을 것이다.
2. 버섯재배 후에 나오는 재배잔사의 이용법을 개발한다.
  - 그냥 버려지는 재배잔사의 이용법은 자원의 효율적인 이용에 중요하다.
3. 임업 유용버섯에 대한 균사의 근연관계를 조사하여 새로운 품종여부를 판정한다.
  - 현재 재배되고 있는 버섯균의 상호 유사성을 파악하여 이용시에 활용한다.
4. 표고버섯의 mating에 의하여 새로운 품종을 육성한다.
  - 우리 고유의 품종을 보유하여 종균의 해외의존도를 낮추고 나아가서는 독립적인 국가경쟁력을 확보할 수 있다.
5. 임신버섯의 생육단계별 품종별 유전자 발현양상을 분석하여 자실체 형성에 관여하는 유전자를 탐색한다
  - 발이율을 높임으로써 생산성을 증대시켜 소득증대에 기여한다.
6. 표고버섯의 형질전환기술을 개발한다
  - 버섯품종의 새로운 육종기술개발로 우량종균의 개발을 촉진한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

1. 생육활성물질 첨가에 의한 표고 톱밥재배의 생산성향상 및 재배 잔사의 유효이용  
가. 버섯 생육활성 성분추출 및 성상구명  
나. 톱밥재배에서 생육활성물질의 효과 구명  
다. 생육활성물질의 버섯생산에 대한 첨가효과 구명  
라. 재배 잔사내 생육활성 물질구명  
마. 유기질 토양개량제조 및 개량효과 시험
  
2. 임업유용버섯에 대한 균사의 근연관계 조사 및 mating에 의한 육종방법 개발  
가. 임업유용버섯의 수집  
나. 수집균주의 생물학적인 관계구명  
다. mating에 의한 균사합성  
라. 표고 발이과정과 톱밥배지에서의 성장과정관찰  
마. mating된 균사의 특성파악  
바. 버섯균사의 발이에 관련되는 생리적인 특성구명
  
3. 임산버섯 생육단계별, 품종별 유전자 발현양상 분석 및 형질전환 기술 탐색  
가. 표고균주의 cDNA합성  
나. cDNA클론화 및 cDNA library구축  
다. 발이유전자분리  
라. promoter선발  
마. Gene Knock-out기술 탐색

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

〈제1세부과제〉 생육활성 물질 첨가에 의한 표고 톱밥재배의 생산성 향상 및 재배 잔사의 유효 이용

#### 가. 표고버섯 톱밥재배를 위한 효과적인 배지의 탐색

수종별 최적배지 선발과 관련하여 표고버섯 톱밥재배용 원료로 많이 사용되는 H01(상수리나무)은 9cm로 우수한 균사 성장량을 보였고, 활엽수인 H02 (은수원사시나무), H03(이태리포푸라), H04(프라타나스), 그리고 H05(자작나무) 등도 7.5~8.5cm의 균사 성장을 보였다. 침엽수에서는 S01(일본잎갈나무)이 8cm로 활엽수 수종들과 비슷한 성장을 보였고, S02(리기다소나무)와 S03(스트로부잣나무)은 6~6.5cm로 좋지 않은 성장량을 보였다.

배지의 수분함량이 톱밥재배에 미치는 영향과 관련, 산림6호가 다른 균주보다 수분함량에 영향을 덜 받으며, 기타 균주는 수분율 125% ~ 175%에서 생장이 양호하였다. 수분율 75%에서는 4균주 모두 생장이 저해되었으며, 산림4호가 특히 수분율변화에 민감하였다. 수분함량에 따른 톱밥의 분해속도는 수분율 175%에서 가장 빠르고 산림4호가 수분율 변화에 민감하였다. 수분율 75%에서 분해율은 5%~10%인데 반하여 175%에서는 16%~21%였다. 수분량이 많을수록 원기를 빨리 형성하였으며, 이것은 균주에 따라 달랐다. 임협1호가 수분 225%에서 원기를 가장 잘 형성하였으나, 산림 6호는 원기를 전혀 형성하지 않았다. Mok H균주는 수분 175%에서도 원기를 형성하였다.

침엽수류 중 S02(리기다소나무)의 냉·온수 추출물의 첨가로 톱밥 잔사에 각각 미강을 10:1(W:W)로 혼합한 배지에서 산림5호 종균의 균사 성장을 측정한 결과, 균사 생장이 크게 저해받았으며, 냉·온수 추출물 중에 균사 성장을 저해하는 성분이 있을 것으로 추정된다. PDA배지에 각각의 추출물을 첨가하여 균사 성장을 측정한 결과도

동일한 균사의 생장을 억제함을 확인하였다.

표고균사의 액체 배양체와 톱밥 배양체를 가지고 에르고스테롤을 분석한 결과 표고균사내 이 물질의 함량은 배양균사체의 생체량과 직선적 상관관계가 매우 높고, 균주나 배양기간, 배양조건에 따라서도 달라짐을 파악하였다. 에르고스테롤(ergosterol)은 고등균류 균사세포막의 중요한 구성 성분으로 이들의 특징 물질이고, 균의 생장에 중요한 기능을 한다. 그러므로 균사 배양체에서 이 물질의 함량을 분석함으로써 고체상 배지 속에 있는 곰팡이의 생체량을 추정할 수 있다.

표고균사의 액체 배양체와 톱밥 배양체를 가지고 에르고스테롤을 분석한 결과, 이 물질의 함량은 균사체의 중량과 직선적 상관관계가 있으면서( $r=0.98$ ), 배양기간, 균주, 배지내 수분함량에 따라 달라졌다. 액체배양체에서 에르고스테롤 농도는 10주간 배양된 것이 0.13%로 20주간 배양된 것의 0.10% 보다 높았다.

톱밥배양체에서 이 물질의 농도는 균주와 수분 함량에 따라 0.015 - 0.042% 범위였다. 표고균주 산림 4호 배양체에서 에르고스테롤 함량은 균주 목-H나 산림 6호의 것보다 건조배지 g당 20~140 $\mu\text{g}$  정도 높았다. 이 화학물질의 함량은 표고균사를 수분율이 125%나 175%인 배지에서 배양하였을 때 건조배지 g당 297~425 $\mu\text{g/g}$  였다. 이 양은 수분율이 75%나 225%인 배지에서의 함량, 148~286 $\mu\text{g/g}$  건조배지, 보다 높은 것이다. 에르고스테롤을 분석함으로써 톱밥이나 원목과 같은 고체배지내에 있는 표고균사량의 추정이 가능하리라 생각한다.

#### 나. 생육활성물질 첨가가 표고버섯의 톱밥재배에 미치는 영향

표고버섯의 생장이 매우 좋았던 일본잎갈나무의 구성당류를 분석한 결과, glucose 함량이 68.1%로서 가장 많았으며, galactose가 18.2%로서 소나무류 함량의 약 3배를 보이고 있다. 그리고 mannose함량이 2.5%로서 다른 침엽수재의 1/4 - 1/5 정도에 지나지 않았다. arabinose와 galactose 의 함량비는 1:7 로서 galactose의 함량이 매우 높았다. 수용성추출물의 구성당류를 분석한 결과, rhamnose 및 mannose는 거의 존재하지 않았으며, glucose도 2.2%의 매우 낮은 함량을 보여주고 있다. arabinose 및 galactose의 함량은 전체추출물의 약 92%로 나타났으며, arabinose와 galactose의 비는 1 : 4.1로서 목재의 함량비인 1 : 7.3보다 매우 낮았다.

arabinogalactan을 정제하여, 완전메틸화.가수분해.가스크로마토그래피에 의하여  $\beta$ -1,3-결합한 D-galactopyranose 기가 주고리를 이루며, 이 주고리에 galactose의 C<sub>6</sub>위가 분기를 이루면서 측쇄를 형성하였다. 이 측쇄에는 2종의 분자가 결합하고 있는데,  $\beta$ -1,6-결합한 D-galactose 와,  $\beta$ -1,3- 결합한 L-arabinose로서, 전자는 2-3개의 D-galactopyranose기가 결합을 하고 있으며, 후자는 furanose형의 L-arabinose기가 1-2개 중간의 측쇄구조를 이루고, 말단은 pyranose형의 L-arabinose 로 구성되어 있었다. L-arabinose와 D-galactose기의 비는 1 - 4.5였다. arabinose 와 galactose의 함량비도 1 : 3.8로서 조 arbinogalactan의 함량비 1 : 3.4 와 거의 유사한 값을 보여주고 있다.

PDA배지에 일본잎갈나무의 WSF(수용성추출물) 첨가효과와 관련하여, 표고버섯균의 균환생장량은 1 - 12%의 첨가량에서는 대조구에 비하여 균사 생장이 증진되었다. 특히 산림 6호의 경우에는 2%의 첨가량이, Mok-H의 경우에는 4% 첨가에서 균사 생장이 최대였고, 첨가량이 더 많으면 생장이 오히려 감소하였다. 톱밥배지에서의 WSF 첨가농도를 달리한 조건에서 배양한 결과, PDA 배지에서의 결과와 마찬가지로 1 - 15%의 첨가량에서 대조구에 비하여 균사 생장이 증진되었다. 특히 산림 6호의 경우에는 4%의 첨가량이, Mok-H의 경우도 4% 첨가에서 균사의 생장이 최대였고, 첨가량이 더 많으면 생장이 오히려 감소하였다. 일본잎갈나무의 WSF를 4% 첨가함으로써 ergosterol 함량의 변화를 측정된 결과, 균사가 콜로니를 형성하는 초기단계에서는 낮은 ergosterol함량을 나타냈으나 fruiting이 시작되는 시기에 급격히 높아지는 결과를 나타냈다. 결국 추출물은 배지내에서의 균사의 활동을 도와 배지의 분해를 효과적으로 일으키면서 배지의 성숙도를 높여주는 것으로 나타났다. 그러나 자실체 발생시기의 뚜렷한 단축은 없었다.

#### 다. 표고버섯 톱밥재배 잔사의 유효이용

시멘트블록조 발효상을 축조, 발효 촉진을 위하여 발효균 및 발효 첨가제를 적량 첨가하여, 공기가 잘 통하도록 쌓았으며, 함수율을 약 60% 가 되도록 조절하였다. 퇴적후 1개월마다 환적하였으며, 그간의 발효상 온도변화를 측정된 결과, 퇴적 1주일에서 10일 이내에 최고온도 (본 실험에서는 약 60℃)까지 상승하였으며, 이러한 온도수준이 10일정도 경과되다가 다시 감소하기 시작하였다. 초두목 부후시 발효상온도 변화를



폐골목의 부후시와 비교하였을때, 초기 발효상온도가 66℃로서 발효 15일만에 상승하였으며, 더이상 온도가 올라가지 않았다. 매 뒤집기 이후에도 온도는 다소 높게 올라갔지만 초기만큼은 올라가지 못하고 64℃를 기록하였는데, 이는 분해되기 용이한 성분이 잔존하기 때문으로 사료된다.

유식물 파종실험에서 유기질비료의 혼합량이 많아질수록 무우의 생장이 우수한 것으로 나타났으며, 유기질비료 사용이 토양온도 변화에 미치는 영향에 관해서는 유기질비료 혼합율이 토양온도의 변화는 유기질비료의 혼합율이 증가함에 따라 토양의 온도가 다소 높아지는 경향을 보여주었다.

근원경생장에 있어서 음식물쓰레기는 중국단풍, 쥐똥나무가 우수하였고, 함박꽃나무, 가래나무, 단풍나무가 불량하였다. 표고재배 폐골목 비료는 황벽나무, 쥐똥나무가 우수하였고, 가래나무, 단풍나무, 함박꽃나무 등이 불량하였다. 신선 지조목의 경우도 중국단풍과 쥐똥나무가 우수한 생장을 보였고, 가래나무, 함박꽃나무, 단풍나무 등이 불량한 근원경 생장을 나타냈다.

수종별로 살펴본 수고생장은 음식물쓰레기의 경우 중국단풍이 730.9%, 단풍나무가 602.5% 로서 높은 성장율을 기록하였고, 함박꽃나무가 200%를 초과하는 성장량을, 황벽나무는 52.5%, 귀룽나무 78%, 고로쇠나무 72.8%로서 매우 낮은 수고생장율을 나타냈다. 표고재배 폐골목비료는 중국단풍, 단풍나무, 귀룽나무등이 우수하였고, 황벽나무, 가래나무, 쥐똥나무가 불량하였다. 신선 지조목비료의 경우는 중국단풍, 단풍나무, 함박꽃나무, 귀룽나무 및 가래나무가 불량한 것으로 나타났다.

## 협동연구과제

〈제2세부과제〉 임업유용버섯에 대한 균사의 근연관계조사 및 mating에 의한 육종방법개발

가. 표고 균주의 수집과 이들의 계통간의 생물학적인 관계;

한국에서 사용된 표고 품종 33개를 수집하였고, 이들은 연구기관에서 개발 및 일본에서 수입한 표고 품종을 야산에서 채집한 표고 균과 비교하였다. 생물학적인 계통

분류는 알려진 채집된 야생 종으로 표고의 품종의 계통적인 관계를 관찰하였다. 일본 균과 우리나라에서 개발된 균들은 서로 비슷하게 분류되어, 한국의 고유의 품종으로 인정되는 균들은 거의 없었다. 야생에서 채집된 균들은 대부분이 재배 장소에서 나간 포자들로 생각되며, 몇몇의 야생 표고 품종은 한국 및 일본의 상업적인 품종과는 다른 것으로 나타났다. 표고 품종간의 수종 나무의 분해 률을 측정하였으며, 이는 다양한 분해 률을 나타내어 앞으로 육종에 좋은 자료가 될 것으로 판단된다.

#### 나. 표고 (임협-1호)의 발이 과정에서 발현되는 유전자:

표고(*Lentinus edodes*)의 톱밥 인공재배에서 자실체의 형성은 원목에서 자연적인 자실체의 형성과 비교는 상당히 중요하다. 실험을 위한 표고 한 품종 (ImHyup-1)은 인공 배양으로 톱밥 배지에 접종하였고, 자실체를 인위적으로 유도하였다: 표고 발이 단계는 4단계로, 균사체 (mycelia; D), 원기형성 (primordial, B), 자실체의 줄기 (stipes; C)과 갓 (pileus of fruiting bodies; A)로 나누어서 mRNA를 분리하였다. 이때에 자실체 형성에 관여되는 여러 가지 유전자를 찾기 위하여, 임의의 primer를 사용하여 cDNA합성을 하였다. 아가로스 겔에서 자실체에서 3개의 fragments of cDNA 가 다른 형태의 band를 확인하였다. 이들은 각각 선정하여 DNA sequence을 분석하여 유전자를 찾고 저장하였다. 만들어진 각각 the pRIP-T™ vector를 이용하여 cloning하여 분석하였다. 분석된 DNA 염기서열은 140-200 bps이었고, GeneBank (NCBI)를 조사하여 유전자를 검사하였다. 여기서 자실체를 유도하는 유전자를 분석한 결과는 알려진 유전자인 부분적으로 15-20bps만 일치되었고, 어떤 일치되는 유전자가 없어 단백질을 합성하는 유전자 (structural genes; exons)는 아닌 것으로 생각되었다.

이러한 결과를 놓고 볼 때에 여기서 나온 유전자는 조절하는 유전자 (introns)로 생각되었고, 다음의 연구의 표고의 형태 번이에 관한 기본적인 연구로 중요한 것으로 생각된다

#### 다. 다양한 한천 배지에서 나무 분해률과 톱밥 배지에서 표고 발이 과정 관찰:

한천 배지로 환경을 변화시키고, 수종으로 나무 분해률을 조사하여 분리된 균주의 능력의 차이점을 관찰하였다. 이는 선발된 균주가 어떤 조건에서 유전적인 차이점을

관찰하기 위한 방편으로 계획적으로 만들어진 실험의 내용이다. 우선, 표고 균사는 여러 가지 영양원의 환경에서 많은 차이점을 나타내었고, Yeast extract는 나무 분해력을 저해시키고 있었다. 그리고 한천 배지에서는 단백질이 약간 나무의 lignocellulose 분해력을 높이고 있었다. 분리된 표고의 유전적인 차이점은 통계처리의 분산 분석표로 분석하였으나, 환경적인 요인과 수종의 성질에 대한 요인보다도 낮게 나왔다. 이는 사용된 표고 균사는 유전적으로 수종의 분해력에서 상당히 안정된 상태로 나타났고, 다른 버섯인 느타리와 노루궁뎅이 버섯에 비하여 분해력이 유전적으로 안정된 것으로 나타났다. 그러나 품종의 수종 분해력의 분포와 비교하였을 때에 본 실험에서 나온 분해력의 분포와 비슷한 값을 가졌으므로, 앞으로 육종에는 기질인 수종에 따른 품종의 개발이 더욱 좋을 것으로 나타났다. 이는 앞으로의 톱밥 부족과 원목 부족에 대한 대비책으로 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

#### **라. 표고균의 생리조사 및 접종원으로 액체배양:**

표고의 접종 원으로 표고를 액체 배양하여 균사의 성장과 활성도를 측정하였다. 액체배양에서 균사의 건 중량과 포도당, pH 및 Laccase 활성을 조사하였다. MM배지의 조성을 이용한 결과, 표고의 균사는 약 18일간 배양한 결과 4-6g/L의 건 중량을 만들고, 산도인 pH가 낮아져서, 많은 유기산을 생산하는 것으로 나타났다. 그리고 단백질의 함량에 따른 균사체의 성장은 큰 차이점을 관찰할 수가 없었다. 단백질 함량이 클수록, 산도인 pH는 높아지나, Laccase활성은 낮아졌다. 그와 반대로 균 첨가제를 첨가한 배지에서는 균사체 성장이 약 3-6배 가량 많아졌고, 균사의 활력도 완성해졌다. 액체 배양 결과 느타리는 표고비하여 빠르게 성장하고 있었고, 대사과정은 다른 것으로 나타났다. 버섯 첨가제 혼합의 효과는 일반적인 배지에 4-6배의 건 중량을 증가시켰고, 이는 앞으로 버섯 재배에 중요한 자원이 될 것으로 생각된다.

#### **마. 표고 버섯의 육종과 이와 관련된 프로그램:**

표고 자실체에서 뽑은 포자를 이용하여 matings 실험을 하였고, 이들에게 mating될 때는 여러 가지 반응 보였으나, 품종이 다른 포자끼리는 어떤 tetrapolar적인 특성이 보이지 않고 반응하였다. 여기서 다양한 mating을 통하여 7개의 균사를 만들고, 다른

알려진 3개의 균사를 선택하여 실험하였다. 선발된 7개의 균사는 알려진 균사와 비교할 때에 액체 배양과 톱밥 배양 상태를 보고 선별하여 여러가지 수종의 나무의 분해력을 조사 검토하였다. 표고의 유전자는 다른 느타리나 노루궁뎅이에 비하여 상당히 유전적으로 안정된 균으로 크게 차이점이 있는 균사를 찾기가 힘들었다.

그러나 선별된 균주에 따라서 수종의 분해력이 각각 다른 형태로 나타났으며, 앞으로 자실체 형성에 관한 실험자료가 있어야 되겠지만, 연구에 큰 도움될 것으로 기대된다. 앞에서 실험한 여러 가지 자료를 이용하여, 즉 표고 품종의 계통분류 혹은 생물학적인 근원관계, 표고 발이 관련된 발현 유전자, 톱밥 배양에서 표고의 생리적인 반응 및 액체 배양에서 표고 균사의 성장에 대한 연구 결과를 이용하여 간단한 표고 육종의 programming을 제시하였다. 앞으로 버섯 육종에 필요한 자료로 필요에 따른 다른 모델을 세울 수 있겠다.

## 위탁연구과제

〈제3세부과제〉 임산버섯 생육단계별, 품종별 유전자 발현양상 분석 및 형질전환 기술 탐색

### 가. 시료확보 및 cDNA 합성

표고 버섯의 각 조직에서 발현되는 유전자를 분석하고자 하였다. 이를 위해 표고균주 산림 4호와 산림 5호를 각각 톱밥배양과 액체배양을 하였다. 톱밥배양은 자실체를 발이시키기 위한 것으로 약 1달간 배양한 후 물을 추가로 첨가하고 온도충격을 주었다. 액체배양은 CellFarm™ 3B를 이용하였고, 약 8-9일간 공기량을 0.5 vvm에서 약 2.3 vvm 늘려가며 배양을 하였다. 실험과정 동안 액체 배지안의 pH를 조사하였는데 시간이 경과될수록 산성화가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이 같은 이유는 균사가 방출하는 물질로 인하여 배지의 산성화가 진행된 것으로 판단된다. 유전자 분석을 위하여 톱밥배지에서 발이된 자실체와 액체배양된 균사체로부터 guanidium thiocyanate와 phenol을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 이와 같이 분리된 RNA를 template으로 하여 oligo-dT primer를 이용하여 cDNA를 합성하고, 다

시 arbitrary primer를 이용하여 DDRT-PCR을 하였다. 이 반응물을 acrylamide gel에 loading하여 전기영동한 후, Silver staining을 하여 그 결과를 분석하였다. 같은 과정을 거쳐 균사체와 자실체에서 각기 다르게 발현되는 유전자를 검색할 수 있었다

#### 나. cDNA 클론화 및 특정 유전자 Screening

PCR로 증폭된 cDNA를 클론화하기 위해 우선 버섯의 갓, 자루, 원기, 균사체 조직에서 total RNA를 분리하였고, 이를 SMART technique을 이용하여  $\lambda$  phage library를 만들어 screening한 결과, 'proteolytic activation gene'을 찾았다.

또한 DDRT-PCR한 결과, 원기에서 특이적으로 발현되는 유전자를 발견하였고, 이를 terminal deoxynucleotidyl transferase를 이용하여 dCTP와 dGTP를 tailing하는 방법으로 cloning하고 그 염기서열을 분석하였다. 이 유전자를 다시 RNA dot blotting 방법으로 원기에서만 발현된다는 것을 확인하였다. 따라서, 이 유전자는 버섯의 발이 과정에 관계하리라 예상된다.

#### 다. 버섯의 형질전환 기술개발

세균이나 식물에서는 유전자 조작 기술이 눈부시게 발달함에도 불구하고 표고 버섯을 비롯한 식용 담자균류 (Basidiomycetes)에서는 아직 적합한 유전자 조작 tool이 개발되지 않은 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 버섯에서 이용할 수 있는 vector로써 *A. nidulans*에서 사용되던 pDH25를 선발하였고, green fluorescent protein을 여기에 cloning하여 pDH25가 가지고 있는 tryptophan promoter가 표고버섯에서도 정상적으로 작동함을 확인할 수 있었다. 또한 pDH25는 항생제인 hygromycin B에 저항성을 나타낼 수 있는 hph 유전자를 가지고 있는 데, 이는 형질전환이 계속 유지될 수 있도록 해주는 selection marker로 작용할 수 있을 것이다.

pDH25를 이용하여 형질전환실험을 실시한 결과, 최적의 electroporation 조건은 전기장의 세기는 2-4 kV/cm, RC-time은 10 msec.임을 알 수 있었다. 또한, 형질전환 결과 pDH25 vector는 버섯의 chromosome에 삽입되었다는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 표고의 tryptophan 유전자에서 pDH25와 homologous recombination이 되었기 때문이며, gene knock-out이 가능함을 보여준다.

## 2. 활용에 대한 건의사항

### 가. 생육활성물질 첨가에 의한 표고 톱밥재배의 생산성향상 및 재배잔사의 유효이용 (세부과제:충북대학교)

현재 우리 나라에 산림은 국토의 65%를 차지하나 유명림인데다 높은 인건비로 인하여 재대로 활용하지 못하고 있는 실정이다. 목재용 혹은 건축용 나무는 모두가 외국에서 수입하고 있는 현실정에서 버섯 재배용 수종 개발은 중요하며, 특히 버섯재배에 많이 이용되는 참나무류 자원의 수급이 매우 어려워가는 현실정에서 새로운 수종을 버섯재배에 이용할 수 있는 목재자원 확대는 매우 중요한 과제이다.

따라서 본 연구에서 참나무류 이외에 다양한 수종을 이용할 수 있는 연구결과는 버섯재배에 사용되는 나무(수종) 자원의 확대와 이들의 부산물을 이용하여 참나무 및 기타 수종들의 이용가치를 높이고, 자원화 함으로 경제적으로 농가 부업으로 경제적인 생산을 촉진시킨다.

위와 같은 국가 혹은 지역 단체에서 기술 개발에 대한 지식에 확대됨에 따라서 아래와 같은 국민 경제 및 산업에 도움을 줄 것으로 예상하고 있다.

- ♣ 자원화하기 어려운 나무 수종을 새로운 자원화함으로 국민 경제를 높임
- ♣ 유기성 폐기물인 나무의 잎과 가지 또는 톱밥과 같은 것을 이용하여 자원재 활용
- ♣ 농수산 폐기물과 농가 부산물을 활용함과 폐자원 이용 방안의 추구가 가능하다.
- ♣ 개발된 유망 버섯 종을 이용한 톱밥재배를 통한 계획생산.대량 생산 체계를 이룩하고 안정적 생산으로 인한 농가소득 증대와 경제 활성화를 도모할 수 있다.
- ♣ 계획생산 및 시설재배를 위한 정부의 재정지원이 생산체계의 확립에 크게 기여할 수 있다.

### 나. 임업유용버섯에 대한 균사의 근연관계 조사 및 Mating에 의한 육종방법 개발 (협동연구과제: 한국교원대학교)

우리나라에서 사용되는 모든 표고 균주의 품종 및 분리 균을 수집하여, 균주의 근연관계를 조사하였다. 이는 미래에 올 균주 분쟁을 위한 방안과 앞으로 새로운 균주 생산으로 육종 기술을 개발하기 위한 방안으로 실험하였다. 많은 경우에 균주들이 일

본의 균주와 비슷하고, 지역적인 특성이 있는 균주는 몇 개 뿐이었다. 최소한 실험에서 사용된 균주나 여기서 사용한 근연관계의 분류 체계는 1) 현재 우리나라에서 사용되는 표고 품종에 관한 근연관계와 2) 일본에서 수입된 균주의 관계를 분석하여 3) 앞으로 새로운 품종을 생산하기 위한 기초 자료를 만든 것이다. 균사의 수집과 보관으로 앞으로 없어질 위기에 있는 품종에 대한 영구 보존이 시급한 실정이다. 또한 앞으로 부족한 원목이나 톱밥을 위한 각종의 수종의 분해력은 육종 및 표고 재배에 원목 혹은 톱밥 대치로 좋은 자료로 사용될 것으로 판단된다.

현재까지 우리나라에서 버섯균의 품종 개발은 느타리에 국한하여 원형질 융합방법으로 농진청 균이과에서만 진행해 왔다. 최근 이러한 방법은 바이러스 혹은 기타 버섯 세포의 활성이 저조한 문제로 거의 사용되지 않고 있는 실정이다. 현재 사용하는 육종방법은 단지 버섯의 생활사에 있는 4핵성 포자를 이용한 mating방법을 통한 육종 방법이다. 육종이 중요한 이 시점에서 본 실험에서는 어떤 수종 (나무 종류)과 어떤 환경 (원목 혹은 톱밥)에 대한 기본적인 실험을 실시하였고 표고버섯의 유전적인 안정성과 육종의 방향을 알기 위하여 표고 균과 느타리 균 혹은 노루궁텅이 균과 비교 실험도 실시하였다.

인공 버섯 배지에서는 자실체의 발이와 균사의 성장이 중요하다. 우선, 버섯의 발이는 톱밥 배양시에 언제나 필요할 때에 버섯을 생산하는 기술로써 생물학적방법으로 유도(Induction)하여 유전자의 발현과 m-RNA의 연구에서 미토콘드리아와 관련된 유전자가 관여하는 것으로 나타났으며, 앞으로의 학문적인 연구에 대단히 중요한 것으로 생각된다. 이는 아직 많은 연구가 더 진행되어야 하지만, 일단 많은 산소와 다른 어떤 영양물질이 필요한 것으로 나타났다. 또한 균사의 성장과 관련되는 연구는 액체 및 고체 배양을 통하여 균사의 성장과 Laccase 활성도를 측정하였다. 이는 표고 균사의 배양시 성장 곡선으로 톱밥 배지의 환경을 유추할 수가 있겠다. 현재에 사용되는 톱밥 배지는 질소함량이 낮은 편으로 균사의 성장보다는 아직 대사과정에 불안한 점이 많았고, 질소함량의 많은 첨가는 다른 균의 오염이 많을 것으로 예상되고 있다. 여기서 적당량의 질소량의 첨가는 표고 균사와 자실체 형성에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

#### 다. 임신버섯 생육단계별, 품종별 유전자 발현양상 분석 및 형질전환 기술 탐색 (바이오니아)

표고의 자실체 형성 시초인 프리모디움 형성과정을 DNA 추출과정으로 관찰하였다. 이는 자실체의 원기 형성에서 나오는 것으로 실험실적인 방법을 개발하였다. 표고 품종 임협-4을 이용하여, 벡터로는 일반적으로 곰팡이에 많이 사용하는 *A. nidulans*의 균의 pDH25의 종류를 사용하였다. 이는 green fluorescent protein와 tryptophan promoter 유전자를 삽입하여 표고균에 유용한 가능성 있는 것으로 판단하여, 대장균에 삽입하여 만들었다. 그리고 항생제 저항성이 있는 유전자를 삽입하여, 쉽게 cloning 할 수 있는 벡터를 합성하였다. 녹색형광물질은 형질전환된 표고 균사를 쉽게 확인하는 유전자로, 항생제의 저항 유전자 (hygromycin B)는 형질 전환된 균사를 확인하는 방법으로 고안하였다. 또한, 트립토판 포로모터는 균의 아미노산 대사과정에 필요한 트랜스포존의 유전자로 삽입되었을 때에 균의 크로모조좀의 유전자와 intergration 할 수 있도록 설계하였다. 이러한 유전자를 제한효소 및 다른 대장균의 벡터를 이용하여 설계하여 대장균에 삽입하였다. 그후 대량 생산된 이 벡터를 진건(전기 충격)을 통하여 삽입하였다. 삽입시 여러 조건을 달리하여 실험하여 앞으로 이러한 벡터를 이용한 표고버섯의 유전삽입을 용이하게 하기 위하여 다양한 실험을 하였다. 이것은 기본적인 실험으로 표고버섯에서의 유전자 삽입과 형질 전환에 관련되는 최초의 실험으로 앞으로 버섯 연구에 기본적인 도움을 주기 위한 것이었다.

갯 자루 원기 균사체 조직에서 분리된 m-RNA를 모두 cDNA로 합성하여, SMART technique로  $\lambda$  phage library를 만들었다. 이는 앞으로 실험에서 중요한 유전자를 찾기 위한 유전자의 data base로 필요할 때마다 발현되는 유전자와 비교 실험하기 위한 작업이다. 우선, 최근에 언급된 Human과 Rice genome 사업을 위하여 전 DNA 염기서열을 파악하기 위한 작업이기도 하지만, 우리가 사용한 표고 균의 유전자를 파악하기 위한 기본 자료를 얻기 위한 수단이기도 하다. 우선 여기서 표고 유전자에서 단백질 분리 유전자와 미토콘드리아에 관련되는 유전자는 앞의 실험과 본 실험에서 밝힌 내용이다. 이러한 기초 작업을 위하여, 우선  $\lambda$  phage에 표고 유전자를 저장하여 앞으로 다른 연구자에게 도움을 주기 위하여 시험을 하였다. 이 연구는 앞으로 분자생물학 연구에 새 길을 만든 것으로 많은 도움이 될 것으로 기대되어진다.



# SUMMARY

**Title :** Improvement of *Lentinula edodes* by Genetic Analysis and Mating, and Variegation of Mushroom Production Substrate

**〈No. 1 Project〉** Productivity Improvement of sawdust cultivation of *Lentinula edodes* by adding biological active substances and effective utilization of sawdust cultivation residues

A fundamental characteristics for diversification of material species in sawdust cultivation of *Lentinula edodes*(*L. edodes*) were studied. Hardwood 5 species and softwood 3 species and 3 strains were used. pH variation of substrates became lower after autoclaving and mycelia entirely grown. *Quercus acutissima*(QUA), *Populus alba*×*glandulosa*(POA), *Betula platyphylla* var. *japonica*(BEP), and *Larix leptolepis*(LAL) were shown to fast mycelia growth rates in the middle of 8 species without distance with 3 strains. According to each strains, mycelia growth phase was all similar. After conifer(*Pinus rigida*) sawdust was extracted by several solvents, mycelia growth rate of Sanlim No.5(*L. edodes*) on extractive-free sawdust was that the fast growth rate was on ethyl alcohol extractive-free sawdust.

Ergosterol is an indicator chemical of fungi and involves in fungal cell growth as a major component in fungal cell membranes. Thus, this chemical can be used to estimate live fungal biomass within various solid substrates. Ergosterol content in liquid culture of *Lentinla edodes* had a linear relationship ( $r=0.98$ ) with the hyphal mass of the fungus. This chemical content differed depending on the fungal strains, age of culture and water content levels of sawdust substrate. Ergosterol content was 0.13% in the 10 weeks old liquid culture while it was

0.10% in 20 weeks old one. The chemical content in the sawdust cultures of the fungus varied 0.015% to 0.042% depending upon strains and water content levels within sawdust substrate. Ergosterol content in the culture of a *L. edodes* strain, Sanrim 4, was higher by 20 $\mu$ g to 140 $\mu$ g/g dry substrate than those of strains, Mok-H and Sanrim 6. And the chemical contents in the sawdust cultures with 125% or 175% water, 297 to 425  $\mu$ g/g dry substrate, were higher than those with 75% or 225% water, 148 to 286 $\mu$ g/g dry substrate. We conclude that ergosterol analysis can estimate the fungal biomass within solid substrate such as logs and sawdust.

With increased utilization of chemical fertilizer, soil fertility is getting serious problem. As a result, using organic soil conditioner (woody wastes or sawdust compost) would be only solution to recover soil vitality.

In this study, manufacturing and characteristics of organic soil conditioner from Shiitake bedlogs (woody wastes) were studied. Also, to investigate the effect of continuous application of this bedlog compost on growth of plants, growth tests for radish and tree seedlings were done. The results are as follows ;

Analytical results of decayed and fresh wood materials showed almost same as its wood components. The mixing ratio of raw materials with the other filling materials is essential for the manufacturing as well as good quality of its compost during composting process. In this experiment, mixing 12kg of urea, 20kg of lime, 50kg of chicken shit, and small amount of fermentation aids corresponding to 1 ton of sawdust resulted good composts. Their moisture contents were adjusted to about 55%. Temperature of pile, in composting process, rose after 1 week and kept about above 60'C for certain period. They were turned two times, 14th and 33rd day, respectively, after piling.

This bedlog compost contained 81.7% of high organic matter, 1.4% of a little nitrogen, 6.75 of pH and 25 - 30 of C/N ratio. There were no harmful effect on germination and growth of plants, such as radish and softwood and hardwood

seedlings. Concerned the effect of bedlog compost on soil temperature, the compost did not affect plant growth by changing soil temperature abruptly, but compensated the soil temperature such as a little increasing on the early morning, a little decreasing on the mid-day or afternoon (pm 2:00), and increasing on the early evening (pm 6:00).

**〈No. 2 Project〉** Studies on the classifications of the various varieties of important mushrooms and the development of the techniques of mushroom breedings by matings

**1. Collections and Classifications of the various varieties of *Lentinula edodes* with the biological aspects**

The 10 varieties of *Lentinula edodes* cultured in Korea were collected and also compared with those in Japan or with the fungal lines collected from the field. The varieties of *L. edodes* actively cultured in Korea were measured to be related to, or grouped with those in Japan. The unique line of *L. edodes* was not found in the genetic analysis and, however, several lines were desolated from the important varieties of *L. edodes* cultured in both Korea and Japan in analysis of PCR-RAPD. The eight wild lines collected from the different Mountains were considered to be related to the commercially important varieties of *L. edodes*. The growth rate of *L. edodes* were measured in saw-dust media and the degradation of wood-chips by various varieties of *L. edodes* were calculated in water agar for further selection. These informations for the various varieties of *L. edodes* were considered to be much important for breeding of this mushroom in the further works.

**2. Several genes expressed during morphogenesis of *Lentinula edodes* (ImHyup-1).**

Formation of fruiting body in the artificial cultivation of *Lentinula edodes* was very important as compared with that in natural cultivation on the wood logs. The lines of *L. edodes* (ImHyup-1) employed was cultivated in the artificial blocks of sawdust, and the fruiting body was induced from the mycelia (stage D) or the mass protruded on the surface of the sawdust blocks. The four different fungal stages; (D) mycelial, (C) primordial, (B) stipes and (A) pileus of fruiting bodies were collected for the extraction of mRNA, searching the genes related to morphogenesis. The fragments of cDNA were synthesized from the combinations of the arbitrary primer 3 with the fungal tissues of stipe (the stage C) than those with the others. The three fragments of cDNA not showed in the stage (D) were picked up and displayed, to be two bands in the agarose gels. Total five bands, four bands (from the two bands originated from the F-3 and F-14 fragments) and a band from F-18 fragment, were selected for analyzing the DNA sequences, using the pRIP-T<sup>TM</sup> vector system. The five DNA sequences sized to be the 140 to 200 bps in length were compared with the genes provided by the BlastX searching; The five DNA sequences were not completely, at the whole portions of sequence, matched with, but partially, at the 15 to 20 bps of sequences, similar to those of gene informed from the GeneBank (ncbi.). The fragments of cDNA investigated in this work were believed to be not those related to the structural genes (exons), but to be related to the controlling genes (introns). Also, these fragments would be not only considered to useful for the next steps of research for morphogenesis of *L. edodes*, but also to be a raw data for basic information not observed.

### **3. Measuring the degradation of various wood-chips and Observation of morphogenesis of *Lentinula edodes* in the sawdust solid culture**

The degradation rates of the six different wood-chips inoculated with the various fungal lines were measured as the genetic potentials of the fungal lines of

*L. edodes*. The wood-chips were placed in the three different agars (Water, 2% Yeast, 5,7% Milk agar) and incubated for 3 months with a single inoculum of *L. edodes*. The degradation of wood-chip were various under the different agars and especially very low under the Yeast agars, as compared with the others.. The degradation of wood-chip was observed to be increased when the protein sources were added in the agars. The degradation of lignocellulose of the different wood-chips by the fungal lines of *L. edodes* was influenced by the different agar and by the different wood kinds rather than by the varieties of *L. edodes*. The informations resulted from the statistic analysis for the degradations of wood-chips indicated that the lines of *L. edodes* were very stable in the genetic aspects, as compared with those of *Pleurotus ostreatus* or *Hericium erinaceum*. The wood-chips of poplar tree were higher degraded by most fungal lines of *L. edodes* than other wood-chips but those of pine tree were not much degraded within 10% of weight loss. The basic information for degradation of wood-chips were considered to be valuable for the future works of *L. edodes*, being related to supplement of wood raw materials.

#### **4. Observations of *Lentinla edodes* in the physiological aspects and shaking cultures as an inoculum.**

The growths and activities of *L. edodes* mycelia were measured in the shaking cultures as the sources of liquid inoculum; dry weights of mycelia, residual glucose by DNS method, pH, and Laccase by degradation of DOPA and/or ABT in shaking cultures with MM broths. The growth of the mycelia was showed to be the 4-6 g/L of dry weight, at the peak after 18 days' shaking cultures, and the pH of liquid state was measured to be so low, indicating the productions of organic acid in the cultures. The growth of mycelia were not observed to be increased, but the pH to be increased (the activities of Laccase to be decreased), when the MM broth were added with the protein sources of the dry skim milk.

The growth of dry weight of mycelia was increased three to six time and the activities of mycelia were increased when the MM broth added with the stimulant (kind of lipid). The responses of mycelia were different to those of *L. edodes*, indicating that the mycelia of *P. ostreatus* have the fast growing or different systems. The stimulant referred would be speculated to increase the growth of dry weight for the species of six mushroom, being the important resource in the future.

#### **5. Breedings of *Lentinula edodes* by matings and breeding programings**

The breeding work of *L. edodes*, using the mycelium originated from the basidiospore (MOB) and mating them under the artificial conditions, was investigated. The responses of matings mentioned above were observed to be various; 1) the growth of mycelium was stopped near the other colony of MOB in PD agar, 2) the MOB meet with other MOB and make the thick white barrier (two kinds of MOB mixed each other, later becoming the brown at the barrier), and 3) the MOB meet with other MOB but does not make the thick white barrier (becoming the brown in the whole plate), when the two different MOD were placed in a plate of PDA. The MOB was speculated to have the tetrapolar mating system within the basidiospores collected from the same basidiocarps or variety, but not when the MOB was crossed with the different MOB collected from the different variety of *L. edodes*. The seven dikaryotic mycelia obtained from the matings were compared with the others obtained from Dr. Kitamanoto's works; the characteristics of the dikaryotic mycelia in shaking cultures and in the saw-dust solid cultures were evaluated for selection. Also, the degradations of wood-chips to the six different species of tree were calculated by the dikaryotic mycelia selected after the three month's incubation. The abilities of degradation of wood-chip by the different dikaryotic mycelia were various due to the different mycelia. This was speculated to be much helpful for the further breeding work of

*L. edodes*. The genetic features of *L. edodes* were restricted in gene diversity as compared with those of *Pleurotus ostreatus* or *Hericium erinaceum* investigated. The 3 or 4 lines of dikaryotic mycelia were evaluated again with the information related to morphogenesis. The various information previously worked would be needed for the breeding work of *L. edodes* or other species of mushrooms: the biological classifications of *L. edodes* varieties and their relationship of phylogeny, studies on several genes related to the morphogenesis of *L. edodes*, and physiological responses of *L. edodes* in the shaking cultures and in the saw-dust culture. A simple programming of breeding for *L. edodes* was established as based on the results mentioned above, and modified with the other purpose with other information.

**〈No. 3 Project〉** The techniques of detections and analysis of the genes induced by the various varieties with the stages of morphogenesis during artificial cultures.

1. **Cloning of the cDNA obtained from *Lintinula edodes* genes;** The two varieties, SanLim-4 and SanLim-5, of *L. edodes* were cultured by shaking or by sawdust solid types for analyzing the genes expressed in various stages. The stress of low temperatures, as the cold water added to, took place, after a month' culture in the solid sawdust media. The liquid cultures were made in the 3 L fermenter of CellFarm™ 3B by the air supplying 0.5 to 2,3 vvm for 8-9 days. The pH was observed to become low, indicating the strong acidity, during the time that the mycelia grow in the fermenter. The various organic acids would be speculated to be produced by the cultured mycelial pellets and not to be any amino acids. The total RNA was isolated from the mycelial mass from the shaking cultures or the basidiocarps developed from the saw-dust cultures, using guanidium thiocyanate and phenol. The cDNA's was synthesized from the total RNA mentio

ned above with the oligo-dT primer of template, and DDRT-PCR (full spelling, please) was carried out with the arbitrary primers. The cDNA's made by DDRT-PCR was loaded in 4 % acrylamide gel, and the detail bands considered as a product of them were detected with silver staining. The genes differently expressed in various gels of RNA (resulted in the various stages of *L. edodes* mycelia) were detected with various techniques employed in this works.

**2. Cloning the cDNA and the screening of the special genes;** The total RNA were isolated from the mycelial tissues of the pileus, stipe, primordium of Basidiocarp, and the mycelial mass, and the proteolytic activation gene were screened by the SMART techniques in the  $\lambda$  phage library made from RNA. The special gene expressed in the stage of primordium during morphogenesis were observed, and analyzed for DNA sequences by using the terminal deoxynucleotidyl transferase and the techniques of employing the dCTP and dGTP as the tailing of DNA sequences. This DNA sequence was confirmed to be expressed only in the stage of primordium and speculated to be related to the genes induced when the basidiocarps would be developed in the culture.

### **3. Establishing the techniques of transformation in the mushrooms;**

The basic tools of the gene transformation were not developed in the fungi, especially in the species of Agaricales or its related species, in spite that they were so unfolding in the plants or bacteria, Thus, a vector of pDH 25 actively employed in *Aspergillus nidulans* were selected for this work after the gene of green fluorescent protein were inserted as an easy mark; Afterward, the modified pDH25 were confirmed to be adequately involved in the genomic DNA of *Lentinus edodes* at the site of tryptophan promoter. Also, the selection marker resisting the agar containing the hygromycin B would be helpful for the further experiments in screening the useful lines of basidiospores after the transformation of fungal cells was made



with this modified pDH 25; the electroporation of pDH 25 was 2-4 kV/cm in strength voltage and 10 msec in RC-duration and this condition was revealed to be optimum for cooperation of this vector into the fungal cells. Since the genes encoded in the pDH25 vector were expressed in the agar containing hygromycin B, this vector modified would be not only speculated to be homologously recombined with the site of trypton genes in fungal chromosomes, but also be able to manipulate the fungal genes with the techniques of knock-out.

# CONTENTS

Summary(Korean) .....	2
Summary(English) .....	15
Chapter 1. Introduction .....	27
1. Necessity and Purpose of the study .....	27
2. Scope of the study .....	32

## 〈No. 1 Project〉

Chapter 2. Effect of biological active substances for Sawdust cultivation and effective utilization of sawdust cultivation residues of *Lentinula edodes*

1. Introduction .....	34
2. Screening of effective substrates for Sawdust cultivation of <i>Lentinula edodes</i> .....	35
3. Effect of biological active substances for Sawdust cultivation of <i>Lentinula edodes</i> .....	59
4. Effective utilization of sawdust cultivation residues of <i>Lentinula edodes</i> .....	73

## 〈No. 2 Project〉

Chapter 3. Studies on the classifications of the various varieties of important mushrooms and the development of the techniques of mushroom breedings by matings

1. Introduction .....	93
2. Collections and Classifications of the various varieties of <i>Lentinula edodes</i> with the biological aspects .....	109
3. Several genes expressed during morphogenesis of <i>Lentinula edodes</i> (ImHyup-1). .....	128

4. Measuring the degradation of various wood-chips and Observation of morphogenesis of <i>Lentinula edodes</i> in the sawdust solid culture .....	151
5. Observations of <i>Lentinula edodes</i> in the physiological aspects and shaking cultures as an inoculum. ....	170

⟨No. 3 Project⟩

Chapter 4. The techniques of detections and analysis of the genes induced by the various varieties with the stages of morphogenesis during artificial cultures.

1. Introduction .....	194
2. Cloning of the cDNA obtained from <i>Lentinula edodes</i> genes; .....	195
3. Cloning the cDNA and the screening of the special genes; .....	204
4. Establishing the techniques of transformation in the mushrooms; .....	215

# 목 차

요약문 .....	2
Summary(English) .....	15
제 1 장 서 론 .....	27
제 1 절 연구개발의 필요성과 목적 .....	27
제 2 절 연구개발범위 .....	32
제 2 장 생육활성물질 첨가에 의한 표고 톱밥재배의 생산성향상 및 재배잔사의 유효이용 .....	34
제 1 절 서 설 .....	34
제 2 절 표고버섯 톱밥재배를 위한 효과적인 배지의 탐색 .....	35
제 3 절 생육활성물질 첨가가 표고버섯의 톱밥재배에 미치는 영향 .....	59
제 4 절 표고버섯 톱밥재배 잔사의 유효이용 .....	73
제 3 장 임엽 유용버섯에 대한 균사의 근연관계 조사 및 mating에 의한 육종방법 개발 .....	93
제 1 절 표고 균주의 수집과 이들의 계통간의 생물학적인 관계 .....	93
제 2 절 표고 (임협-1호)의 발이 과정에서 발현되는 유전자 .....	109
제 3 절 다양한 한천 배지에서 나무 분해력과 톱밥 배지에서 표고 발이 과정 관찰 .....	128
제 4 절 표고균의 생리조사 및 접종원으로 액체배양 .....	151
제 5 절 표고 버섯의 육종과 이와 관련된 프로그램 .....	170
제 4 장 임산버섯의 생육단계별, 품종별 유전자 발현양상 분석 및 형질전환 기술 탐색 .....	194
제 1 절 서 설 .....	194
제 2 절 시료 확보 및 cDNA 합성 .....	195
제 3 절 cDNA 클론화 및 특정 유전자 Screening .....	204
제 4 절 버섯의 형질전환 기술 개발 .....	215

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구개발의 필요성과 목적

### 1. 개 황

우리나라에서 식용버섯을 인공재배한 시초는 1905년 제주도에서부터 시작되어 왔다. 그 후 버섯재배는 이익을 증진시키고 농촌의 경제발전을 도모할 수 있는 유망한 산업의 일종이 될 수 있는 것으로 보고, 임산자원이 중요하다는 의도에서 1957-1961년 까지 제1차 버섯증식 5개년 계획을 수립하여 실천함으로써 본격적인 인공재배가 실시되었다. 식용버섯재배는 1955년 종균의 인공배양법이 개발됨에 따라 그 다음해부터 종균에 의한 재배가 시작되었으며 그 후 정부의 권장시책에 따라 꾸준한 발전을 보게 되어 현재는 7,000여 농가가 표고재배를 하고 있다(표 1-1참조). 우리나라는 전국토 면적의 65 % 가 산림으로 이루어져 있으며, 그 가운데 약 40 % 가 활엽수림으로 이루어져 있다. 특히 표고버섯재배에 적당한 참나무류는 우리나라 천연활엽수림의 대부분을 점유하고 있어, 기업적 표고버섯 재배업으로서 혹은 농산촌의 부업으로서 표고버섯 재배의 필요성은 그 의미를 더해가고 있다.

나아가서 표고버섯의 식품으로서의 안정성 및 맛이 원목재배의 중요성을 배가시키고 있다. 특히 최근 연구.보급되고 있는 높은 관심거리인 표고버섯의 균상재배는 장차 새로운 재배기술로 정착.보급되겠지만, 원목재배 및 균상재배가 지는 각각의 장단점을 충분히 검토하여 재배조건이나 경영의 목적에 부합되도록 선택하여야 할 것이다.

표고 생산량은 1990년에 건표고 1,524 M/T, 생표고 3,366 M/T으로 그 중 건표고를 비롯하여 1,056 M/T(23.3백만 달러)을 수출하던 것이 최근에는 수출이 많이 줄고 수입은 늘어나는 추세를 보이고 있다(표 1-2참조). 표고는 고래로부터 고귀한 식품으로 진중되어 왔으나 최근에는 혈압강하와 항암등 약리적 효과가 현저함이 인정되면서부터 보건식품으로도 각광을 받게 되어 국내외적으로도 그 수요가

격증하고 있는 실정이다. 표고는 주로 농산촌에서 참나무 등 원목을 사용 재배하고 있기 때문에 농산촌의 귀중한 수입원으로 되고 있을 뿐 만 아니라 간접적으로 농산촌 인구정착에도 크게 기여하고 있다고 할 수 있다.

표 1-1. 표고버섯 재배현황(1999년도)

행정구역별	임가수	재배면적(ha)	접종본수	생산		판매	
				임가수	생산량(kg)	임가수	판매량(kg)
전국	6,888	2,980.07	79,217,959	6,065	17,531,483	5,967	16,906,366
서울특별시	0	0	0	0	0	0	0
부산광역시	13	5.93	93,400	11	14,000	11	13,960
대구광역시	10	2.31	74,100	9	19,430	9	19,310
인천광역시	27	3.80	110,850	21	23,776	20	23,256
광주광역시	2	1.65	15,800	1	800	1	800
대전광역시	4	1.30	24,500	4	14,500	4	14,500
울산광역시	40	12.55	419,400	35	52,060	32	50,620
경기도	590	155.89	5,903,250	546	2,104,893	542	2,039,651
강원도	251	62.50	2,370,660	201	592,800	199	582,736
충청북도	686	183.39	7,579,750	574	2,937,978	566	2,836,653
충청남도	2,432	981.18	28,231,442	2,216	6,605,545	2,187	6,402,822
전라북도	646	289.98	6,877,000	559	835,895	548	802,015
전라남도	982	485.70	12,530,080	919	1,486,579	897	1,350,988
경상북도	745	251.14	9,592,341	614	2,206,511	608	2,150,493
경상남도	414	435.85	3,698,336	312	513,262	301	498,488
제주도	46	106.89	1,697,050	43	123,454	43	120,874

자료: 임업총조사 산림청. 2000.

표 1-2. 표고버섯의 수출입 추이

연도	수출		수입	
	중량(kg)	액수(US\$)	중량(kg)	액수(US\$)
1998	375,882	8,702,540	913,704	1,643,799
1999	416,503	7,710,737	1,103,284	2,542,895
2000	227,841	5,015,583	1,139,101	2,783,352
2001(10월까지)	195,608	3,896,570	717,436	1,160,097

자료: 농림부 홈페이지 2001년 12월 현재.

원목가격의 앙등, 생산자의 고령화, 농민후계자 부족, 생산가격의 상승에도 불구하고 건조표고 및 생표고 시장 가격의 불안정 등으로 인하여 원목재배량이 매년 감소되고 있다. 최근에 와서 식용버섯 수출시장의 감소, 수요의 다양화, 가정소비의 감소, 업무용 수요증가 등 수요구조 또한 변하고 있다. 한편 해외로 부터 표고버섯 재배기술의 보급으로 인한 수입의 증가, 특히 중국으로부터의 값싼 표고버섯의 대량 입하, 타업종 기업의 참가에 의한 균상 표고버섯 재배기술의 보급 등, 공급면에서 큰 변화에 직면하고 있으며, 원목에 의한 표고버섯 재배는 수요구조의 변화에 대응해야 하는 절박한 상황에 와 있다고 할 수 있다. 그러므로 금후 농산촌의 소득증대와 인구정착을 위하여서도 표고재배의 확대보급과 안정적 재배가 이루어질 수 있도록 현재 문제가 되고 있는 원목과 인력난 등 제문제를 슬기롭게 해소시키는 동시에 재배기술의 근대화화 와 경영개선으로 생산성과 수출 경쟁력을 높이도록 하여야 할 것이다.

## 2. 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

- 표고는 최근에 약리적 효과가 현저함이 인정되면서부터 보건의식품으로도 각광을 받게 되어 국내외적으로도 그 수요가 격증하고 있으므로, 이 버섯 재배의 필요성은 더욱 커지고 있으며 현재 7,000여 임가가 재배를 하고 있다.

- 표고 생산량은 1998년에 4,049 M/T으로 그 중 376 M/T(8.7백만 달러)을 수출하여 표고 재배는 농산촌의 중요한 소득작목으로 발전되고 있다.

- 표고버섯용 골목으로 이용되는 참나무 원목은 약 21만m<sup>3</sup>(1997)인데 점점 부족하여져서 이미 전국적으로 12만m<sup>3</sup>이 부족하므로 표고재배 원목대체가 무엇보다 시급한 문제이다.

- 표고조직내 생리활성물질은 재배시의 생리활성과도 관련되므로 이의 추출, 정제와 생리활성 효과 구명은 재배의 효율성을 높일 수 있다.

- 최근 연구-보급되고 있는 표고 균상재배는 장차 새로운 기술로써 버섯재배

경영의 목적에 부합되도록 개선할 필요가 있다.

- 표고재배에는 종균의 사용이 중요하며 이제까지 대부분 일본에서 수입된 종균을 이용하고 있어 새로운 종균의 개발이 중요하다.

- 버섯재배에서는 자실체 형성이 핵심이라고 할 수 있는데 이를 유전자와 연계시켜 연구하는 것은 매우 중요한 일이다. 유전자를 분리하여 형질전환에 의해 다른 품종으로 이식할 수 있다면 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

- DDRT-PCR 기술은 RNA Display를 이용한 Molecular Genetic Analysis로서 체계적이고 효율적인 신품종의 육종을 가능하게 하며, 특정한 유용 유전자의 분리 및 기능분석이 가능하다. 또한 유전공학적 형질전환의 기초적인 연구에 사용되어질 것이다.

- RNA differential display method (DDRT-RCR)는 유전자의 발현양상 분석이 가능하여 표현형의 발현에 나타나는 특성과 연계되어 분석될 수 있다. 따라서 선발된 균주간 발현양상에 따라 품종구별 molecular genetic marker로 사용되어 육종 프로그램 진행에 강력한 도구로 사용될 것이다.

- DDRT-PCR은 중요한 형질의 encoding gene 또는 genetic locus를 나타내는 marker identification에 중요한 기술로서, 버섯의 life cycle을 조절하는 유전자로 fruiting (원기형성과정)에 관여하는 유전자, 환경조건 (온도, 습도, pH)에 내성을 갖는 유전자, 병원체인 푸른곰팡이류 (*Trichoderma* spp)에 대한 저항성을 나타내는 유전자, 균사생장과 fruiting (원기형성과정)에 관여하는 lignin 유도체의 분해효소를 발현하는 유전자, 버섯향에 관여하는 유전자 등의 분리가 가능하여 우리나라의 낙후된 버섯 육종 및 재배기술의 발전을 가져올 것이다.

- 임산버섯의 분자 유전학적 접근은 변이균주 및 퇴화균주의 PCR 검정 기술의 개발이 가능하여 불량종균의 유통이 억제되며, 유전공학적 형질전환의 기초연구로 활용될 수 있어, 식량작물 및 원예작물에 대한 기술적 파급 효과가 기대된다.

#### 나. 경제산업적 측면

- RNA display의 molecular genetic analysis는 많은 시간과 노력, 자본이 소



요되는 버섯 육종 분야에 시간을 단축시키고, 인력과 경비를 절감할 수 있다.

○ 변이균주 및 퇴화균주의 불량종균을 조기검정하여 재배농민의 피해를 최소화시킨다.

○ 지역적 환경조건과 특성에 알맞고 계절별 재배품종 육성이 가능하고, 소비자의 기호에 알맞는 품종개발에 기여하여 재배자의 소득증대에 기여한다

○ 체계적이고 효율적인 육종 프로그램의 진행은 우수한 형질의 품종 육성이 가능하여 외화획득을 위한 전략적 수출형 임산물로의 육성이 가능하다.

다. 사회문화적 측면

○ 우수한 형질의 버섯 품종의 육성은 재배기술을 개선시켜 농가소득증대와 수출확대로 외화획득이 가능하여 이농현상을 억제시킨다.

○ 불량종균의 조기검정과 우량종균의 보급으로 재배농민과 분쟁을 예방하며 신뢰있는 농림정책 추진에 기여한다.

### 3. 연구의 목적

가. 식용버섯재배 원목으로 쓰이는 참나무류가 부족한 상황이므로 이를 대체할 수 있는 활엽수재 및 침엽수재의 원목을 개발한다. - 이는 부족한 버섯재배 원목문제를 해결할 수 있을 것이다.

나. 버섯재배 후에 나오는 재배잔사의 이용법을 개발한다.

- 그냥 버려지는 재배잔사의 이용법은 자원의 효율적인 이용에 중요하다.

다. 임업 유용버섯에 대한 균사의 근연관계를 조사하여 새로운 품종여부를 판정한다.

- 현재 재배되고 있는 버섯균의 상호 유사성을 파악하여 이용시에 활용한다.

라. 표고버섯의 mating에 의하여 새로운 품종을 육성한다.

- 우리 고유의 품종을 보유하여 종균의 해외의존도를 낮추고 나아가서는 독립적인 국가경쟁력을 확보할 수 있다.

마. 임산버섯의 생육단계별 품종별 유전자 발현양상을 분석하여 자실체 형성에 관여하는 유전자를 탐색한다

- 발이율을 높임으로써 생산성을 증대시켜 소득증대에 기여한다.

바. 표고버섯의 형질전환기술을 개발한다.- 버섯품종의 새로운 육종기술개발로 우량종균의 개발을 촉진한다.

## 제2절 연구개발 범위

1. 생육활성물질 첨가에 의한 표고 톱밥재배의 생산성향상 및 재배 잔사의 유효이용: 표고버섯을 대상으로 시험함.

가. 표고버섯 톱밥재배를 위한 효과적인 배지의 탐색:

톱밥재배를 위한 배지의 개발로는 활엽수로 상수리나무, 현사시나무, 이태리포플러, 양버즘나무, 자작나무를, 침엽수로 낙엽송, 리기다소나무, 스트로브잣나무를 재료로 사용하였다.

나. 생육활성물질 첨가가 표고버섯의 톱밥재배에 미치는 영향: 일본잎갈나무의 추출물을 재료로 버섯생산에 대한 첨가효과를 시험

다. 표고버섯 톱밥재배 잔사의 유효이용: 표고폐골목을 이용하여 작물로 무우종자와 침엽수로 측백나무, 개잎갈나무를, 활엽수로는 회양목과 철쭉을 재료로 성장실험을 실시함.

- 폐골목의 비료화효과 실험에는 음식물쓰레기, 신선지조를 비교로 함박꽃나무, 가래나무, 고로쇠나무, 단풍나무, 굴피나무, 쥐똥나무를 사용하여 활착율을 조사하였고, 발아시험은 붉은아까시나무를 사용함.

2. 임업유용버섯에 대한 균사의 근연관계 조사 및 mating에 의한 육종방법 개발:

가. 표고버섯의 균주과 이들의 생물학적인 관계구명: 표고버섯을 수집하고 니들을 사용하여 갈참나무, 오리나무, 아까시나무, 미루나무, 졸참나무와 소나무의 우드칩의 분해율을 측정

나. 표고의 발이과정에서 발현되는 유전자분석: 표고 임협 1호 사용 mating에 의한 균사합성:

다. 다양한 한천배지에서 목질의 분해율과 톱밥배지에서 표고 발이과정 관찰:갈참나무, 오리나무, 굴참나무, 아까시나무,미루나무와 소나무를 사용, 느타리버섯과 누루궁텅이 버섯도 실험

라. 표고균의 생리조사 및 접종원으로 액체배양: 표고균의 액체배양을 실험

마. mating에 의한 표고버섯의 육종:표고버섯을 mating하여 갈참나무, 아까시나무, 미루나무와 소나무의 woodchip에 대한 분해율을 조사함.

3. 임산버섯 생육단계별, 품종별 유전자 발현양상 분석 및 형질전환 기술 탐색: 표고버섯을 대상으로 시험함

가. 표고균주의 cDNA 합성

나. cDNA 클론화 및 cDNA library 구축

다. 발이유전자분리

라. promoter 선발

마. Gene Knock-out 기술 탐색

## 제 2 장 생육활성 물질 첨가에 의한 표고 톱밥재배의 생산성 향상 및 재배 잔사의 유효 이용

### 제 1 절 서 설

그 동안 표고버섯재배업자들은 참나무류의 원목가격이 매년 상승함으로 이에 대체할수있는 방법으로 다른 수종의 원목으로 표고버섯생산성을 실험하였으나 아직 표고버섯 생산성이 참나무류를 능가하면서 자원이 풍부한 수종이 없는 것으로 보고되고 있다. 우리나라에서는 1960년대에 식재되어 지금은 간벌이나 주벌상태에 있는 임지의 침엽수재 및 활엽수재는 용재로서 이용하기에는 그 용도가 너무 한정되어 있기 때문에 간벌목의 거의 전부와 주벌목의 약 50% 정도는 이용가치가 없어 임지에서 폐기되어 자원손실이 크다. 또한 현재 실시되고 있는 참나무류 원목의 표고재배 형태는 임간의 노지에서 재배하는 것이 주종을 이루며 참나무 1만본을 골목으로하여 재배할수있는 노지의 면적은 450-600여평으로 규모에따라 많은 재배면적의 장소를 필요로 하고, 임지에서의 작업조건이 좋지않아 인력이 많이들고, 인력을 적기에 구하기 어려울 뿐만아니라 집약적관리가 어렵다. 그리고 버섯생산도 자연발생 적기인 봄과 가을로 한정되며 재배기간은 5-6년의 장기간이 필요하다.

이와같은 참나무류의 원목재배의 단점을 해소시키는 한 방법으로 톱밥재배법이 개발되어 국내외적으로 큰 실효를 거두고 있다. 즉 표고버섯의 톱밥재배 기술은 재배사내에서 버섯을 재배하기때문에 장소에 구애받지않고 좁은 면적에서 연중 대량 재배할수 있으며 재배기간도 6-8개월 정도로 단축될수있어 자본회전이 빠르고 톱밥혼합이나 톱밥주입방법등이 기계화,자동화가 가능하여 관리가 편리하여 농촌의 노동력 노령화에 대처할 수 있는 잇점이 있다. 아울러 농산촌의 소득증대는 물론 표고버섯의 수출증대에 크게 기여하게 될것이며, 발생하는 재배 잔사의 용도 개발은 표고버섯재배의 경제성을 더욱 높여주게 될것이다.

본 연구과제에서는 표고버섯 톱밥재배를 위한 배지의 다양화를 위하여 몇가지

수종에 대하여 시험하고 버섯의 생리활성성분을 구명하기 위하여 에르고스테롤을 분석하여 균사의 양을 측정하는 시험을 실시하였으며 침엽수 추출물을 사용, 표고균사의 생장에 미치는 효과를 분석하였다. 일본잎갈나무의 배지로의 사용가능 여부를 시험하였고 표고버섯 톱밥제배 후에 나오는 잔사의 이용법을 개발하기 위하여 비료화를 위하여 첨가물의 효과와 몇가지 수목의 성장을 조사하였다.

## 제 2 절 표고버섯 톱밥제배를 위한 효과적인 배지의 탐색

### 1. 실험재료 및 방법

#### 가. 공시재료

Table 2-1. Characteristics of sample trees

Sample No.	Species	Diameter (cm)	Height (m)	Age (yr.)
H01	<i>Quercus acutissima</i>	9-10	8-10	25-35
H02	<i>Populus alba</i> × <i>glandulosa</i>	7-10	6- 8	15-20
H03	<i>P. euramericana</i>	7-10	7- 9	40-45
H04	<i>Platanus occidentalis</i>	7- 9	7- 8	35-40
H05	<i>Betula platyphylla</i> v. <i>japonica</i>	5- 9	3- 4	6- 8
S01	<i>Larix leptolepis</i>	8-10	10-12	40-43
S02	<i>Pinus rigida</i>	7-10	4- 6	20-30
S03	<i>Pinus strobus</i>	5-10	2- 3	8-15

충북대학교 구내 및 월악산(충북대학교 연습림)에서 1998년 11월에서 12월 사이에 Table 2-1 에 나타난 8수종을 별목한 다음, 이들 수종에 대해 농촌진흥청에서 농가 보급용으로 개발된 톱밥 제조기를 이용, 톱밥을 제조하였다. 공시목의 특성은 Table 2-2과 같다. 공시균주는 임업연구원에서 분양 받은 산림5호(톱밥제배용)와 충북대학교 농과대학 임산공학과에서 보관중인 CB-H, CB-T를 균주로 이용하였고, PDA배지에서

25℃, 20일간 배양하여 균사가 양호하게 성장된 것을 종균으로 사용하였다.

#### 나. 실험방법

##### 1) 배지별 최적 생육조건 및 톱밥배지 영향인자 구명

공시목의 톱밥을 미강과 10:1(W/W)로 혼합한 다음 함수율을 65%로 조절하였다. 직경 2.1cm × 높이 21cm의 Test tube에 충전한 후 고압멸균기를 이용, 121℃에서 60분간 멸균하였다. 멸균배지의 온도가 실온으로 냉각된 후 접종하였다. 접종시 공시균주를 PDA배지에서 배양한 균사를 코르크 천공기를 이용 직경 5mm의 크기로 채취하여 Test tube 중앙에 접종하였다. 접종 후 배지를 25℃의 배양기에서 배양하면서 균사가 성장한 길이를 측정하였다.

##### 2) 수종별 톱밥배지의 pH 변화 조사

톱밥배지 및 미강 혼합 배지의 멸균 전·후, 그리고 균사 만연 후 pH 변화를 측정하였다. 각각의 배지로부터 3g씩을 채취하여 deionized 증류수 50 ml에 혼합·분산한 다음 25℃에서 pH를 측정하였다.

##### 3) 배지의 수분함량이 톱밥재배에 미치는 영향

Table 2-2. *Lentinula edodes* strains used for this study.

Strain	Source	Fruiting temperature	Use
Mok H	Chungbuk University	10 - 22℃	sawdust cultivation
Sanrim No 6	Korean FRI	15 - 20℃	sawdust cultivation
Sanrim No 4	Korean FRI	10 - 20℃	log cultivation
Imhyup No 1	Forestry Cooperation	12 - 25℃	log cultivation

균사생장과 버섯원기형성 및 버섯생장에 수분이 매우 중요하고, 균주에 따라 수분함량변화에 다르게 적응할 것이라고 가설을 세웠다. 이에 따라, 톱밥내 수분량을

습량기준으로 43%, 55%, 64%, 69% 로 조절하고 원목재배용 균주 2개, 톱밥재배용 균주 2개에 대하여(Table 2-2), 이들 표고균사의 성장과 원기형성정도를 조사하였다.

#### 4) 버섯의 생리활성 성분 구명

##### 가) 표고의 균사배양체의 조제

표고균을 배양한 액체 배지는 증류수 1리터 당 글루코스 20g, 이스트엑스트랙트 2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5g, 펩톤 2g을 넣어 121℃에서 고압살균하였다. 액체 배양체는 여과지에 걸러서 모은 후 압지 사이에 넣고 눌러서 수분을 제거한 후 무게를 달고 막자사발에 갈아서 분석시료로 사용하였고 일부 시료는 105℃에서 말린 후 생중량:건중량 비를 구하였다. 표고 톱밥배양체는 2cm x 15cm 시험관에서 미강 10%를 함유한 상수리 톱밥에서 20주 동안 기른 것으로 배지내 수분율은 건중량 기준으로 75%, 125%, 175%, 225%로 조정하였다. 이 톱밥배지에 충북대, 임업연구원, 구임업협동조합(현 산림조합) 미생물 연구소에서 분양 받은 4개의 표고 균주(목-H, 산림4호, 산림 6호, 임협 1호, (후자 3균주는 유전적 특성이 다른 것으로 구분되었다)의 액체 배양 균사체를 접종하였다. 이 톱밥배지 배양체의 생중량 0.5g을 분석에 사용하였다.

##### 나) 에르고스테롤 분석

Pasanen *et al.* 과 Nylund & Wallandaer의 방법들을 변형하여 액체배양 또는 톱밥배양된 표고 균사체의 에르고스테롤 함량을 다음 과정으로 분석하였다.

(1) 사포닌화: 시료를 2cm x 15cm 시험관에 넣고 95% 메탄올에 녹인 10% KOH 8 ml를 넣은 후, 80℃에서 60분 정도 중탕한 후에 용액이 마르지 않도록 10% KOH용액을 2ml 더 첨가하고 30분간 더 중탕하였다.

(2) hexane 추출: 사포닌화한 시료를 실온으로 식히고 각 시험관에 3ml의 물을

첨가하여 보르텍스로 교란하여 섞은 후 hexane 2ml를 첨가하고 섞어서 무색 투명한 hexane분획이 상등액으로 분리되면 파스퇴르 피펫으로 모았다. 그리고 hexane 2ml를 한번 더 넣어 섞은 후 상등액을 모았다. 모아진 hexane 분획을 증발기에 넣어서 hexane을 휘산시킨 후 남은 백색의 옅은 결정을 99.5% 에탄올 2ml에 녹인 후 0.2 $\mu$ m 필터에 여과하였다.

(3) HPLC 분석: 여과된 시료 10 $\mu$ l를 취하여 Waters 510 HPLC 펌프에 주입하였다. HPLC 조건을 UV Detector로 파장 282nm, mobile phase는 HPLC용 메탄올, reverse-phase 컬럼은 Waters Nova-Pak C18, 펌프 유입속도 1.4 ml/min로 하였을 때 에르고스테롤의 피크가 4.6분 후에 나타났다. Waters 746 Integrator에 나타난 수치를 에르고스테롤 표준곡선에 대입하여 함량을 구하였다. 표준곡선은 Nylund & Wallander(1992)의 방법에 따라 Sigma 제품 에르고스테롤을 끓는 에탄올에 녹인 후 재결정, 정제한 후 100 ppm 표준용액을 만들어서 같은 HPLC에서 구하였다.

(4) 시험 설계: 톱밥 배양체내에 있는 에르고스테롤을 사포닌화하기 위한 용액으로서 메탄올이나 메탄올+에탄올 혼합체의 효과를 알기 위하여 95% 메탄올과 95% 에탄올을 사용하였으며, 이들의 혼합비는 4:1 이었다. 추출은 각 용액별로 상기한 4개의 수분수준으로 톱밥배양체에 대하여 2반복하였다. 표고 균사체 중량:에르고스테롤의 함량관계를 알기 위한 분석은 액체배양체 30, 70, 140, 210mg별로 2반복하였다. 톱밥배양체내 에르고스테롤 분석은 4개 균주에 대하여 4수준의 수분 함량별로 3반복하였다.

다) 침엽수 추출물의 표고균사생장에 미치는 영향

(1) 추출물의 준비

균사 생장이 불량하였던 침엽수류 중 S02을 선택하여 추출하였다. 냉·온수 추출 방법은 각각 톱밥 100g을 deionized 증류수 1000ml에 혼합하여 추출하였다. 냉수 추출은 25 $^{\circ}$ C, 48시간 추출하였고, 온수 추출은 100 $^{\circ}$ C, 1시간 추출하였다. 냉·온수 추출한 톱밥 잔사를 각각 미강과 10:1(W:W)로 혼합하여, 함수율을 65%로 조절하여



배지를 조성하였다. 배지를 직경 9cm의 petri dish에 충전하고, 고압멸균기를 이용, 121℃에서 60분간 멸균한 다음 실온 냉각하였다. 공시균주로 산림5호를 접종한 후 25℃의 배양기에서 배양하면서 균사의 생장을 장·단경으로 측정하여 평균을 구하였다.

## (2) 추출물의 균사 생장에 미치는 효과

상기 방법으로 냉·온수 추출을 하여 흡인여과시 추출액이 1400ml가 되게 하여 각각의 추출액을 100ml가 되도록 농축하였다. Petri dish상의 PDA배지에 3cc씩 첨가하고, 공시균주로 산림5호를 접종한 후 25℃에서 배양하면서 균사의 생장을 장·단경으로 측정하여 평균을 구하였다.

## 라) 효과적인 톱밥배지의 선발

### (1) 수종별·종균별 버섯 생산량 비교

수종별 균사 생장의 비교에서 나타난 결과를 바탕으로 활엽수와 침엽수 각각 2수종씩 총 4수종을 선택하여 하였다. 선택된 수종은 상수리, 은사시, 낙엽송, 적송 등 4수종이다. 각 수종의 톱밥에 미강을 10:1로 혼합하여 배지를 제조하였다.

사용된 종균은 농촌진흥청 농업과학기술연구소에서 분양받은 농기3호, 임업연구원으로부터 분양받은 임협 1호와 산림 5호, 그리고 충북대학교에서 보관중인 CB-H 등 4가지 종균을 접종하였다. 사용된 용기는 일반적으로 이용되고 있는 P.P.봉지에서 생산과 장·단점을 비교하기 위해 (주)남산엔지니어링에서 생산 중인 플라스틱 용기를 선택하였다.

### (2) 버섯 생산에 미치는 첨가물 효과 비교

균사 생장이 우수했던 4가지 수종인 상수리, 은사시, 낙엽송, 적송 등 4수종에

대한 숯, 피트모스, 낙엽송 추출물 등 3 가지 첨가물의 효과를 알아보기 위함이다. 숯의 첨가는 톱밥:미강=10:1의 혼합배지 중량을 기본배지로 하여 1%(w/w)첨가하였고, 피트모스는 5%(w/w), 낙엽송 추출물은 20%(w/w) 첨가하였다. 낙엽송 추출은 물과 톱밥의 10:1(w/w) 혼합물을 멸균기를 이용하여 120℃에서 1시간 추출하였다. 기본 배지에 각각의 첨가물을 첨가하여 혼합한 후 P.P.봉지에 2.5kg씩 담아 임협 1호 종균을 접종하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

##### 가. 배지별 최적 생육조건 및 톱밥배지 영향인자 구명

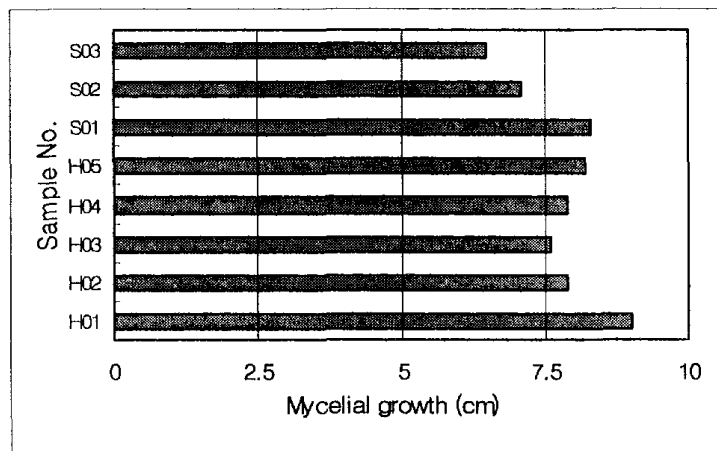


Fig. 2-1. Mycelium growth of Sanlim No. 5 (*Lentinula edodes*) on various mixturing media.

Notes : Mixture medium is sawdust and rice bran (10:1).

Incubation period is 25 days.

Fig. 2-1은 산림5호 종균을 수종별 톱밥배지에 접종하여 성장한 균사의 길이를 측정한 결과이다. 표고버섯 톱밥재배용 원료로 많이 사용되는 H01은 9cm로 우수한 균사 성장량을 보였고, 활엽수인 H02, H03, H04, 그리고 H05 등도 7.5~8.5cm의 균사 성장을 보였다. 침엽수에서는 S01이 8cm로 활엽수 수종들과 비슷한 성장을 보였고, S02와 S03은 6~6.5cm로 T06에 비해 좋지 않은 성장량을 보였다.

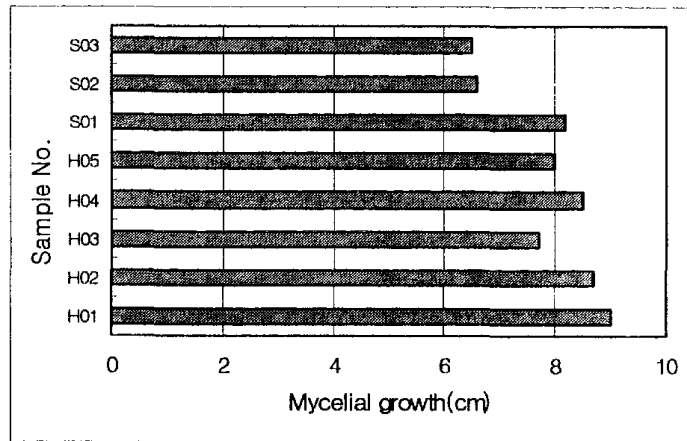


Fig. 2-2. Mycelium growth of CB-H (*Lentinula edodes*) on mixture media.

Legends refer to table 2-1.

Fig. 2-2는 수종별 톱밥배지에 CB-H 종균을 접종하고, 성장한 균사의 길이를 측정하였다. 활엽수에서는 H01, H02, 그리고 H04가 8.5cm 이상의 우수한 성장량을 보였고, H03과 H05는 7.6~8.0cm의 성장을 보였다. 침엽수에서는 S01이 8.2cm로 우수한 성장을 보였고, S02과 S03이 6.3~6.5cm로 낙엽송이나 활엽수에 비해 좋지 않은 성장을 보였다.

Fig. 2-3은 CB-T 종균을 수종별 톱밥배지에 접종하여 성장한 균사의 길이를 측정하였다. 활엽수에서는 H01, H02, 그리고 H05가 8~8.5cm로 우수한 균사 성장량을 보였다. H04는 산림5호나 CB-H 종균에서와 달리 7.2cm로 1cm정도로 차이를 보였고, H03은 마찬가지로 활엽수에서 가장 적은 성장량을 보였다. 침엽수에서는 S01이 8.3cm로 H01과 비슷한 우수한 성장을 보였고, S02과 S03은 5.5~7cm 정도로 활엽수류나 S01에 비해 3~1.5cm의 차이를 보였다.

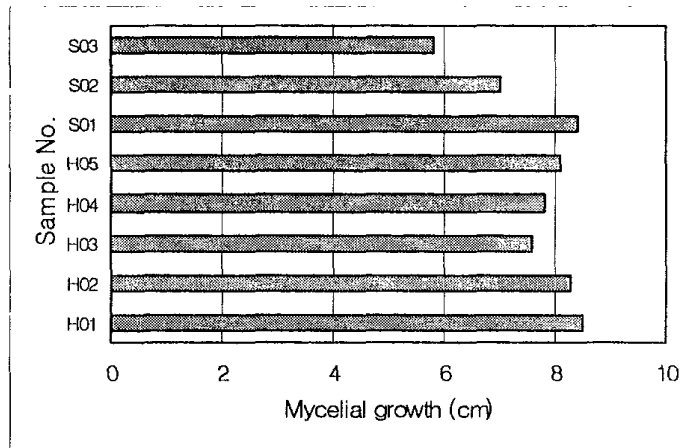


Fig. 2-3. Mycelium growth of CB-T (*Lentinula edodes*) on mixture medium.

Legends refer to Table 2-1.

#### 나. 수종별 톱밥배지의 pH 변화 조사

균사의 생장에 대한 배지의 pH는 기초적 특성이다. 따라서 수종별 톱밥배지(Table 2-3)와 미강 혼합배지(Table 2-4)의 멸균 전·후, 그리고 균사 만연 후의 pH 변화를 측정하였다. 순수 톱밥배지의 pH에 비해 혼합배지의 pH가 더 높게 나타났다. 그것은 미강의 pH가 멸균 전·후로 pH 6.5와 pH 5.8로 톱밥배지의 pH보다 높기 때문이었다.

Table 2-3. pH variations of sawdusts before and after autoclaving

Sample No.	H01	H02	H03	H04	H05	S01	S02	S03
Before autoclaving	4.99	5.17	5.48	5.30	4.41	4.71	4.39	4.42
After autoclaving	4.51	4.50	5.44	4.94	4.07	4.29	4.03	4.06

균사의 생장과 배지의 pH간의 상관관계를 보면, H01, H02, 그리고 H04와 같이 균사 생장이 우수한 수종의 pH는 5.07~5.34에 분포하고 있지만, 침엽수 중 우수한 성장을 보인 S01의 pH는 4.86으로 배지의 pH가 균사의 생장에 영향은 미치지만, pH만으로는 판단할 수 없었다. 그리고, 만연 후의 pH는 3.38~4.17로 0.67~1.50 정도가 떨어졌다.

Table 2-4. pH variations of mixed media before and after autoclaving,  
after mycelial growth on sawdust and rice bran (10:1)

Sample No.	H01	H02	H03	H04	H05	S01	S02	S03
Before autoclaving	5.48	5.42	5.86	5.76	5.10	5.27	5.06	5.33
After autoclaving	5.11	5.07	5.56	5.34	4.88	4.86	4.43	5.00
After mycelial growth	3.67	3.82	4.17	3.95	3.38	3.56	3.76	3.95

다. 배지의 수분함량이 톱밥재배에 미치는 영향

상수리 톱밥내에서 수분함량에 따른 균주별 표고균사의 생장은 Table 2-5와 같다. 산림6호가 다른 균주보다 수분함량에 영향을 덜 받고 잘 자라며, 기타 균주는 수분을 125% ~ 175%에서 생장이 양호하였다. 수분을 75%에서는 4균주 보다 생장이 저해되었으며, 산림4호가 특히 수분율변화에 민감하였다. 수분함량에 따른 톱밥의 분해속도는 수분을 175%에서 가장 빠르고 산림4호가 수분율 변화에 민감하였다. 수분을 75%에서 분해율은 5%~10%인데 반하여 175%에서는 16%~21%였다 (Table 2-5).

Table 2-5. The effect of water content of sawdust medium on the mycelial growth of *Lentinula edodes*.

Water content (%)		Mycelial growth(cm)			
Dry base	Wet base	Strains for sawdust cultivation		Strains for bedlog cultivation	
		Mok H.	Sanrim No 6	Sanrim No 4	Imhyup No 1
75%	43%	4.1±0.3	5.5±0.1	4.1±0.1	4.4±0.4
125%	55%	5.0±0.2	5.7±0.3	4.4±0.1	5.0±0.2
175%	64%	4.9±0.2	5.8±0.3	5.2±0.2	4.9±0.2
225%	69%	4.6±0.3	5.3±0.4	4.0±0.3	4.9±0.2

The values are average ± standard deviation of 10 replications.

시험관내에 톱밥배지에서 배양된 표고균은 Table 2-6에서 보는 바와같이 수분량이 많을수록 원기를 빨리 형성하였으며, 이것은 균주에 따라 달랐다. 임협1호가 수분 225%에서 원기를 가장 잘 형성하였으나, 산림 6호는 원기를 전혀 형성하지 않았다. Mok H균주는 수분 175%에서도 원기를 형성하였다. 일반적으로 추천되는 톱밥배지 수분함량은 균사생장 뿐 만 아니라 버섯원기 형성에도 적당한 수준이지만 균주에 따라 반응하는데 차이가 있었다(Table 2-7).

Table 2-6. Substrate water content and decomposition rates measured by dry weight reduction in 10 weeks

Water content (%)		Dry weight reduction (%)			
dry base	wet base	Mok H	Sanrim No 6	Sanrim No 4	Imhyup No 1
75	43	4.8±1.8	9.3±2.2	6.5±1.1	4.3±2.6
125	55	11.1±1.0	18.3±1.3	13.8±1.3	12.2±4.1
175	64	17.8±2.6	16.8±0.8	20.8±2.8	17.3±5.3
225	69	16.4±5.1	17.3±5.6	8.4±3.5	16.0±5.5

\* Initial substrate was 10 gram dry weight. The values are the means and standard deviation of 4 samples.

Table 2-7. Moisture effect on primordia formation of *Lentinula edodes* strains in 10 weeks old sawdust cultures.

Water content (%)		Number of primordium			
dry base	wet base	Mok H	Sanrim No 6	Sanrim No 4	Imhyup No 1
75	43	0	0	0	0
125	55	0	0	0	3
175	64	39	0	0	2
225	69	70	0	28	120

\* The numbers are the total number of promordia formed in 20 tubes.

라. 버섯의 생리활성 성분 구명

1) 침엽수 추출물의 균사 생장에 미치는 영향

침엽수류 중 균사 성장량이 좋지 않았지만, 산림 축적량이 많은 S02를 선택하여 균사 성장 저해물질을 확인하기 위한 기초 연구로 먼저 냉·온수 추출 잔사 톱밥에서 균사의 성장을 보았다. Fig. 2-4는 S02의 냉·온수 추출 톱밥 잔사에 각각 미강을 10:1(W:W)로 혼합한 배지에서 산림5호 종균의 균사 성장을 측정하였다. S02 미처리톱밥(Control)에 비해 냉·온수 추출 톱밥 잔사의 균사 생장이 더 크게 나타난 것으로 냉·온수 추출물 중에 균사 성장을 저해하는 성분이 있을 것으로 추정된다. 추가적으로 추출물에 대한 분석이 요망된다.

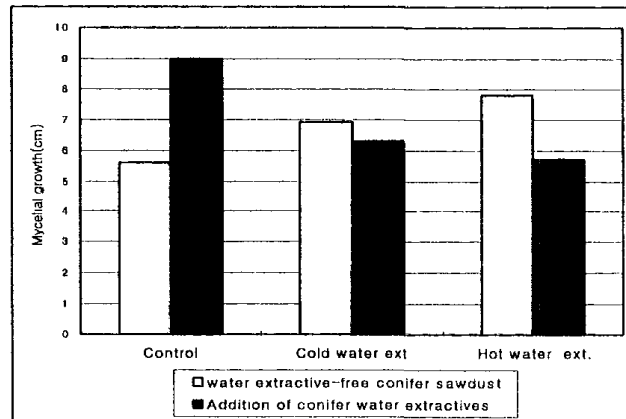




Fig. 2-4. Mycelial growth of Sanlim No.5 (*Lentinula edodes*).

Notes  Incubation period is 15 days.

 The medium made by PDA.

Incubation period is 12 days.

Fig. 2-4는 S02 냉·온수추출물이 균사의 생장에 미치는 영향을 나타낸 것이다. PDA배지에 각각의 추출물을 첨가하여 균사 성장을 측정한 것으로 추출물을 첨가하지 않은 배지에서의 생장이 가장 좋은 것을 볼 수 있었다. 그리고, 냉수추출물보다 온수추출물이 더 균사의 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

## 2) 균사배양체내 에르고스테롤 분석

추출용액에 의한 에르고스테롤 함량분석의 차이. 톱밥배양된 표고 균사체내에 있는 에르고스테롤을 추출할 때 메탄올이나 에탄올+메탄올의 혼합용액을 사용하여도 분석한 결과에는 차이가 없었다 (Table 2-7). 에르고스테롤 분석에 위 두 가지의 추출용액을 톱밥배지내 수분 함량별로 대응하여 사용하였을 때 추출용액에 의한 차이는  $2.6 \pm 13.5$ ,  $t=1.60$ 으로써 10% 유의수준( $t_{df-6,10\%}=1.89$ )에서 차이가 없었다. 그러나 이 오차에는 톱밥배지내 수분 함량과 증탕 수조내의 온도 분포에 따른 분석과정 자체에서 오는 인위적인 영향도 포함된 것이라고 생각한다. Pasanen *et al.* 에 따르면, 실제로 여러 가지 종류의 곰팡이에 대한 에르고스테롤 함량 분석치의 표준 편차는 5 ~ 16% 정도인데, 이 변이는 주로 분석법 자체에 기인한다고 한다. 우리의 실험에서도 각 시료에 대해서 추출용액별로 반복한 분석치의 오차범위는 에르고스테롤 함량의 1 ~ 9% 였다.

에르고스테롤 분석방법은 추출 용액과 온도, 시간에 있어서 논문에 따라 약간의 차이가 있다. 예를 들면 짚섬보-드 같은 건축재료에서는 80℃에서 90분간, 외생균근에서는 100℃에서 15-20분간 그리고 토양에서는 에탄올 + 메탄올의 4:1혼합액에서 70℃로 90분간 또는 메탄올에서는 90℃로 1시간 등이다. 또한 표고균사에 대한 에르고스테롤 분석에서도 추출온도와 시간이 같지는 않은데, 톱밥배지인 경우 40℃에서 90분간 (Ohga, 개인적 접촉), 토양배지인 경우는 75℃에서 45분간 추출과 동시에 사포닌화시켰다. 추출 온도가 높고 시간이 길수록 추출용액으로 사용한 메탄올이 휘발하여 날아갈 확률이 커지므로 분석치의 인위적인 오차 또한 커지리라 생각한다. 실제로 이번 추출에서, 메탄올 용액이 다 휘산한 경우에는 최종 에르고스테롤 분석치가 무의미할 정도로 낮았다 (자료 제시하지 않았음). 이번 추출에서는 60분 정도 증탕한 후에 남아있는 추출용액을 확인하고 같은 추출용액 2 ml를 더 첨가하는 것이 분석 오차를 줄이는데 효과가 있었다(Table 2-8).



Table 2-8. The effect of extraction solutions of methanol or methanol-ethanol mixture on the analysis of ergosterol content in *Lentinula edodes* sawdust culture

Water content-rep.	Ergosterol ( $\mu\text{g/g}$ culture fresh wt)		
	Methanol	Methanol + Ethanol	Difference
75(%)-1	110	124	-14
75(%)-2	105	124	-19
125(%)-1	138	125	+13
125(%)-2	165	149	+16
175(%)-1	101	100	+1
175(%)-2	102	121	-19
225(%)-1	154	162	-8
Mean $\pm$ SD		2.6 $\pm$ 13.5	

$$t=1.60 < t_{df=6,10\%}= 1.89$$

### 3) 균사 배양체의 중량과 에르고스테롤 함량

에르고스테롤 분석에는 현재 HPLC (Ekblad *et al.*, 1998; Pennanen *et al.*, 1998; Nylund & Wallander, 1992; Ohga, 1999; Zelles & Alef, 1995)나 GC-Mass Spectrometer Detector (Pasanen *et al.*, 1999) 와 같은 정교한 분석기기를 사용하고 액체배지에서 10주간 배양된 균사체와 20주간 배양된 것의 균체량을 달리하여 에르고스테롤을 분석하였을 때, 이 물질의 함량은 두 균사체에서 모두 균사체 중량에 비례하였으며 (Fig. 2-5), 상관계수는 10주 배양체에서  $r=0.99$  그리고 20주 배양체에서  $r=0.98$ 이었다. 이러한 직선적인 상관관계는 이미 여러 연구에서 언급되고 있다. 양송이 균사체의 경우 배양 56일 동안 균사중량 증가와 에르고스테롤 함량간에 상관계수( $r$ )가 0.997, 토양내 존재하는 곰팡이 균사의 표면적과 에르고스테롤 함량의 직선적 상관계수는 0.86 집안내 먼지속에 살아 있는 곰팡이의 수와 에르고스테롤 함량과의 상관계수( $r$ )는 0.65 정도였다.

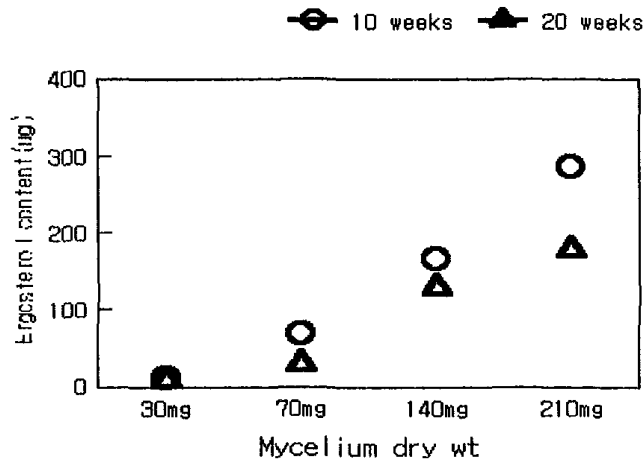


Fig. 2-5. Ergosterol content in 10- and 20-week-old mycelial culture of *Lentinula edodes* grown in a liquid medium.

그러나 에르고스테롤 함량과 실제 균사량간의 상관관계 정도는 균의 종류와 균이 이용하고 있는 물질에 따라 차이가 난다. 예를 들면 포자를 쉽게 형성하는 균과 균사를 주로 형성하는 균과도 차이가 있으며, 건축재료의 수분 상태에 따라 그 속에 적응한 균이 달라서 그 상관관계 값은 0.18 - 0.77의 변이를 보였다.

액체 배양된 표고균사체내의 에르고스테롤 농도는 10주간 배양된 것이 20주간 배양된 것보다 높았다 (Fig. 2-5). 어린 것의 에르고스테롤 농도는 건조균사 중량의 0.13%였고, 오래된 것은 약 0.10%였다. 외생균근에서도 나이가 많아질수록 균근내 에르고스테롤 농도가 낮아지는 것이 알려졌는데 1개월 된 균근에서는 0.2%, 7개월 된 것은 0.05%였다. 이것은 균체가 오래될수록 활성을 잃은 세포의 양이 증가하기 때문으로 생각된다. 그 결과 분해가 잘 되지 않는 균사세포벽의 구성성분인 키틴의 함량은 같은 시료에서도 에르고스테롤 농도보다 70% 더 높은 경우가 있다. 한편 이 분석에서 균사세포내 에르고스테롤의 농도를 계산하여 보면 사용된 시료의 양이 증가할수록 높아지는데 (0.03%에서 0.1% 정도로), 이는 미량의 시료를 취급하면서 생긴 인위적인 결과(분석 용기에 흡수 또는 흡착)라고 생각할 수 있다. 즉 100ppm짜리 에르고스테롤 표준용액을 HPLC에 2.5 - 20 µl 주입하였을 때 분석치는 주입량과 정비례하였으므로 기계분석의 오차는 거의 없었기 때문이다.

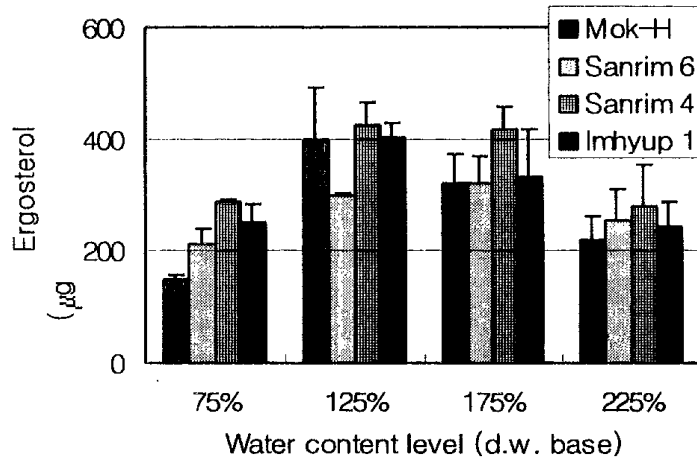


Fig. 2-6. Ergosterol concentrations in the oak sawdust cultures of *Lentinula edodes* strains grown under four different water content levels. Each value is an average of three replications and the error bar is from standard deviation.

#### 4) 톱밥배지의 수분함량과 표고 균주별 균사 배양체내 에르고스테롤 함량

4개의 표고균주를 4개 수분수준의 상수리나무 톱밥배지에서 20주간 배양한 결과, 톱밥 배양체내 에르고스테롤 함량은 배양체 건중량의 0.015 - 0.042% 범위에 있었다 (Fig. 2-6). 배양체내 에르고스테롤의 함량은 일반적으로 배지의 수분을 75%나 225%에서보다 수분을 125%와 175%에서 높았다. 또한 산림 4호균주에서 건조배지 1g당 에르고스테롤의 함량은 다른 균주보다 적게는 20µg, 많게는 140µg이 더 많았다.

하지만 에르고스테롤의 농도는 균주와 배지의 수분율에 따라서도 달랐다. 즉 목-H균주는 수분함량 변화에 민감하여 수분을 75%에서 건조배지 1g당 150µg 정도로 가장 낮았고, 수분을 125%에서는 400µg으로 가장 높았다. 이에 비하여 산림 6호는 수분에 덜 민감하여 75%수분에서 210µg, 175%에서 320µg 정도로 변이가 목-H균주보다 적은 편이었다. 산림4호와 6호 그리고 임협1호 균주는 RAPD 유전자 분석에서도 서로 다른 그룹으로 분석되었다.

위 결과는 Han *et al.* 이 밝힌 것처럼, 표고균의 생장은 배지내 수분함량에 크게 좌우되고 균주별로도 환경변화에 따라 버섯생산이 다르다는 것을 뒷받침하고 있다.

또한 Ohga에 의하면 에르고스테롤 함량의 급격한 증가는 원기형성과도 관련이 있다. 하지만 아직도 원목과 톱밥 속에서 자란 표고균사의 실제 균사량을 측정하는 방법은 개발되지 않은 상태이고 에르고스테롤로써 배지내 표고 균사량을 추정한 연구도 많지 않은 상태이므로 지금 이 결과는 앞으로의 버섯생산 연구결과와 비교 검토되어야 할 것이다.

결론적으로, 에르고스테롤 분석에는 현재 HPLC나 GC-Mass Spectrometer Detector 와 같은 정교한 분석기기를 사용하고 있으면서도 추출방법은 논문에 따라 조금씩 다르다. 이 물질의 분석시 추출용액으로서 메탄올이나 메탄올+에탄올의 혼합용액이 사용되는데, 표고톱밥 배양체내 에르고스테롤을 분석한 우리의 시험에서는 두 용액간에 차이가 없었다. 그리고 표고균사의 액체 배양체와 톱밥 배양체를 가지고 에르고스테롤을 분석한 결과 표고균사내 이 물질의 함량은 배양균사체의 생체량과 직선적 상관관계가 매우 높고, 균주나 배양기간, 배양조건에 따라서도 달라짐을 파악하였다. 그러므로 이 물질의 분석은 원목이나 톱밥 속에 있는 균사의 생체량을 추정하여 어떤 처리의 효과를 비교하는데 효과적이라고 생각한다. 에르고스테롤의 분석으로 원목이나 톱밥 속에 있는 균사의 생체량을 추정할 수 있으므로, 이것은 어떤 처리가 원목이나 톱밥배지내 표고균사의 생장에 미치는 효과를 검정하는데 이용될 수 있을 것이라고 생각한다.

앞으로 에르고스테롤 함량과 균사의 활력, 균사의 성숙도, 버섯원기의 형성이나 발달 등과의 관계가 정확히 밝혀지면, 이 물질의 분석을 통하여 보다 과학적인 표고버섯 생산 과정이 구상되리라 생각한다. 나아가 버섯재배 뿐만 아니라 곰팡이가 관련된 환경오염과 미생물 생태 연구 (Saraf *et al.*, 1997)에도 이 물질의 분석은 중요하게 적용될 수 있을 것이다.

#### 마. 효과적인 배지의 선발

첨가물(숯, 낙엽송 추출물, 피트모쓰)을 4개 수종의 톱밥(2.5kg pp봉지)에 혼합하여 버섯의 생산량에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 2-9에서 보는 바와 같이 표고톱밥재배에서 상수리나무 톱밥을 사용할 경우 숯이나 낙엽송 추출물을 첨가하는

것은 표고 발생량을 각각 36%와 19%증가시켰으나, 피트 모스는 오히려 버섯발생을 39% 감소시켰다. 이에 비하여 적송톱밥을 표고재배에 사용하는 경우에는 상수리톱밥에 비하여 버섯발생량이 28%에 지나지 않았음. 적송톱밥에 숯을 첨가할 경우에는 표고발생량이 49%증가하였으나, 피트모스나 낙엽송추출물 첨가는 표고발생에 영향을 주지 않았음을 알 수 있다. 숯의 첨가가 톱밥배지의 물리성 및 화학성을 개선하여 버섯발생을 증가시켰을 것으로 생각된다.

Table 2-9. Effect of additives on mushroom production of *Lentinula edodes*

Additives	Mushroom production, fresh g/2kg medium		
	Oak	Pine	Average
Control	528 c	129 B	328
Charcoal	718 a	259 A	488
Peat moss	333 d	95 B	214
WSE of larch	629 b	140 B	385
Average	552	156	

\* 8 replicates. Different alphabets refer to at 5% significant level among average values.

액체배지에서는 질소원으로 펩톤과 Mg, Ca, K 첨가로 균사생장량을 120%, 진탕배양할 경우 표고균사의 콜로니 수를 9배 증가시킬 수 있었다 (Table 2-10).

Table 2-10. Mycelial growth of *Lentinula edodes* in loiquid culture containing peptone or minerals

Medium Additives	Sucrose + yeast extract		Glucose + yeast extract			
	No add	Mineral	No add	Mineral	Peptone	Mineral+ peptone
Dry wt (mg/100ml)	31	59	32	56	48	80
No. of colonies	207	180	82	98	853	801

\* Mineral: K, P, Ca, Mg addition.

바. 원목 접종

임협1 및 산림4, 한국종균 290 등 8개 상업용 균주를 굴참나무 1000본에 접종하여 접종강도별로 시험한 결과, 접종 2년차에서 10월 22일까지의 원목 1개당 표고수확량은 Table 2-11과 같다. 접종 원목수는 한국종균은 접종밀도별로 각각 125개씩, 다른 종균은 각각 35개씩으로 하였다. 접종 밀도별 결과는 균주에 따라 달랐으나, 일반적으로 다공밀도 접종에서 표고발생량이 소공밀도에서보다 약 30% 정도 많았다. 현재임협 1호와 7호 등 고온성 표고의 발생량이 월등히 많으며, 산림 4호는 저온성으로 알려져 있으면서도 발생량이 고온성과 비슷하다. 한국종균 접종목에서는 차츰 발생량이 증가되고 있으므로 차후 보완될 필요가 있다.

Table 2-11. Mushroom production from bedlogs

Strains	Mushroom production/bedlog, (g)	
	Low density innoculation	High density innoculation
	(Dia. x 3)	(Dia. x 6)
Hankuk No. 357 (High temp.)	104	78
Hankuk No. 290 (Low temp.)	67	94
Imhyup No. 1 (High temp.)	402	458
Imhyup No. 2 (Low temp.)	30	34
Imhyup No. 5 (Med. low temp.)	52	85
Imhyup No. 6 (Med. temp.)	218	237
Imhyup No. 7 (High temp.)	415	600
Sanrim No. 4 (Low temp.)	369	560
Average	207.12	268.25

3. 결론

수종별 최적배지 선발과 관련하여 표고버섯 톱밥재배용 원료로 많이 사용되는

H01(상수리나무)은 9cm로 우수한 균사 성장량을 보였고, 활엽수인 H02 (은수원사시나무), H03(이태리포푸라), H04(프라타나스), 그리고 H05(자작나무) 등도 7.5~8.5cm의 균사 성장을 보였다. 침엽수에서는 S01(일본잎갈나무)이 8cm로 활엽수 수종들과 비슷한 성장을 보였고, S02(리기다소나무)와 S03(스트로부잣나무)은 6~6.5cm로 좋지 않은 성장량을 보였다.

배지의 수분함량이 톱밥재배에 미치는 영향과 관련, 산림6호가 다른 균주보다 수분함량에 영향을 덜 받으며, 기타 균주는 수분을 125% ~ 175%에서 생장이 양호하였다. 수분을 75%에서는 4균주 모두 생장이 저해되었으며, 산림4호가 특히 수분율변화에 민감하였다. 수분함량에 따른 톱밥의 분해속도는 수분을 175%에서 가장 빠르고 산림4호가 수분을 변화에 민감하였다. 수분을 75%에서 분해율은 5%~10%인데 반하여 175%에서는 16%~21%였다. 수분량이 많을수록 원기를 빨리 형성하였으며, 이것은 균주에 따라 달랐다. 임협1호가 수분 225%에서 원기를 가장 잘 형성하였으나, 산림 6호는 원기를 전혀 형성하지 않았다. Mok H균주는 수분 175%에서도 원기를 형성하였다.

침엽수류 중 S02(리기다소나무)의 냉·온수 추출물의 첨가로 톱밥 잔사에 각각 미강을 10:1(W:W)로 혼합한 배지에서 산림5호 종균의 균사 성장을 측정된 결과, 균사 생장이 크게 저해받았으며, 냉·온수 추출물 중에 균사 성장을 저해하는 성분이 있을 것으로 추정된다. PDA 배지에 각각의 추출물을 첨가하여 균사 성장을 측정된 결과도 동일한 균사의 성장을 억제함을 확인하였다.

표고균사의 액체 배양체와 톱밥 배양체를 가지고 에르고스테롤을 분석한 결과 표고균사내 이 물질의 함량은 배양균사체의 생체량과 직선적 상관관계가 매우 높고, 균주나 배양기간, 배양조건에 따라서도 달라짐을 파악하였다. 에르고스테롤(ergosterol)은 고등균류 균사세포막의 중요한 구성 성분으로 이들의 특징 물질이고, 균의 성장에 중요한 기능을 한다. 그러므로 균사 배양체에서 이 물질의 함량을 분석함으로써 고체상 배지 속에 있는 곰팡이의 생체량을 추정할 수 있다. 표고균사의 액체 배양체와 톱밥 배양체를 가지고 에르고스테롤을 분석한 결과, 이 물질의 함량은 균사체의 중량과 직선적 상관관계가 있으면서( $r=0.98$ ), 배양기간, 균주, 배지내 수분함량에 따라 달라졌다. 액체배양체에서 에르고스테롤 농도는 10주간

배양된 것이 0.13%로 2주간 배양된 것의 0.10% 보다 높았다. 톱밥배양체에서 이 물질의 농도는 균주와 수분 함량에 따라 0.015 - 0.042% 범위였다. 표고균주 산림 4호 배양체에서 에르고스테롤 함량은 균주 목-H나 산림 6호의 것보다 건조배지 g당 20~140 $\mu\text{g}$  정도 높았다. 이 화학물질의 함량은 표고균사를 수분율이 125%나 175%인 배지에서 배양하였을 때 건조배지 g당 297~425 $\mu\text{g/g}$  였다. 이 양은 수분율이 75%나 225%인 배지에서의 함량, 148~286 $\mu\text{g/g}$  건조배지, 보다 높은 것이다. 에르고스테롤을 분석함으로써 톱밥이나 원목과 같은 고체배지내에 있는 표고 균사량의 추정이 가능하리라 생각한다.

첨가물(숯, 낙엽송 추출물, 피트모쓰)을 4개 수종의 톱밥에 혼합, 버섯의 생산량에 미치는 영향을 검토한 결과, 상수리나무 톱밥을 사용할 경우 숯 및 낙엽송 추출물의 첨가로 표고 발생량을 각각 36%와 19%증가시켰으나, 피트 모쓰는 오히려 버섯발생을 39% 감소시켰다. 적송톱밥의 경우에는 상수리톱밥에 비하여 버섯발생량이 28%로 매우 낮았고, 숯을 첨가하므로써 표고발생량이 49%증가하였으나, 피트모쓰나 낙엽송추출물 첨가는 표고발생에 영향을 주지 않았음을 알 수 있다. 숯의 첨가가 톱밥배지의 물리성 및 화학성을 개선하여 버섯발생을 증가시켰을 것으로 생각된다. 액체배지에서는 질소원으로 펩톤과 Mg, Ca, K 첨가로 균사생장량을 120%, 진탕배양할 경우 표고균사의 콜로니 수를 9배 증가시킬 수 있었다. 임협1 및 산림4, 한국중균 290 등 8개 상업용 균주를 굴참나무 1000본의 원목에 접종한 결과, 접종 2년차에서 10월 22일까지의 원목 1개당 표고수확량은 균주에 따라 접종 밀도별로 달랐으나, 일반적으로 다공밀도 접종에서 표고발생량이 소공밀도접종에서보다 약 30% 정도 많았다. 임협 1호와 7호 등 고온성 표고의 발생량이 월등히 많았으며, 산림 4호는 저온성으로 알려져 있으면서도 발생량이 고온성과 비슷하였다. 한국중균 접종목에서는 차츰 발생량이 증가되고 있으므로 차후의 결과가 주목되고 있다.



〈참고문헌〉

- Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Pattern에 의한 표고버섯 품종간 비교. 한국균학회지 25(3) : 176 - 190.
- An, G. 1986. Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol.* 81 : 86 - 91
- Benfey, P. N. and Chua, N. H. 1989. Regulated gene expression in transgenic plants. *Science* 244 : 174 - 181
- Camerini - Otero, R. D. and Hsieh, P. 1993. Parallel DNA triplexes, Homologous recombination and other homology - dependent DNA interaction. *cell* 73 : 217 - 223
- Christou, P. 1992. Genetic transformation of crop plant using microprojectile bombardment. *Plant J.* 2 : 275 - 281
- Davies, K. M. and Grierson, D. 1989. Identification of cDNA clones for tomato mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene. *Planta.* 179 : 73 - 80
- Dopico, B., Lowe, A. L., Wilson, I. D., Merodio, C. and D. Grierson. 1993. Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low temperature storage. *Plant Mol. Biol.* 21 : 437 - 449.
- Ekblad, A., II. Wallander and T. Nasholm 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytol.* 138:143-149.
- Elliott, T.T. 1995. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Balkenna, Netherlands.
- Francois Guidet. 1994. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.* 22(9) : 1772 - 1773
- Frost, R. R. and Passmore, E. L. 1980. Mushroom Viruses: are- appraisal. *phytopath.*, j. 98 : 272 - 284
- George, C. A., Gerald, H. J., Susan, M., Winnell, N., Steven, S., Arthur, K. W., and William, F. T. 1996. High - Level Transgene Expression: Effects of a strong Scoffold Attachment Region from Tobacco. *Plant cell* 8 : 899 - 913

- Gessner, M.O. and E. Chauvet 1993. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:502-507.
- Gray, J., Picton, S., Sabbeer, J., Schuch, W. and D. Grierson, 1992. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with Antisense genes. *Plant Mol. Biol.* 19 : 69 - 87
- Han, Y.H., W.T. Ueng, L.X. Chen and S. Cheng. 1981. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Mushroom Science* Xi: 623-658.
- Hart, M.R. and P.C. Brokes. 1996. Effects of two ergosterol inhibiting fungicides on soil ergosterol and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 28:885-892.
- Ito, T. 1978. Cultivation of *Lentinus edodes*. in "The biology of Cultivation of edible mushroom." Eds. S. T. Chang and W. A. Hayes. Academic Press. N. Y., San Francisco, London. pp. 461 - 473
- Kangiu Yu and K. P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.* 20 (10) : 2606
- Kulkarni, R. 1991. DNA Polymorphisms in *Lentinula edodes*, the shiitake mushroom *Appl. and Environ. Microbiol.* 57 : 1735 - 1739.
- Kwan, H., S. Chiu, K. Pang. and S. Cheng, 1992. Strain typing in *Lentinus edodes* by polymerase chain reaction. *Expt. Mycol.* 16 : 163 - 166
- Matcham, S.E., B.R. Jordan, and D.A. Wood 1985. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl. Microbiol. Technol.* 21:108-122.
- Matzke, M. A., and Matzke, A.J.M 1991. Differential inactivation Loci containing homologous sequences. *Plant Mol. Biol.* 16 : 821 - 830
- Newell, S.Y. 1994. Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3479-3482.
- Nylund, J.-E. and H. Wallander 1992. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. *Methods in Microbiology* Vol 24:77-88.
- Ohga, S. 1999. Culture maturity of *Lentinula edodes* sawdust-based substrate in relation to fruiting potential. '99학술발표논문집. 한국목재공학회. 서울 pp 20-30.
- Okeke, B.C., A. Paterson,, J.E. Smith and I.A. Watson-Craik 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:563-569.

- Pasanen, A.-L., K. Yli-Pietila, P. Pasanen, P. Kalliokoski, and J. Tarhanen 1999. Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:138-142.
- Pennanen, T., H. Fritze, P. Vanhala, O. Kiikkila, S. Neuvonen, and E. Baath 1998. Structure of a microbial community in soil after prolonged addition of low levels of simulated acid rain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2173-2180.
- Roland, S. B., Rose - Marie, H., Monique, T., and Frederick, M. J. 1996. Decreased Susceptibility to Viral Disease of  $\beta$  - Glucanase - Deficient Plants Generated by Antisense Transformation. *Plant cell* 8 : 1001 - 1011.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold. Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraf, A., L. Larsson, H. Burge and D. Milton 1997. Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: Comparison with fungal culture and determination of endotoxin by *Limulus* Amebocyte Lysate assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2554-2559.
- Schnurer, J. 1993. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:552-555.
- Seitz, L.M., D.B. Sauer, R. Burroghs, H.E. Moohr, and J.D. Hubbard 1979. Ergosterol as measure of fungal growth. *Phytopathology* 69:1202-1203.
- Song, C. H., Cho, K. Y. and Nair, N. G. 1987. A Synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus Edodes*. *Mycologia* 79(6): 866-876.
- Staddon, W.J., L.C. Duchesne, and J.T. Trevors 1999. The role of microbial indicators of soil quality in ecological forest management. *The forestry Chronicle* 75:81-86.
- Stahl, P.D. and T.B. Parkin 1996. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biol. Biochem.* 28:847-855.
- Weete, J.D. and S.R. Gandhi 1996. Biochemistry and molecular biology of fungal sterols. *In* The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. edited by K. Esser and P.A. Lemke. III Biochemistry and Molecular Biology. edited by R. Brambl and G.A. Marzluf. Springer, Berlin, 421-438p.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. U. 1990. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genomic markers.

Nucleic Acid Res. 18 : 6531 - 6535

- Williams, J. G. K., Kubelik, A., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 19 : 6532 - 6535.
- Yamamura, Y. and Cochrane, K. W. 1976. A selective inhibitor of myxovirus from shiitake (*Lentinus edodes*). Mushroom Science 9(1) : 495 - 507
- Yii - Mattila, Y., Paavanen, S., Hannukkala, A., Paarikka, P., Tahvonen, R. and Karjalainen, R. 1996. Isozyme and RAPD - PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. Plant Pathology, 45 : 126 - 134
- Yoo, YB, and Shin, PG. 1996. Intergenic Transfer of Isolated Nuclei from *Lentinus edodes* into Protoplasts of *Pleurotus florida*. Korean Journal of Mycology 24: 111-125
- Zelles, L. and K. Alef. 1995. Biomarkers: ergosterol. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. ed. K. Alef and P. Nannipieri. AP. London. pp 422-424.
- 김규중, 신광수, 홍순우. 1986. 목재 부후균의 목질소 분해효소 유도에 관하여. 한국균학회지 14(1): 43-47
- 민두식, 조남석, 성재모, 조재명. 1995. 표고버섯, 새로운 재배와 경영. 농민신문사. 서울. 320p.
- 박경목, 김동찬, 이종윤, 양재경, 유창현, 정원일. 1994. 침엽수 톱밥에서 표고 균사생장 촉진에 관한 연구. 한국균학회지 22(3): 222-228
- 박원목, 송치현, 현재욱. 1992. 표고 버섯의 영양생리 및 기질개발. 한국균학회지 20(1): 77-82
- 이태수, 박원철, 강호덕, 김세권, 변병호, 이창근, 이원규, 민두식. 1997. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 검정을 이용한 한국 표고균주의 계통분류. 한국균학회지 25:219-225.
- 이태수, 조남석, 민두식. 1998. 액체종균 접종에 의한 표고톱밥재배 효과. 목재공학회지 26(1): 19-28

# 제 3 절 생육활성물질 첨가가 표고버섯의 톱밥재배에 미치는 영향

## 1. 실험재료 및 방법

### 가. 공시재료

충북대학교 구내에서 35년생 일본잎갈나무 2본을 별채하여 공시하였다.

### 나. 실험방법

#### 1) 생육활성물질의 추출

냉수 및 온수추출물을 추출하여 농축 후, 다량의 알코올에 침전시켜 에틸알코올, 에틸에테르순으로 세척하여 고형분을 얻고, 동결건조시켜 공시하였다.

#### 2) 성분의 동정 및 정량

##### 가) 화학적 조성분의 분석 및 정량

탈지시료를 사용하여 한국공업규격의 목재성분분석법으로 목재의 화학조성분을 분석하였다.

##### 나) 구성당의 분석

탈지목분을 72% 황산으로 가수분해하여 얻은 가수분해물을  $Ba(OH)_2$ 의 포화용액으로 중화시키고 그 상등액을  $NaBH_4$ 로 실온에서 환원시킨 다음, 아세틸화하여 얻은 alditol acetate를 methylene chloride로 추출.농축 후, inositol을 내부표준품으로 하여 가스크로마토그래프에 의하여 구성당을 정량하였다.

##### 나) 생육활성물질의 정제 및 화학구조의 구명

생육활성물질로서 추정되고 있는 수용성추출성분을 분리, 그 구성당을 분석한 결과,

arabinose 와 galactose 로 이루어진 당류임을 확인하고, 이 fraction을 정제하여 그 화학적 구조를 구명코자 하였다.

정제는 Ekman법에 의한 음이온교환수지 컬럼을 통하여 720nm 의 fraction을 분리하였고, 다시 Sephadex G100 G150을 사용하여 480nm에서의 fraction을 분리시켜 정제한 arabinogalactan으로 하였다. 정제된 arabinogalactan에 대하여 과요드산 산화법 및 메틸화분석을 통하여 구성당의 결합위치를 확인, 화학구조를 구명하였다.

### 3) 추출된 생육활성물질의 첨가효과 구명

#### 가) 톱밥배지에서의 균사생장량조사

톱밥배지에 첨가하여 균사의 성장상태 조사

#### 나) 톱밥배지에서의 버섯생산량 조사

톱밥배지에서의 버섯생산량 조사

#### 다) 톱밥배지 분해정도 조사

#### 라) 적정배합량 구명

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 버섯의 생육활성 성분 추출 및 성상구명

#### 1) 일본잎갈나무 목재의 화학적 조성분

일본 잎갈나무의 화학적 조성분은 Table 2-12에서 보는 바와 같이 다른 수종에 비하여 추출물이 많은 특징을 가지고 있다. 일본산 수종과 비교하였을 때 국산 일본잎갈나무의 추출물 함량이 2 - 2.5배 높은 것으로 나타났다.

Table 2-12. Chemical composition of larch wood

Compositions	Contents, %
Extractives	
Cold-water	13.5
Hot-water	16.3
1% NaOH	23.5
1% KOH	24.8
Alcohol-benzene	5.4
Lignin	26.3
Ash	0.28

### 2) 원료목재의 구성당류의 분석

Table 2-13은 원료목재의 구성당의 조성을 분석한 결과인데, glucose 함량이 68.1%로서 가장 많았으며, galactose가 18.2%로서 소나무류 함량의 약 3배를 보이고 있다. 그리고 mannose함량이 2.5%로서 다른 침엽수재의 1/4 - 1/5 정도에 지나지 않았다. arabinose와 galactose의 함량비는 1:7로서 galactose의 함량이 매우 높았다.

Table 2-13. Relative composition of carbohydrates of larch wood

Compositions	Relative contents, %
Rhamnose	trace
Arabinose	2.5
Xylose	8.6
Mannose	2.5
Galactose	18.2
Glucose	68.1

### 3) 수용성추출물의 분리

우리나라산 일본잎갈나무(충북대 구내)재 톱밥을 제조하고, 이에 기건 중량비로 5배량의 물을 가하여 48시간 실온에서 교반하면서 추출을 행하였다. 보통의 여과로는 분리가 되지 않아서 원심분리기를 사용하여 여액을 분리하고, 이를 실온에서 감압농축하여 투석해서 염을 제거하고, 다량의 알코올에 떨어뜨려, 건조시켜 분말상의

수용성 추출물(water soluble fraction, WSF)을 얻었다. 톱밥에 대한 추출물의 수율은 약 10% 정도였다.

Table 2-14. Relative composition of water-soluble extractives of larch wood

Compositions	Relative contents, %
Rhamnose	trace
Arabinose	18.3
Xylose	3.1
Mannose	trace
Galactose	75.3
Glucose	2.2

Table 2-14는 수용성추출물의 구성당류를 분석한 결과이다. rhamnose 및 mannose는 거의 존재하지 않았으며, glucose도 2.2%의 매우 낮은 함량을 보여주고 있다. arabinose 및 galactose의 함량은 전체추출물의 약 92%로 나타났으며, arabinose와 galactose의 비는 1 : 4.1로서 목재의 함량비인 1 : 7.3보다 매우 낮았다. 이러한 결과는 이들 수용성추출물 가운데 arabinose 및 galactose가 세포벽에 존재하는 것이 아니고, 세포의 내강에 존재함을 의미하는 것이며, 전체의 합계가 100%을 넘고 있는데, 서로 결합하여 중복으로 정량되었음을 나타내고 있다.

#### 4) Crude arabinogalactan의 성상

##### 가) 구성당분석

Dutton등의 방법으로 단리.정제한 조 arabinogalactan의 성상을 alditol acetate법으로 유도체화하여 gas chromatography로 분석한 결과 표 2-15에서 보는 바와 같이 rhamnose, mannose 및 glucose 는 거의 존재하지 않았으며, xylose함량도 정제전의 7.1%로부터 2.1%로 감소되었으며, 결과적으로 비교적 순수한 상태의 arabinogalactan이 얻어진 것으로 생각된다. 그리고 arabinose 및 galactose의 함량비가 1 : 3.4로서 정제전의 수용성추출물의 함량비에 비하여 다소 낮은 결과를 보여주고 있다.



Ekman 의 방법으로 단리한 crude arabinogalactan의 성상을 alditol acetate법으로 유도체화하여 gas chromatography로 분석한 결과(Table 2-15 참조), arabinose 함량이 22.1%, galactose가 75.7%로 나타났다. 추출물을 가수분해하지 아니하고 그대로 alditol acetate로 유도체화하여 분석하였을 때 거의 구성당의 함량이 혼적으로 나타나는 정도였으므로 이 추출성분에 들어 있는 당들은 다당류로서 서로 결합하고 있음을 알 수 있었다. arabinose와 galactose의 함량비는 1: 3.4 로서 그 이외의 당류로서는 xylose가 2.1% 였으며, 기타 arabinose, mannose glucose 등의 당은 거의 존재하지 않았다.

Table 2-15. Relative composition of crude arabinogalactan

Compositions	Relative contents, %
Rhamnose	-
Arabinose	22.1
Xylose	2.1
Mannose	-
Galactose	75.7
Glucose	-

#### 나) arabinogalactan의 화학구조

##### (1) 메틸화분석

Hakomori 법으로 완전메틸화한 arabinogalactan을 개미산 및 황산으로 2단 가수분해시키고, 수산화바륨으로 황산을 제거한 다음, 가수분해물을 농축하기전  $\text{NaBH}_4$ 로 환원시켰다. 이는 tri-O-methyl-pentose 류가 농축과정에서 휘발할 염려가 있기때문에 이를 방지하기 위해서였다. 이러한 과정을 거쳐 얻은 arabinogalactan의 가수분해물 alditol acetates를 가스크로마토그래프로 분석하여 Table 2-16과 같은 결과를 얻었다. 이 결과로부터 일본잎갈나무재로부터 추출한 수용성 추출물중의 arabinogalactan의 화학구조를 정리하면  $\beta$ -1,3-결합한 D-galacto- pyranose 기가 주고리를 이루고 있으며, 이 주고리를 이루는 galactose의 C<sub>6</sub>위 모두가 분기를 이루면서

측쇄를 가지고 있다. 이 분기를 이루는 측쇄에는 2종의 분자가 결합하고 있는데, 그 하나는  $\beta$ -1,6-결합한 D-galactose 와, 다른 하나는  $\beta$ -1,3- 결합한 L-arabinose 로서, 전자는 2-3개의 D-galactopyranose 기가 결합을 하고 있으며, 후자는 furanose 형의 L-arabinose기가 1-2개 중간의 측쇄구조를 이루고, 말단은 pyranose형의 L-arabinose 로 구성되어 있다. 전체적으로 L-arabinose와 D-galactose기의 비는 1 - 4.5였으며, 이는 목재구성당의 분석치 및 정제 arabinogalactan의 분석결과와도 매우 유사하였다.

Table 2-16. Composition of hydrolyzates from methylated arabinogalactan

Components	Peak area of gas chromatogram	molar ratio
2,3,5-tri-O-methyl-L-arabinopyranose	11.9	0.30
2,5-di-O-methyl-L-arabinopyranose	22.8	0.57
2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactopyranose	40.0	1.00
2,3,4-tri-O-methyl-D-galactopyranose	50.1	1.25
2,4-di-O-methyl-D-galactopyranose	66.9	1.67

### (2) 우론산 정량 및 분자의 성상

arabinogalactan.의 가수분해물로부터 이온교환수지를 사용하여 산성당을 분리하였고, Johansson등의 방법으로 우론산을 정량한 결과, 소량의 D-glucuronic acid를 검출할 수 있었으며, 이들 우론산이 주고리인  $\beta$ -1,3-D-galactopyranose 기의 C6위에 말단으로서 결합하고 있는 것으로 판단된다. 이들 arabinogalactan의 분자의 균일성을 조사하기 위하여 전기영동법으로 분석한 결과, 분자량이 서로 다른 2개의 arabinogalactan으로 구성되었음을 알 수 있었다.

### (3) arabinogalactan의 결합양식

과요드산을 사용하여 산화시킨 분석결과는 Table 2-17과 같다. 반응에 사용된 과요드산의 소비량은 1.19mol이었으며, 이때 생성된 개미산은 0.50mol 로서

Timell(23)의 결과와 잘 일치하였다. 4탄당의 alditol인 threitol이 1.19mol이나 생성된 것은 arabinogalactan에 또다른 galactose분자가 1->6 혹은 1->4 결합이 존재함을 시사하는 것으로서 Table 2-16의 결과와 잘 일치하고 있다. 그리고 arabinose 와 galactose의 함량비도 1 : 3.8로서 조 arbinogalactan의 함량비 1 : 3.4 와 거의 유사한 값을 보여주고 있다.

arabinogalactan의 화학구조를 보다 확실하게 구명하기 위하여 정제한 arabinogalactan을 부분메틸화한 alditols의 TMS유도체를 기 발표된 논문의 retention time 과 비교하여 Table 2-18과 같은 결과를 얻었다.

Table 2-17. Periodate oxidation analysis of crude arabinogalactan

Compositions	Contents
Periodate consumed, mol	1.19
Formic acid produced, mol	0.50
Degradation products, mol %	
Glycerol	53.0
Threitol	1.1
Arabinose	9.7
Galactose	37.3

Table 2-18. Partial methylation of arabinogalactan

Methylated sugars	Relative retention time*	Molar proportion
	min.	%
2,3,5-tri-O-Me-Araf	0.64	8.0
2,3,5-tri-O-Me-Arap	0.69	2.7
2,5-di-O-Me-Araf	0.79	3.1
2,4-di-O-Me-Arap	0.85	1.0
2,3,4,6-tetra-O-Me-Galp	1.00	31.2
2,4,6-tri-O-Me-Galp	1.11	3.3
2,3,6-tri-O-Me-Galp	1.14	3.9
2,3,4-tri-O-Me-Galp	1.20	17.4
2,6-di-O-Me-Galp	1.29	1.0
2,4-di-O-Me-Galp	1.33	25.6
2-O-Me-Galp	1.54	2.8

\* relative retention time of 2,3,4,6-tetra-O-Me-Galactitol.

2,4,6-tri-O-Me-Galactitol과 2,3,6-tri-O-Me-Galactitol은 arabinogalactan과 함께 추출된 galactoglucomannan 으로부터 유래된 것으로 생각되며, 2-O-Me-Galactitol은 일본잎갈나무의 arabinogalactan 구성성분으로서 확인되지 않았던 1->4 결합한 galactopyranose로부터 생성된 것으로 생각된다. 2,3,4,6-tetra-O-Me-Galactitol은 말단기로부터 유래된 것으로서 31.2mol을 함유하고 있으며, 2,3,4-tri-O-Me-Galactitol 및 2,4-di-O-Me-Galactitol이 약 43mol을 차지함은 1->6 결합을 이루고 있음을 의미한다. 이상의 분석결과를 종합하면 일본잎갈나무가 포함하는 arabinogalactan의 화학구조는 그림 과 같이 제안할 수 있다.

#### 나. 추출된 생육활성물질의 첨가효과 구명

##### 가) 균사생장량 조사

충북대가 보유하는 표고 균주 Mok H 와 산림6호 2종은 Table 2-19와 같다.

Table 2-19. *Lentinula edodes* strains used for this study

Strain	Source	Fruiting temperature	Use
Mok H	Chungbuk University	10 - 22℃	sawdust cultivation
Sanrim No. 6	Korean FRI	15 - 20℃	sawdust cultivation

PDA배지에 WSF 첨가농도를 달리하여 배양한 표고버섯균의 균환생장량은 Fig. 2-7에 나타냈다. 1 - 12%의 첨가량에서는 대조구에 비하여 균사 생장이 증진되었다. 특히 산림 6호의 경우에는 2%의 첨가량이, Mok-H의 경우에는 4% 첨가에서 균사 생장이 최대였고, 첨가량이 더 많으면 생장이 오히려 감소하였다. 그리고 WSF의 첨가량이 이이상으로 증가되면 어느 표고버섯균에 있어서도 생장의 저해를 가져왔다.

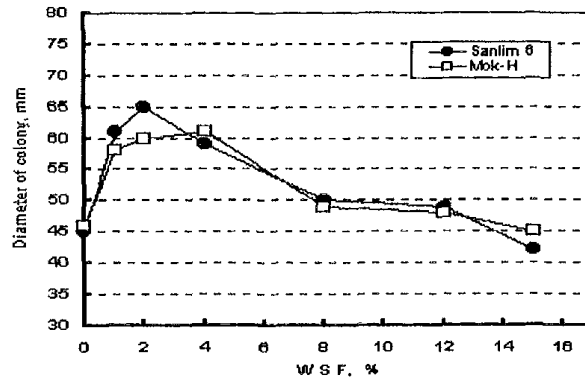


Fig. 2-7. Effect of water soluble fraction(WSF) of larch wood on colony diameter growth of oak mushroom(PDA media).

Fig. 2-8은 톱밥배지에서의 WSF 첨가농도를 달리한 조건에서 배양한 표고버섯균의 균사체의 성장량을 나타낸것이다. Fig. 2-7의 Agar 배지에서의 결과와 마찬가지로 1 - 15%의 첨가량에서 대조구에 비하여 균사 생장이 증진되었다. 특히 산림 6호의 경우에는 4%의 첨가량이, Mok-H의 경우도 4% 첨가에서 균사의 생장이 최대였고, 첨가량이 더 많으면 생장이 오히려 감소하였다. 그리고 WSF의 첨가량이 이이상으로 증가되면 어느 표고버섯균에 있어서도 생장의 지해를 가져왔다.

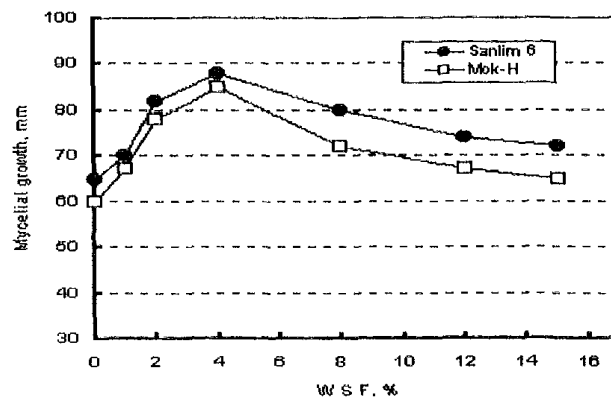


Fig. 2-8. Effect of water soluble fraction(WSF) of larch wood on mycelial growth of oak mushroom(Sawdust media).

나) 균사체의 중량에 미치는 영향

표고 균주 Mok H 와 산림6호 2종에 대하여 WSF 첨가농도를 달리하여 PDA배지에서 배양한 경우 균사체의 중량변화를 Fig. 2-9에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 균사체의 중량은 대조구에 비하여 매우 높은 증가를 나타내고 있으며 4% 첨가까지는 점차 증가하여 최대의 균체량을 보인 다음, 그 이후는 그다지 효과가 없는 것으로 나타났다. 전체량으로 약 5배정도의 증가를 나타내고 있다. 따라서 WSF의 첨가가 균사체의 신장생장에는 그다지 크게 영향하지 않았으나 균체의 중량에는 크게 영향함을 알 수 있었다

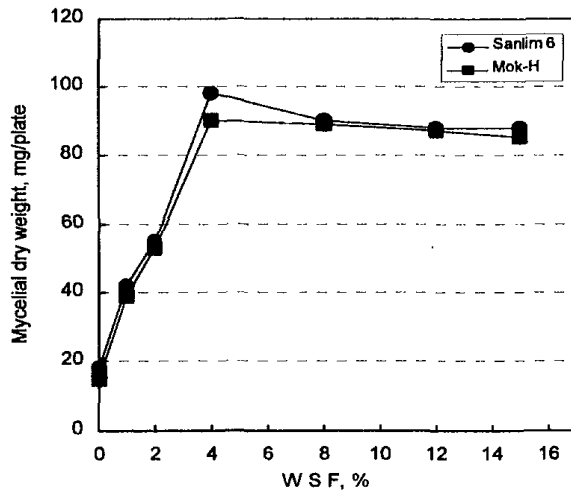


Fig. 2-9. Effect of water soluble fraction(WSF) of larch wood on mycelial weight of oak mushroom(PDA).

다). 톱밥배지에서의 버섯생산량 조사

톱밥배지에 WSF 첨가농도를 달리하여 배양한 표고버섯균의 버섯생산량은 Table 2-20에 나타냈다. 4%의 WSF첨가에 의하여 버섯의 생산량은 대조구에 비하여 균사 생장이 증진되었다. 특히 산림 6호의 경우에는 2%의 첨가량이, Mok-H의 경우에는 4% 첨가에서 균사 생장이 최대였고, 첨가량이 더 많으면 생장이 오히려 감소하였다.

그리고 WSF의 첨가량이 이 이상으로 증가되면 어느 표고버섯균에 있어서도 생장의 저해를 가져왔다.

Table 2-20. Mushroom production of *Lentinula edodes* by 4% of WSF addition

Strain	Source	Fruiting temperature	Flushing		
			1	2	3
Control	Mok H Chungbuk Univ.	10 - 22°C	65	127	140
WSF addition			88	149	187
Control	Sanrim No 6 Korean FRI	15 - 20°C	71	139	166
WSF addition			91	168	202

라) 톱밥배지 분해정도 조사

버섯의 톱밥재배시 배지의 성숙도는 자실체의 발생시기를 결정하는 매우 중요한 지표이며, 아울러 균주, 영양생장기간, 효소의 활성등도 관여하며, 배지내에서의 pH의 변화, 그리고 수분포텐셜의 변화등이 일어난다. 이러한 여러 가지 인자가운데 ergosterol의 함량이 자실체발생직전에 최고에 달한다는 사실로부터 배지내의 ergosterol함량을 자실체형성의 주요 예측수단으로 이용할 수 있는 것으로 평가되었다.

Table 2-21는 일본잎갈나무의 WSF를 4% 첨가하므로써 ergosterol 함량의 변화를 측정한 결과로서 균사가 콜로니를 형성하는 초기단계에서는 두 균주 모두 낮은 ergosterol함량을 나타냈으나 fruiting이 시작되는 시기에 급격히 높아지는 결과를 나타냈다. 이러한 동일경향이 WSF를 4% 첨가하므로써 더욱 그 함량이 증가되는 것으로 나타났다. 결국 추출물은 배지내에서의 균사의 활동을 도와 배지의 분해를 효과적으로 일으키면서 배지의 성숙도를 높여주는 것으로 나타났다. 그러나 자실체발생시기의 뚜렷한 단축은 없었다.

Table 2-21. Ergosterol contents of sawdust culture media of *Lentinula edodes* by 4% of WSF addition

Strain	Source	Fruiting temperature	Ergosterol contents, $\mu\text{g/g}$ of dry wt.	
			Colonized stage	Fruiting stage
Control	Mok H Chungbuk Univ.	10 - 22°C	850	1090
WSF addition			1100	1550
Control	Sanrim No 6 Korean FRI	15 - 20°C	910	1310
WSF addition			1290	1890

### 3. 결론

표고버섯의 생장이 매우 좋았던 일본잎갈나무의 구성당류를 분석한 결과, glucose 함량이 68.1%로서 가장 많았으며, galactose가 18.2%로서 소나무류 함량의 약 3배를 보이고 있다. 그리고 mannose함량이 2.5%로서 다른 침엽수재의 1/4 - 1/5 정도에 지나지 않았다. arabinose와 galactose의 함량비는 1:7 로서 galactose의 함량이 매우 높았다. 수용성추출물의 구성당류를 분석한 결과, rhamnose 및 mannose는 거의 존재하지 않았으며, glucose도 2.2%의 매우 낮은 함량을 보여주고 있다. arabinose 및 galactose의 함량은 전체추출물의 약 92%로 나타났으며, arabinose와 galactose의 비는 1 : 4.1로서 목재의 함량비인 1 : 7.3보다 매우 낮았다.

arabinogalactan을 정제하여, 완전메틸화.가수분해.가스크로마토그래피에 의하여  $\beta$ -1,3-결합한 D-galactopyranose 기가 주고리를 이루며, 이 주고리에 galactose의 C<sub>6</sub>위가 분기를 이루면서 측쇄를 형성하였다. 이 측쇄에는 2종의 분자가 결합하고 있는데,  $\beta$ -1,6-결합한 D-galactose 와,  $\beta$ -1,3- 결합한 L-arabinose 로서, 전자는 2-3개의 D-galactopyranose기가 결합을 하고 있으며, 후자는 furanose 형의 L-arabinose기가 1-2개 중간의 측쇄구조를 이루고, 말단은 pyranose형의 L-arabinose로 구성되어 있었다. L-arabinose와 D-galactose기의 비는 1 - 4.5였다. arabinose와 galatose의 함량비도 1 : 3.8로서 조 arbinogalactan의 함량비1 : 3.4 와 거의



유사한 값을 보여주고 있다.

PDA배지에 일본잎갈나무의 WSF(수용성추출물) 첨가효과와 관련하여, 표고버섯균의 균환생장량은 1 - 12%의 첨가량에서는 대조구에 비하여 균사 생장이 증진되었다. 특히 산림 6호의 경우에는 2%의 첨가량이, Mok-H의 경우에는 4% 첨가에서 균사 생장이 최대였고, 첨가량이 더 많으면 생장이 오히려 감소하였다. 톱밥배지에서의 WSF 첨가농도를 달리한 조건에서 배양한 결과, PDA 배지에서의 결과와 마찬가지로 1 - 15%의 첨가량에서 대조구에 비하여 균사 생장이 증진되었다. 특히 산림 6호의 경우에는 4%의 첨가량이, Mok-H의 경우도 4% 첨가에서 균사의 생장이 최대였고, 첨가량이 더 많으면 생장이 오히려 감소하였다. 일본잎갈나무의 WSF를 4% 첨가함으로써 ergosterol 함량의 변화를 측정된 결과, 균사가 콜로니를 형성하는 초기단계에서는 낮은 ergosterol 함량을 나타냈으나 fruiting이 시작되는 시기에 급격히 높아지는 결과를 나타냈다. 결국 추출물은 배지내에서의 균사의 활동을 도와 배지의 분해를 효과적으로 일으키면서 배지의 성숙도를 높여주는 것으로 나타났다. 그러나 자실체발생시기의 뚜렷한 단축은 없었다.

〈참고문헌〉

- Aspinall, G.O., R.M. Fairweather and T.M. Wood (1968) J. Chem. Soc. (C). pp.21-74
- Cote, W.A.Jr., A.C. Day, B.W. Simson, and T.E. Timell (1956) Horzforschung 20:178
- Dutton, G.G.S. (1974) Adv. Carb. Chem. Biochem. 30:100-109
- Dutton, G.G.S., B.I. Joseloeu and P.E. Reid (1973) Tappi 56:168-173
- Dutton, G.G.S., G.D. Jensen and P.E. Reid (1968) J. Chromatography 36:152-155
- Ekman, K.E. (1962) J. Chromatography 1:419
- Folin, O and W. Denis (1915) J. Biol. Chem. 28:350-355
- Freeman, B.H., A.M. Stephen and P. van Der Buji (1972) J. Chromatography  
73:29-36
- Reid, P.e., B. Donaldson, D.W. Secret and B. Bradford (1970) J. chromatography  
47:199-203
- Timell, T.E. (1965) Adv. Carb. Chem. 20:409-415
- Whistler, R.L. (1965) Methods in Carbohydrate Chemistry vol. 5, Academic Press  
pp.287-296
- 半澤道郎 (1968) 落葉松材 化學的成分. 北方林業 20(7):218-221
- 寺谷文之. 天野保行 (1982) Effect of heating on chemical structure of  
arabinogalactan in Japanese larch. Japan Mokuzai gakkaiishi 28(5):312-316

## 제 4 절 표고버섯 톱밥재배 잔사의 유효이용

### 1. 서 설

오랜 옛날부터 우리나라 농가는 자급비료로서 퇴비나 구비를 자가 제조하여 사용하여 왔으며, 또한 불량한 농경지를 개량하는 토양 개량제로서 혹은 화학비료 부족시 비료의 목적으로 사용하는 등 볏짚과 같은 신선유기물과 퇴.구비가 지력의 유지 및 향상을 위해 중요시 되어왔음은 재론의 여지가 없다. 그러나 근년에 와서 경제의 고도성장으로 농촌으로부터 도시로 젊은 노동인구가 유출되어 노동력이 감소되고 노임이 상승됨에 따라 신선한 유기물의 채취가 어려워져 유기질 비료의 시용이 감소되고, 화학비료의 편중사용이 장기화함에 따라 지력의 감퇴가 심각한 우리농촌의 문제로 대두되고 있다. 나아가서 지금까지 퇴.구비의 원료로 사용되던 볏짚, 풀, 낙엽등이 가축사료와 경합하여 그 구입조차 점점 어려워 가는 실정에 있다.

1987년도 우리나라의 목재사용량은 약 1000만 $m^3$  으로서 이들로 부터 발생하는 폐재는 약 30% 인 300만 $m^3$  에 달하고<sup>1)</sup> 있으며, 이 가운데 폐재는 그 일부가 보일러 연료로 사용되는데 그치고 있으며, 폐기 내지는 공해원으로 까지 되어 각 기업은 그 처리대책에 고심하고 있다. 한편 농업, 임업, 원예 분야에서의 목질계 퇴비는 퇴구비에 대체되는 우수한 유기질 공급원으로서 선진 각국에서는 대단한 주목을 받고 있다.

톱밥을 비롯한 목질계 폐재퇴비라 하더라도 폐재의 종류에 따라 각기 원소의 조성이나 그 성질이 전혀 다르며, 일반적으로 짚류, 풀, 낙엽등 보다는 분해가 어렵고<sup>2)</sup>, 수중에 따라서는 식물의 생육을 저해하는 물질을 포함<sup>3 - 6)</sup> 하는 경우도 많다. 그리고 탄소율(C/N율)이 매우 높기 때문에<sup>4)</sup> 그대로 사용하면 질소 결핍이나<sup>7)</sup> 병해가 발생되기 쉽고, 다량 사용하면 건조의 해를 입게되는 경우도 있다. 그러나 원료의 특성과 퇴비화의 과정을 면밀히 파악하여 제조하고, 그 성질을 살려 사용하면 매우 효과적인 유기질 비료 내지는 토양개량제로서 지력의 유지 증진에 크게 도움을 줄수 있는바, 이미 일본, 미국등지에서는 널리 시판되고 있으며, 공급이 수요를 따르지 못하고 있는 실정에 있다.

본 연구에서는 이러한 맥락에서 폐기되고 그 처리가 어려운 표고버섯 폐골목을 이용한 유기질비료를 개발코저 하며, 제조과정에서 소요되는 각종 첨가제, pH, C/N 율 등 부후와 관련된 여러가지 부속조건을 검토함으로서 유기질비료 생산을 위한 적정 제조조건을 구명함을 제1의 목적으로 하고, 나아가서 식물에 미치는 생육저해 여부까지도 검토코저 하였다. 농작물의 유체, 낙엽 혹은 풀 등을 이용한 퇴비의 제조는 농업분야에서 옛날부터 행해져 왔으나, 목재공업 분야에서 대량으로 배출되는 목질계 폐재 (수피, 톱밥등)도 동일한 식물유체이나 미생물에 의해 분해가 곤란하여 퇴비의 원료로서 이용되지 못하였다. 따라서 목질계 퇴비화의 역사는 그리 오래된 것이 아니며, 미국의 경우 1950년대 초부터, 그리고 가까이 일본의 경우 1960년대 초부터 이루어졌다.

우리나라의 경우 1974년 산림청 임업시험장에서 최초로 목질계 폐재를 이용한 퇴비화 및 사료화에 관한 교재<sup>17)</sup>가 발간되었고, 1985년 산림청 임업연구원 에서 목질계 폐재의 퇴비화 및 에너지화의 가능성에 관한 진단을 실시한 바 있다. 톱밥퇴비의 실용화에 관하여 1977년부터 반도목재(주) 에서 톱밥을 이용한 특수퇴비의 개발에 착수하여 1983년 봄부터 풍성이란 상품명으로 시판되기에 이르렀다. 이외에도 대삼기업(주)으로부터 수피그린, 미원유기질비료, 연암축산으로부터 하이 바아크, 계분발효 비료등 몇종류의 유기질비료가 생산되고 있다. 그러나 목질계 폐재의 퇴비화 및 부속톱밥 퇴비의 성능에 관한 연구는 조<sup>18)</sup>가 실시한 연구를 제외하고는 전무한 실정이다.

미국의 경우 퇴비의 원료로서 목재톱밥을 이용한것은 1950년대초 Dunn 등<sup>8 11)</sup>이 행한 계분 첨가및 기타처리에 의한 톱밥 퇴비화와 토양에 대한 시용효과를 검토한것이 최초의 것이며, Wisconsin 대학의 Davey 등<sup>12, 13)</sup>에 의해 Sugar maple 톱밥을 이용, 분해균을 접종하여 퇴비화하는 방법을 연구, 실용화에 까지 이르렀다. 그 후 1970년대 초 이미 18개의 주립대학, 농림업 관계연구소 및 민간기업에서 목질계 폐재톱밥 이용개발에 관한 연구가 강력히 추진되어 그 성과가 급속히 실용화<sup>14)</sup>되어, 오늘날 Bark dust, Fertile mulch Forest gold, Forest humus, Ivory orchid bark, Oregon black gold, Silvacon 등의 상품명으로 농업, 원예, 임업분야에서 널리 이용되고 있다. 일본에 있어서는 1956년 Shimamoto<sup>15)</sup>가 발효 첨가제를

사용한 톱밥 퇴비화에 관한 연구가 처음으로 실시되었으며, 오사카 영림국 Ootaki<sup>16)</sup>가 퇴비화를 실용화하는데 성공하였다. 그후 농림성 임업시험장, 북해도 임업시험장, 시미즈항 목재산업 협동조합등이 중심이 되어 1968년부터 본격적인 목질계 퇴비의 기업화를 추진하였으며, 근년에 와서 약 80개 공장에서 년생산량이 약 40만톤에 달하고 있다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 가. 공시재료

표고폐골목은 청원버섯영농조합으로부터 발생되는 골목을 공시하였으며, 비교를 위하여 초두목.지조목.임지폐재(이하 신선 지조목으로 함)을 월악산 충북대학교 농과대학 연습림으로부터 별채하여 톱밥제조기를 사용하여 톱밥을 제조하여 공시재료로 사용 하였다.

### 나. 실험방법

#### 1) 폐골목의 비료화

##### 가) 발효상 설계 및 축조

유기질비료를 제조하기 위한 발효상은 축조하였는바, 한개 발효상의 크기는 가로 1.5m, 세로 1.5m, 높이 2m 로서, 시멘트블록을 이용하였다. 이러한 발효상을 연속하여 4개 축조하므로써 발효과정이 진행됨에 따라 뒤집기를 하면서 비어있는 다음 발효상으로 이적할 수 있도록 하였다.

##### 나) 원재료의 배합 및 퇴적

톱밥을 부숙시킴에 있어서 가장중요한 사항은 목질계 폐재가 일반적으로 C/N 율이 매우 높을뿐 만 아니라 미생물에 의해 분해되기 어려운 리그닌 성분을 많이 함유하고 있으므로, 자연 분해시키기가 다른 유기재료에 비하여 매우 어렵다. Table 2-22는 본 실험에서 사용한 원료의 배합비율을 나타낸 것이다.

Table 2-22. Mixing of raw materials for composting

Raw materials	Japan		This Exp.
	A	B	
Shiitake bedlog	1,000 Kg	1,000 Kg	1,000 Kg
Urea	10 Kg		12 Kg
Chicken shit	50 Kg		50 Kg
Man excretion	-	650 l	-
Fermentation aids	little	little	4 kg
Lime	-	10 Kg	20 Kg
Rice bran	-	-	5 kg
M. C.(%)	50-60	50-60	60

본 실험에서 사용된 배합비 및 부숙 발효 조건은 많은 예비실험 결과를 거쳐 이루어진 것이며 발효 촉진을 위하여 발효균 및 발효 첨가제를 다량 첨가하였다. 이와같이 배합된 원재료를 1.5m 내지 2.0m 의 높이로 공기가 잘 통하도록 쌓았으며, 함수율 또한 발열을 좌우하는 가장 중요한 인자중에 하나이므로 약 60% 가 되도록 조절하였다.

#### 다) 비료성분 분석 및 유식물 파종 실험

##### (1) 비료 성분 분석

산도, 질소, 인산, 칼리 및 유기물함량을 분석하였다.

##### (2) 유식물파종실험

유기질비료와 모래에 유기질비료를 0%, 50% 혼합한 것과 유기질비료 100% 혼합한

꽃트에 무우종자를 파종하고 2일마다 1회 관수하면서 그 생육상황을 관찰하였다.

### (3) 활엽수 및 침엽수 식재시험

일반 포장에서 토양과 유기질비료를 여러가지의 혼합비 (30, 50, 70%) 로 섞고, 이들 혼합비의 공시상토를 직경 30cm, 높이 30cm 의 구덩이에 넣은 다음, 침엽수 2 수종 (측백나무, 개잎갈나무) 및 활엽수 2 수종 (회양목, 철쭉) 을 각각 5 본을 식재하고, 활착율을 조사하였다.

### (4) 비료화 효과실험

본 실험에서 제조한 표고버섯 폐골목으로부터 제조한 유기질비료, 신선지조목 으로부터 제조한 유기질비료의 시용효과를 조사하였다. 참고로 음식물쓰레기의 처리문제가 심각한 문제로 대두되고 있는바, 음식물쓰레기를 이용한 퇴비와의 시용효과를 함께 분석하였다.

#### (가) 음식물쓰레기 비료의 조제

음식물쓰레기 유기질비료는 음식물쓰레기 (밥찌꺼기, 육류, 생선, 조개껍질, 상한 음식, 야채찌꺼기, 호박, 무, 과일껍질 등) 100kg, 건조한 톱밥 30kg, 발효조제 (흙살림연구소 제품) 1kg을 배합하여 수분을 적절히 조절한 다음 3개월이상 발효시켜 공시한다. 제조한 비료 및 공시토양의 성분을 충청북도 농촌진흥원에 의뢰하여 분석하였다.

#### (나) 비료 시용실험

① 공시수종 : 수목류 9종을 사용하였는데, 여기에는 함박꽃나무(*Magnolia sieboldii*), 황벽나무(*Phellodendron amurense*), 귀룽나무(*Prunus padus*), 중국단풍

(*Acer buergerianum*), 가래나무(*Juglans mandshurica*), 고로쇠나무(*Acer mono*), 단풍나무(*Acer palmatum*), 굴피나무(*Platycarya strobilacea*), 쥐똥나무 (*Ligustrum obtusifolium*) 9종을 사용, 발아율실험에는 각각 90립, 활착률 및 성장량 실험에 각각 27본을 공시하였다.

② 파종실험은 1m<sup>2</sup> x 1종 x 3처리로 m<sup>2</sup> 당 90립을 파종하였으며, 활착율은 90m<sup>2</sup>에 10수종 x 9본 x 3처리 x 3반복으로 이식하여 조사하였으며, 성장량조사의 경우는 활착율조사구에 대하여 근원경 및 수고를 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 재배잔사내 생육활성 물질구명

버섯재배잔사내에 존재하는 활성물질을 정량하기 위하여 시료를 50mM 의 phosphate buffer (pH 7)를 가하고 30분간 진탕 추출을 행한 다음, 24,000g로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 이를 Sephadex G-25로 탈염후, 0 - 5℃에서 보관하여 공시하였다. 재배중 버섯이 크게 성장하였을 때 배지의 성분과 버섯수확 후 잔사내의 성분을 측정한 결과는 Table 2-23와 같다.

Table 2-23. Changes in various substances in sawdust culture media

Substances	Fruiting	After fruiting
Peroxidase, U/mg protein x 10 <sup>-3</sup>	0.25	0.93
Laccase, nkat/μg protein	0.2	15.3
MnP activity, U/mg protein x 10 <sup>-3</sup>	0.04	0.13
Superoxide dismutase, U/mg protein x 10 <sup>-3</sup>	68.8	1.06
SOD free radicals, A560	0.38	0.12
Methoxy phenols, A450	4.0	5.1
Sugars, μg/ml	11.8	5.33
Protein, μg/ml	58	17.2



표에서 보는 바와 같이 배지내의 성분조성은 자실체의 발생전후 매우 상이한 것으로 나타났다. 자실체가 발생하여 성숙기에 달한 시기에는 superoxidase dismutase 효소의 활성이 매우 높게 나타났으며, 당의 함량이 자실체발생 후에 비하여 배이상, 단백질함량도 3배이상 높은 것으로 나타났다. 자실체를 수확한 후의 배지 내에는 peroxidase 및 laccase의 효소활성이 증가하였으며, superoxide dismutase 효소활성이 극도로 낮아지는 현상을 나타냈다. 기타성분에 있어서도, 이러한 결과로부터 버섯을 생산하고 난 배지에서 활성물질의 이용은 기대하기가 어려운 것으로 판단되었다.

#### 나. 유기질 토양개량제 제조 및 개량효과 시험

##### 1) 폐골목의 비료화

###### 가) 부숙 과정에서 발열 경과(온도 변화)

소정의 배합비로 혼합된 표고버섯 폐골목 부숙재료를 발효상에 퇴적하고 1개월마다 환적하였으며, 그간의 발효상 온도변화를 측정한 결과, Fig. 2-10에서 보는 바와 같이 퇴적 1주일에서 10일 이내에 최고온도 (본 실험에서는 약 60℃)까지 상승하였으며, 이러한 온도수준이 10일정도 경과되다가 다시 감소하기 시작하였다. 이러한 온도의 감소는 부숙중 유기물의 소멸 및 수분함량과도 관계가 깊은 것으로 생각된다.

뒤집기의 목적은 퇴비를 제조하는 과정에서 호기성균의 생육을 도와주기 위한 공기유통의 조절과 외부의 기상조건 및 퇴비의 발열에 따른 건조등으로 부터 올 수 있는 수분의 부족을 보충하므로서 미생물의 활동을 재차 촉진시키는 데 있다.

환적시 다시 수분함량이 55% 전후가 되도록 조절 후 인접 발효상으로 이적하였으며, 이적후 발효상의 온도역시 4-5일 27-30℃의 저온을 유지하다가 증가하기 시작하였으며, 최고 발열온도는 초기의 온도에 이르지 못하고 55-57℃ 부근이었다. 퇴적 60일 만에 2차 환적하였으며, 온도는 50℃를 넘지 못하였으며, 90일이 지나면서 45℃의 온도로 레벨오프되는 결과를 나타냈다.

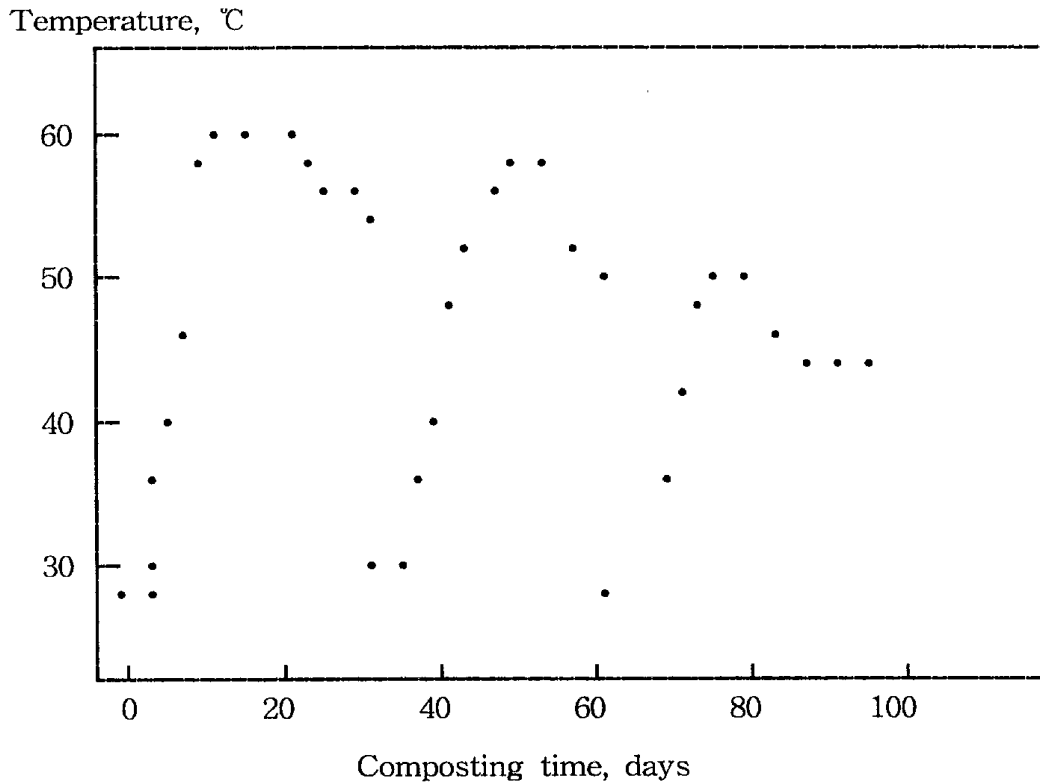


Fig. 2-10. Changes in temperature during composting process.  
(Shiitake bedlog)

이와같은 톱밥의 발효과정에서 60°C 이상의 고온이 3주 이상 계속되면 목재속에 존재하는 phenolic acids, tannic acids 등의 독성분이 분해되며, C/N 율도 30 전후로 개선되어 토양 개량제로서 사용할수 있는 것으로 생각되고 있다.

Fig. 2-11 는 소정의 배합비로 혼합된 지조목 부숙재료를 발효상에 퇴적하고 1개월마다 환적하였으며, 그간의 발효상 온도변화를 측정한 결과, 퇴적 2주일에서 20일 이내에 최고온도 (본 실험에서는 약 66°C)까지 상승하였으며, 이러한 온도수준이 10일정도 경과되다가 다시 감소하기 시작하였다. 이러한 온도의 감소는 부숙중 유기물의 소멸 및 수분함량과도 관계가 깊은 것으로 생각된다. 초두목 부후시 발효상온도 변화를 폐골목의 부후시와 비교하였을때, 초기 발효상온도가 66°C 로서 발효 15일만에 상승하였으며, 더이상 온도가 올라가지 않았다. 매 뒤집기 이후에도 온도는 다소 높게 올라갔지만 초기만큼은 올라가지 못하고 64°C를 기록하였는데,

이는 분해되기 용이한 성분이 잔존하기 때문에 사료된다.

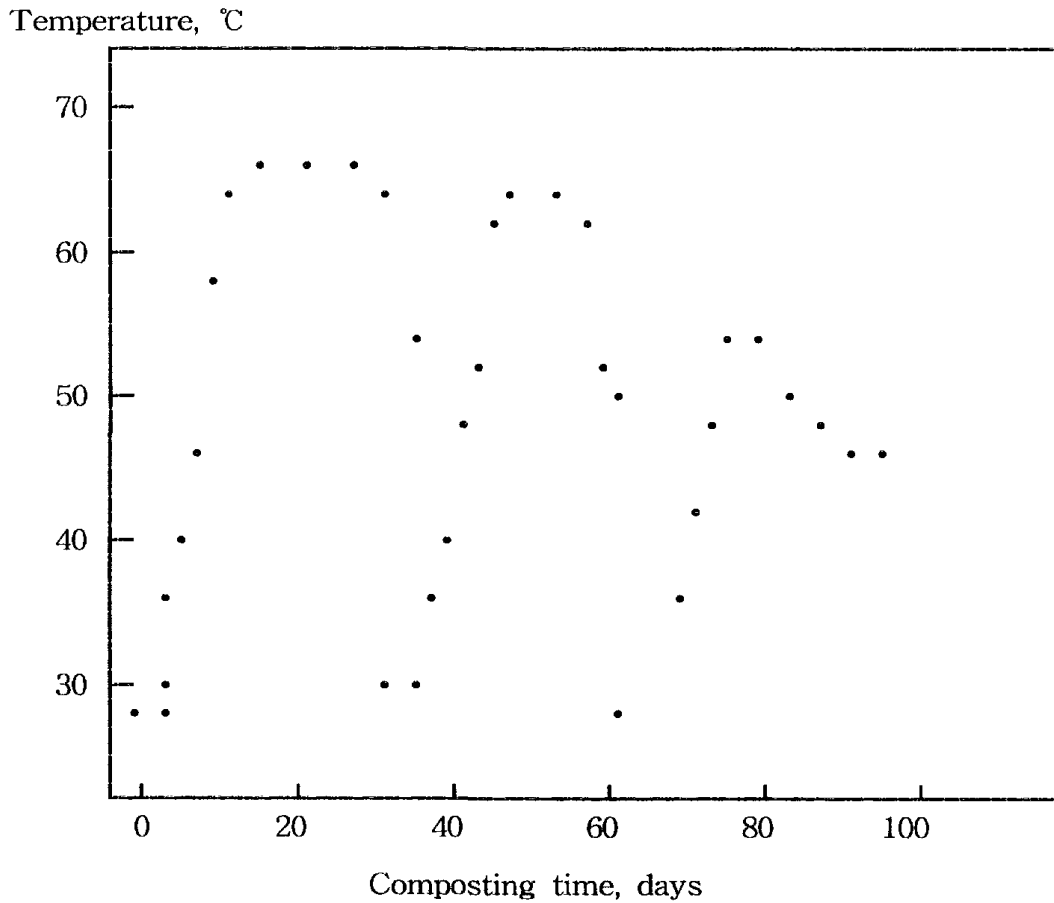


Fig. 2-11. Changes in temperature during composting process.  
(Fresh twig)

나) 비료성분 분석 및 유식물 파종 실험

(1) 비료 성분 분석

Table 2-24 는 표고버섯 폐골목으로부터 제조한 유기질비료의 성분을 초두목, 지조제로부터 제조한 유기질비료, 그리고 음식물쓰레기 비료와 비교한 결과를 나타낸 것이다. 신선재에 비해 폐골목 유기질비료 및 음식쓰레기 비료의 질소함량이 다소 증

가하였고, 특히 초두목 및 표고버섯 폐골목으로 유기질비료를 만들게 되면, 발효과정에서 유기물함량이 점차 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 표고버섯 폐골목의 경우는 칼슘함량이 높은 것이 특징이었다.

Table 2-24. Chemical components of composts

L/I	Bedlog compost	Fresh twig compost	Garbage compost
P <sub>2</sub> O, %	0.57	1.02	0.85
Total N, %	0.48	0.31	0.58
K <sub>2</sub> O, %	0.38	0.33	1.46
CaO, %	3.01	2.82	0.16
MgO, %	0.22	0.19	0.13
Organic matter, %	7.77	10.68	58.63

(2) 유식물 파종실험

유기질비료와 모래에 유기질비료를 0%, 50% 혼합한 것과 유기질비료 100% 혼합한 포트에 생육저해 물질에 가장 민감한 것으로 알려진 무우종자를 파종하고 2일마다 1회 관수하면서 그 생육상황을 관찰하였다. 모든 처리에서 무우종자가 발아되었으며, 모래만의 대조구에 비해 유기질비료의 혼합량이 많아질수록 무우의 생장이 우수한 것으로 나타났다(Table 2-25 참조). 모래와 유기질비료를 여러가지의 혼합비 (0, 30, 50, 80, 100%) 로 섞고, 이를 직경 20cm, 높이 30cm 의 화분에 넣은 다음, 식물생육검정 재료로서 많이 사용되는 무우종자를 파종하고, 2일 1회 관수하면서 그 생육상황을 관찰하였다.

Table 2-25. The effect of organic wood composts on growth of radish

Organic composts	Days after seeding	Mixing ratio with sand, %		
		0	50	100
Shiitake bedlog(B-1)	5	9.5/2.5	11.5/3.5	14.5/5.0
	10	11.0/3.5	14.5/3.8	15.8/7.5
Fresh twig(B-2)	5	8.0/2.1	11.0/3.5	13.5/4.2
	10	11.5/3.0	12.5/3.0	14.5/8.0

All values are top/root length(unit : cm) of radish.

무우종자를 파종하여 4 - 5일이 지나면서 모두 발아하였으며 모래로만 이루어진 100:0 구가 1일 늦게 발아하였다. 그리고 파종하여 10 일이 경과한 무우의 지상부 및 지하부 생육상황을 관찰한 결과, 유기질비료를 전혀 첨가하지 아니한 100:0 구를 제외하고는 거의 동일한 생장을 보여주었으며, 유기질비료 첨가에 따른 무우의 생장은 유기질비료의 첨가가 높아짐에 따라 생장이 좋아졌으나, 50% 이상 첨가에서는 그 차이가 거의 없었다. 지하부의 경우는 80% 첨가구까지도 생장이 왕성함을 보였다.

파종후 15일이 경과한 무우의 생장은 100:0 구를 제외하고는 거의 균일한 생장을 보여주었으며, 유기질비료의 첨가 효과는 파종후 10일의 결과와 동일 하였다. 특히 하부의 생장은 거의 안정화되는 양상으로 나타났다. 파종후 25일이 경과하면 처리간에 현저한 차이를 인정할 수 있었는데, 유기질비료 혼합율이 증가됨에 따라 지상부 및 지하부의 생육이 크게 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 지상부는 지하부 생장의 약 2배에 이를 정도로 왕성한 생장을 보였다. 그리고 유기질비료 혼합율이 적을수록 떡잎의 황화 현상이 일어나기 시작하였다.

#### 다) 활엽수 및 침엽수 식재시험

일반 포장에서 토양과 유기질비료를 여러가지의 혼합비 (30, 50, 70%) 로 섞고, 이들 혼합비의 공시상토를 직경 30cm, 높이 30cm 의 구덩이에 넣은 다음, 침엽수 2 수종 (측백나무, 개잎갈나무) 및 활엽수 2 수종 (회양목, 칠쭉) 을 각각 5 본을 식재하였으며, 100% 성공적인 활착율을 보였고, 120일이 경과한 현재까지 생육 장애가 없이 잘 자라고 있었다.

Fig. 2-12 는 야외의 침엽수 및 활엽수 식재포장의 온도변화를 5월 20일 부터 1개월간 측정한 결과로서, 아침 08:00 에는 지온이 8.5℃ 전후로서 매우 낮았으며, 오후 및 저녁의 온도는 15℃로 유기질비료의 혼합량에 따라 큰 지온의 변화를 관찰할 수 없었다.

발효열이 뿌리에 미치는 영향을 알기위하여 토양의 온도를 측정한 결과, 유기질비료로 인한 온도의 변화(온도의 급격한 증가 혹은 고온발생)가 없었다. 그리고

하루중의 온도변화는 아침에는 지온이 기온보다 낮은 것이 일반적인 바, 유기질비료의 혼합율이 증가함에 따라 지온이 약간 증가 하였다. 오후(14:00)의 경우 유기질비료의 함량이 증가함에 따라 토양의 온도가 오히려 낮아지는 결과를 얻었다. 저녁(18:00)이 되면 기온보다 토양온도가 높았으며 유기질비료 함량의 증가와 함께 지온이 높아지는 경향을 보여주었다.

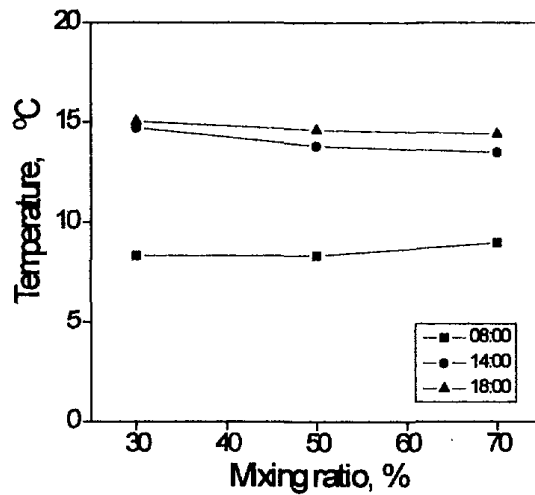


Fig. 2-12. The effect of bedlog compost on soil temperature of tree planting field.

결론적으로 본 연구에서 제조, 공시된 유기질비료는 어린식물의 발아 및 생장에 영향을 주지 아니한다는 긍정적인 결과를 얻었으며, 이러한 사실로부터 이들 유기질비료에는 어린식물의 생육을 저해하는 유해물질을 포함하지 아니한 것으로 생각되며, 80% 이상의 높은 유기물을 함유함에도 불구하고 잔존 유기물의 분해로부터 야기될지도 모르는 고온발생으로 인한 토양온도의 증가현상이 전무하였던 결과로부터 본 유기질비료는 우수한 유기질 비료로서 사용가능한 것으로 사료된다.

#### 라) 비료 사용효과

유기질비료의 사용이 수목종자의 발아, 이식묘의 활착 및 수목의 생장에 미치는 효과를 3종의 비료에 대하여 조사하였다.

Fig. 2-13 은 붉은 아카시아를 파종하여 발아율을 조사한 결과로서 유기질비료의 종류에 관계없이 약 80% 가까운 발아율을 보여주고 있다. 이와같이 종자의 발아율이 양호한 것은 제조된 유기질비료에 생육을 저해하는 물질들이 포함되지 않았음을 증명하는 것이 된다. Fig. 2-14 은 9수종을 이식하여 활착율을 평균하여 유기질비료별로 나타낸 것으로서 유기질비료 간에 큰 차이가 없이 약 94% 전후의 활착율을 나타냈다. 수종별로는 단풍나무가 81% 로서 가장 낮았으며, 그 외의 수종들은 우수한 활착율을 보여 주었다.

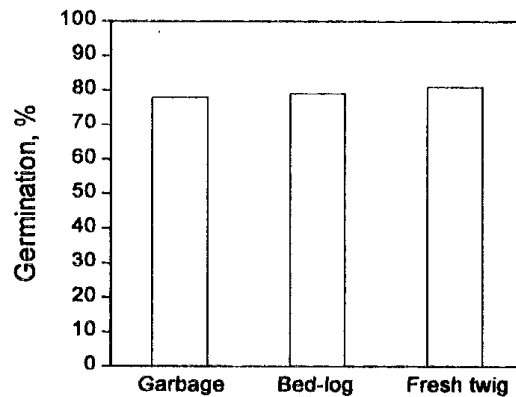


Fig. 2-13. The effect of organic composts on germination of tree seed(red acacia).

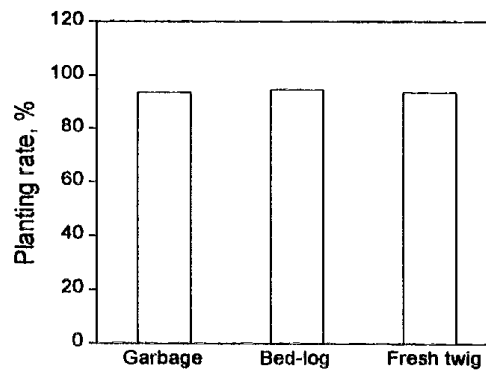


Fig. 2-14. The effect of organic composts on planting of trees(9수종평균).

Table 2-26은 수종별로 측정된 유기질비료별 성장상황을 나타낸 것으로서 수종에 따라 성장에 상당한 차이가 나타났다. 근원경의 성장에 있어서는 중국단풍 및 쥐똥나무가 220 - 250% 정도의 높은 성장을 나타냈는데 대하여 함박꽃나무, 가래나무, 단풍나무 등의 생장은 매우 저조해서 11 - 22%정도의 근원경생장을 나타냈다. 수고생장에 있어서는 중국단풍이 730%의 가장 높은 성장을 기록하였으며, 적단풍이 602%의 성장율을, 그리고 가래나무, 굴피나무, 쥐똥나무 등이 117 - 120%의 성장을 보였고, 황벽나무, 귀룽나무, 고로쇠나무 등이 52 - 78%의 낮은 성장율을 나타냈다.

Table 2-26. The effect of organic composts on growth of trees

Organic composts Species	Garbage		Bed-log		Fresh twig	
	Stump cm	Height cm	Stump cm	Height cm	Stump cm	Height cm
<i>Magnolia sieboldii</i>	1.08	62.0	1.15	69.8	1.18	71.7
<i>Phellodendron amurense</i>	1.36	111.6	1.43	116.1	1.12	85.4
<i>Prunus padus</i>	0.60	46.8	0.71	56.6	0.65	52.6
<i>Acer buergerianum</i>	1.53	182.8	1.72	190.7	1.38	162.6
<i>Juglans mandshurica</i>	1.85	99.2	2.02	72.0	2.02	76.3
<i>Acer mono</i>	0.94	96.2	0.90	77.3	1.06	122.8
<i>Acer palmatum</i>	0.54	50.3	0.60	60.5	0.50	48.9
<i>Platycarya strobilacea</i>	1.04	49.2	1.22	45.4	1.14	52.6
<i>Ligustrum obtusifolium</i>	0.94	90.8	1.08	81.6	0.98	102.1
Average	1.04	84.1	1.14	82.3	1.06	82.5

근원경생장에 있어서 음식물쓰레기는 중국단풍, 쥐똥나무가 우수하였고, 함박꽃나무, 단풍나무등이 불량하였다. 표고재배 폐재비료는 황벽나무, 쥐똥나무가 우수하였고, 가래나무, 적단풍, 함박꽃나무 등이 불량하였다. 신선 지조목의 경우도 중국단풍과 쥐똥나무가 우수한 성장을 보였고, 가래나무, 함박꽃나무, 단풍나무 등이 불량한 근원경 성장을 나타냈다.

Fig. 2-15 는 3종의 유기질비료의 근원경생장에 미치는 효과를 종합한 것으로서 음식물쓰레기의 성장율에 미치는 효과가 가장 컸으며, 표고버섯 폐골목 및 신선지조목 비료의 효과는 유사하게 나타났다.



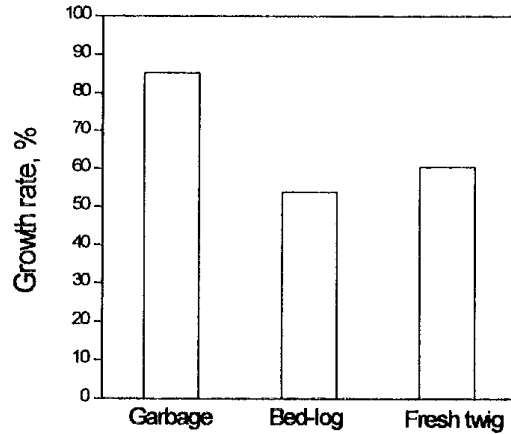


Fig. 2-15. The effect of organic composts on growth rate of stump diameters.

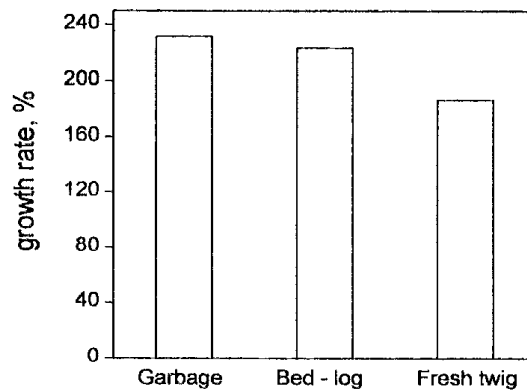


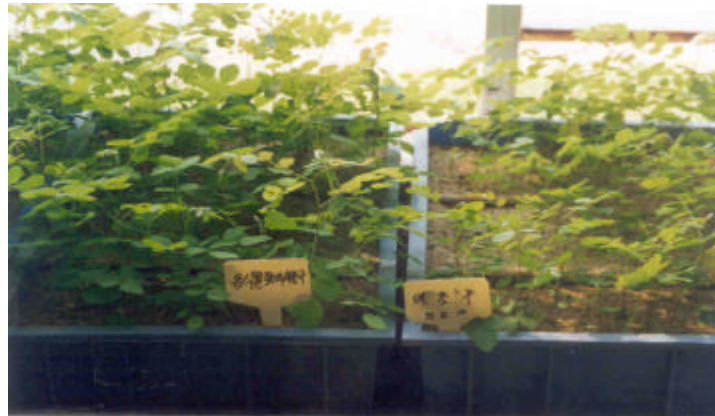
Fig. 2-16. The effect of organic composts on growth rate of heights.

Fig. 2-16은 유기질비료가 높이생장에 미치는 효과를 종합적으로 나타낸 것으로서 근원경에서와 마찬가지로 음식물쓰레기가 232%의 가장 높은 성장률을 나타냈으며, 그 다음이 224%의 표고폐골목 비료로서 음식물쓰레기 비료와 거의 유사한 결과를 보였다. 이에 대하여 신선 지조목비료는 187%의 가장 낮은 성장율을 기록하였다.

수종별로 살펴보면 음식물쓰레기의 경우 중국단풍이 730.9%, 적단풍 602.5% 로서 높은 성장율을 기록하였고, 산복련이 200% 를 초과하는 성장량을, 황벽나무는 52.5%, 귀룽나무 78%, 고로쇠나무가 72.8%로서 매우 낮은 수고성장율을 나타냈다. 표고재배

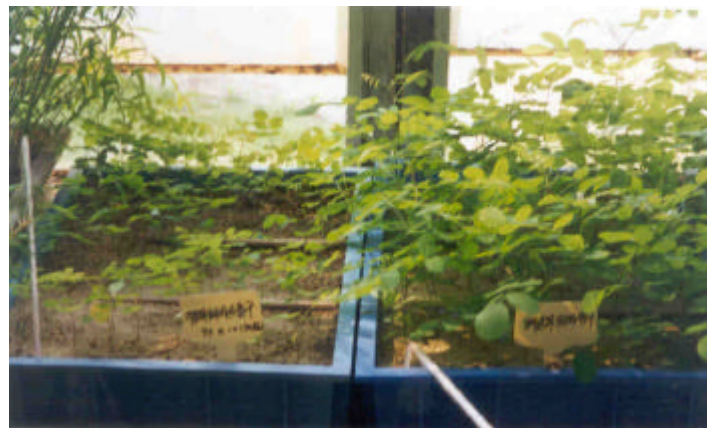
폐골목비료는 중국단풍, 단풍나무, 귀룽나무 등이 우수하였고, 황벽나무, 가래나무, 쥐똥나무가 불량하였다. 신선 지조목비료의 경우는 중국단풍, 단풍나무, 함박꽃나무 등이 우수하였고, 황벽나무, 귀룽나무 및 가래나무가 불량한 것으로 나타났다.

마. 파종묘의 생장



Garbage

Control



Fresh twig

Shiitake bedlog

Fig. 2-17. Growth of red acacia on organic composts.

폐골목비료는 중국단풍, 단풍나무, 귀룽나무 등이 우수하였고, 황벽나무, 가래나무 쥐똥나무가 불량하였다. 신선 지조목비료의 경우는 중국단풍, 단풍나무, 함박꽃나무 등이 우수하였고, 황벽나무, 귀룽나무 및 가래나무가 불량한 것으로 나타났다.

마. 파종묘의 생장



Garbage

Control



Fresh twig

Shiitake bedlog

Fig. 2-17. Growth of red acacia on organic composts.

2000. 4. 10일 3종의 유기질비료를  $m^2$  당 3kg 시비후 붉은 아카시아 종자를 파종하고 10월 하순 성장량을 조사하였으며, 음식물쓰레기 비료구가 근원경 및 수고생장에서 가장 우수하였고, 그 다음이 폐골목비료구였고, 지조목비료구가 가장 성장량이 낮게 나타났다. 근원경에는 처리간 큰 차이가 없었으나, 수고에서는 Fig. 2-17 에서 보는 바와 같이 음식물쓰레기구가 우수하였다.

#### 4. 결론

시멘트블록조 발효상을 축조, 발효 촉진을 위하여 발효균 및 발효 첨가제를 적량 첨가하여, 공기가 잘 통하도록 쌓았으며, 함수율을 약 60% 가 되도록 조절하였다. 퇴적후 1개월마다 환적하였으며, 그간의 발효상 온도변화를 측정 한 결과, 퇴적 1주일에서 10일 이내에 최고온도 (본 실험에서는 약 60℃)까지 상승하였으며, 이러한 온도수준이 10일정도 경과되다가 다시 감소하기 시작하였다. 초누목 부후시 발효상온도 변화를 폐골목의 부후시와 비교하였을 때, 초기 발효상온도가 66℃로서 발효 15일만에 상승하였으며, 더 이상 온도가 올라가지 않았다. 배 뒤집기 이후에도 온도는 다소 높게 올라갔지만 초기만큼은 올라가지 못하고 64℃를 기록하였는데, 이는 분해되기 용이한 성분이 잔존하기 때문으로 사료된다.

유식물 파종실험에서 유기질비료의 혼합량이 많아질수록 부후의 생장이 우수한 것으로 나타났으며, 유기질비료 시용이 토양온도 변화에 미치는 영향에 관해서는 유기질비료 혼합율이 토양온도의 변화는 유기질비료의 혼합율이 증가함에 따라 토양의 온도가 다소 높아지는 경향을 보여주었다.

근원경생장에 있어서 음식물쓰레기는 중국단풍, 쥐똥나무가 우수하였고, 함박꽃나무, 가래나무, 적단풍이 불량하였다. 표고제배 폐골목 비료는 황벽나무, 쥐똥나무가 우수하였고, 가래나무, 적단풍, 함박꽃나무 등이 불량하였다. 신선 지조목의 경우도 중국단풍과 쥐똥나무가 우수한 성장을 보였고, 가래나무, 함박꽃나무, 단풍나무 등이 불량한 근원경 성장을 나타냈다.

수종별로 살펴본 수고생장은 음식물쓰레기의 경우 중국단풍이 730.9%, 단풍나무 602.5% 로서 높은 성장율을 기록하였고, 함박꽃나무가 200% 를 초과하는 성장량을,

황벽나무는 52.5%, 귀룽나무 78%, 고로쇠나무 72.8%로서 매우 낮은 수고생장율을 나타냈다. 표고재배 폐골목비료는 중국단풍, 단풍나무, 귀룽나무등이 우수하였고, 황벽나무, 가래나무, 쥐똥나무가 불량하였다. 신선 지조목비료의 경우는 중국단풍, 단풍나무, 함박꽃나무가 우수하였고, 황벽나무, 귀룽나무 및 가래나무가 불량한 것으로 나타났다.

〈인용 문헌〉

- 1) J.M. Jo, Illustration of wood demand-supply and forest products industries in Korea. Mokjaebojon 5(1):22-38(1987)
- 2) Nam - Seok Cho, C. Y. Lee, B. H. Yoon, B. H. Whang, Wood Chemistry, Yeungnam Univ. Publ., (1987)
- 3) 河田 弘, Bark 堆肥, 博友社 p.41 (1981)
- 4) 河田 弘, Bark 堆肥, 博友社 p.15 (1981)
- 5) 日本科學技術廳 資源調查會編, 木材工業의 廢材의 그 利用 (1971)
- 6) Allison, F. E., W. H., Demar, & J. H. Smith, Toxicity to garden peas of certain finely ground wood and barks mixed with soil. Agron. J. 55 : 358-360(1963)
- 7) Allison, F.E., R.M. Murphy, & C.J. Klein, Nitrogen requirements for the decomposition of various kinds of finely ground wood in soil. Soil Sci. 96 : 187-190(1963)
- 8) Dunn, S., L.P. Jr. Wolfe, W.A. Macdonald, & J. R. Baker. Field plot studies with sawdust for soil improvement. Plant & Soil 2:164-170 (1952)
- 9) Macdonald, W.A.& S. Dunn, Sawdust composts in soil improvemet. Pot culture studies with compost mixtures of sawdust and manure, steam treated composts and miscellaneous mixtures. Plant & Soil 4:235-247(1953)
- 10) Wolf, S.P.Jr. & S. Dunn, Sawdust composts in soil improvement. - Studies on aeration, acid hydrolysis, manure, and waste materials as composting aid. Plant & Soil 4:223-234(1953)
- 11) Baker, J.R. & S. Dunn, sawdust composts in soil improvement.-Pot studies with composts from out-door pits, wooden bins with high moisture, and other mixtures. Plant & Soil 6:113-128(1955)
- 12) Davey, C., Sawdust composts: their preparation and effect on plant growth. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 17:59-60(1953)

- 13) -----, transformation of sawdust in the course of its decomposition under the influence *Coprinus ephemerus*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 19 : 376-377(1955)
- 14) Sales, R.L., Using and marketing bark residues. For. Proc. J. 23(8) : 10-14(1973)
- 15) 島本賞也, 最近 微生物農法, 酵素의 世界社 (1956)
- 16) 十河村男, 樹皮lignin 及び 樹皮 phenol に 關する 研究, 香川大學 農學部 紀要 25:1-76 (1971)
- 17) Nam - Seok Cho, On the manufacturing of soil conditioner and fodder from waste wooden materials. Forest Res. Inst. (1974)
- 18) 조 남석. 목질계 폐재를 이용한 토양개량제 제조에 관한 연구, 영남대 자원문제연구논문집 9(1):1-9(1990)

# 제 3 장 입엽유용버섯에 대한 균사의 근연관계 조사 및 Mating에 의한 육종방법 개발 (협동연구 과제)

## 제 1 절 표고 균주의 수집과 계통간의 생물학적인 관계

### 1 서설

표고[*Lentinus edodes* (Berk.) Singer]는 한국, 일본, 중국 등 동남 아시아 지방에서 주로 재배되고, 중요한 버섯으로 알려졌다. 표고는 양송이와 느타리와 함께 세계에서 많이 생산되는 버섯으로, 버섯 생산량 3,794 천톤 중에서 402 천톤이나 생산된다 (Chang *et al*, 1993). 표고는 주로 동북 아시아에서 많이 생성되고 소비되는 것으로 다른 버섯에 비하여 향이 좋은 버섯으로 알려져 있다. 이러한 표고는 현재 많은 면에서 품종(균주)의 개량이 필요한 상태이다. 표고는 입엽연구원과 산림조합중앙회에서 여러 가지 품종을 만들고 있으나, 일본에서 만들어진 품종과 비교되고 있다. 현재는 표고 생산에 필요한 원목 부족과 품종의 안정화에 관한 문제가 많아, 새로운 방법의 표고의 품종이 필요하다 (Chang & Miles, 1993). 또한, 최근에는 농산물에 관한 품종 등록으로 말미암아, 질적으로나 양적으로 보다 좋은 형질을 갖고 있는 표고 품종의 개발이 무엇보다 중요하다 (Yukitaka *et al*, 1994). 또한, 대부분의 표고 품종은 외국에서 개발되었기에 우리나라의 실정에 알맞은 균주의 개발이 시급하다. 이러한 면에서 단(담자낭) 포자분리를 이용한 새로운 균주의 육종은 필요하고, 앞으로 버섯 육종에 도움이 될 것으로 생각된다.

버섯 육종에서 단포자 균주 간의 교배를 통해 모 균주보다 우수한 균주를 선발 육종하는 방법으로 많은 시도가 진행되고 있다 (Lee *et al*, 1998). 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등 여러 나라에서는 새로운 품종 및 표고의 계통 균주의 선발되고 있으나, 표고에서만 육종과 과학적인 지식에 관한 많은 것들이 알려지지 않고, 공개되지 않은 기술과 내용이 많다 (Lee, 1997). 버섯균인 느타리의 계통 분류에 대한 연구는 여러



방법으로 많이 연구된 바 있다. 과거에는 형태적인 분류나 한천 배지 상에서 두 균주 간의 대치선 생성 여부로 계통을 구분하였으나, 근래에는 Esterase 동위효소 분석법에 의한 계통 분류(Lee *et al*, 1997), Isozyme Polymorphism과 RAPD에 의한 계통 분류(Park *et al*, 1997), rDNA에 의한 계통 분류(Hibbet *et al*, 1998)가 시도되었다. DNA에 기초한 분류체계는 환경적 요인을 배제할 수 있는 장점이 있어서 mitochondria DNA의 제한 효소처리에 의한 다형성 분석, RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), ribosomal DNA 분석 등 다양한 실험 기술을 사용하여 계통 관계 분석에 이용하고 있다 (Kim *et al*, 1995). RAPD방법은 Williams (1990)등이 arbitrary primer를 사용하여 PCR 증폭시킨 DNA 단편이 genetic marker로서 사용될 수 있다고 발표하면서 시작되었으며, 이를 이용하여 버섯의 균주 및 품종의 구분에 많이 사용되고 있다 (Lee *et al.*, 1997). 그러나, 우리나라에서 재배되는 표고의 품종에 관한 연구는 거의 알려진 바가 없고, 표고 육종에 필요한 기본적인 자료가 없는 형편이다.

계통 분류에서 PCR-RAPD는 증폭되는 부위의 염기서열을 알 필요가 없으며, Southern blotting이나 Restriction Endonuclease digestions이 필요 없기 때문에 RFLP보다 간편하다. 즉, 빠르고 경제적이기 때문에 많은 개체의 계통적인 분류 연구에 적합하다 (Yoon, 1992). 이러한 면에서 표고 균주의 개량에서 우선적으로 수행하여야 할 것은 현재 우리나라에서 나오는 표고 품종에 대한 가계와 일반적인 정보를 파악하는 것이 중요한 것으로 생각된다. 본 실험에서는 RAPD 방법을 통하여 우리나라에서 상업적으로 보급되고 있는 균주 간의 유연 관계를 알아 보고, 새로운 품종 개발의 기본 자료로 삼고자 하였으며, 이들의 표고 품종간의 가능한 수종 분해능은 앞으로의 표고 육종 연구에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 가. Fungal isolates:

임업 산림조합중앙회 미생물사업소에서 분양 받은 균주(L-series 및 K-series), 본 실험실에서 채집되어 분리된 균주(K-01), 농업과학기술원 응용 미생물과에서 분양받

은 균주 (3-series)는 Table 3-1과 같다. 각 균주는 PDA (Potato Dextrose Agar; Difco)배지에 3개월에 한번씩 계대 배양하여 25℃ 배양기에서 배양하였다. 보관용 균주는 균사의 변이를 막기 위하여, 증류수 용액에 PDA 배지에서 자란 균사 조각을 넣어 냉장상태로 유지 보관하였다

나. **Mycelia Growth test:** 균사의 성장력을 측정하기 위하여 지름 30mm, 길이 200mm인 시험관을 사용하였다. 참나무 톱밥과 미강을 80:20(V:V) 비율로 섞고, 수분을 70%가 되게 하여 충전하고 silistopper (Kyung-il Co)로 마개를 막았다. 시험관을 121℃에서 30분간 멸균하고 32개 균주를 각각의 시험관에 접종하여 25℃에서 21일동안 배양하며 균사의 길이를 측정하였다. 단포자 분리주의 균사 성장률을 조사하기 위하여 21개의 단포자 균주를 위와 같은 방법으로 접종 배양하면서 균사의 길이를 측정하였다. 또한, 표고 품종에 따른 수종의 분해률을 파악하기 위하여, 충북 월악산에 자생하는 다섯 가지의 수종인 갈참나무, 오리나무, 소나무, 굴참나무를 채집하였고, 아카시 나무는 한국교원대학교 주변의 것을 잘라서 wood-chip을 만들었다. 만들어진 wood-chip은 PDA배지에 넣어서 각 품종을 60일간 배양하여, 건중량으로 분해률을 측정하였다.

#### 다. Nucleic acid extraction:

DNA는 Weising *et al.* (1995)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 멸균된 막자 사발에 약 1g의 균사를 넣고, 액체질소를 부은 후 갈아 분말로 만들고 polypropylene tube에서 7ml의 CTAB extraction buffer (2% w/v CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol)를 넣고 잘 혼합하였다. 60℃ water bath에서 한 시간 동안 반응시키고 원심 분리하여 상등액을 새로운 tube에 옮겨 담고, 동 부피의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)를 넣고, 잘 섞어주고, 11,000×g에서 15분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 tube에 옮기고, 다시 한번 chloroform-isoamyl alcohol을 처리하여 원심분리 하였다. 상등액을 다시 새로운 tube에 옮기고 RNase A를 최종농도가 100 $\mu$ g/ml가 되도록 넣어주고, 30min 동안 상온에서 반응을 시킨 후, 다시 한번 chloroform-isoamyl alcohol를 처리하여 원심분리 하였다.

상등액에 0.6vol 의 isopropanol을 넣고 -20℃에서 overnight하였다. 4,000×g에서 10분 간 원심 분리하고 pellet을 70% ethanol로 세척하여, 1시간 동안 말린 후, 최종적으로 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 를 넣고 4℃에서 1시간 동안 녹여서 1.0% agarose gel에 전기영동을 한 후, OD<sub>260</sub>에서 농도를 측정 하였으며, 농도를 5ng/ul로 동일하게 맞추어 -20℃에서 냉동 보관하였다.

#### 라. PCR-RAPD:

추출된 DNA에서 4개의 random primer를 사용하였으며, 여기서 나온 밴드를 이용하여 계통적인 분류를 시도하였다; OPD-18 (5'-GAGAGCCAAC-3'), OPO-02 (5'-ACGTAGCGTC-3')는 Operon Technologies, Inc (Alameda, CA94501, USA) 에서 구입하였고, Primer # 28(5'-CCCGCCGTTG-3')과 primer # 36 (5'-GGGCCCGCGG-3')는 (Bioneer Co)에서 구입하여 RAPD-PCR반응을 진행하였다. RAPD는1 unit의 thermostable DNA polymerase, 50mM Tri-HCl, pH 8.3, 40mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250μM의 dATP, dCTP, dGTP and dTTP가 들어있는 Accupower™ PCR PreMix Kit (Bioneer Co.,)을 사용하였으며, 10pmole primer와 5ng 의 genomic DNA를 넣고 나머지 부피를 멸균수로 채워 최종 부피가 20μl가 되도록 하였다. PCR반응은 Biometra DNA Personal Cycler를 이용하였으며, primer별로 PCR 조건을 다르게 하여 반응하였다. Primer OPO-02는 94 °C에서 5분간 전반응 시키고, 94℃에서 1분, 37 °C에서 2분, 72 °C에서 3분을 1cycle로 하여 총 40 cycles 동안 진행시켰고, 최종적으로 72 °C에서 5분간 반응시킨 후 4℃에서 보관하였다 (Lee *et al*, 1999). Primer OPD는 94℃에서 5분간 전반응 시키고, 94℃에서 1분, 30℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1cycle로 하여 총 40cycles 동안 진행시켰고, 최종적으로 72℃에서 5분간 반응시킨 후 4℃에서 보관하였다. Primer #28은 94℃에서 5분간 전반응 시키고, 94 °C에서 1분, 34℃에서 1분, 72 °C에서 1분을 1cycle로 하여 총 40cycles 동안 진행시켰고, 최종적으로 72℃에서 5분간 반응시킨 후 4℃에서 보관하였다. Primer # 36은 94℃에서 5분간 전반응 시키고, 94 °C에서 1분, 36℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1cycle로 하여 총 40cycles 동안 진행시켰고, 최종적으로 72 °C에서 5분간 반응시킨 후 4 °C에서 보관하였다.

#### 마. Electrophoresis:

증폭된 PCR fragment는 1.5% agarose gel과 6% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 하였다. Agarose gel은 Mupid kit(Cosmo Bio Co, Ltd)이나 평판 전기영동 장치(Bioneer Co.)를 이용하여 50 volts로 전기영동을 하여, Ethidium Bromide로 15분간 염색하고 흐르는 물에 15분간 탈색하여 UV transilluminator 상에서 나타난 밴드를 확인한 후, polaroid 667 film으로 촬영하여 분석하였다(Lee *et al.* 1999). 6% polyacrylamide gel은 Poker Face II (Hoefler Ins)와 Econo Sequencer<sup>TM</sup> I (Bioneer Co)를 사용하여 25mA에서 5시간 동안 전기 영동하고 silver staining 하여 scanner를 이용하여 분석하였으며, Agarose gel의 보조 자료로만 사용하였다.

#### 바. Silver staining:

6% sequencing gel은 Silverstar<sup>TM</sup> staining kit (Bioneer Co.)을 이용하여 염색하였으며, 사용자 설명서에 따라 진행하였다. 정착 및 고정용액으로는 10% glacial acetic acid (Junsei Chemical Co., Ltd.)를 사용하였고 염색 용액과 현상 용액은 Silverstar<sup>TM</sup> staining kit의 silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>)와 30% sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 사용하였다. Gel 판을 정착용액에 담가서 30분간 흔들어 주어 정착시킨 후 30분간 염색용액에서 염색을 시키고 이어 미리 녹여 냉장실에 차게 준비해 둔 현상 용액에 넣고 유리판에 밴드가 보일 때까지 흔들어 주었다. 밴드가 최적으로 염색되면 정착 용액을 2분 정도 처리하여 염색 반응을 끝내고 증류수로 잘 씻어 실온에서 건조시키고 밴드를 확인하였다.

#### 사. Cluster analysis:

통계 프로그램으로는 SPSS-WIN(Version 9.0)을 사용하였으며, 각각의 PCR 반응에서 나온 DNA 밴드의 유무에 따라 0과 1로 코드화하여 집괴 분석을 하였다 (Lee & Sung, 1997). 이때 나온 자료는 모두 사진을 보고 scanning하여 작업하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 균주 수집:

산림조합중앙회에서 개발한 균과 일본에서 수집한 균들, 총 14 균주가 수집되었다 (Table 3-1). 이들은 대부분이 당시 임협 협동조합에서 만들어진 품종으로 임협-1에서 산림-8호까지 수집된 것들이다. 일본에서 온 균주들은 모든 일본에서 공식적으로 온 것이 라기보다는 일반 종균 업자들이 개별적으로 구입된 것을 수집한 것들이다. 또한, 임협에서는 우리나라에서 자생하는 균주 8개를 지역별 시기별로 분리하여, 보관한 것들이다. 또한 농업과학기술원에서는 산림조합중앙회에 있는 몇몇의 균주와 동일한 것으로 생각되는 6개의 균주가 분양되었다. 여기서 나온 균주는 모두가 PDA에서 계대 배양한 것으로 오래 동안 수집된 것들이다. 이들 중에는 실제 농가에서 사용하는 균도 있고, 세계 여러 지역에 사용하는 균으로 알려진 것들이다. 그러나, 이러한 것은 공식적으로 수집된 것인지는 아직 파악되지 않고 있다. 이는 나중의 연구를 위하여 균주의 변호를 L-series와 K-series로 표시하였다. 그리고 여기서 표기된 K-series는 그 표시된 지역에서 자생하는 표고 균주를 분리하여 보관한 것으로 어떤 계통적인 분석을 한 것은 아니다. 표고 품종인 각각의 균주에 대한 기본적인 서술과 상세한 능력은 현재로써는 알 수가 없는 상태로 보관되어져 있다. 각각의 균을 미강 20%로 배합된 톱밥에 배양하며 균사의 성장 속도를 측정하는 것이다. 일단, 톱밥 배지를 긴 튜브에 넣어서 멸균 후 동시에 접종시킨 후에 21일 동안 배양한 것으로 성장한 길이로 나타낸 것이다.

한국에서 개발된 표고 균은 대부분이 원목 재배용임 (간략한 표고 품종에 관한 설명): 고온성 균주: 임협 1, 산림 2, 농기 3호가 주로 일반적으로 사용되는 표고 균임, 산림 4호, 임협 7호, 3602 등이 고온성 균으로 알려지고 수집함.

중온성 균주: 임협 6호, 산림 8호.

저온성 균주: 임협 5호, 산림 1호, 일본 모리 290의 저온성 표고 균을 수집함.

톱밥용 균주: 산림 5호는 산림청 임업 연구원에서 표고톱밥 재배용으로 개발한 것으로 중 고온성 품종으로 성장속도가 빠른 것으로 보고되었음, 임협협동조합에서 개발

된 균주를 본 실험실에서는 mark를함: L-1: 임협-1 L-2: 임협-2 L-3: 임협-5  
L-4: 임협-6 L-5: 임협-7, 임업연구원에서 개발된 균주: L-6: 산림-5 (북연 600)  
L-7: 산림-8

Table 3-1. Marks and Isolate of *Lintinus edodes* collected in Korea

Marks	Descriptions of varieties	Sources	Growth, mm
1	L-01 임협 1호 (임업협동조합, 중앙회에서 만듦)	임업협동조합	47.2±7.2 <sup>a</sup>
2	L-02 임협 2호 (임업협동조합, 중앙회에서 만듦)	임업협동조합	77.4±1.8
3	L-03 임협 5호 (임업협동조합, 중앙회에서 만듦)	임업협동조합	77.5±1.0
4	L-04 임협 6호 (임업협동조합, 중앙회에서 만듦)	임업협동조합	72.8±0.8
5	L-05 임협 7호 (임업협동조합, 중앙회에서 만듦)	임업협동조합	78.2±1.0
6	L-06 산림 5호 (임업연구원에서 만듦)	임업협동조합	80.4±1.1
7	L-07 산림 8호 (임업연구원에서 만듦)	임업협동조합	57.8±3.0
8	L-08 북연 603 KN 1, N 603	임업협동조합	71.6±3.1
9	L-09 균원 (일본 균종 115)	임업협동조합	75.7±3.0
10	L-10 균원 (일본 균종 115)	임업협동조합	80.7±2.3
11	L-11 추산 A500-1	임업협동조합	74.5±2.5
12	L-12 일본명치 균주 20306-1(4M-10) : 톱밥중균	임업협동조합	85.8±3.6
13	L-13 미국 균상 (톱밥제 개발) 22206-1	임업협동조합	70.1±1.8
14	L-14 일본 야크르트Y602	임업협동조합	75.9±1.7
15	K-01 표고(자실체)-(98/12/28 K-01), 마곡사	한국교원대학교	80.3±4.0
16	K-07 1305(005) 980909 강원도 오대산 평창	임업협동조합	54.1±2.1
17	K-11 13024(영동-1) 980825 충북 영동 상촌 민주지산	임업협동조합	60.9±3.4
18	K-13 12022(HH-5) 980827 지리산	임업협동조합	62.7±0.9
19	K-15 12022(HH-5) 980827 지리산	임업협동조합	63.0±3.8
20	K-18 13034 83-0-2 2126 강원도 인제 설악산	임업협동조합	52.0±5.7
21	K-36 12034 (86-CN-2) 980824 전남 구례 토지 내동리 지리산	임업협동조합	60.1±1.9
22	K-41 경남 거제도 신천	임업협동조합	76.1±1.7
23	3033 일본균심연	농업과학기술원	87.2±0.6
24	3039 일본명치제	농업과학기술원	68.1±2.6
25	3046 농기 3호	농업과학기술원	74.2±2.7
26	3105 파푸아뉴기니	농업과학기술원	65.5±1.1
27	3147 대한 산림조	농업과학기술원	72.8±3.2
28	3167 일본 북연계통	농업과학기술원	70.5±2.6
29	3177 일본 모리게통	농업과학기술원	80.6±2.2
30	3209 일본 모리게통	농업과학기술원	68.4±2.5
31	3235 산림 5호 (임업연구원에서 만듦)	농업과학기술원	67.0±1.1
32	3236 산림 6호 (임업연구원에서 만듦)	농업과학기술원	85.1±2.3

<sup>a</sup>Growth rate mm (standard deviation) for 21 days in the solid sawdust medium of oak sawdust (80%) mixed with the rice bran (20%).

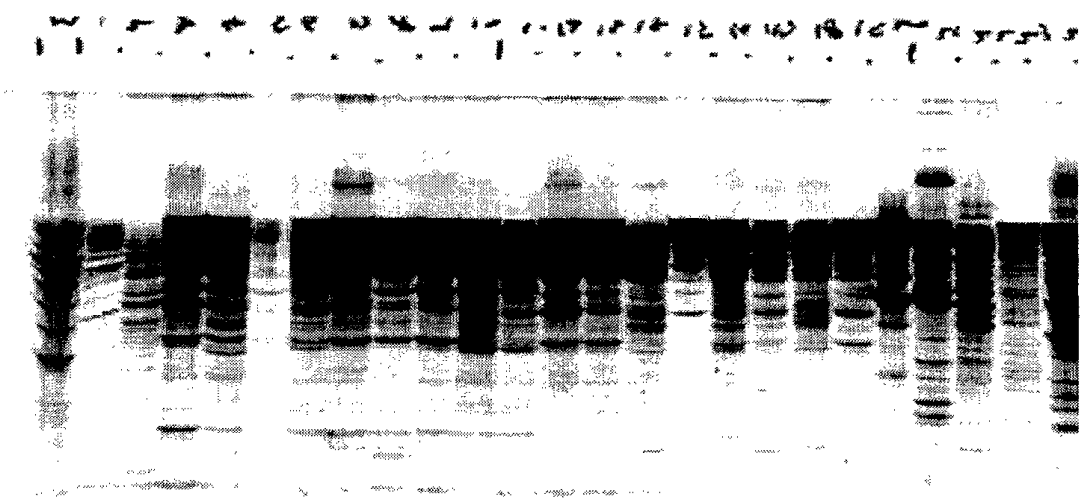
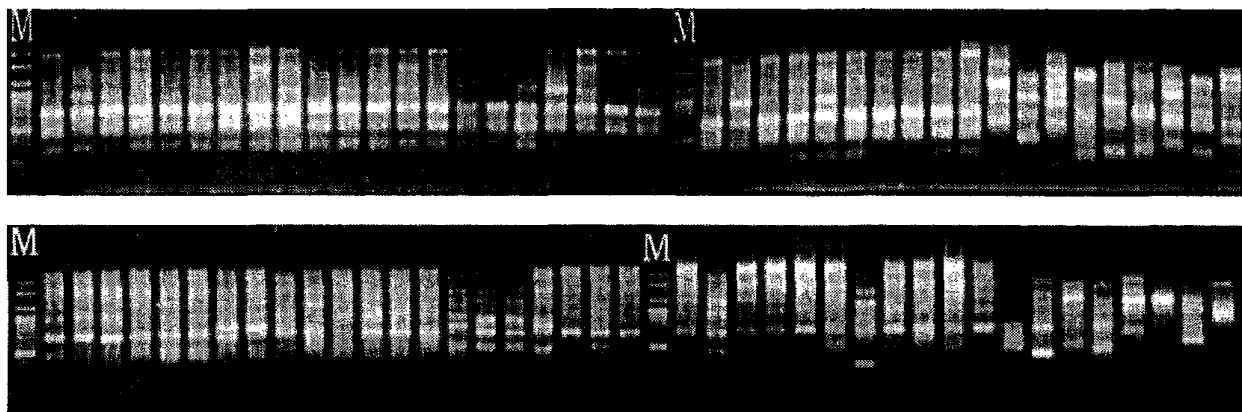


Fig.3-1. Polymorphism of isolates and varieties. of *Lentinus edodes*'s PCR-PAPD: M(arker), B(lank), K-1, K-7, K-11, K-13, K-15, K-18, K-41, L-1, L-2, L-3, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, L-9, L-10, L-11, L-12, L-13, L-14, 송이버섯, 냄새무당버섯, 그물버섯, 갈대기 무당버섯, 황소비단그물버섯, 뽕나무버섯, 느타리, blank, marker. The polymorphisms reacted with the primer OPO-2 (upper), bioneer-28 (middle), and 36 (bottom).

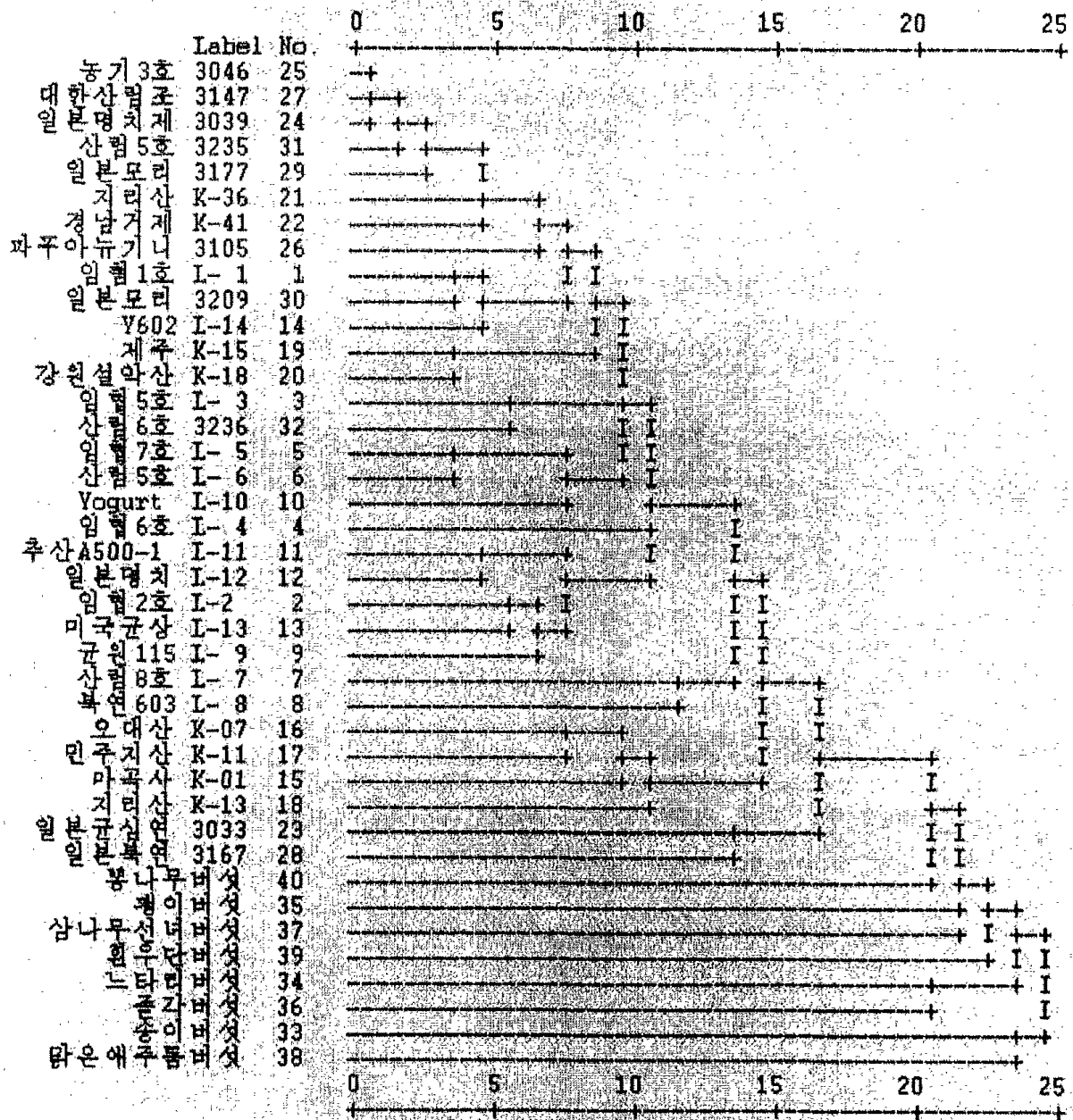


Fig.3-2. UPGMA dendrogram showing the relationship among the 32 isolates of *L. edodes* based on the polymorphic bands formed in 1.5% agarose gel in RAPD analysis



**야외 채집 균주** (아직 이들의 야외 균들이 위와 동일한 것인지는 알 수 없음) K-01: 충남 마곡사에서 아주 큰 표고를 채집하여 분리한 균(이상선), K-07: 강원도 오대산 평창 13005(005) 980909, K-15: 제주도 11014(32) 980827, K-13: 지리산 12022(HH-5) 980827, K-11: 충북 영동 상촌 민주지산 13024 (영동-1) 980825, K-18: 강원도 인제 설악산 13034 83-0-2 2126, K-36: 전남 구례 토지 내동리 지리산 12034 (86-CN-2) 980824, K-41: 경남 거제도 신천

**현재 농진청 균이과** (응용미생물과) 에서 가져온 표고 균주 10개 (새로 분양 받음): ISA3033: 일본 균심연 (1974 수집), ISA3039: 일본명치제 (1975 수집), 중온성 단생, ISA3046: 농기 3호, 교배종 (1978 제조), ISA3105: 파푸아뉴기니아에서 수집 (1987 수집), ISA3147: 대한 산림조합 (1991 수집), 명다갈색, ISA3167: 일본 북연 (1994 수집), 톱밥재배용, ISA3177: 일본 모리(1994 수집), 저온성, ISA3209: 산림-5호(기록없음), 임업 연구원에서 개발한 품종으로 생각됨, ISA3235: 산림-6호 (기록없음), 임업 연구원에서 개발한 품종으로 생각됨, ISA3236: 여기서 표고 균사인 3046에 관한 것은 아래의 논문에 있음,

#### 나. PCR-RAPD:

표고 균주 32(L-series, K-series, 3-series)개와 뽕나무버섯(AM-2)의 total DNA 추출은 Petridish에서 배양 중인 균사 조각 전체를 액체질소를 이용하여 갈아서 추출하였으며, 이외의 버섯 total DNA 추출은 본 실험실에서 채집되거나 구입한 (송이,삼나무선녀버섯, 흰우단버섯,줄각버섯, 맑은애주름버섯, 느타리, 팽이버섯)자실체에서 total DNA를 추출하였다. 자실체에서 추출된 DNA와 균사에서 추출된 DNA의 RAPD를 통한 DNA patterns 은 거의 같은 양상을 보인다고 하였으며(Lee *et al*, 1997), 3개의 균주를 다른 날짜에 추출하여 AP-PCR 분석을 하였을 때 동일한 DNA band pattern을 보였다(Chang & Miles, 1993). 이것을 기초로 하여, Fig.3-1에서 다양한 밴드들이 나타났다. 우선 위에서 언급된 primer들은 사용되었으나, OPD-18는 제외되었다. 그림에서 순서로 3가지의 primer를 사용한 결과이다. 우선, Bioneer primer에서는 많은 공통 밴드가 보인다. 그리고, 분자량이 낮은 곳에 공통적인 밴드가 보여, 표고버섯의 유사성을 파악하는 연구에는 중요한 것으로 생각되나. 본 실험에서는 서로 이질

적인 밴드와 동질적인 밴드를 합하여, 표고 균의 계통적인 생물학적인 연관성을 추론하고자 한다.

여기서 나온 표고 균주들의 DNA와 여러 primer들과 반응한 결과를 모두 모아서 집괴분석한 결과가 Fig 3-2에 표시하였다. 우선, 이들은 무작위로 반응시킨 결과로 각 primer를 반응시킨 내용을 놓고 각각 SPSS-Win 프로그램을 돌려서, 생물학적인 계통을 가진 것을 선정하였다. 여기서, 많은 경험을 통하여, 송이버섯과에 계통적으로 잘 나오는 것을 선정하였고, 계산 결과 얻은 내용이다. 여기서 표고의 버섯의 분류 체계를 알 수가 없어, 임의로 송이버섯과 내에 있는 알려진 버섯의 DNA를 추출하여 비교 실험을 하였다. 여기서 나온 집괴분석에서 삼나무선녀버섯, 흰우단버섯, 느타리, 뽕나무, 송이, 팽이, 맑은애주름버섯, 줄각버섯을 산야에 채집된 것을 이용하였다. 이들은 표고 품종과 비교하여 우선 out-group으로 나타났고, 이들간의 group은 대략적인 버섯 분류 군과 비슷하게 분리되었다. 계통적인 분류와 도감을 찾아서 가능한 차이점이 있는 것을 보고 표고 품종을 비교하였다. RAPD를 이용한 7개 표고 균주의 계통분류에서 20개의 random primer를 사용한 결과 품종식별이 가능한 9개의 primer가 선발되었지만, 7개의 품종을 구분할 수 있는 단일 primer가 없다고 하였다(Lee *et al*, 1997). 본 실험에서도 32개의 표고 균주에 대하여 각각의 품종을 구분할 수 있는 단일 primer는 없었다. 3개의 primer를 이용한 총 band의 수는 66개였으며, 표고 균주에서 나타나는 band의 수는 27개의 band pattern이 관찰되었다.

In-group내에는 구임업협동조합중앙회(현 산림조합중앙회) 미생물사업소에서 분양 받은 균주(L-series 및 K-series), 본 실험실에서 채집되어 분리된 균주(K-01), 농업과학기술원 응용 미생물과에서 분양받은 균주(3-series) 등 총 32개의 표고 균주를 포함하였다. Out-group으로는 같은 송이과(Tricholomataceae)의 송이, 뽕나무버섯, 팽이버섯, 줄각버섯, 흰우단버섯, 삼나무선녀버섯, 맑은 애주름버섯 그리고 식용버섯으로 유명한 느타리과 (Pleurotus)의 느타리버섯 등 8개를 포함하였다. 이는 최소한 표고 균주에 대한 품종간의 생물학적인 관계는 알 수 없기 때문에 이미 동정된 균종을 사용하였다. 사용된 out-group에 의한 다른 송이버섯과의 버섯 종에 의한 것으로, 우선 표고 품종과 다른 외부 group으로 나타났고, 계통적으로 분리가 되었다. 이러한 것은 알려지지 않은 표고의 품종에 대한 분석을 보기 위한 것으로 일단 알 수 없는 것을

다른 알려진 송이과 버섯 종 (species)으로 구분하려고 시도하였다.

표고 32개의 균주들은 분석 결과 3개의 그룹으로 나뉘어졌다. 가장 큰 그룹은 국내에서 개발되어 종균으로 판매되고 있는 품종과 일본에서 개발되어 도입된 균주들의 대부분을 포함하고 있는 그룹으로 유사성이 상당히 높게 나타나고 있다. 2번째 그룹은 우리나라 야생 채집종인 K-01(마곡사), K-07(, K-11, K-13를 포함한 그룹으로, 야생종들이 재배 균주와 다른 그룹에 묶이는 것으로 보아 유전적으로 다양성이 있는 것으로 고려된다. 3번째 그룹은 일본 균심연(3033) 균주와 일본 북연(3167) 균주가 포함된 그룹으로 나뉘고 있다. 중국의 표고 재배 품종간의 RAPD를 이용한 계통분석에서 지역적으로는 많이 떨어져 있는 균주들도 유전적 동질성이 매우 높게 나타났으며, 이는 채집된 야생종들은 생태적으로는 한정된 지역에서도 매우 다양한 band pattern을 보이고 있기 때문에 산업적으로 중요한 생물 다양성을 위해 자연적인 표고 균주의 보전이 중요하다고 하였다 (Chiu *et al*, 1996).

우리나라에서 개발된 균주와 일본에서 개발된 균주들이 같은 그룹으로 묶이는 것으로 보아 품종간의 유전적 상동성이 매우 높다고 할 수 있다. 국내 채집종 중에서도 유전적 다양성을 보이지 않는 K-15(제주), K-18(강원 설악산), K-36(지리산), K-41(경남 거제) 균주는 재배 품종과 많은 유사성을 보이고 있다. 이들 균주는 순수한 야생 균주가 아니 재배품종의 포자가 산포하여 발아되어 발생한 자실체가 채집되었다고 생각된다. 우리 나라 전역에 걸쳐 야생 표고 품종들을 채집하여 표고의 유전적 다양성을 조사하여야 할 것이다. 여기서 나타난 내용으로 제주도에서 분리된 표고 균(K-15), 마곡사 (K-01) 및 영동 민주지산 (K-11)에서 분리된 것이 다른 일본의 균과 다른 것으로 나타났다. 앞으로 균 등록을 위한 실험을 이러한 일본에서 개발된 표고 품종과 연관성이 적은 것으로 시도하면 되겠다.

#### 다. 나무 분해률조사:

채집된 표고 품종으로 여섯 가지의 나무를 PDA배지에 넣고 2개월가량 배양하여 건조무게 손실을 계산하여 분해률을 조사하였다 (Table 3-2). 여기서 분해률에 마이너스 값은 이론적으로 옳지 않은 것이나, 대부분이 건조무게 측정을 잘 못하여 나온 것으로 실험적인 실수로 생각된다. 우선, 표고 균들은 소나무의 분해률이 가장 낮고. 미

Table 3-2. The degradation rates of 6 different wood chip by the various lines of *Lentinus edodes*

Lines	갈참나무	오리나무	아까시나무	소나무	미루나무	굴참나무
L-1	17.86	17.24	10.65	-1.92	19.44	25.91
L-2	21.08	30.25	17.39	5.77	24.59	28.70
L-3	8.44	-9.43	-3.16	-5.32	-4.00	22.64
L-4	38.97	49.18	26.05	4.37	53.57	48.28
L-5	23.18	18.87	4.90	2.51	7.78	29.43
L-6	0.85	7.45	5.77	-0.79	21.74	25.74
L-7	13.09	28.93	48.39	2.86	22.22	20.81
L-8	0.47	12.50	12.00	-5.77	46.15	20.81
L-9	40.91	52.75	38.35	6.77	63.89	45.99
L-10	39.50	37.37	48.94	10.70	57.78	44.85
L-11	31.41	-	23.81	14.41	61.11	37.50
L-12	32.32	59.46	66.67	35.58	67.74	37.10
L-13	3.21	2.08	4.63	-3.57	-7.50	20.67
L-14	28.31	45.56	25.86	10.34	45.00	28.28
K-1	20.33	17.71	19.75	-2.20	40.00	31.41
K-7	32.90	31.58	44.79	10.17	26.47	33.58
K-11	31.21	51.09	19.23	11.86	44.12	38.50
K-13	39.37	68.97	45.83	17.80	50.00	40.33
K-15	16.47	21.36	4.76	-1.86	15.79	24.92
K-18	31.63	30.08	17.72	2.15	25.00	33.72
K-36	24.73	33.78	17.16	5.26	19.15	35.61
K-41	40.82	66.67	15.65	19.57	60.47	62.50
3033	22.40	28.57	17.11	31.54	53.70	36.26
3039	42.60	77.53	35.61	8.74	61.90	39.78
3046	4.39	0.78	4.71	-4.08	6.82	17.50
3147	36.56	60.00	22.84	13.64	20.15	51.27
3167	7.89	11.96	9.19	-1.79	37.50	19.05
3177	42.66	30.84	-34.62	24.59	38.30	37.80
3209	9.57	37.97	64.86	-8.15	20.00	58.29
3235	31.58	41.75	24.54	8.50	61.40	38.67
3236	20.67	36.67	27.78	1.16	15.94	27.96
노루궁뎅이	16.94	11.64	19.77	1.69	27.59	29.38
Pholiota	5.82	4.41	4.63	-0.69	1.59	18.58

루나무와 졸참나무를 가장 높게 분해하였다. 의외로 아까시나무와 오리나무에서 표고균도 많이 분해하였다 (Table 3-3).

Table 3-3. Average values of degradation rates of wood-chips by various lines of *L. edodes*

Wood-chips	N <sup>a</sup>	Mean	Standard Error <sup>b</sup>
갈참나무	33	33.5798	2.3341
오리나무	33	41.7746	3.7082
아카시아	33	33.3902	3.0379
소나무	33	16.4803	1.8231
미루나무	33	44.6807	3.7856
졸참나무	33	43.6496	1.9728
Total	198	35.5925	1.3515

<sup>a</sup> The replicates <sup>b</sup> F(df=5) = 13.445, Sign = 000

Table 3-4. ANOVA of Degradation rates of wood chips by the 33 different lines of *L. edodes*.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	34144.218	32	1067.007	4.745	.000
Contrast	332.125	1	332.125	1.477	.226
Deviation	33812.093	31	1090.713	4.850	.000
Within Groups	37105.618	165	224.883		
Total	71249.836	197			

각각의 품종을 이용한 나무 분해률은 Table 3-4와 같이 뚜렷하게 다르게 나타났다. 여기서 이러한 자료는 앞으로 표고의 품종 개발을 위한 기초 자료로 사용될 것으로 생각된다. 여기서 나온 자료는 분리된 표고 품종에 따른 나무의 분해률은 다르게 나타났고, 품종에 따른 수종의 분해률도 다르게 나타났다. 그 예로 K-41 (거제도에서 분리된 균)은 다른 어떤 표고 품종보다 나무 분해률이 높은 반면에, 임협-1호는 가장 모든 품종에 비하여 나무 분해률이 낮았다.

#### 4. 결론

한국에서 사용되는 표고 품종 33개를 수집하였고, 이들은 연구기관에서 개발하였거나 일본에서 수입한 표고 품종을 야생에서 채집한 표고 균과 비교하였다. 생물학적인 계통 분류는 알려진 채집된 야생 종으로 표고 품종의 계통적인 관계를 관찰하였다. 일본 균과 우리나라에서 개발된 균들은 서로 비슷한 묶음으로 뭉쳐서, 한국의 고유의 품종으로 인정되는 균들은 거의 없었다. 간혹, 야생에서 채집된 균들은 대부분이 재배 장소에서 나간 포자들로 생각되며, 몇몇의 야생 표고 품종은 한국 및 일본의 상업적인 품종과는 다른 것으로 나타났다. 표고 품종간의 수종 나무의 분해률을 측정하였으며, 이는 다양한 분해율을 나타내어 앞으로 육종에 좋은 자료가 될 것으로 판단된다.

#### 5. 참고문헌

- Chang, S. T., Buswell, J. A. and Miles, P. G. 1993. Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers. Pp. 2.
- Chiu, SW., Ma, AM., Lin, FC. and Moore, D. 1996. Genetic homogeneity of cultivated strains of shiitake(*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 100: 1393-1399.
- Hibbet, DS., Hansen K. and Donoghue, M. 1998. Phylogeny and biogeography of *Lentinula* inferred from and expanded rDNA dataset. *Mycol. Res.* 102: 1041-1049.
- Kim, BG., Jeong MJ., Lee, CS., Lee, HK., Yoo. YB. and Ryu, JC. 1995. Parameters affecting ploymerase chain reaction in RAPD analysis of *Pleurotus* spp.. *Kor. J. Mycol.* 23: 202-208.
- Lee, SS. Kim, MH., Chang, HB., Shin, CS. and Lee, MW. 1998. *Pholiota adiposa* and its Related Species Collected from the Wild Forestry. *Kor. J. Mycol.* 26: 574-582.

- Lee, SS., Hong, SW., Jung, HC., Sung, CK., Kim, JH., Ka, KH. and Kim, HJ. 1999. The specific probes confirming the genomic DNA of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 27: 20-26.
- Lee, SS. & Sung, CK. 1997. The Mycelia isolated from the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 25: 121-129.
- Lee, TS., Bak, WC., Kang, HD., Kim, SK., Byun, BH., Yi, CK., Lee, WK. and Min, DS. 1997. Classification of Korean *Lentinula edodes* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Kor. J. Mycol.* 25: 219-225.
- Park, W. M., Ko, HG., Park, RJ., Hong, KS. and Kim, GH. 1997. Differentiation of *Lentinus edodes* Isolates in Korea by Isozyme Polymorphisms and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Kor. J. Mycol.* 25: 176-190.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in Plants and Fungi. CRC press. pp 24-135.
- Williams, JG. K., Kubelik, AR., Livak, KJ., Rafalski, JA. and Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 19: 6531-6535
- Yukitaka, FN., Teruruki, M. and Mitsuo, K. 1994. Fruiting body productivity of protoplast-derived clones in *Lentinula edodes*. *Mycoscience* 35: 137-139.
- Yoon, CS. 1992. Examination of parameters affecting polymerase chain reaction in studying RAPD. *Kor. J. Mycol.* 20: 315-323.

## 제 2 절 표고 (임협-1호)의 발이 과정에서 발현되는 유전자

### 1 서설

송이과에 속하는 표고 버섯은 일반적으로 목재 부후균이고, 세계에서 가장 인기가 있는 버섯 중 하나이다 (Chang & Miles, 1991; Lee, 1988). 이 버섯은 다른 어떤 버섯에 비하여 저장성과 맛 및 향기가 뛰어나기 때문에, 재배는 현재 빠른 속도로 확산되고 있다 (Park et al., 1997). 또한, 버섯 생산량은 약 4,049 tons (1999)이고, 한국에서 산림 자원 생산물의 약 90%에 해당하는 금액을 차지하고 있다 (Lee et al., 2000). 최근 버섯에 관한 새로운 품종이 개발되고, 단위 면적당 생산를 증대시키기 위하여 잡종화되고 있으나, 표고 버섯에 대한 연구는 거의 없는 것으로 생각된다.

전통적으로 버섯의 품종(lines)은 형태적인 혹은 채집 환경에 따라서 분류되고 있고, 상업적인 문제에서는 재배의 온도와 자실체의 형태가 문제가 되고 있다. 그런데 다양한 식용 버섯의 품종은 한 종에서 분류되고 있으나, 이에 대한 연구는 많은 경우에 발표되지 않은 상태이다. 단백질의 전기 영동 방법과 Polymerase Chain Reaction (PCR)- Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 는 종분류와 종 이하의 품종 분류를 위하여 많이 사용되고 있다 (Lee et al., 1996). 그러나 표고 품종의 경우는 대부분은 생산되는 온도와 자실체의 형태에 따른 분류를 하고 있으나 아직 모호한 면이 많다.

표고의 전통적인 생산은 주로 참나무 통나무에서 많이 생산되고 있으나, 최근 통나무 생산이 줄어들면서 톱밥 재배로 전환되고 있다 (Hiromoto, 1991). 통나무 재배는 그냥 노지에서 재배하여 약 5년간 계속적인 생산을 하고 있고, 저장성 좋은 표고를 생산하고 있으나, 자본금이 오래 동안 묶여 있고, 표면이 딱딱한 표고 생산으로 현재는 톱밥 배지를 위한 표고 생산이 우리나라의 경제에 알맞은 편이고, 중국과 일본은 거의 톱밥 재배를 위한 많은 기술이 개발되었다 (Diehle and Royse, 1991; Lee et al., 2000). 톱밥 재배는 참나무 혹은 비슷한 수종을 이용한 톱밥을 미강과 혼합하여 멸균하여 접종한 후 3-4개월 후에 버섯 발이를 유도하고 있다 (Ng et al., 2000). 톱밥 재배는 다른 원목 재배에 비하여 버섯의 발이가 어느 정도로 조절됨으로 아무 때나 생



표고 생산하는 것이 중요하다. 표고의 균사의 접종과 균사의 성장 및 갈변화의 조건은 대부분이 표고 버섯의 재배에 필수적으로 필요하고 (Leung et al., 2000; Yoo et al., 1998), 이에 따른 버섯 자실체의 형성은 다른 어떤 재배보다 중요하고, 이는 버섯 생산 시기를 조절함으로써 가격 경제면에서 우위를 점할 수 있는 조건이 되고 있다. 이러한 면에서 표고 버섯의 발이는 환경적인 조건인 발이 조건을 파악하고 이들이 분자 생물학적인 환경에서 어떠한 상태로 변화하는가를 조사하는 것이 중요하다고 하였다.

표고의 발이에서는 우선 기질의 영양 상태에 대한 연구 (Park et al., 1992; Bak et al., 1996)와 품종 개발에 중점으로 연구가 진행되었다 (Kim et al., 1987). 액체 배양을 통한 배지 조절의 연구 (Song et al., 1987)와 유전자의 조절로 발이가 된다는 연구가 진행되었다 (Lee et al., 1997; Park et al., 1997; Chiu et al., 1996). 일본의 많은 연구는 발이는 유전자인 *priA* gene에 의하여 원기 발현이 된다고 연구하였다 (Kajiwara et al., 1992). 이러한 유전자는 균사 형태나 자실체가 형성된 곳에는 거의 보이지 않고 있으나, 원기 발현에서 풍부하게 작용한다고 보고하였다 (Endo et al., 1994). 다른 연구에서 세포 내 미토콘드리아에 있는 유전자 ( $\beta$ -subunit of mitochondrial processing peptidase;  $\beta$ -MPP gene)가 활발히 작용하는 것으로 보고되고 있고, 이는 발이 과정에서 산소가 많이 소모되는 것과 같은 현상으로 발이과정에서 중요하고 발표하였다 (Zhang et al., 1998). 다른 연구에서는 알려진 유전자인 *Le hyd1* (Ng et al., 2000)와 *mfbAc* transcript (Kondoh et al., 1995; Ng et al., 2000)가 발이 과정에서 풍부하게 발현된다는 연구가 있으나, 앞의 연구와는 어떤 유전자가 일치되는지는 아직 알수가 없다. 이러한 면에서 표고 발이와 관련된 유전자의 연구는 중요하다고 생각된다.

최근 연구에서 발현되는 유전자는 mRNA 분석으로 다른 발현되지 않은 유전자와 구별하고 있다 (Lee et al., 1991). 이러한 기술은 중요한 유전자 연구에 사용되고 있으나, 대부분의 연구에서 많은 양의 시료가 필요하고, 발현되는 유전자를 찾기가 어렵다 (Liang et al., 1994). 그런데, 최근에 개발된 Differential Display of Reverse Transcription (DDRT)- Polymerase Chain Reaction (PCR)는 새롭고, 변형된 조건에서 혹은 돌연변이된 세포에서 생산하는 유전자를 분석하기 위한 방법으로 개발되어졌다 (Bauer et al., 1993). 특히, 중금속 이온의 stress에 대한 연구 (Hong et al., 1997)

와 벼의 낮은 온도에 발현되는 유전자의 파악 (Choi et al., 1997)과 식물과 균의 상호 작용에서 발현되는 유전자 (Benito et al., 1996)를 구별하기 위한 방법으로 많이 사용되었다 (Ayala et al., 1995; Liang and Pardee, 1992). 여기서 본 연구는 DDRT-PCR의 장점인 단순성과 고감도를 이용하여 표고 버섯의 발이과정 동안 일어나는 여러 가지의 유전자를 파악하려고 노력하였다. 그 결과는 표고버섯의 발이 과정에서 가능한 전 RNA를 수집하여 여러 가지의 primer를 사용한 결과 몇 개의 유전자를 찾았으며, 이들의 유전자의 염기서열을 분석하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 가. Fungal isolates:

표고 품종인 임협-1 (ImHyup-1; 통나무 재배에서 가장 일반적으로 사용되는 품종)을 산림조합 중앙회 (National Forestry Cooperatives Federation; NFCF)에서 구입하였다. 표고 버섯의 균사는 주로 PDA (Difco)에서 25 °C에 배양하여 보관하였으며, 필요할 때마다 옮겨 심기를 하여 사용하였다. 한천 배지에 배양한 균사는 액체 배지 (glucose 20g, yeast extracts 2g, trytone 2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> 0.75g, FeSO<sub>4</sub> 0.02g, ZnSO<sub>4</sub> 0.02g, H<sub>2</sub>O 1L)를 넣고 진탕 배양하였다. 액체 배지에 배양한 균사는 다시 균일하게 균사를 갈아서 집중하여 배양된 균사체를 1-1.5 kg의 톱밥 배지에 집중하여 균사를 배양하였다 (미강과 비율 80:20 수분 소독전 60%로 조절). 균사는 일반적으로 열에 강한 비닐 백으로 싸고, 균사의 배양은 암실에서 수행하였다. 균사가 자란 톱밥 배지는 약 2달 정도 되면, 검은 갈변화가 일어나고, 이때 15°C 방에 습도기를 틀어주면 약간의 primordium이 형성되고 있는 것은 단계별 시료를 채집하여 냉동 보관하여 실험하였다(그림 3-3).

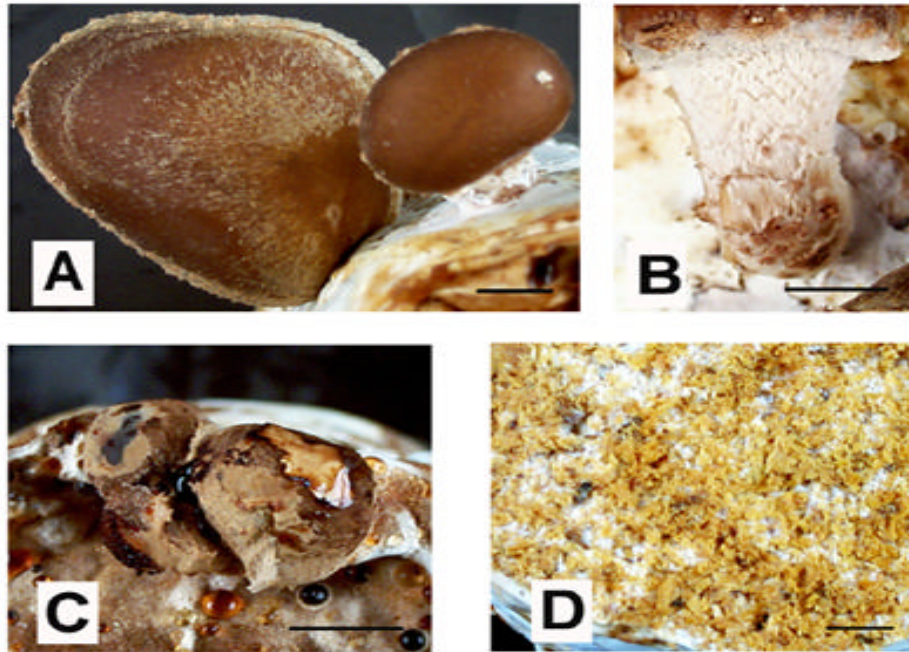


Fig.3-3. The different stages of *Lentinus edodes* (ImHyeup-1) growth: A: Formations of Fruiting body (Pileus), B: Fruiting body Stipe C: Primordia formations from the surface of the sawdust D: The mycelia colonized in the sawdust media (Each scale = 1cm).

#### 나 . RNA분리 :

위에서 언급한 표고 균사 및 조직에서 SDS-Phenol extraction 방법을 이용하여 전체 RNA's를 분리하였다 (Ausbel et al., 1999); 조직들은 5-15g의 양을 채집하여 액체 질소 속에 모르타르를 이용하여 분쇄하였다. 갈아진 조직은 50mℓ centrifuge tube에 넣고, 추출 용액 (0.18 M tris, pH 8.7, 90 mM LiCl, 4.5 mM EDTA, 1% SDS)를 첨가하여 분리하였다. 여기서 원심분리한 후에 동일 부피의 acidic phenol (pH 4.3)를 재 첨가하여, 호모겐라즈하였다. 이후에 원심분리는 12,000 rpm 에 10 분간 한 후, 윗 용액 5 ml을 새로운 원심분리 튜브에 넣고 동일 부피의 Chloroform을 첨가하여 흔든 후에 동일 조건에서 재 원심분리를 하였다. 원심분리된 용액에서 상등액을 800 μℓ를

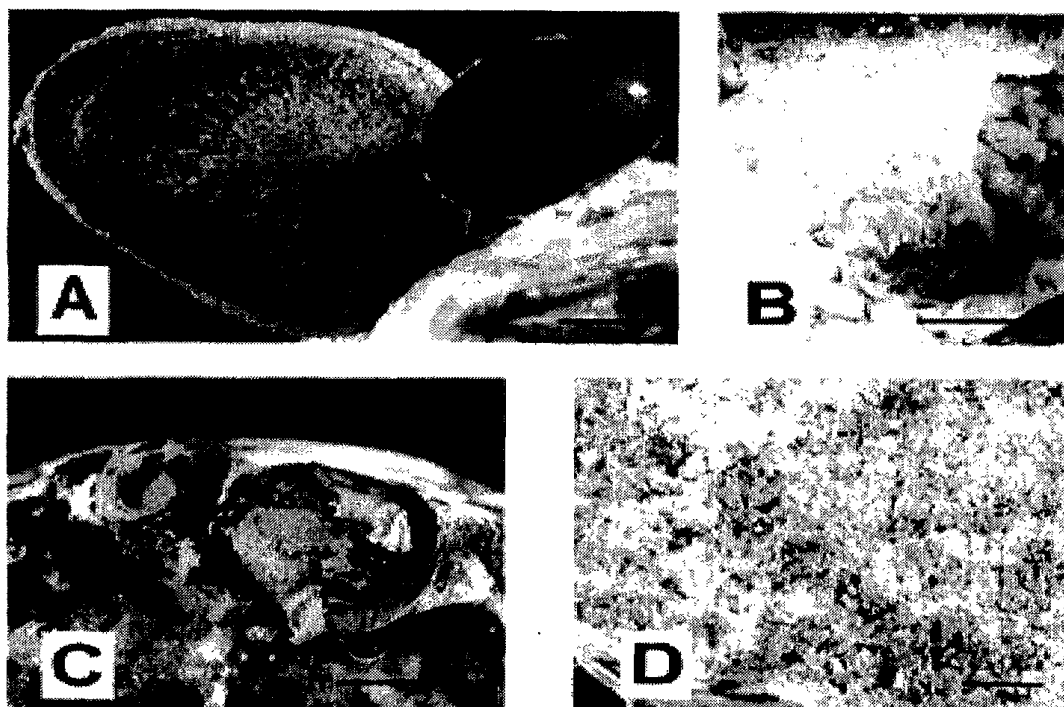


Fig.3-3. The different stages of *Lentinus edodes* (ImHyeup-1) growth; A: Formations of Fruiting body (Pileus), B: Fruiting body Stipe C: Primordia formations from the surface of the sawdust D: The mycelia colonized in the sawdust media (Each scale = 1cm).

#### 나. RNA분리:

위에서 언급한 표고 균사 및 조직에서 SDS-Phenol extraction 방법을 이용하여 전체 RNA's를 분리하였다 (Ausbel et al., 1999); 조직들은 5-15g의 양을 채집하여 액체 질소 속에 모르타르를 이용하여 분쇄하였다. 갈아진 조직은 50ml centrifuge tube에 넣고, 추출 용액 (0.18 M tris, pH 8.7, 90 mM LiCl, 4.5 mM EDTA, 1% SDS)를 첨가하여 분리하였다. 여기서 원심분리한 후에 동일 부피의 acidic phenol (pH 4.3)를 재 첨가하여, 호모겐라즈하였다. 이후에 원심분리는 12,000 rpm 에 10 분간 한 후, 윗 용액 5 ml을 새로운 원심분리 튜브에 넣고 동일 부피의 Chloroform을 첨가하여 혼든 후에 동일 조건에서 재 원심분리를 하였다. 원심분리된 용액에서 상등액을 800 $\mu$ l를 취하여 새로운 튜브 (eppendorf tube)에 넣고, 동일 4 M LiCl 부피를 첨가하였다. 이

튜브는 다시  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 RNA가 침전되도록 방치시킨 후에 다시 위와 같은 조건으로 원심분리를 하였다. 이때에 상등액은 버리고 침전된 것은 새로운 2M LiCl 용액으로 재원심분리하고, 마지막으로 70% ethanol 용액에 원심 분리하여 건조시켰다. 여기서 침전된 것은  $50\mu\text{l}$  DEPC-treated water을 첨가하여 RNA PrepMate™ Lysis buffer을 재처리하여 순수 분리를 한다. 이와같은 방법을 통하여 2-3 번정도 재 분리하여 가능한 RNA의 순수도를 높이고, 그 농도를 측정하였다. 그리고 전기 영동 (formaldehyde agarose gel)을 통하여 RNA 밴드를 확인하고, 다음 실험을 하였다 (Ausbel et al., 1999; Sambrook et al., 1989)..

#### 다. DDRT-PCR분석:

추출된 RNA는 새롭게 reverse transcriptase반응(AccuPower™ RT PreMix, Bioneer Co)을 이용하여 cDNA을 만들었다. 이때 반응의 조건으로는  $20\mu\text{l}$ 의 용액에  $1\mu\text{g}$  of total RNA, 1,2,3 M-MLV Reverse Transcriptase 20 U, RNase in 10 U, Stabilizer, tracking dye 와 20 pmole의 3' one anchored oligo-dT primers (아래 참조)을 포함시켜서 반응시켰다. 역전사 DNA polymerase (reverse transcription)는  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시킨 후에 마지막으로  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 두어서 반응을 정지시켰다. 여기서 합성된 RNA에 대응되는 cDNA는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 PCR 반응을 사용할 때 까지 보관하였다. 이때 반응된 cDNA는 같은 조건으로  $20\mu\text{l}$  PCR mixture (1U Taq DNA polymerase, the 250  $\mu\text{M}$  dNTP of each, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , stabilizer, tracking dye (Bioneer Co.), 20 pmole 3' one anchored oligo-dT primers and 20 pmole arbitrary primers)가 포함된 것을 구입하여 반응시켰다. 여기서 사용된 anchored primer와 다른 primer는 아래의 표와 같다. 이러한 조건에서 PCR 반응은  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간,  $40^{\circ}\text{C}$ 에서 30 sec,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 30 sec 처리한 한 후에;  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 30 sec동안 30 cycles,  $40^{\circ}\text{C}$ 에서 30 sec,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1 min을 30 cycles을 돌리면서 반응시켰고, 나머지 마지막 반응으로  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 30 초,  $40^{\circ}\text{C}$ 에서 30초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 반응시켰다. 이때 나온 산물은 PCR산물  $5\mu\text{l}$ 을 1.5 % agarose gel에서 전개하고, ethidium bromide로 염색시킨 후에 합성된 DNA 염기서열을 관찰하였다. 관찰된 염기서열은 염색 후에 밴드로 확인한 후에 디지털 카메라 (Kodak)를 찍어 보관하였다.

Primer (Length)	Nucleotide sequences
oligo dT/G (16 mer)	5' - <u>AAGCT</u> TTTTTTTTTTTG - 3'
oligo dT/C (16 mer)	5' - <u>AAGCT</u> TTTTTTTTTTTC - 3'
oligo dT/A (16 mer)	5' - <u>AAGCT</u> TTTTTTTTTTTA - 3'
AP 1 (13 mer)	5' - <u>AAGCT</u> TGATTGCC - 3'
AP 2 AP 1 (13 mer)	5' - <u>AAGCT</u> TCGACTGT - 3'
AP 3 AP 1 (13 mer)	5' - <u>AAGCT</u> TTGGTCAG - 3'
AP 4 AP 1 (13 mer)	5' - <u>AAGCT</u> TCTCAACG - 3'

#### 라. Electrophoresis:

전기 영동은 바이오니아(주)에서 제조된 Econo Sequencer ITM Electrophoresis System을 이용하여 아주 적은 차이점이 있는 DNA 염기서열 band를 확인하였다. 염색액 6 $\mu$ l에서 DDRT-PCR products을 혼합하여 100 °C에서 5분간 끓였다. 이것을 약 3 $\mu$ l mixture을 취하여 염기 서열을 관찰하는 gel에 넣어서 관찰하였다. 전기 영동에서 전개는 1600 V로 전개한 후에 xylen cyanol dye가 밑바닥까지 갈 때까지 전개를 시켰다. 전개된 염기서열을 가진 DNA band는 가장 감도가 높은 염색 용액인 Silverstar<sup>TM</sup> staining kit (Bioneer)을 사용하여 관찰하였다. 우선, silver staining은 기록된 방법으로 염색하고, 3차 증류수로 2-3회 희석 혹은 다른 잡물질이 없도록 깨끗이 세척하였다. 이때 새롭게 만들어진 PCR증폭한 cDNA 산물은 다시 6% polyacrylamide gel에서 전개하여 관찰하였다.

#### 마. cDNA fragment:

표고 버섯의 조직에서 만들어진 RNA는 위와 같은 방법으로 모두 cDNA로 합성하였다. 그리고 사용된 특수 primer로 합성된 band는 날카로운 칼로 오려내어, 다시 DNA추출과정을 통하여 재 정제하였다 (Reeves et al., 1999). 정제된 cDNA는 다시 희석하여, 20 $\mu$ l PCR mixtures (Bioneer)을 이용하여, PCR reactions을 하여서, DNA band를 재합성하여 앞으로의 실험을 위하여 사용하였다. 이때 사용한 PCR 조건은 위에서 언급한 바와 같이 같은 종류의 primer와 반응 조건을 이용하여 실험을 진행하였다.

#### 바. DNA 염기서열분석:

표고 버섯 조직에서 발견된 유도 유전자로 생각되는 DNA 조각은 계속하여 PCR 반응을 통하여 증폭시킨 후에 일반적으로 사용하는 pRIP-TTM vector system와 E. coli DH 12S (Bioneer)를 이용하여 cloning을 하였고, cloning된 것은 일반적으로 알려진 DNA sequencing 방법으로 분석하였다 (Ausbel et al., 1998). 분석된 염기 서열은 같은 유전자를 파악하기 위하여, BLASTX at the National Center for Biotechnology Information and at the National Institute of Health 에 컴퓨터 조회를 통하여 유전자에 대한 정보를 얻었다 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul et al., 1990). 또한, 이러한 유전자가 표고 버섯의 조직에 있는 것을 재확인하기 위하여 Northern Hybridization을 하여 확인하였고, 이는 slot blotting 방법을 통하여 실험하였다 (Sambrook et al., 1989).

### 3. 결과

#### 가. 생장:

한국에서 판매 혹은 일반적인 표고 생산을 위하여 사용되는 20개의 품종 중 (3장 제1절)에서 툽밥 재배 혹은 통나무 재배용으로 가장 무난하고, 고온에서 자실체를 형성하는 균 품종인 입협-1 (ImHyup-1) 를 선발 시험하였다. 이것은 또한 오래 동안 한국 표고 생산을 위하여 많이 사용되어져 온 것이고, 가능한 툽밥 배지에서도 가장 잘 자라는 균으로 다른 어떤 품종보다 포고 생산을 위한 용이한 균으로 알려졌다. 액체 배양을 통하여 종균은 집중되고, 비닐 백을 이용한 툽밥 재배에서는 거의 1-1.5개월만에 균사 성장은 완료되었고 (D in Fig.1), 이들은 다시 암실에 넣어서 표면의 갈변화를 시켰으며, 약간 온도를 낮추고, 또한 습기를 보충하여, 원기 생성을 유도하였다. 이러한 과정은 약 종균 집중 후에 2 - 2.5개월 동안의 과정으로 단계별로 원기 형성과 버섯 자실체 형성이 이루어졌다 (Fig.3-3).

#### 나. RNA bands:

각각의 표고 조직에서 분리된 동일량의 RNA ( $1\mu\text{g}$ )는 위에서 언급한 4개의 four

arbitrary primers 와 three 3' one anchored oligo-dT primer combinations 을 이용한 것으로 만들어진 RNA의 유전자를 DDRT-PCR 반응으로 찾아내는 방법을 설명한 것이다 (Fig.3.4 & 3.5). 각각의 조직에서 나타나지 않은 유전자를 구별하기 위하여, 처음은 1.5% agarose gel에 loading하여 보았으나, 구별되지 않아 6.0 % polyacrylamide gels 에서 다시 전개하여 보았다. 여기서 감도가 높은 염색을 사용하여 본 결과 서로의 gel 에서 차이점을 나타내는 네개의 band를 F-series로 표시하였다 (F series; the bands marked in the left of Fig.2). 여기서 표시된 F-01는 원기와 군사 조직에서 나온 것이고, F-02는 군사 조직에서만 유래되는 유전자이다. 여기서 밝혀진 F-05, F-09 F-11과 F-17은 각각의 표고 조직인 원기 및 자실체에서만 발견되는 밴드로 가능한 원기형성 및 자실체 형성에서 유도되는 유전자로 가정한 후에 실험을 하였다. 표-3.5와 같이 약 20개의 DNA fragment를 가능한 자실체 혹은 원기 형성 때에 유조되는 유전자로 유도 m-RNA로 간주하여 실험을 진행하였다. 여기서 특히, F-14와 는 F-18와 F-03함께 비교하기 위하여 선발되어 실험을 진행하였다.

각각의 표고 조직에서 추출된 mRNA와 임의로 저장된 primer을 반응에서 얻어진 DNA 조각들은 표-3.5에서 표시하였다. 그림 3.4와 3.5에서 보인 다른 유도 유전자로 인식되는 19개의 염기서열 조각들 (F-series)을 관찰하였고, 표-3.5 로 정리하였다. 정리된 염기서열의 조각은 재 확인하기 위하여,그림-3.6과 같이 재반응을 시켜서 확인하여, 표고 조직에서 발견되는 3개의 유전자와 군사에서만 발견되는 1개의 유전자를 선택하여 다음 실험을 하였다.



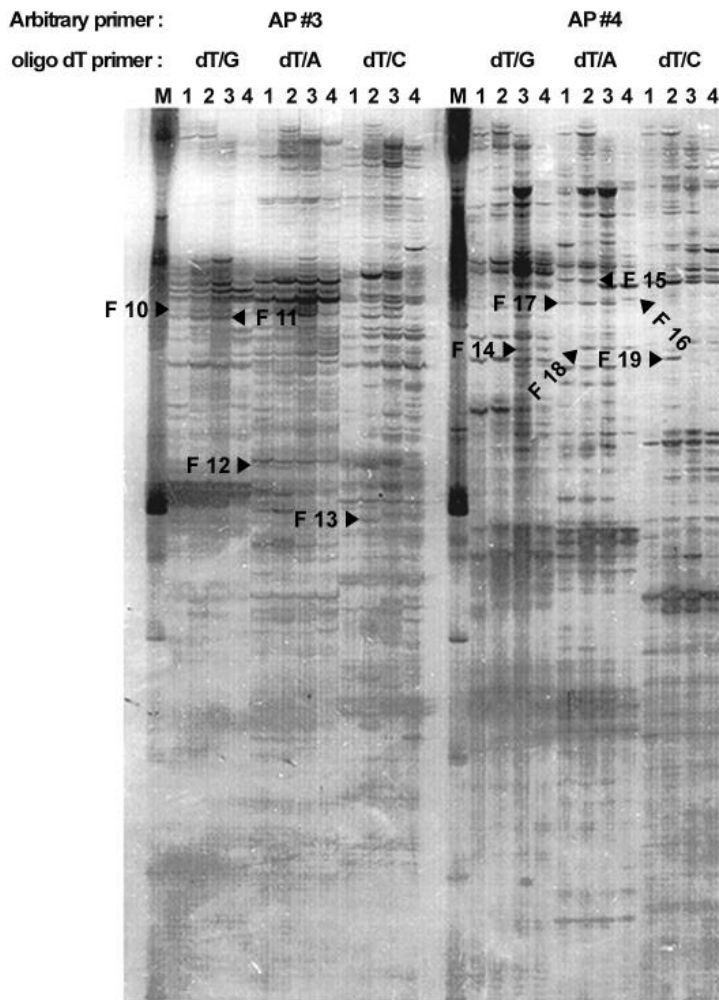


Fig.3-4. Differential display of total RNA from the three development stages and different tissue types of *L. edodes* using the arbitrary Primer AP #1 and AP #2. The DDRT-PCR bands were displayed on 6% polyacrylamide gel stained with the silver staining method. Marked (M): marker (100bp ladder), 1: Fruiting body Pileus, 2: Fruiting body Stipe, 3: Primordia, 4: mycelia, respectively.

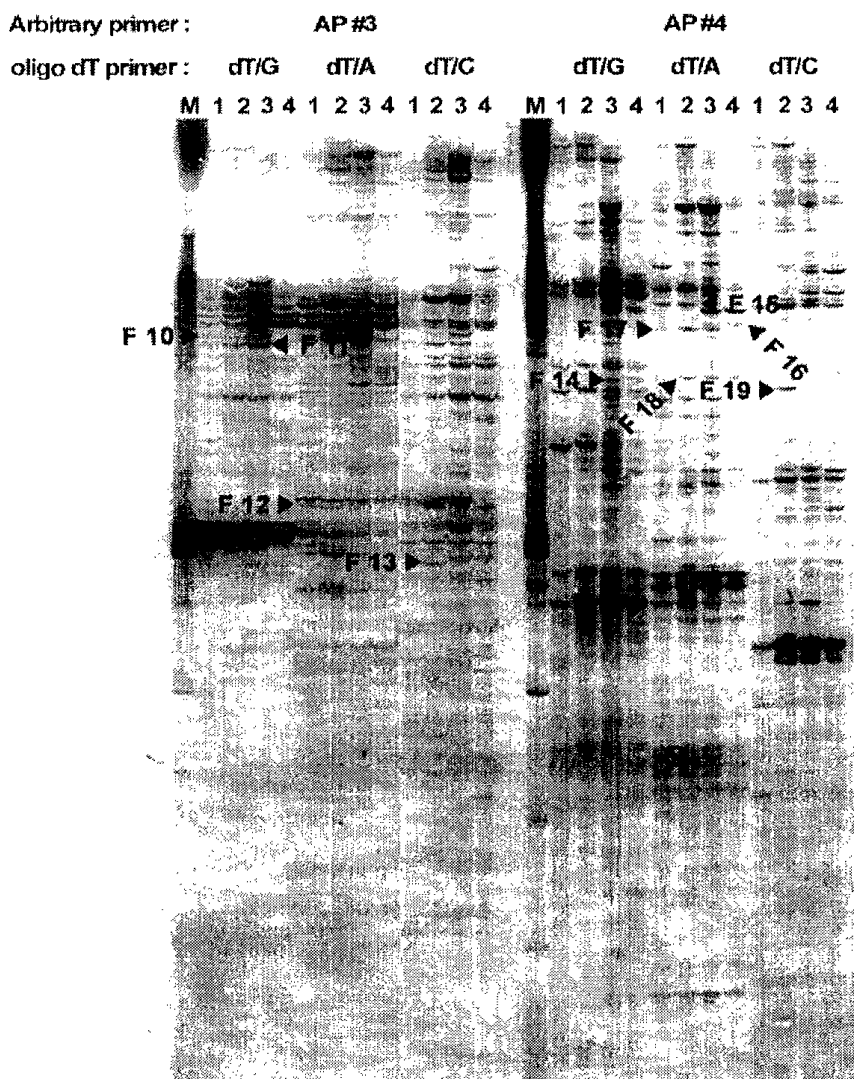


Fig.3-4. Differential display of total RNA from the three development stages and different tissue types of *L. edodes* using the arbitrary Primer AP #1 and AP #2. The DDRT-PCR bands were displayed on 6% polyacrylamide gel stained with the silver staining method. Marked (M): marker (100bp ladder), 1: Fruiting body Pileus, 2: Fruiting body Stipe, 3: Primordia, 4: mycelia, respectively.

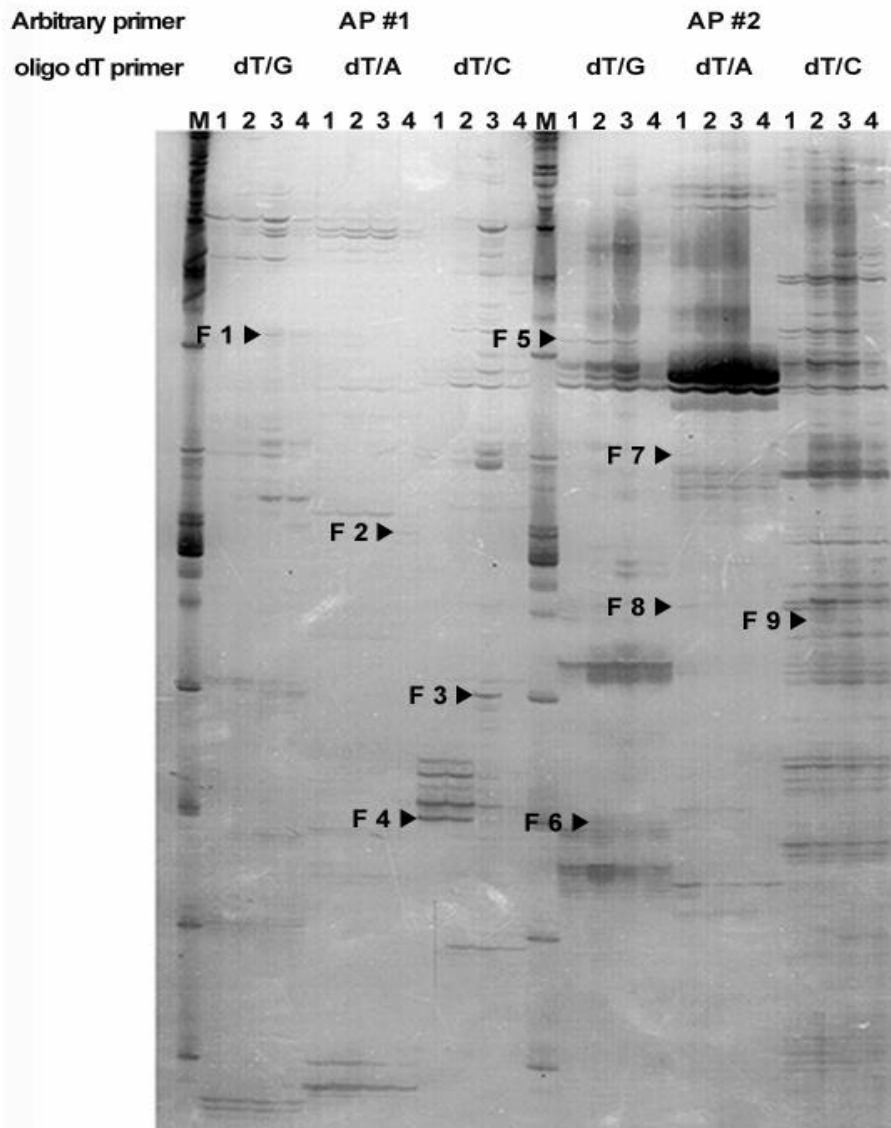


Fig.3-5. Differential display of total RNA from the three development stages and different tissue types of *L. edodes* using Arbitrary Primer AP #3 and AP #4. The DDRT-PCR products were resolved on 6% polyacrylamide gel, stained with Silver staining method. Marked M: the marker (100 bp ladder), 1: Fruiting body Pileus. 2: Fruiting body Stipe. 3: Primordia. 4: mycelia. respectively.

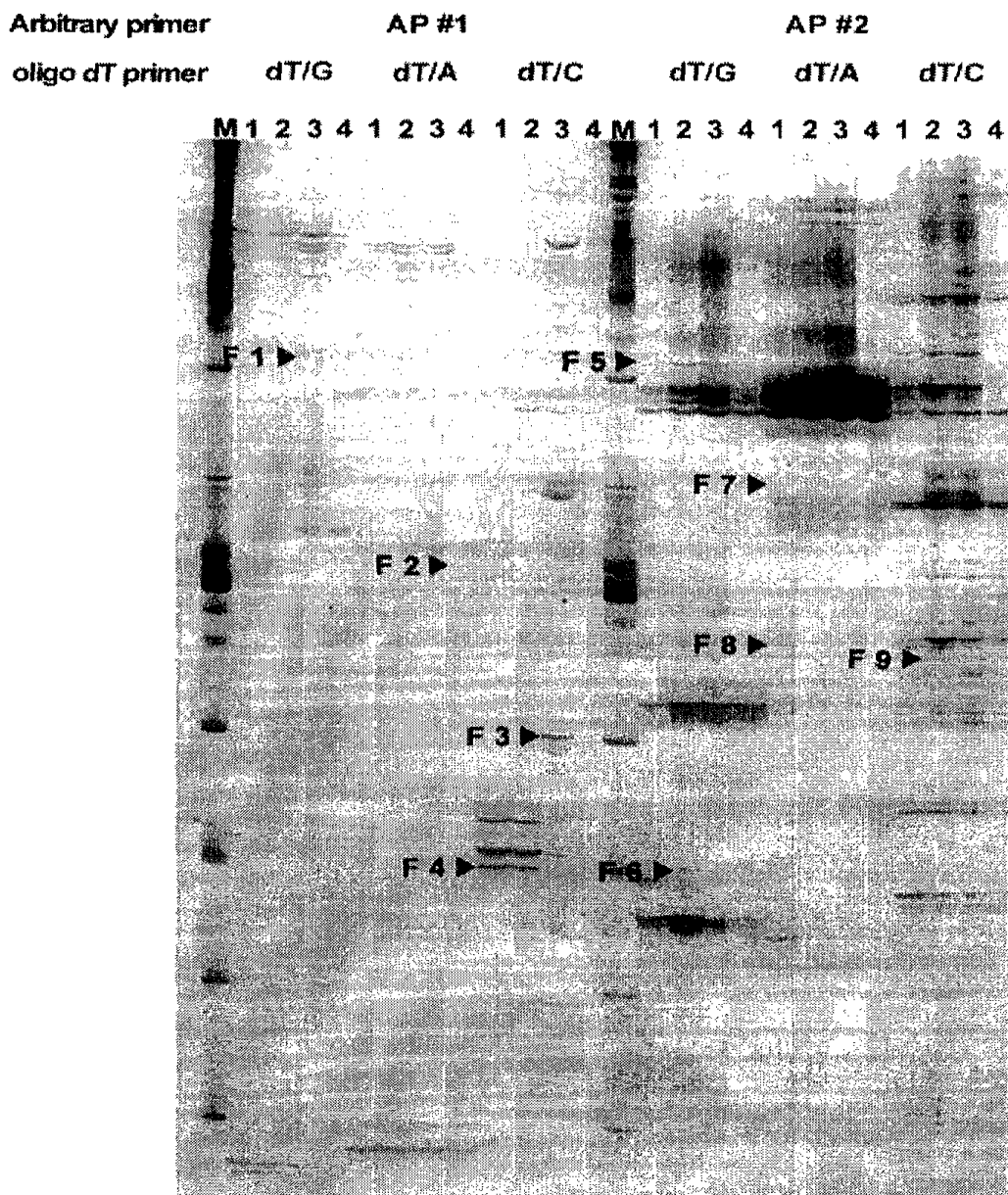


Fig.3-5. Differential display of total RNA from the three development stages and different tissue types of *L. edodes* using Arbitrary Primer AP #3 and AP #4. The DDRT-PCR products were resolved on 6% polyacrylamide gel, stained with Silver staining method. Marked M: the marker (100 bp ladder), 1: Fruiting body Pileus. 2: Fruiting body Stipe. 3: Primordia. 4: mycelia. respectively.

Table 3-5. The fragments of gene differentially expressed and determined.

Fragments	Primer combination		Molecular Weight <sup>a</sup> (bp)	Expression stage and tissue			
	Arbitrary primer	Oligo-dT primer		Pile up	Stip e	Primordia	Mycelia
F 1	AP 1	dT/G	-b			○	○
F 2	AP 1	dT/A	-				○
F 3	AP 1	dT/C	150			○	
F 4	AP 1	dT/C	110	○	○		
F 5	AP 2	dT/G	-	○	○	○	
F 6	AP 2	dT/G	-		○		
F 7	AP 2	dT/A	-	○			
F 8	AP 2	dT/A	-	○	○		
F 9	AP 2	dT/C	160	○	○	○	
F 10	AP 3	dT/G	320	○	○	○	
F 11	AP 3	dT/G	-	○	○	○	
F 12	AP 3	dT/A	240	○	○		
F 13	AP 3	dT/C	230		○		
F 14	AP 4	dT/G	300			○	○
F 15	AP 4	dT/A	-	○	○		
F 16	AP 4	dT/A	160				○
F 17	AP 4	dT/A	330	○	○	○	
F 18	AP 4	dT/A	300		○	○	○
F 19	AP 4	dT/C	300		○		

a) Re-amplified Molecular weight

b) Re-amplification band was not shown.

#### 다. Sequence:

위에서 언급한 바와 같이 DDRT-PCR를 통하여 생성된 DNA 조각들은 두개의 다른 primer를 이용하여 재 합성하였으며, 이들의 순도를 확인하기 위하여 1.5 % agarose gels에서 loading하였다 (Fig.3-6). 염색을 통하여 확인된 DNA 조각 (DDRT-PCR fingerprints; F-03, F-14 & F-18)은 특히 선정된 3개의 조각은 염기 서열에서 약 110-330 bps의 길이를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 조각을 확인된 5개의 조각을 pRIP-TTM vector 인 cloning kit을 이용하여 염기 서열을 조사하였다. 이때에 200 bps을 기준으로 분석하였고, 표-3.6 같이 나타났다. 한 예로 F-3 DNA 조각은 분석된 bps에서 140 bps가 A/T rich로 나타났으며, F-18 DNA 조각은 190 bps가 C/T rich로 나타났다 (표 3-6). 대표적을 표시한 이러한 DNA 조각은 다른 것에 비하

여 상당히 다른 형태의 A/T 혹은 C/G가 많이 포함된 DNA조각으로 판단되었다. 염기서열이 확인된 DNA조각은 BLAST search program에 들어가서 같은 종류의 염기서열을 가진 연구된 유전자 혹은 기본적인 성격을 파악기 위하여, 조사를 하였다 (BLASTX: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 여기서 분석된 염기서열은 어떠한 것도 완전히 일치하는 것이 없었고, 부분적으로 15-25 bps가 일치되는 것이 몇 개 관찰되었다. 한 예로 intron 유전자로 생각되는 염기서열 조각들이 발견되었으며, 이들은 모두가 prokaryotic cells에서 유래되는 것보다는 eukaryotic cells에서 유래된 유전자로 나타났다. F-18 의 염기서열 조각은 intron genes (repeating regions)과 부분적으로 일치하고, 구조적인 유전자인 structural genes (exon) of Human DNA sequences (HSJ1050K3) 가 비슷한 것으로 나타났다.

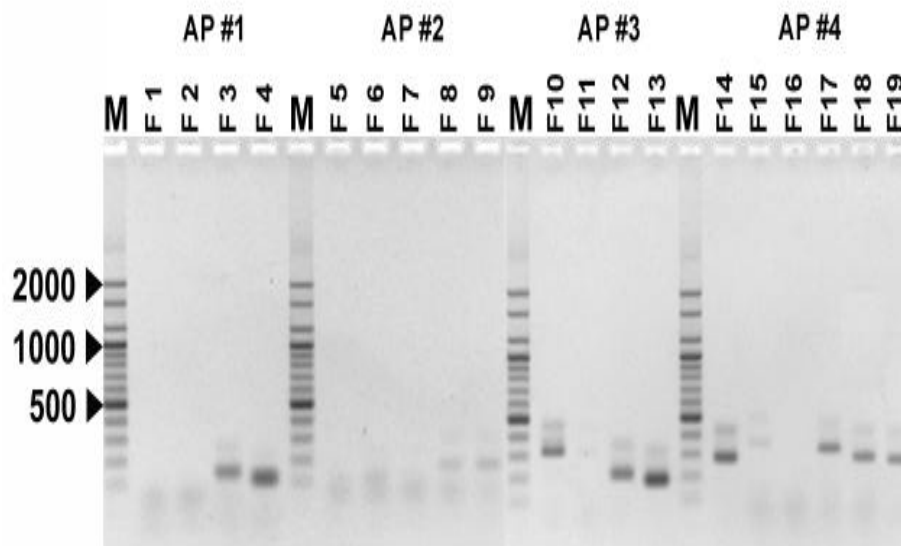


Fig.3-6. The re-amplified band-products differentially expressed by *L. edodes* on 1.5% agarose gel. The differentially expressed bands were picked up from the polyacrylamide gel. Marked M: marker (100bp ladder).

여 상당히 다른 형태의 A/T 혹은 C/G가 많이 포함된 DNA조각으로 판단되었다. 염기서열이 확인된 DNA조각은 BLAST search program에 들어가서 같은 종류의 염기서열을 가진 연구된 유전자 혹은 기본적인 성격을 파악기 위하여, 조사를 하였다 (BLASTX; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 여기서 분석된 염기서열은 어떠한 것도 완전히 일치하는 것이 없었고, 부분적으로 15-25 bps가 일치되는 것이 몇 개 관찰되었다. 한 예로 intron 유전자로 생각되는 염기서열 조각들이 발견되었으며, 이들은 모두가 prokaryotic cells에서 유래되는 것보다는 eukaryotic cells에서 유래된 유전자로 나타났다. F-18 의 염기서열 조각은 intron genes (repeating regions)과 부분적으로 일치하고, 구조적인 유전자인 structural genes (exon) of Human DNA sequences (HSJ1050K3) 가 비슷한 것으로 나타났다.

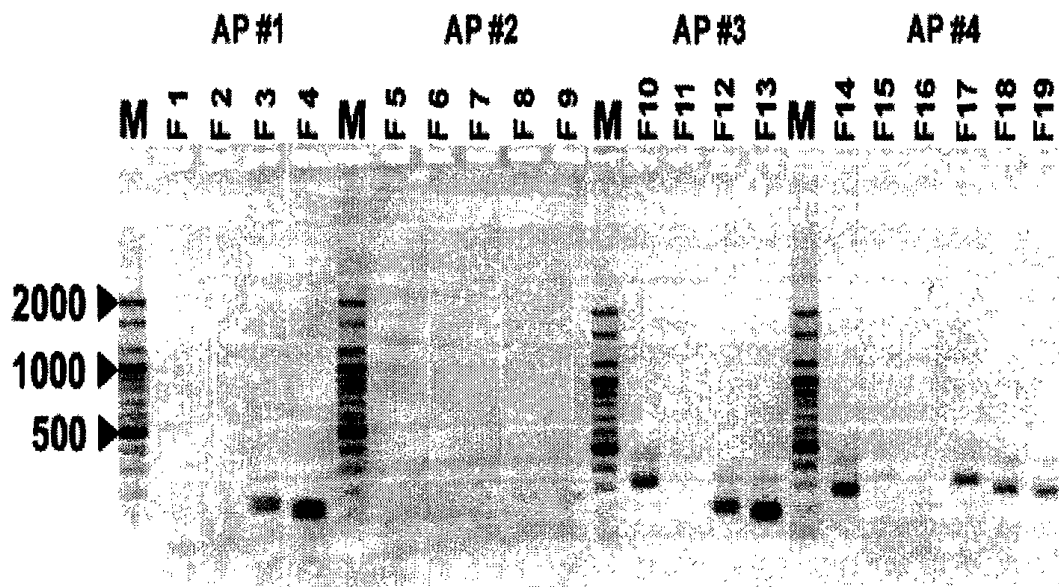


Fig.3-6. The re-amplified band-products differentially expressed by *L. edodes* on 1.5% agarose gel. The differentially expressed bands were picked up from the polyacrylamide gel. Marked M: marker (100bp ladder).

Table 3-6. The DNA sequences of the bands obtained from DDRT-PCR.

Clones	Sequences (bps)	
	Length	The sequences determined
F 3-1	140	aagcttgattgccaatgtgaggaagggttcctggcaattgtattaatccaggagtaagtcgatcttaa aaccagtcctaaagggtaataaggccatatattattataatctctgatggtgaaaaaaaaa
F 3-2	121	aagcttttttttcaaccatcaggaatataaatttaataatatttcttattgacccttaggactggt ttaagatcgacctactcctggattaatacaattgccaggaacc
F 14-1	143	aagcttttttttggcatacatcaggagtaattattgacaagtagtgccaaattggataaatatggtc aagcaatattatgcattaagtatacggtagcatatgtgcttgaacaagagaatagctctcatcaacc
F 14-2	165	aaagaagctatggatgaagggggaattcgatgaagatgagcatgacgaatagctatgacgacga cgacgatgagcgggtgccggagggtggacacaaggtgatgagagctatttctctgtttccaacacatatt ctaaccgtatacttaaatgcataaatatt
F 18	199	gaattcactagtgattaagcttctcaacgtgctgcctcagcttcgttaccctacaggaactctcctata cactatgcaaatctcgggagagtgccatccaaccctcatcaggaaccaattctgcaccttgaag gattggaatctcagtctacaaaacaggaacaggtggatgaaaagccgctcacttaag

The poly A tails underlined. The black box represented 3' UTR region. Direction 5' → 3'.

Table 3-7. The DNA sequences of the five fragments compared with the other genomic sequences obtained from the the BLAST searchings.

	Code number	The organisms and some descriptions	Homology sequences
F 3-1	gb U69572.1 CPU69572	Mitochondrion Culex pipiens A+T rich m	97→119: 636 atatattataaatttatatt 658
	gb U41277.1 CELC06E4	Caenorhabditis elegans cosmid C06E4	99→119: 15414 atattataaatttatatt 15394
	gb AE003442.1 AE003442	Drosophila melanogaster genomic scaf	97→116: 167763 atatattataaatttatatt 167782
	gb AC004845.2 AC004845	Homo sapiens clone RP4-63505, comple	97→120: 50459 atatattataaatttatattc 5048
	gb AC004749.1 AC004749	Homo sapiens chromosome 5, P1 clone	96→115: 36497 catatattataaatttata 36478
F 3-2	gb U69572.1 CPU69572	Mitochondrion Culex pipiens A+T	27→49: 658 aatataaatttaataatatt 636
	ref NC_001993.1	Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus	27→51: 24133 aalatataaagtaataatattt 24109
	gb AF063866.1 AF063866	Melanoplus sanguinipes entomopoxviru	27→51: 24133 aalatataaagtaataatattt 24109
	gb U41277.1 CELC06E4	Caenorhabditis elegans cosmid C06E4	27→47: 15394 aatataaatttaataalat 15414
	gb AE003442.1 AE003442	Drosophila melanogaster genomic scaf	30→49: 167782 atataaatttaataatatt 167763
F 14-1	8 gb AE003528.1 AE0031952	Drosophila melanogaster genomic	75→95: 281829 gcaatattatgcattaagta 281849
	gb AC006075.1 AC006075	Homo sapiens chromosome 16	108→128: 155819 atglgcttgaacaagagaaa 155799
	gb U73649.1 U73649	Human Chromosome 11 Cosmid	103→123: 21689 agcatatglgcttgaacaag 21669
	gb U61947.1 CELC06G3	Caenorhabditis elegans cosmid	25→43: 1920 aggagtaatttatgacaa 1938
	gb AC012446.2 AC012446	Homo sapiens clone RPI1-101A12	64→85: 71654 aatatggtaagcagatttat 71633
F 14-2	gb J05161.1 LUMHBC	Earthworm (L.terrestris) extracellular	50→74: 1111 atgactatgacgacgacgatga 1135
	emb AJ249549.1 EMU2495	Echinococcus multilocularis	12→39: 2295



	49		ggatgaaggggaattc gatgaggatgag 23
	ref NC_001139.1	Saccharomyces cerevisiae chromosome VII	50→74: 70202 atgacgatgacgacgacgacgatga 70226
	W emb Z72749.1 SCYGL227	S. cerevisiae chromosome VII	50→74: 872 atgacgatgacgacgacgacgatga 896
	dbj AB025323.1 AB025323	Eptatretus burgeri mRNA	36→68: 862 tgaggatgacgaagatgacgatgacgacgacga 894
F 18	0 emb AL365234.1 ATT30N2	Arabidopsis thaliana DNA chromosome	68→87: 16388 tatacacttatgtcaaatct 16407
	emb AL121776.1 HSJ1050K3	Human DNA sequence	170→189: 74436 aacagggtggatgaaaagccg 74455
	gb AC009541.16 AC009541	Human Chromosome 7 clone	147→165: 80344 ggaalctcagtcacaaaa 80362
	gb AC002352.1 AC002352	Homo sapiens 12q24 PAC P256D10	129→147: 6002 tgcaccttgaaggattg 6020
	gb AC005255.1 AC005255	Homo sapiens chromosome 19	138→160: 92056 gaaggattggaatcacagicta 92034
The fragments synthesized were compared with the genes informed from the GeneBank			

#### 4. 고 찰

표고버섯 중 입협-1은 일반적으로 높은 온도에서 빨리 자라는 균으로 알려져 있다. 약재 종균을 접종하여 균사의 성장을 일반 톱밥배지에서 짧은 시간 내에 성장시켰다. 여러 가지 조건에서 혹은 다양한 환경에서 표고의 발이가 된다고 실험을 하였으나, 명확하고 확실한 이론은 아직 없다. 여기서는 암실과 온도 충격을 통하여 습도를 충분히 공급함으로 자실체를 유도하였고, 이는 약 균사 성장 1 - 1.5개월과 갈변화 과정 0.5-1.0개월을 합한 2.0-2.5개월이란 시간이 소요되었다 (Fig.1). 그림에서 보는 것 같이 균사의 성장과 균사에서 원기 생성 및 자실체의 줄기 및 갓의 조직은 서로서로 형질을 표현하는 기질이 다른 어떤 유전자에 지배를 받은 결과로 생각하였다. 그래서 각각의 조직에서 RNA를 직접 분리하고, 순수분리를 하였다. 여기에서 서로 다른 유전자가 표고의 자실을 유도한다고 생각하여 실험을 진행시켰다. 그림에서 보는 것 같이 많은 유전자들이 나타났고, 이들은 각각의 RNA분석을 위한 특수한 DDRT-PCR 분석을 위하여 선발된 특수 primer를 사용하였다. 표고의 유전자 발이와 관련된 많은 유전자가 AP primers와 oligo primers T/C의 end primers 에 의하여 나타났다. 여기서 나타난 유전자들에서 본 실험 조건에 알맞은 것을 선발하여 사용하였으나, 나온 염기서열 조각의 유전자는 앞으로 다른 연구에 필요한 것으로 생각된다 (Tables-3.5 & Fig.3-4 & 3-5). 여기서 나타난 유전자들은 균사 성장에서는 비교적 다른 상태에 비하여 낮은 유전자 수를 보이고, 원기 형성과 갓 및 줄기에서는 많은 유전자 band가

확인되었다. 이러한 결과는 단순한 균사의 성장은 구조가 복잡한 자실체의 구조에 더 많은 유전자가 발현될 것으로 생각되는 것과 일치되는 내용이었다. 선발된 염기서열 조각 (F3, F14, and F18) 은 염기서열 분석을 위하여 선택되었고, 가능한 자실체 발현에 관련된 염기서열의 유전자를 확인하여 가정하였다 (Table 3-5). 여기서 분리된 F-3과 F-14 DNA 조각에서 순도 및 염기서열의 크기를 확인 작업 과정에서, 두개의 band가 확인되었고, 이들을 모두 합하여 5개의 DNA조각으로 가정하여 염기 서열을 분석하였다. 우선, 그림-3.5 에서 보이는 각각의 DNA 염기서열 조각은 서로 다른 크기로 나타났기에 서로 다른 유전자로 생각하고 분석하여, F3-1은 140 bp와 F3-2 는 121 bps로 분석되었다 (Table 3-6). 여기서 나온 결과에서 비록 6 % polyacrylamide gels에서 같은 종류의 band 일지라도 서로 다른 종류의 염기 서열을 가진 유전자가 포함될 수가 있는 것으로 나타났다 (Fig.3-4 와 3-5).

현재, 우리가 하는 실험에서 표고 버섯의 자실체 발이는 톱밥 재배 당시에 어떤 조건에서 발이가 되는지 또는 발이하는 유전자를 파악하여, 아무 때나 표고버섯을 생산하고자 실험을 진행하였다. 그리고 위의 분리된 유전자가 실제 실험 과정 속에서 잘못된 것으로 만들어진 것인가 혹은 진짜 조직속에서 나온 유전자인지를 파악하기 위하여, Northern blot 혹은 PCR methods으로 재 확인하였다 (Fig.3-7). 현재 버섯 조직에서 분리된 RNA에서 만들어진 유전자는 BlastX를 통하여 분석한 결과는 대부분이 intron에 관련된 유전자로 나타났다. 이들은 모두가 발현될 때에 만들어진 RNA로 생각되어지고 있다. 특히 다른 유전자는 구조 유전자인 exon으로 미토콘드라와 관련된 유전자로 나타났다 (gb|U69572.1 |CPU69572 Mitochondrion Culex pipiens A+T rich or gb|U41277.1 |CELC06E4 Caenorhabditis elegansThe fragments 참조). 또한, F-18의 DNA염기서열의 조각은 인간의 유전자와 비슷한 것으로 나타났다. 여기서 원기 형성에 관련된 유전자중 하나로 미토콘드라아에 있는 유전자는 이미 버섯의 발이 과정에서 산소의 공급이 필요하는 내용과 많이 일치되는 것으로 생각된다 (Zhang et al., 1998). 이러한 것은 아직 많은 것이 밝혀지 않은 내용으로 앞으로의 연구에서 중요한 내용으로 생각된다.우선 우리 실험에서 사용한 DDRT-PCR방법과 다른 유전자 선택 방법은 처음으로 사용한 기술로 앞으로 다른 버섯 연구에 중요한 구실을 할 것으로 생각된다.

## 5. 결론

표고(*Lentinus edodes*)의 톱밥 인공재배에서 자실체의 형성은 원목에서 자연적인 자실체의 형성과 비교는 상당히 중요하다. 실험을 위한 표고 한 품종 (ImHyup-1)은 인공 배양으로 톱밥 배지에 접종하였고, 자실체를 인위적으로 유도하였다: 표고 발이 단계는 4단계로, 균사체 (mycelia; D), 원기형성 (primordial, B), 자실체의 줄기 (stipes; C)과 갓 (pileus of fruiting bodies; A)로 나누어서 mRNA를 분리하였다. 이때 자실체 형성에 관여되는 여러 가지 유전자를 찾기 위하여, 임의의 primer를 사용하여 cDNA 합성을 하였다. 아가로스 젤에서 자실체에서 3개의 fragments of cDNA가 다른 형태의 band를 확인하였다. 이들은 각각 선정하여 DNA sequence을 분석하여 유전자를 찾고자 하였다. 만들어진 각각 the pRIP-TTM vector를 이용하여 cloning하여 분석하였다. 분석된 DNA 염기서열은 140-200 bps이었고, GeneBank (NCBI)를 조사하여 유전자를 검사하였다. 여기서 자실체를 유도하는 유전자를 분석한 결과는 알려진 유전자인 부분적으로 15-20bps만 일치되었고, 어떤 일치되는 유전자가 없어 단백질을 합성하는 유전자 (structural genes; exons)는 아닌 것으로 생각되었다. 이러한 결과를 놓고 볼 때에 여기서 나온 유전자는 조절하는 유전자 (introns)로 생각되었고, 다음의 연구의 표고의 발이에 관한 기본적인 연구로 중요한 것으로 생각된다.

## 6. 참고문헌

- AccPower™ RT PreMix. Bioneer Technical Manual.
- AccuPower™ PCR PreMix Kit. Bioneer Technical Manual.
- Econo Sequencer I™ Electrophoresis System. Bioneer Technical Manual.
- RNA PrepMate™ I kit. Bioneer technical Manual.
- Silverstar™ staining kit. Bioneer technical Manual
- Ayala, M, Balint, RF, Fernandez-de-Cossio, ME., Cannna-Hade, L. Larrick, JW, and Gavilondo, JV. 1995. New primer strategy improves precision of differential display. *BioTechniques*. 18: 842- 850.
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W., Myers, EW, and Lipman, DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 404-410.
- Ausubel, FM., Brent, R., Kingston, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA. and Struhl, K. 1999. Current protocols in molecular biology. USA.
- Bak, WC., Lee, TS., Byun, BH. and Yi, CK. 1996. Selective breeding and hybridization of *Lentinus edodes* strains for bed-log cultivation. *J. Korean For. Soc.* 85: 309-315.
- Bauer, D., Muller, H. Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P. and Strauss, M. 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21: 4272-4280.
- Benito, EP., Prins, T. and Kan, AL. 1996. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol. Bio.* 32: 947-957.
- Chiu, SW., Ma, AM., Lin, FC. and David, M. 1996. Genetic homogeneity of cultivated strains of shiitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 100: 1393-1399.
- Chang, ST. and Miles, PG. 1991. Recent trends in world production of cultivated mushrooms. *Mush. J.* 503: 15-18.
- Choi, KH., Choi, HS., Lee, CH., Kwon, YM. and Rhew, TY. 1997. Identification of

- genes induced by low temperature in rice. *J. Biochem. Mol. Biol.* 30: 292-295
- Diehle, DA. and Royse, DJ. 1991. Effect of substrate heat treatment on biological efficiency(BE) and size of a selected line of *Lentinus edodes*. in "Science and Cultivation of Edible Fungi", (ed. Maher, MJ) Balkema: Rotterdam. see pp. 517-521.
- Endo, H., Kajiwara, S., Tsunoka, S. and Shishido, K. 1994. A novel cDNA, *priBc*, encoding a protein with a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> zinc cluster DNA-Binding motif, derived from basidiomycete *Lentinus edodes*. *Gene* 139: 117-121.
- Haag, E. and Raman, V. 1994. Effects of primer choice and source of *Taq* DNA polymerase on the banding patterns of Differential Display RT-PCR. *Biotechniques*. 17: 226-228.
- Hiromoto, BT. 1991. Comparative analysis of Shiitake culture systems. in pp. 489-496: *Science and Cultivation of Edible Fungi*", ed. Maher, MJ. Balkema: Rotterdam. see.
- Hong, YM., Kwon, J. and Choi, SY. 1997. Molecular characterization of gene induced under heavy metal stress in yeast. *Proc. Mol. Biol. & Genet.* 12: 611-612.
- Kajiwara, S., Yamaoka, K., Hori, K., Miyazawa, H., Saito, T., Kanno, T. and Shishido, K. 1992. Isolation and sequence of a developmentally regulated putative novel gene, *priA*, from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *Gene* 114: 173-178.
- Kim, HK., Park, YH., Cha, DY. and Chung, HC. 1987. Studies on the artificial cultivation of *Lentinus edodes* on sawdust media. *Kor. J. Mycol.* 15: 42-47.
- Kociok, N., Unfried, K., Esser, P. Krott, R., Schraermeyer, U. and Heimann, K. 1998. The nonradioisostopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display. *Molecular Biotechnology* 9: 25-33.
- Kondoh, S., Muto, A., Kajiwara, S., Takagi, J., Saito, Y. and Shishido, K. 1995. A fruiting body-specific cDNA, *mfbAc*, from the mushroom *Lentinus edodes* encodes a high-molecular-weight cell-adhesion protein containing an Arg-Gly-Asp motif. *Gene* 154: 31-37.
- Leung, GS., Zhang, M., Xie, WJ. and Kwan, HS. 2000. Identification by RNA

- fingerprinting of genes differentially expressed during the development of the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 977-990.
- Lee, JY. 1988. Coloured Korean Mushrooms Vol. I . Academy. pp. 106
- Lee, SW., Tomasetto, C. and Sager, R. 1991. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 2825-2829.
- Lee, SS., Hong, SW., Jung, HC., Sung, CK., Kim, JH., Ka, KH. and Kim, HJ. 1999. The specific probes confirming the genomic DNA of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 27: 20-26.
- Lee, TS. Kang, HD., Bak, WC., Yi, CK and Min, DS. 1996. Electrophoretic profiles of proteins from the mycelia and fruiting-bodies of *Lentinus edodes* strains in Korea. *FRI. J. For. Sci.* 54: 207-213.
- Lee, TS., Bak, WC., Kang, HD., Kim, SK., Byun, BH., Yi, CK., Lee, WK. and Min, DS. 1997. Classification of Korean *Lentinula edodes* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Kor. J. Mycol.* 25: 219-225
- Lee, TS., Yoon, GH., Park, WC., Kim, JS. and Lee, JY. 2000. New cultivation techniques of oak-mushroom. Forest Research Report. Korea Forest Research Institute.
- Liang, P. and Pardee AB. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, RP., Averboukh, L., Wang, F. and Pardee, AB. 1994. Differential display using one base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* 22: 5763-5764.
- Ng, WL., Ng, TP., and Kwan, HS. 2000. Cloning and characterization of two hydrophobin genes differentially expressed during fruit body development in *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiology Letters.* 185: 139-145.
- Park, WM., Song, CH and Hyun, JW. 1992. Nutritional physiology and improvement of substrate of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* 20: 77-82
- Park, WM., Ko, HG., Park, RJ. Hong, KS. and Kim, GH. 1997. Differentiation of

- Lentinus edodes* isolates in Korea by isozyme polymorphisms and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Kor. J. Mycol.* 25: 176-190.
- Reeves, SA., Rubio, M. and Louis, D. 1994. General Method for PCR Ampification and Direct Sequencing of mRNA Differential Display Product. *BioTechniques* 19: 18-20.
- Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Song, CH., Cho, KY. and Nair, NG. 1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia.* 79: 866 - 876.
- Yoo. CH., Cho, NS., Cho, SM. and Chon, CS. 1998. Pyogo in "Mushroom Science", (ed. Sung, JM., Yoo, YB. and Cha, DY.) Kyp-Hak Pub. Inc. see pp. 393-432.
- Zhang, M., Xie, W., Leung, GS, Deane, EE, and Kwan, HS. 1998. Cloning and characterization of the gene encoding beta subunit of mitochondrial processing peptidase from the basidiomycetes *Lentinula edodes*. *Gene.* 206: 23-27.

### 제 3 절 다양한 한천 배지에서 목질 분해률과 톱밥 배지에서 표고 발이 과정

#### 1. 서설

우리나라와 일본 중국에서 표고 재배에 가장 큰 어려움은 싸고 좋은 원목을 구하여 생산비를 낮추고, 표고의 생산량을 올리는 일이다. 우리나라에도 원목 생산이 모두 외국에서 수입하는 관계로 원목 재배보다는 톱밥 재배가 미래의 표고 생산에 중요한 것으로 간주되고 있다. 현재 일본에서는 톱밥 재배된 표고가 식용으로 사용하기에 좋고, 높은 가격에 팔리고 있으나, 저장성의 문제에 직면해 있는 것으로 알려져 있다. 중국 상하이 표고 연구실은 모두가 톱밥으로 원목형을 만들어서 표고를 접종하여 재배하는 것을 보았으며, 어떤 면에서 톱밥 재배에 관련된 연구는 우리보다 앞선 기술을 갖고 있는 것으로 이해된다. 아직 이에 대한 표고의 톱밥 기질에 대한 연구는 표고의 육종과 사용하는 기질의 가격이 큰 문제가 되고 있다. 우선 참나무 톱밥은 계속하여 가격이 폭동하여, 버섯 생산에 문제가 되고 있고, 버섯 재배에 참나무 톱밥만 기준으로 사용함으로 이러한 현상이 나와 참나무 톱밥 구입을 과거 십년 전에 비하여 10배가 올랐다. 생산량은 그의 동일한 반면에 종균 생산과 함께 다른 버섯의 재배와도 함께 나온 결과로 앞으로 원목과 톱밥 생산에도 중요한 과제로 생각된다. 이러한 면에서 표고 생산에 중요한 기질의 공급은 다른 어떠한 첨가보다 중요하고, 대체 기질 톱밥에 관한 연구는 앞으로 과제로 생각된다.

우리 나라에서는 참나무 수종이 많이 있고, 이들은 수종에 관계 없이 참나무 톱밥으로 사용되고 있다. 그러나 사용되는 참나무 톱밥에 대한 화학적인 분석은 비슷하여도, 생물인 버섯 균의 사용에는 생물학적인 어떤 화학적 혹은 물리적인 구조가 다를 것으로 육종의 연구에 필요한 연구 단계로 생각되어진다. 화학적인 분석은 잘 알 수가 없으나 버섯의 재배에 참나무의 수종은 중요한 과제로 생각된다. 일본의 경우는 참나무 보다는 우리나라에 많지 않은 수종인 너도밤나무를 많이 이용하여 표고버섯 재배를 하고, 우리와는 다른 환경에서 표고를 재배하고 있는 실정이다. 이러한 면에서 우리나라에 자생하는 흔한 수종인 참나무와 다른 수종에 대한 표고버섯 균의 성장과 분해율에



대한 연구는 중요하다고 생각된다. 또한, 표고버섯의 톱밥 재배에서는 미강을 혼합하기 때문에 어떤 조건에서 어떤 톱밥이 잘 분해되는 가는 앞으로 표고 육종 연구에 중요한 기초적인 자료될 것으로 생각된다. 우선, 질소원과 비타민원과 관련되는 첨가물의 혼합이 참나무 톱밥에서 표고의 성장에 미치는 영향력의 자료가 필요한 상황이다. 이러한 연구는 아주 기본적인 연구로 앞으로의 연구에 필수적인 자료가 될 것으로 생각된다.

본 실험에서는 여러 가지 다양한 표고 균주를 이용하여, 여러 수종의 톱밥을 이용하여 나무의 고분자물질의 분해율을 관찰하였다. 우선, 다양한 배지 환경에서 나무의 분해율에 대한 것을 다른 느타리버섯과 노루궁뎅이 버섯을 이용하여 비교 실험을 하였다. 이는 우선, 만들어진 표고의 균사의 능력 파악과 어느 수종에 잘 자라고 또한 어떤 환경에서 성장하는가를 비교 실험한 내용으로 표고균은 다른 느타리 균과는 다른 생리적인 차이점이 관찰되었다

## 2. 실험재료 및 방법

### 가. Wood-chip의 확보

충북대학교 농과대학 부속연습림(월악산)에 자생하는 20-30년 생의 갈참나무, 오리나무 및 굴참나무를 채집하여 wood-chip을 만들었다. 소나무와 아까시나무는 한국교원대학교 주변에 자생하는 20-30년 생의 나무를 잘라서 wood-chip을 만들고, 미루나무는 거친 톱밥을 구입하여 사용하였다. Wood-chip은 0.5-1.0 cm의 크기의 조각을 건 중량을 측정하여 200-500 mg정도 되는 것을 선별하여, 완전 열처리를 통하여 멸균하고, 무게 측정하여 사용하였다. 열처리는 알미늄 포일에 감싸 보관하였고, 각각은 언급된 한천 배지에 넣어서, 표고 균사를 접종하여 3개월간 배양하였다. 균사가 나무 조각에 완전히 덮고 성장하는 것을 확인하였다.

### 나. 사용된 균주(교배종):

일반적으로 담자낭에서 얻어진 담자낭 포자를 순수 분리하여 저장하였다가 계속하여 PDA에 배양하여 다른 담자낭 포자끼리 결합시켰다. 사용된 균사는 아래와 같고, 계속하여 교배하여 아래와 같은 균사를 얻었다, 이는 최소한 한 품종에서 30-40개의

단포자를 얻어서 참나무 톱밥 추출 용액에서 성장이 빠른 것을 선발하여 각각 성(tetrapolar)를 파악하고, 이들을 무작위로 교배시켜서 아래와 같은 균사를 얻었다. 시중에서 얻은 톱밥을 이용한 실험에는 구 임협에서 분양받은 임협-1 (*Lentinus edodes*; L-1)를 사용하였다.

1) 표고 품종 K1-5×L6-5 (B): 2) K1-5×L6-21 (E): 3) K1-17×L6-6 (G): 4) K1-5×L6-3 (H): 5) L1-5×L6-13 (I): 6) K1-4(L6-3 (J): 7) K1-4×L6-15 (K): 8) 일본 Kitamoto-110: 9) 일본 Kitamoto-005: 10) 일본 Kitamoto-096

1) 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*; Dikaryotic mycelia; JungBu SuHan)

1) PO-RD (Rice straw 5×33) 2) PO-RC (Rice straw 11×16) 3) PO-RF (Rice straw 10×15) 4) PO-B1 (Oak wood 8×6) 5) PO-B3 (Oak wood 3×9) 6) PO-B4 (Oak wood 1×6) 7) PO-B5 (Oak wood 4×6)

2) 노루궁뎅이 (*Hericium erinaceum*) : 중국에서 분양받음 C-002, C-911 (상하이표고 연구원에서 구입함)

여기서 일본 표고 균주는 일본 도토리 대학교에 팽이버섯 연구자인 Dr. Kitamoto 박사에게 분양 받은 것으로 비교 실험하기 위하여 사용하였다. 그리고 느타리는 직접 시중에 판매되는 느타리의 우수한 품종에서 분리된 표자를 교배시킨 것을 한 모 자실체에서 포자를 받아서 임의적으로 mating시킨 것이다. 노루궁뎅이 (*Hericium erinaceum*)는 중국 상하이 식용버섯 연구 센터에 구입한 것으로 현재 중국에서 인공 재배를 통하여 생산하고 있는 버섯이다.

#### 라. 생리적 특성실험:

일반적으로 교배에서 얻어진 균사를 다양한 나무 기질에 배양하여, 나무의 리그린 혹은 섬유소원의 분해량을 측정하는 실험이다. 수종의 종류는 아까나무, 굴참나무, 갈참나무, 미류나무, 소나무, 오리나무 조각에 위에서 언급된 교배된 균사를 접종하여 수종의 물질 이용량을 측정하여 균사의 성격을 파악하였다: 1) water agar (국산 한천, 2%), 2) 2% yeast extract water agar, 3) dry milk powder 5.7g/L의 water

agar 을 이용하여 표고 균사의 성장의 차이점 혹은 이러한 결과로 유전적인 차이점을 파악하기 위하여 실험을 하였다. 위의 물질을 각각 만들어진 배지에 나무 조각들 멸균하여 약 3개월동안 배양하여 균사에 의하여 사용된 무게 손실 (weight loss)을 중심으로 측정하여 균사의 생리적인 특징을 파악하였다.

### 3. 결과 및 고찰

가. 한천배지: 여러 수종의 나무의 분해율을 알아내고, 선발 균들의 능력을 파악하기 위하여 여러가지 환경을 인위적으로 만들었다. 우선, 한천 배지에 Yeast extract 와 Dry skim milk를 사용하였다. 영양분을 전혀 첨가하지 않은 water agar 와 다른 영양원을 첨가한 것으로, 비타민과 다른 영양원이 포함된 배지와 단백질을 풍부하게 넣은 배지를 만들어서 나무 lignocellulose의 분해를 파악하려고 하였다. 또한, 이들의 분리된 혹은 선택된 균사들은 대부분이 동일한 모체에서 생산된 포자들끼리 결혼 (mating)시킨 것으로 이러한 환경적인 변화에 어떤 적응 능력이 감지되고, 어떻게 그 분해율이 분산되어 나오는가를 파악하고자 하였다. 즉 다른 말로 균사들의 유전자를 쉽게 알 수 있는 방법이 아직 고안되지 않았기 때문에, 이러한 방법으로도 쉽게 유전자들의 차이점을 파악하고자 실험을 하였다.

분리된 혹은 선발된 표고의 균사는 모두 마곡사에 채집된 표고 (K-1)의 포자와 산림-5호 (L-6)의 포자를 교배시킨 것으로 실험실 상에서 자실체가 형성되는 것을 확인하였다. 현미경적 관찰에서 clamp connection 구분은 힘들어도, PDA상에 갈색 균사가 형성되는 것으로 보아, 자실체가 생성될 것으로 간주하고 실험하였다. 여기서 인위적으로 잘 알려진 느타리 균사와 노루궁뎅이 균사를 사용하여 표고 균사의 생리적인 차이점을 관찰하고자 하였다. 하나 특이한 것은 표고의 균사가 하나 같이 수종의 lignocellulose와 관계없이 Yeast extract 에서는 거의 분해가 되지 않았다. 그러나 water agar와 단백질을 첨가한 배지에서는 분해율이 높았다. 그러나 단백질 첨가에는 다른 어떤 배지 첨가 보다 높은 분해율을 나타내었다. 배지에 따른 나무 분해는 뚜렷하였고, 가장 많이 분해되는 것은 미루나무로 관찰되었다 (Table 3-8). 그 다음은 오리나무 및 갈참나무로 분해율이 높았다.

Table 3-8. The degradation rate (% dry weight) of wood-chip on various agars by the fungus of *Lentinus edodes* for three months' incubation.

Kinds of woods	Media	Mean	Replicates
갈참나무	Yeast EA	0.045	20
	Milk Agar	0.464	20
	Water Agar	0.257	20
오리나무	Yeast EA	0.010	20
	Milk Agar	0.487	20
	Water Agar	0.359	20
아까시나무	Yeast EA	0.070	20
	Milk Agar	0.408	20
	Water Agar	0.339	20
소나무	Yeast EA	0.006	20
	Milk Agar	0.044	20
	Water Agar	0.177	20
미루나무	Yeast EA	0.003	20
	Milk Agar	0.624	20
	Water Agar	0.510	20
굴참나무	Yeast EA	0.147	20
	Milk Agar	0.413	20
	Water Agar	0.342	20
Total	Yeast EA	0.047	120
	Milk Agar	0.407	120
	Water Agar	0.331	120
Total		0.261	360

Table 3-9. ANOVA of the degradations of wood-chip on different media (average values listed above)<sup>a</sup>. <sup>a</sup>R Squared = .829 (Adjusted R Squared = .821)

Source	Type III Sum of Squar	df	MSquare	F	Sig.
Corrected Model	13.959	17	.821	97.764	.000
Intercept	24.594	1	24.594	2928.153	.000
WOOD	3.036	5	.607	72.289	.000
MEDIA	8.637	2	4.318	514.132	.000
WOOD * MEDIA	2.287	10	.229	27.228	.000
Error	2.873	342	8.399E-03		
Total	41.426	360			

가장 분해율이 낮은 것은 소나무이고, 아까시나무는 거의가 다른 참나무 수준으로 분해율이 높았다. 여기서 주어진 3가지의 배지와 수종에 따른 lignocellulose의 분해는 큰 차이를 나타내고, 상호 배지에 따른 나무 분해률도 많이 다른 것으로 나타났다 (Table-3.10). 여기서, 가장 흥미 있는 것은 미루나무에서 yeast extract를 첨가한 배지에는 거의 분해가 일어나지 않는 것으로 나타났고, 다른 배지에는 다른 수종보다 더 많은 분해가 일어났다. 여기서 전체적으로 볼 때, 표고 균사는 yeast extract에 나무 분해에 어떤 장애 물질이 있는 것으로 나타났다. 이는 다른 느타리 균사와 비교하였을 때, 큰 차이가 나타났다 (Appendix-1). 이는 영양원 흡수 과정에서 표고와 느타리는 서로 다른 생리를 가지는 것으로 판단된다. 그러나 노루궁뎅이버섯은 표고와 같이 yeast extract 배지에서는 거의 분해율이 없었다 (Appendix-5). 다른 배지에는 표고와 같이 분해를 하고 있으나, 단백질이 포함된 배지에 나무 분해가 잘 되었다. 이러한 것은 서로 다른 생리적인 차이점을 보이고 있다. 수종에 따른 분해율에서는 표고는 미루나무, 오리나무, 갈참나무에 잘 분해했고, 느타리는 미루나무, 오리나무로 수종에 따른 것은 비슷하게 나타났다. 여기서 사용된 버섯 균에서는 소나무가 가장 분해력이 떨어졌으나, 생각에 비하여 아까시나무에는 분해력이 낮지 않고 다른 수종인 참나무와 비슷하게 나왔다. 이러한 것은 앞으로 나무부족에 따른 대책으로 표고버섯 재배에 오리나무와 아까시나무는 참나무 대신으로 대체될 수가 있겠다. 종균용 톱밥 배지의 수종으로 소나무 아까시나무도 좋은 것으로 생각된다.

#### 나. 선발된 균주:

여기서는 모두 당자낭 포자를 이용하여 mating 한 균사를 사용했기 때문에 통계분석에서 ANOVA의 결과를 서술하였다 (Table 3-11). 이는 실험상에서 나타나는 오차는 모두가 실험적인 오차보다는 균사의 유전적인 오차로 생각할 수가 있기 때문이다. 우선 균사에 따른 나무 분해률은 배지에 따라서 완전히 다르게 나타났다 (Table 3-10).

Table 3-10.. The degradation rates (%) of wood-chips by the different fungal isolates of *Lentinus edodes* on three agars for three months' incubation.

Media	Fungal Isolates (marked)	Mean	Replicates
Yeast EA	표고-B (1)	6.29936E-02	12
	표고-E (2)	4.74304E-02	12
	표고-G (3)	6.28248E-02	12
	표고-H (4)	5.43793E-02	12
	표고-I (5)	4.81133E-02	12
	표고-J (6)	3.02014E-02	12
	표고-K (7)	3.62823E-02	12
	표고-110 (8)	3.04790E-02	12
	표고-96 (9)	5.57185E-02	12
	표고-005 (10)	3.92831E-02	12
Milk Agar	표고-B (1)	.390046	12
	표고-E (2)	.398077	12
	표고-G (3)	.395765	12
	표고-H (4)	.394341	12
	표고-I (5)	.380548	12
	표고-J (6)	.387059	12
	표고-K (7)	.521863	12
	표고-110 (8)	.406661	12
	표고-96 (9)	.377608	12
	표고-005 (10)	.414856	12
Water Agar	표고-B (1)	.345900	12
	표고-E (2)	.332541	12
	표고-G (3)	.393736	12
	표고-H (4)	.326477	12
	표고-I (5)	.332658	12
	표고-J (6)	.232202	12
	표고-K (7)	.293529	12
	표고-110 (8)	.359939	12
	표고-96 (9)	.333181	12
	표고-005 (10)	.356536	12
Total	표고-B (1)	.266313	36
	표고-E (2)	.259349	36
	표고-G (3)	.284109	36
	표고-H (4)	.258399	36
	표고-I (5)	.253773	36
	표고-J (6)	.216487	36
	표고-K (7)	.283891	36
	표고-110 (8)	.265693	36
	표고-96 (9)	.255503	36
	표고-005 (10)	.270225	36
	Total Average	.261374	360

Table 3-11. ANOVA of the degradations of wood-chip on different fungal isolates (average values listed above from Table 3-10) <sup>a</sup>.

Source	Type III Sum of Squa	Df	MS	F	Sig.
Corrected Model	9.045	29	.312	13.219	.000
Intercept	24.594	1	24.594	1042.341	.000
MEDIA	8.637	2	4.318	183.017	.000
VARIETY	.118	9	1.306E-02	.554	.835
MEDIA * VARIETY	.291	18	1.619E-02	.686	.825
Error	7.786	330	2.359E-02		
Total	41.426	360			
Corrected Total	16.832	359			

<sup>a</sup>R Squared = .537 (Adjusted R Squared = .497)

Table 3-12. ANOVA of the degradations of wood-chip on the different fungal isolates of *L. edodes* (average values not listed)<sup>a</sup>.

Source	Type III Sum of Squa	df	MS	F	Sig.
Corrected Model	3.532	59	5.987E-02	1.350	.057
Intercept	24.594	1	24.594	554.769	.000
VARIETY	.118	9	1.306E-02	.295	.976
WOOD	3.036	5	.607	13.696	.000
VARIETY* WOOD	.379	45	8.419E-03	.190	1.000
Error	13.300	300	4.433E-02		
Total	41.426	360			
Corrected Total	16.832	359			

<sup>a</sup>R Squared = .210 (Adjusted R Squared = .054)

일반적으로 우유배지에서 나무의 분해률이 높고 균사간의 차이도 크게 나타났다. 균사 표고-K는 다른 어떤 균사 보다 우유배지에 분해률이 높고, 물 배지에서도 높았다. 이 균사는 일본에서 개발된 균사와 비교하였을 때에 손색이 없이 나무를 잘 분해시키고 있었다. 그러나 위의 자료를 통계처리한 결과는 표고 균사의 수종 분해 능력은 모두가 산만한 분포로 유전적인 능력보다 환경적인 배지의 요인이 더 크게 작용한 결과를 얻었다 (Table 3-11). 수종별 표고의 균사의 분해률은 여기서는 보이지 않았다

으나, 통계 처리한 결과는 균사의 유전적인 차이점은 다른 환경적인 요인과 수종의 종류에 따라서 나타나지 않았다 (Table 3-12). 여기서 표고의 균사의 나무 분해력은 배지의 미량 성분의 조성에 크게 작용하고, 다음은 수종의 나무의 lignocellulose의 종류에 따라서 큰 영향력을 주고 있다는 것이 밝혀졌다. 앞 장에서 표고의 품종에 다른 나무 분해률은 여기에 나온 자료와 비슷한 수치를 갖고 있고, 품종에 따라서 다양한 형상을 보였다 (제1절 Table 3-2). 이러한 분해률의 변이 수종에 다른 변이와 품종의 유전적인 분해 능력을 비교하였을 때에, 수종에 따른 변이가 더욱 크게 나타났다. 그리고 표고 품종에 따른 변이는 크게 나타나지 않았다 (제1절 Table 3-3 & 3-4 참조). 비교로 사용한 느타리의 경우는 모자실체에서 분리된 균사를 이용한 것으로 균사에 따른 나무 분해률은 크게 나타나고 있고, 또한 환경적인 배지의 영향력도 크게 나타났다 (Appendix 3). 그리고 이들의 균사의 분해률도 표고와 다르게 큰 차이가 나는 것이 관찰되었다. 그러나, 나무를 분해하는 배지의 환경과 균사의 능력에서 상호작용은 없는 것이 표고의 분석과는 다른 것을 보이고 있어, 균사에 따른 유전적인 변이 큰 것이 관찰되었다 (Appendix 4). 노루궁뎅이 균사도 유전적인 차이점이 환경적인 차이점과 수종의 차이점과 같이 중요한 것으로 나타났으며 (Appendix 7 & 8), 이는 표고와 다른 차이점으로 생각된다. 여기서, 통계 처리에서 ANOVA에서 나온 Error는 여러 가지로 분석될 수가 있으나, 실험의 성격으로 본다면 (Table 3-11),

Total error = Mean Square (error) from the media (배지의 반복 혹은 차이점)  
 + Mean Square (error) from the variety (품종 혹은 균사의 차이점; 유전적인 차이점)  
 + their interaction (배지와 품종의 실험적인 반복에서 오는 실수의 오차)

로 설명될 수가 있다. 그런데 이들의 상호작용에서 어떤 차이점이 없는 것은 실험적인 반복에서 오는 차이점이 없는 것을 의미하고 있고, 환경적인 배지의 차이점에서 많은 오차가 나왔다 (F값이 크게 나옴). 이는 반복에서 오는 오차가 크게 없다고 가정하면, 표고 균사들은 유전적인 차이점이 크게 없는 것으로 나타났다. 표고는 다른 느타리 (Appendix 4)와 노루궁뎅이 (Appendix 8)에 유전적으로 안정된 균으로 생각될 수가 있다. 다른 말로 표고 균사는 다른 환경적인 요인을 제외한 수종이나 다른 어떤 변이에 대한 유전적인 차이점이 없기 때문에 느타리에 비하여 안정적으로 표고



를 생산할 수가 있고, 다른 농업적인 실패의 우려가 거의 없는 것이 나타났다. 그러나 분리 선발된 균사는 그런대로 나무의 분해력의 차이점이 보이고 있고 (Table 3-10), 이들을 기준으로 표고의 육종은 아주 좋은 결과가 나올 것으로 추정된다. 여기서 선발된 표고 균사는 K와 G는 어떠한 면에서 여러 수종을 분해하는 능력이 뛰어난 것으로 나타났다. 그러나, 아직 톱밥 재배에 대한 자실체 형성에 관한 자료는 없는 것으로 한번 더 숙고하여야 겠다. 아직 많은 자료인 자실체 형성과 자실체의 모양의 자료가 더 축척 되어야겠고, 위의 실험 내용은 실제 톱밥을 이용한 생산 대비표를 만들어서 재 검정이 필요한 상태이다.

#### 다. 표고 균주:

앞장에서 표고 품종에 대한 생물학적인 관계를 조사하였다. L-7 (산림-7; 톱밥용 균주로 중고온성)과 3209 (일본의 모리 계통)는 아까시나무와 다른 수종에도 분해력이 높은 균이다 (Table 3-2). 이 균들은 본 실험의 모 균주로 사용된 K-1과 L-6보다 수종의 분해력이 높은 것으로 앞으로 버섯 육종에 중요할 것으로 생각된다. 앞장의 실험에서 서로 다른 계통적인 관계를 갖고 있지만, 현재로서는 이러한 생물학적인 계통도에 대한 문제점은 균주의 보관과 혼합된 어떤 관계로 많은 설명하기에는 실험적인 오차가 너무 크다. 그러나 주어진 자료로 앞으로 실험에서 분해력이 큰 것을 이용한 mating작업은 앞서 보인 균주에 따른 수종 분해력의 차이점 (Table 3-9 & 3-10)을 극복할 수 있는 것으로 기대되어 진다. 다른 말로 주어진 목질의 분해력은 처음 실험에 균주의 선정 과정과 톱밥 배지에서 키운 것이 자실체 형성이 문제가 생겨서, 포자를 받지 못하여 포자mating실험에 사용할 수가 없기 때문에 유전적이 차이점을 발견하는데 문제가 있었다. 그러나, 앞장의 표고 품종에서 수종 분해력의 분포 (Table 3-2 in Chapter 3.1)는 본 실험에서 나온 선택된 균사의 분해력 (Table 3-10)의 분포와 큰 차이점이 없었기 때문에 육종에 필요한 품종을 선발한다면 앞으로 훨씬 좋은 분해력을 갖는 균주를 개발할 수가 있겠다. 또한, 앞에서 분석한 자료와 생물학적인 유연관계는 앞으로 연구에 큰 도움이 될 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

**라. 균사의 톱밥 배양:**

톱밥 배지를 만들어서 표고 종균 (임협 1호인 L-1과 산림 5호인 L-6)을 접종하여 인위적인 조건에서 발이 과정(morphogenesis) 을 관찰하였다. 다양한 수종으로 임협-1를 배양하여 자실체 형성을 유도하였다. 일반적인 느타리 붕지 재배용 용기에 수분을 포함하는 배지 1kg를 사용하여 멸균하고 접종하였다. 균사는 모두 균일하게 고체인 톱밥과 액체 접종을 하였고 (1999년 11월), 자실체 형성은 다음 해의 2월에서 3월 사이에 발이를 유도하였다 (Table 3-13). 여기서, 실험과정에서 톱밥 배지인 A, B, 및 C 의 경우는 실험적인 잘 못으로 많이 오염되었고, 발이되는 과정에서 잘 못 처리되어 버렸다. 또한, 이 실험을 위하여 온실 내에 조그만한 발이실을 개조하였으며, 실험실적으로 온도와 습도를 맞추는 동안 모두 오염되어 실험에 사용할 수가 없었다. 이러한 이유로 자실체 형성에 대한 자료를 얻을 수가 없었다. 재실험을 통하여 톱밥 부족과 구할수 없는 입장에 재 실험을 하였다 (Table 3-14).

이러한 붕지 톱밥 재배에서 나온 것과 같이 수작업으로 이들의 균을 액체 종균을 접종하여 실험하였고, 배양은 3개월 동안 수행하였으며, 발이실에 자실체 형성을 유도하였다. 아래의 표 (Table 3-14)와 같은 성분으로 인위적인 성분의 배지를 만들어서 임협1호 (L-1)를 액체 종균을 만들어서 배양하였다.

Table 3-13. The compositions of the saw-dust medium for *Lentinus edodes* (L-1:Imhyup 1)

Experiments	Saw-dusts of wood species employed			Rice bran	Remarks
	상수리	버드나무	아까시나무		
A	80			20	++
B		80		20	+Not measured
C			80	20	+Not measured
D	24		56	20	+++
E	40		40	20	+++
F		24	56	20	+++
G		40	40	20	+++

Symbol (+) indicated the growth of mycelia and degrees of morphogenesis

Table 3-14. Productions of Basidiocarps (g) of *Lentinus edodes* (Imhyup-1) per polyetenenevyl-bag.

Various sawdust	Productions of basidiocarps (mushroom) on the dates of morphologogenesis from Februry 15, 2000			
	Feb 24	Feb 26	March 2	Sum
D	173	16	16	205
E	0	50	10	60
F	166	66	60	292
G	140	71	0	211
Sum	125	51	14	200

Average value of basidiocarp production (g/bag: five replications): The bag containing approximately 300 g (dry weight; 800-1,000 gm when added with the water) of the saw-dust mixture (80 % w/w; see Table-3.10.8 in detail) and the rice bran (20 % w/w). Inoculated on October 15, 1999 and developed on Februry 15, 2000 after cold shocking at the water..

툽밥 배지를 만들고 1999년 10월 15일 액체 종균 접종하여 균사 성장을 유도하였다. 아까시나무 툽밥에는 비교적으로 푸른곰팡이의 오염이 많이 되었으나, 다른 툽밥 배지에는 전혀 오염된 것이 없었다. 2개월 가량 균사를 성장시킨 후에 균사체가 뻗뻗하게 표면까지 덮였으며, 곧 표면에 갈 변화가 일어났다 (Fig.3-8). 배양실이 따로 없어서, 지하실을 배양실로 사용하였으며, 버섯 발이 실이 없어 계절의 온도대로 방치하여 발이 실을 만들 때까지 기다렸다. 현재 실험에서 여러 종류의 툽밥을 사용한 것은 참나무 툽밥을 균일한 것을 구할 수가 없는 상태에서, 다른 종류의 툽밥을 첨가하여 사용하였다. 여기서 Table-3.13에서 사용된 툽밥 배지를 이용하여 표고 자실체 형성되는 량을 조사하였다. 우선 Table 3-13에 나온 배지 조건에서 A, B, C 배지는 즉 순수한 참나무, 아까시나무, 버드나무의 툽밥을 사용한 표고재배를 수행하였으나, 정상적인 조건에서 실험을 임하기 힘들었다. 발이 실이 만들어지지 않았고, 여러 가지 조건이 맞지 않아서 자연 상태에서 발이가 되는 과정을 관찰하였다. 여기서 참나무 툽밥에서 많은 량의 표고 생산되었으며, 오염도가 적은 편이었다. 그러나 다른 수종에 따른 표고는 생산이 되었으나, 그 수량과 반복적인 실험은 수행하지 못하였다. 아

아까시나무 톱밥은 서울 농대 이경준 박사의 의뢰로 표고 생산이 가능한가에 대한 실험을 기본적으로 수행하였다. 좀 불양하지만 그런대로 아카시 및 버드나무 톱밥에도 표고가 생산되었다. 톱밥을 만드는 과정에서 아카시나무는 상당히 힘들었고, 수분이 많은 상태에서 오염 균들이 많이 산재하였다. 그러나, 일반적으로 접종된 톱밥 배지에서는 모두 표고 생산되는 것으로 관찰되었으며, 이는 앞으로 참나무 수종이 없을 때를 대비한 중요한 실험으로 생각된다 (Fig.3-7). 여기서나 여러 가지 첨가된 톱밥에서 표고의 생산량은 여러 번의 반복을 통하여 수행하였다 (여기서 0.2평의 발이실로 일차 발이만 조사하였다). 2000년 2월 15일 온도 조절과 습도 조절할 수 있는 발이실을 간이로 온실에 만들었다. 계속하여 갈 변화된 블럭 속에서 표고버섯이 발생하였다. 상세한 것은 다음의 버섯 생산에 관한 곳에 기록하였다. 버섯의 발생 정도를 놓고, 다음의 생리적인 실험을 위한 시료를 조사하였다. 여기서 아카시 톱밥이 포함된 배지에서 표 생산은 거의 200g이상이 생산되었다. 이는 약 건조 중량으로 환산한다면 20-40 g으로 미강 첨가량 밖에는 지나지 않는다. 이것은 앞으로 많은 실험을 통하여 에너지 대사에 관련된 자료가 확보되어야 되겠다. 그러나, 본 실험실에서는 우선 아카시 톱밥을 이용한 표고 생산과 인위적인 상태에서 표고 자실체 형성을 앞으로 실험에서 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.



Fig.3-7. Fruiting body formation of *Lentinus edodes* Impyup L-1 in the sawdust substrates

까시나무 톱밥은 서울 농대 이경준 박사의 의뢰로 표고 생산이 가능한가에 대한 실험을 기본적으로 수행하였다. 좀 불량하지만 그런대로 아카시 및 버드나무 톱밥에도 표고가 생산되었다. 톱밥을 만드는 과정에서 아카시나무는 상당히 힘들었고, 수분이 많은 상태에서 오염 균들이 많이 산재하였다. 그러나, 일반적으로 접종된 톱밥 배지에서는 모두 표고 생산되는 것으로 관찰되었으며, 이는 앞으로 참나무 수종이 없을 때를 대비한 중요한 실험으로 생각된다 (Fig.3-7). 여기서나 여러 가지 첨가된 톱밥에서 표고의 생산량은 여러 번의 반복을 통하여 수행하였다 (여기서 0.2평의 발이실로 일차 발이만 조사하였다). 2000년 2월 15일 온도 조절과 습도 조절할 수 있는 발이실을 간이로 온실에 만들었다. 계속하여 갈 변화된 블록 속에서 표고버섯이 발생하였다, 상세한 것은 다음의 버섯 생산에 관한 곳에 기록하였다. 버섯의 발생 정도를 놓고, 다음의 생리적인 실험을 위한 시료를 조사하였다. 여기서 아카시 톱밥이 포함된 배지에서 표고 생산은 거의 200g이상이 생산되었다. 이는 약 건조 중량으로 환산한다면 20-40 g으로 미강 첨가량 밖에는 지나지 않는다. 이것은 앞으로 많은 실험을 통하여 에너지 대사에 관련된 자료가 확보되어야 되겠다. 그러나, 본 실험실에서는 우선 아카시 톱밥을 이용한 표고 생산과 인위적인 상태에서 표고 자실체 형성을 앞으로 실험에서 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.



Fig.3-7. Fruiting body formation of *Lentinus edodes* Impyup L-1 in the sawdust substrates

#### 4. 결 론

한천 배지로 환경을 변화시키고, 수종으로 나무 분해력을 조사하여 분리된 균주의 능력의 차이점을 관찰하였다. 이는 선발된 균주가 어떤 조건에서 유전적인 차이점을 관찰하기 위한 실험의 내용이다. 우선, 표고 균사는 여러 가지 영양원의 환경에서 많은 차이점을 나타내었고, Yeast extract는 나무 분해력을 저해시키고 있었다. 그리고 한천 배지에서는 단백질이 나무의 lignocellulose 분해력을 약간 높이는 결과를 나타냈다. 분리된 표고의 유전적인 차이점은 통계처리의 분산 분석표로 분석하였으나, 환경적인 요인과 수종의 성질에 대한 요인보다도 낮게 나왔다. 이는 사용된 표고 균사는 유전적으로 수종의 분해력에서 상당히 안정된 상태로 나타났고, 다른 버섯인 느타리와 노루궁뎅이 버섯에 비하여 분해력이 유전적으로 안정된 것으로 나타났다. 그러나 품종의 수종 분해력의 분포와 비교하였을 때에 본 실험에서 나온 분해력의 분포와 비슷한 값을 가졌으므로, 앞으로 육종에는 기질인 수종에 따른 품종의 개발이 더욱 좋을 것으로 나타났다. 이는 앞으로의 톱밥 부족과 원목 부족에 대한 대비책으로 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

## 5. 참고문헌

- 박원목, 김동찬, 이종윤, 양재경, 유창현, 정원일. 1994. 침엽수 톱밥에서 표고 균사생장 촉진에 관한 연구. 한국균학회지 22: 222-228
- 박원목, 송치현, 현제욱. 1992. 표고 버섯의 영양생리 및 기질개발. 한국균학회지 20(1): 77-82
- 이태수, 조남석, 민두식. 1998. 액체종균 접종에 의한 표고톱밥재배 효과. 목재공학회지 26(1): 19-28
- Lee, K. H., Jeong, H., Kim, Y. I. And Kim, B. K. 1991. Production of antihypertensive constituents from *Ganoderma lucidum* IY005 by fermentation using industrial wastes. Kor. J. Mycol. 19: 79-84.
- Song, C. H., Cho, K. Y. and Nair, N. G. 1987. A Synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus Edodes*. Mycologia 79: 866-876

〈느타리버섯의 자료〉

Appendix 1. The degradation rate (% dry weight) of wood-chip on various agars by the fungus of *Pleurotus ostreatus* for three months' incubation.

kinds of woods	media	Mean	Std. Deviation	N
갈참나무	Yeast EA	.355754	.201972	9
	Milk Agar	.393633	.182133	8
	Water Agar	.215947	7.01730E-02	8
오리나무	Yeast EA	.537007	.244427	8
	Milk Agar	.468839	.174160	8
	Water Agar	.302184	.123291	8
아까시나무	Yeast EA	.425135	.198463	8
	Milk Agar	.296287	.121785	8
	Water Agar	.330114	.173899	8
소나무	Yeast EA	.221758	.127602	8
	Milk Agar	.145508	9.89749E-02	8
	Water Agar	.112616	5.14242E-02	8
미루나무	Yeast EA	.550177	.343907	8
	Milk Agar	.543243	.279183	8
	Water Agar	.384722	.159926	8
굴참나무	Yeast EA	.382487	.135268	8
	Milk Agar	.399033	9.23305E-02	8
	Water Agar	.332668	.162076	8
Total	Yeast EA	.410904	.236920	49
	Milk Agar	.374424	.206149	48
	Water Agar	.279708	.154706	48
	Total	.355398	.208498	145

Appendix 2. ANOVA of the degradations of wood-chip on different media (average values listed from Appendix 1 by *Pleurotus ostreatus*)<sup>a</sup>

Source	Type III Sum of Sq	df	Mean Sq	F	Sig.
Corrected Model	2.213	17	.130	4.087	.000
Intercept	18.301	1	18.301	574.391	.000
WOOD	1.560	5	.312	9.793	.000
MEDIA	.449	2	.225	7.051	.001
WOOD * MEDIA	.208	10	2.085E-02	.654	.764
Error	4.046	127	3.186E-02		
Total	24.574	145			
Corrected Total	6.260	144			

<sup>a</sup>R Squared = .354 (Adjusted R Squared = .267)



Appendix 3. The degradation rates (%) of wood-chips by the different fungal isolates of *Pleurotus ostreatus* (PO) on three agars for three months' incubation.

Media	VARIETY	Mean	Std. Deviation	N
Yeast EA	PO-RD	2.36109E-02	4.04581E-02	7
	PO-RC	.548867	.189738	6
	PO-RC	.531296	.123278	6
	PO-RF	.333597	.124259	6
	PO-B1	.440257	.147958	6
	PO-B3	.505681	.230938	6
	PO-B4	.529767	.198254	6
	PO-B5	.438705	.261976	6
Milk Agar	PO-RD	8.01707E-02	7.09403E-02	6
	PO-RC	.374631	9.24288E-02	6
	PO-RC	.365721	.143743	6
	PO-RF	.349224	.273724	6
	PO-B1	.504684	.230380	6
	PO-B3	.480356	.171762	6
	PO-B4	.366441	.146979	6
	PO-B5	.474163	.188510	6
Water Agar	PO-RD	.193715	.250891	6
	PO-RC	.293528	.132231	6
	PO-RC	.313727	.123764	6
	PO-RF	.279754	.166562	6
	PO-B1	.294906	5.93881E-02	6
	PO-B3	.264238	.116620	6
	PO-B4	.303803	.156168	6
	PO-B5	.293997	.219031	6
Total	PO-RD	9.51890E-02	.157264	19
	PO-RC	.405675	.173952	18
	PO-RC	.403581	.155449	18
	PO-RF	.320858	.188879	18
	PO-B1	.413282	.176741	18
	PO-B3	.416759	.201970	18
	PO-B4	.400003	.186263	18
	PO-B5	.402288	.226225	18
	Total	.355398	.208498	145

Appendix 4 ANOVA of the degradations of wood-chip on different fungal isolates (average values listed above from Appendix 3) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> R Squared = .430 (Adjusted R Squared = .322)

Source	Type III Sum of Squ	df	Mean Squ	F	Sig.
Corrected Model	2.692	23	.117	3.969	.000
Intercept	18.535	1	18.535	628.556	.000
MEDIA	.489	2	.244	8.289	.000
VARIETY	1.553	7	.222	7.524	.000
MEDIA * VARIETY	.620	14	4.425E-02	1.501	.121
Error	3.568	121	2.949E-02		
Total	24.574	145			
Corrected Total	6.260	144			

<노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*)>

Appendix 5. The degradation rate (% dry weight) of wood-chip on various agars by the fungus of *Hericium erinaceum* for three months' incubation.

kinds of woods	media	Mean	Std. Deviation	N
갈참나무	Yeast EA	5.98291E-02	2.41746E-02	2
	Milk Agar	.249746	7.03517E-02	2
	Water Agar	8.44392E-02	5.46420E-02	2
오리나무	Yeast EA	2.09790E-02	2.96688E-02	2
	Milk Agar	.262528	.156064	2
	Water Agar	.170850	.194867	2
아까시나무	Yeast EA	4.72050E-02	1.40543E-02	2
	Milk Agar	.117739	5.10627E-02	2
	Water Agar	.110422	5.46476E-03	2
소나무	Yeast EA	1.40845E-02	1.99185E-02	2
	Milk Agar	7.00397E-02	7.37973E-02	2
	Water Agar	1.44231E-02	2.03973E-02	2
미루나무	Yeast EA	2.08333E-02	2.94628E-02	2
	Milk Agar	.335997	6.12548E-02	2
	Water Agar	8.06452E-03	1.14049E-02	2
굴참나무	Yeast EA	.142409	2.27587E-02	2
	Milk Agar	.246574	8.13875E-02	2
	Water Agar	.137438	4.80693E-02	2
Total	Yeast EA	5.08899E-02	4.92569E-02	12
	Milk Agar	.213771	.115550	12
	Water Agar	8.76061E-02	8.89830E-02	12
	Total	.117422	.111591	36

Appendix 6. ANOVA of the degradations of wood-chip on different media (average values listed above)<sup>a</sup>.

Source	Type III Sum of Sq	df	Mean Squa	F	Sig.
Corrected Model	.341	17	2.005E-02	3.798	.004
Intercept	.496	1	.496	94.023	.000
WOOD	7.529E-02	5	1.506E-02	2.853	.046
MEDIA	.175	2	8.759E-02	16.592	.000
WOOD * MEDIA	9.034E-02	10	9.034E-03	1.711	.154
Error	9.503E-02	18	5.279E-03		
Total	.932	36			
Corrected Total	.436	35			

<sup>a</sup>R Squared = .782 (Adjusted R Squared = .576)

Appendix 7. The degradation rates (%) of wood-chips by the different fungal isolates of *Hericium erinaceum* on three agars for three months' incubation

Media	VARIETY	Mean	Std. Deviation	N
Yeast EA	HE-C002	6.20292E-02	3.56159E-02	6
	HE-C911	3.97506E-02	6.14120E-02	6
Milk Agar	HE-C002	.155562	9.62666E-02	6
	HE-C911	.271979	.109429	6
Water Agar	HE-C002	4.94322E-02	4.95825E-02	6
	HE-C911	.125780	.107069	6
Total	HE-C002	8.90078E-02	7.87072E-02	18
	HE-C911	.145837	.133165	18
	Total	.117422	.111591	36

Appendix 8. ANOVA of the degradations of wood-chip on different fungal isolates (average values listed above from Appendix 7) <sup>a</sup>.

Source	Type III Sum of Squ	df	Mean Squ	F	Sig.
Corrected Model	.235	5	4.696E-02	7.009	.000
Intercept	.496	1	.496	74.077	.000
MEDIA	.175	2	8.759E-02	13.072	.000
VARIETY	2.907E-02	1	2.907E-02	4.338	.046
MEDIA * VARIETY	3.057E-02	2	1.528E-02	2.281	.120
Error	.201	30	6.701E-03		
Total	.932	36			
Corrected Total	.436	35			

Squared = .539 (Adjusted R Squared = .462)

Appendix 9. The degradation rate (% dry weight) of the six different wood-chips by the fungus of *Lentinus edodes* for three months incubation

VARIETY	Kinds of woods	Mean	Std. Deviation	N
1.00	갈참나무	.253037	.173607	6
표고-B	오리나무	.327740	.258766	6
	아까시나무	.308422	.200475	6
	소나무	7.15362E-02	8.86884E-02	6
	미루나무	.287685	.278473	6
	굴참나무	.349459	.137887	6
	2.00	갈참나무	.256917	.172136
표고-E	오리나무	.255364	.193665	6
	아까시나무	.287042	.203668	6
	소나무	4.15130E-02	7.33549E-02	6
	미루나무	.422554	.330600	6
	굴참나무	.292706	.125034	6
	3.00	갈참나무	.275275	.185821
표고-G	오리나무	.263691	.211037	6
	아까시나무	.353317	.206436	6
	소나무	8.25779E-02	8.59218E-02	6
	미루나무	.429984	.341922	6
	굴참나무	.299807	.101752	6
	4.00	갈참나무	.273746	.226086
표고-H	오리나무	.312416	.294413	6
	아까시나무	.243090	.143961	6
	소나무	9.86796E-02	.104434	6
	미루나무	.350686	.260945	6
	굴참나무	.271776	9.77151E-02	6
	5.00	갈참나무	.208764	.126327
표고-I	오리나무	.252060	.198161	6
	아까시나무	.278166	.196501	6
	소나무	7.68846E-02	.101748	6
	미루나무	.417118	.349404	6
	굴참나무	.289646	.108749	6
	6.00	갈참나무	.213645	.181641
표고-J	오리나무	.214025	.185757	6
	아까시나무	.209701	.148113	6
	소나무	.000000	.000000	6
	미루나무	.384507	.358792	6
	굴참나무	.277048	.143626	6

7.00	갈참나무	.333252	.316771	6
표고-K	오리나무	.327702	.323187	6
	아까시나무	.247109	.159288	6
	소나무	5.78953E-02	8.73754E-02	6
	미루나무	.422340	.334083	6
	굴참나무	.315050	.216066	6
8.00	갈참나무	.254660	.236027	6
표고-110	오리나무	.302702	.252331	6
	아까시나무	.226845	.162806	6
	소나무	9.42857E-02	.146078	6
	미루나무	.391245	.320039	6
	굴참나무	.324419	.142691	6
9.00	갈참나무	.242558	.168640	6
표고-96	오리나무	.281277	.217539	6
	아까시나무	.241369	.131447	6
	소나무	.138958	.165812	6
	미루나무	.360572	.284771	6
	굴참나무	.268283	.144422	6
	합계	.255503	.190289	36
10.00	갈참나무	.244328	.190980	6
표고-005	오리나무	.314911	.247355	6
	아까시나무	.326969	.250573	6
	소나무	9.39906E-02	.148010	6
	미루나무	.323611	.293467	6
	굴참나무	.317540	.148000	6
Total	갈참나무	.255618	.190570	60
	오리나무	.285189	.225828	60
	아까시나무	.272203	.174897	60
	소나무	7.56321E-02	.107061	60
	미루나무	.379030	.295242	60
	굴참나무	.300573	.131512	60
	합계	.261374	.216530	360

Appendix 10. ANOVA of the degradations of wood-chips on different fungal isolates (average values listed above from Appendix 7) <sup>a</sup>

Source	Type III Sum of Sq	df	Mean Squ	F	Sig.
Corrected Model	3.532	59	5.987E-02	1.350	.057
Intercept	24.594	1	24.594	554.769	.000
VARIETY	.118	9	1.306E-02	.295	.976
WOOD	3.036	5	.607	13.696	.000
VARIETY * WOOD	.379	45	8.419E-03	.190	1.000
Error	13.300	300	4.433E-02		
Total	41.426	360			
Corrected Total	16.832	359			

<sup>a</sup>R Squared = .210 (Adjusted R Squared = .054)

## 제 4 절 표고균의 생리 및 접종원으로 액체배양

### 1 서 설

표고 [*Lentinus edodes* (Berk.) Singer]는 한국, 일본, 중국 등 동남 아시아 지방에서 주로 재배되고, 중요한 식용 자원으로 중요하다. 표고버섯의 재배는 대부분이 원목 재배로 생산되어지고, 표고의 접종은 톱밥에서 배양된 균사를 사용하고 있다. 우리나라에서는 아직 표고의 재배는 원목을 이용한 톱밥 접종으로 수행되고 있기 때문에, 새로운 신기술을 위하여서는 액체 종균의 개발이 필요하다. 또한, 표고 버섯의 생리적인 성격을 이해함으로써 좀 더 좋은 버섯 생산에 대한 도움이 될 것으로 기대된다. 표고의 재배기술 개발에도 액체 배양을 통하여 균사의 활성 여부와 균사의 성장 상태에 관한 기본 자료는 표고의 육종에 도움이 될 것으로 생각된다. 현재 표고 버섯은 일본과 중국에서 고전적인 방법으로 원목에서 생산하고, 느타리에 비하여 오랜 재배 경험이 있다. 그러나 중국의 경우는 원목 접종보다는 톱밥 배지로 표고를 생산하고 있고, 일본 역시 톱밥 배지를 통한 표고생산으로 바꾸어 가고 있는 실정이다. 유독, 우리나라에서는 원목을 이용한 표고 생산을 고집하고 일본으로 수출하고 있는 입장에 곧 원목 부족으로 다른 대체 톱밥 재배로 전환될 위기에 있다.

표고 재배에서 표고 균사의 생리적인 조사는 현재 표고가 성장하는데 얼마만큼 질소원 혹은 다른 금속이온을 요구하고, 어떤 조건에서 표고 생산을 얼마나 하는 가 필수적으로 알아야 할 내용으로 생각된다. 과거 원목에 의한 표고 생산에서 톱밥 배지의 표고 생산으로 전환하기 위한 방법으로 표고 균사의 생리적인 요구는 앞으로 표고 연구에 필수적인 것으로 생각된다. 우선 원목에서 표고의 생산은 전통적인 방법으로 일본과 중국에서 오래 동안 진행된 내용이고, 이에 대한 생리적인 연구는 거의 없이 관행적으로 생산되고 있다. 그러나 표고 생산시 톱밥 재배에서의 생리적인 연구와 단백질등 다른 어떤 영향력에 관한 연구가 필요한 것으로 생각된다. 우선, 표고 재배에서 액체 종균의 개발은 앞으로 버섯 생산을 위한 기계화에 도움이 되고, 톱밥 접종에 비하여 많은 균사를 투입함으로써 균사의 활력을 높여 오염에 대한 방지에 도움이 될 것으로 추정하고 있다. 그러나, 액체 종균은 앞의 방법에 비하여 세균의 오염과 공



정이 복잡한 것이 단점으로 대두되고 있으나, 앞에서 언급한 장점 때문에 연구는 시도되어야 한다고 생각된다. 또한, 주어진 톱밥 배양은 원목 재배와 달라서 영양물질이 한정된 용기 속에 있기 때문에 표고 생산을 위하여 필수적인 연구로 생각된다.

액체 배양은 한천과 톱밥에서 균사의 배양에 비하여 균사의 생장을 조절할 수가 있고, 균사의 생리를 파악할 수 있는 면에서, 다른 배양보다 균사의 조절이 가능하다. 고체배양을 통한 균사의 집중은 균사의 량과 균사의 생리적인 상태를 잘 모르기 때문에, 집중 후 균사의 성장과 관련된 톱밥 배양은 오염과 균일한 균사의 성장에 문제점이 있는 것으로 생각된다. 그러나 액체 배양원 집중은 우선 균사의 양이 많이 투입되고 균사의 생리조절로 배양기간 단축과 균일한 균사의 성숙을 기대할 수가 있겠다. 우선, 표고 균사는 액체 상태에 성장할 때에 균사의 생리적인 상태를 최소한 톱밥 배지 활착이 잘 되도록 만들어져야 할 것으로 생각된다. 이러한 면에서 균사를 액체 배양을 통하여 균사의 생리적인 것을 조사하였고, 질소원 혹은 다른 영양원에 다른 반응을 주었다. 우선 이러한 점에서 액체 종균을 이용하여 표고 균사의 성장이 빠르고, 생리적으로는 사용될 기질에 적응이 빠른 상태의 균사를 키우는 것이 중요하다. 본 연구에서는 액체 종균을 만들기 위하여, 균사체를 액체 배지에 접종하여 균사의 성장 상태를 관찰하였으며, 균사의 성장에 필요한 촉진제를 개발하였다.

## 2 실험 재료 및 방법

### 가. Fungal isolates:

사용된 표고 균주는 구 임업 협동조합중앙회 미생물사업소에서 분양 받은 표고 균주(임협-1, 5, 6, 7) 이고 (Table-3.1), 일본에서 MOK-1 및 일본 표고-005호는 표고 생산지인 일본 도토리 대학교의 Kitamoto박사로부터 분양받아 비교 실험을 하였다. 실험에서 사용한 표고 E (K1-5×L6-21)와 표고 G (K1-17×L6-6)는 마곡사에 채집된 표고 (K-1)와 산림-5호 (L6)의 단포자를 결합시킨 것이다 (상세한 것은 앞의 제1절 Table 3-1과 뒤의 제5절 결과를 참조하기 바람). 이들의 표고 균주는 여러 가지 생리적인 차이점을 찾기 위하여 비교 실험을 하였다. 다른 버섯 균주는 액체배양의 첨가제 효과를 보기 위하여, 시중에서 판매되는 만가닥 버섯, 팽이버섯과 느타리

(*Pleurotus ostreatus*; 흑형-2과 수한)을 직접 조직 분리하여 실험에 사용하였다. 각 균주는 PDA (Potato Dextrose Agar; Difco)배지에서 계대 배양하였으며, 3개월에 한번씩 계대 배양하여 25°C 배양기에서 보관 배양하였다. 보관용 균주는 균사의 변이를 막기 위하여, 일반적으로 많이 사용하는 증류수 용액에서 낮은 온도에 저장하였고, PDA 배지에 자란 균사 조각을 넣어 냉장 상태로 유지 보관하였다.

#### 나. 액체 배지:

일반적인 MM 배지에 시중에서 판매되는 skim milk 5.7 g/L와 glucose 17.0 g/L을 변형시켜 액체 배지를 만들었다 (MMM배지). 여기서 단백질원으로 우유를 사용하였고, 우유 속에 포함된 젖당을 계산하여 에너지원이 약 20g/L되게 계산하였다. Cotton plug한 250mL 삼각 플라스크에 위의 MMM배지를 50 mL의 배지 용액을 넣고, 멸균 후에 한천 배지 조각을 넣어서 균사체를 배양하였다. 균사체가 약 2-3주동안 성장시킨 후에 접종량을 동일하게 하기 위하여, 멸균 상태의 성장한 균사체를 blending하여 잘게 부순 후에 접종하였다. 균일한 균사체를 멸균된 pipet으로 2mL각각 접종하여, 25°C에서 150 rpm 조건으로 shaking culture하였다. 또한, 많은 접종 원을 만들기 위하여, 발효기를 사용하였다. 발효기 사용은 일반적으로 2L용기에 1.5 L의 MM배지를 넣었으며, 잘게 부순 균사체를 넣어서, agitation은 230 rpm조건으로 25°C 에서 배양한 것을 톱밥 배지에 접종하였다. 질소원에 관한 생리실험에서는 A) 단백질 5.7 g/L-glucose 17.0g/L, B) 단백질 5.7 g/L-glucose 10.0g, C) 단백질5.7 g/L-glucose 5.0g/L 및 D) 단백질11.4 g/L-glucose 14.1g/L 의 비율로 탄수화물과 질소원의 영양원을 첨가하여 실험하였다. 버섯균의 촉진제 실험에서는 버섯균의 촉진제 (stimulant)는 시중에 판매되는 기름을 0.5 ml/flask씩으로 첨가하였다.

#### 다. 종균 접종:

접종원이 될 균주를 배양하기 위하여 BioPilot 3B fermentation system (Bioneer Co)을 이용하였다. 배양 조건은 배지 액은 1.5 L가 되도록 하였으며, 통기량 1.0 vvm, 온도 25°C±1, 교반 속도 100rpm 이 유지되도록 하였다. 1일1회1분간 교반 속도를 1,000 rpm 으로 돌려서 균사체가 영기는 것을 방지하였다. 여기서 만들어진 균사체

는 직접 혹은 간접적으로 톱밥 배지에 접종하였다. 직접적으로 접종하지 못할 때는 멸균된 통에 냉장 보관하여 사용하였다. 50 mL의 배지가 들어있는 250 mL Erlenmyer flask 에 1 mL씩 접종하여 (접종량 2% V/V), 25°C에서 배양하였다.

#### 라. 균사체:

배양액 전체를 여과지 (Watman NO. 2)로 여과하여 배양액을 제거한 후, 얻어진 배양 균사체를 멸균수로 충분히 씻어 80 °C 의 건조기에 넣고, 24시간 동안 건조한 후 균사체의 건조량을 측정하였다. 배양 여액은 냉동 보관하며 효소분석과 환원당 정량에 사용하였다 (Lee *et al.*, 1991).

#### 마. 정량:

배양 여액 속의 당은 환원당 정량을 통하여 glucose의 양을 측정하였다. DNS 용액은 1g의 3,5-dinitrosalicylic acid를 20ml 의 2N NaOH 용액을 만들고, 30g의 K-Na tartrate를 녹여 100ml의 부피가 되도록 하였다. 이 용액 1.0 ml를 배양 여액 1.0 ml와 섞어 2.0 ml가 되도록 하여, 끓는 물에 5 분간 반응시켰다. 얼음물에 넣어 반응을 종료시키고, 10 ml의 증류수를 첨가하고 550 nm에서 OD값을 측정하였다. L-dihydroxyphenol alanine (DOPA; 다른 기질 ABT사용함) 를 기질로 하여 Polyphenol Oxidase (PO; Laccase)의 활성을 측정하였다 (김등, 1986). 0.03M phosphate buffer(pH 6.5) 용액 2mL의 5mM DOPA를 만들고, 1 mL 효소용액을 넣어 최종 부피가 3mL 가 되도록 하여, 30°C에서 10 분 동안 반응시킨 후, 475nm에서 OD를 측정하였으며, 0.001 OD의 변화를 1 unit라고 정의하였다. 환원당은 발효액 속에 있는 포도당을 기준으로 0.01-0.1 mL을 취하여 반응시켜서 포도당에 준하는 값으로 잔존 포도당의 함량으로 계산하였고, PO activities는 위에서 언급한 1 mL을 반응시킨 내용으로 상대적인 값으로 표시하였다.

#### 바. 액체 종균 접종:

일반적인 톱밥 배지인 머루나무와 참나무 톱밥을 미강 20% (w/w)로 만들고 수분은 약 65-70%으로 병 배지를 만들었다. 이러한 톱밥 배지를 800 mL용기인 버섯 접

중용 폴리에틸렌 병에 넣었다. 툽밥 제조와 입병(人瓶)은 일반적으로 많이 사용하는 입병 기계로 실시하고 멸균하였다. 멸균한 후에 완전히 식힌 후에, 위에서 만들어진 액체 종균을 각각 2-5 mL씩 넣어서 접종하였다. 병 툽밥 배지는 2-3주 동안 균사의 배양의 흰 균사가 나타날 때까지 기다려서 오염 여부를 판단하였다.

### 3 결과 및 고찰

#### 가. 균사의 생장:

액체 배양으로 균을 성장하는 것으로 건중량 (Dry Weight), 포도당의 함량 (Residual glucose), pH 및 Laccase (Polyphenol Oxidase activity)을 시간별로 조사하였다. 표고 3 균주와 느타리 (*Pleurotus ostreatus*) 수한 균을 사용하여 서로 균사의 성장을 비교 검토하였다. 본 실험실에서 만든 표고-E와 표고-G는 6일 내에 균사는 거의 3-4 g/L가 자랐고, 포도당의 사용은 10일째에 모두 사용된 것으로 나타났다 (Fig 3-8 & Fig 3-9). 그리고, 산도인 pH는 6일 후에는 일정한 상태로 유지되었다. Laccase효소 활력으로는 DOPA를 사용하였으며, 시간이 지남에 따라서 증가하고 있다. 일본-005균 (Fig 3-10)도 이와 같은 성장 곡선을 그리고 있으나, 비교로 사용된 느타리 균은 표고의 성장에 비하여 성장 속도가 빠른 것으로 관찰되었다 (Fig. 3-11). 느타리 버섯의 액체배양은 산도인 pH변화 및 Laccase활성은 표고의 성장 곡선과는 다르게 나타났다. 여기서 나온 기본적인 것은 느타리가 표고에 비하여 성장이 빠르고, 액체 배양의 대사가 다른 것으로 나타났다.

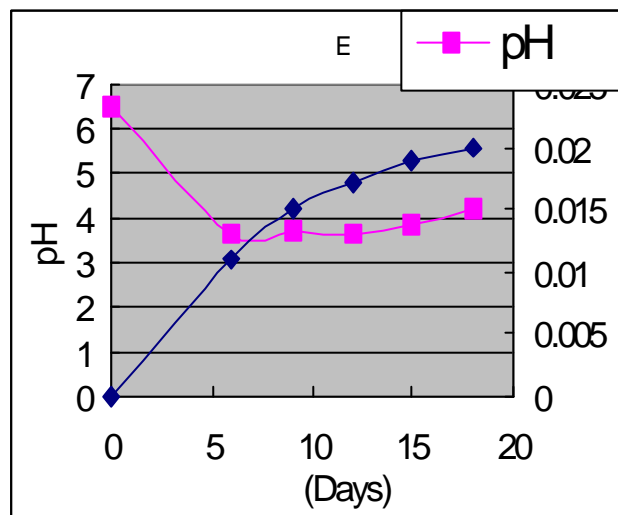
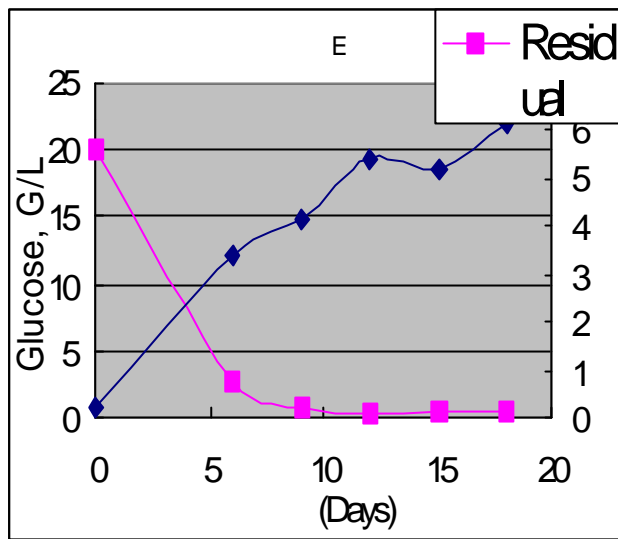


Fig3-8. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(■) produced by the shiitake-E by shaking cultures

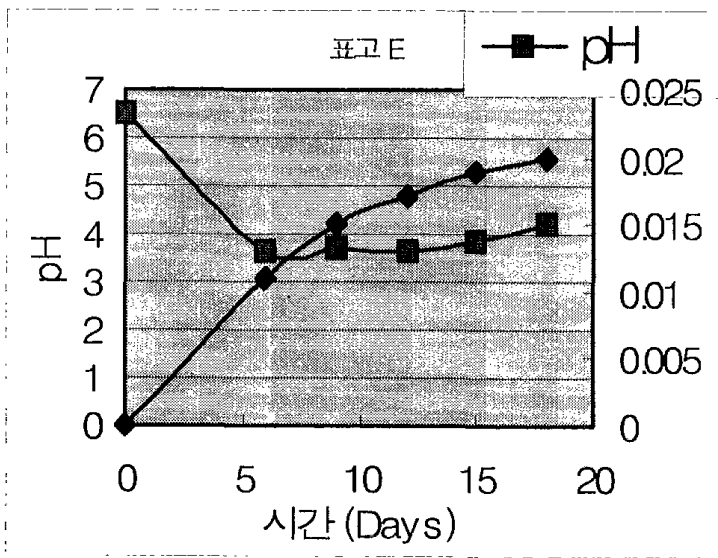
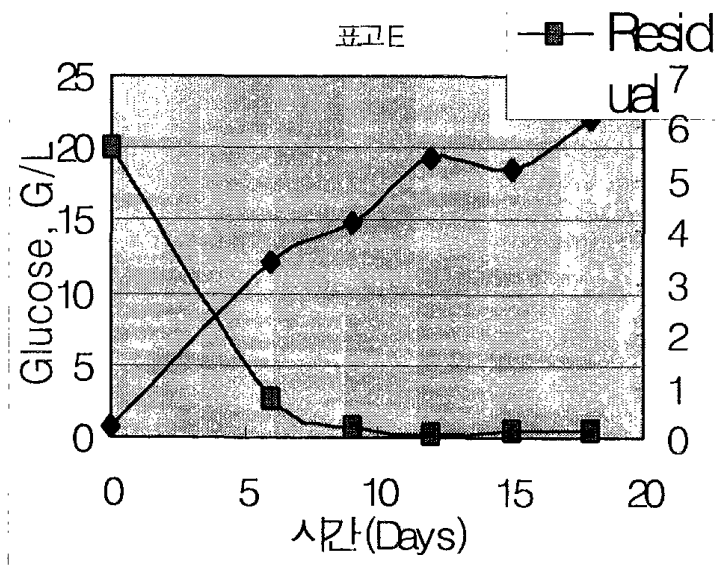


Fig.3-8. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(◆) produced by the shiitake-E by shaking cultures

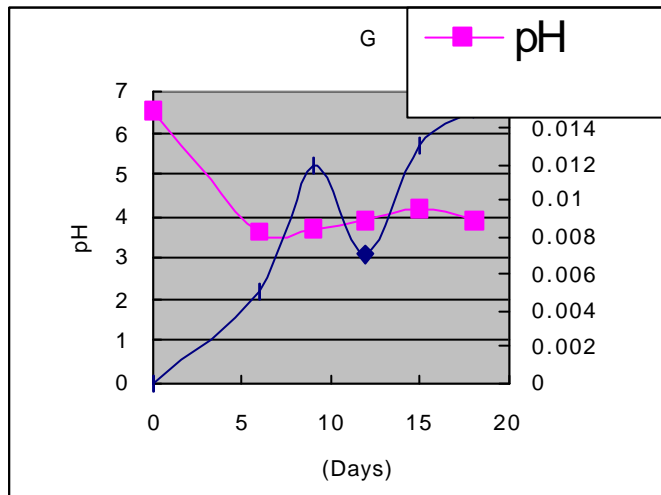
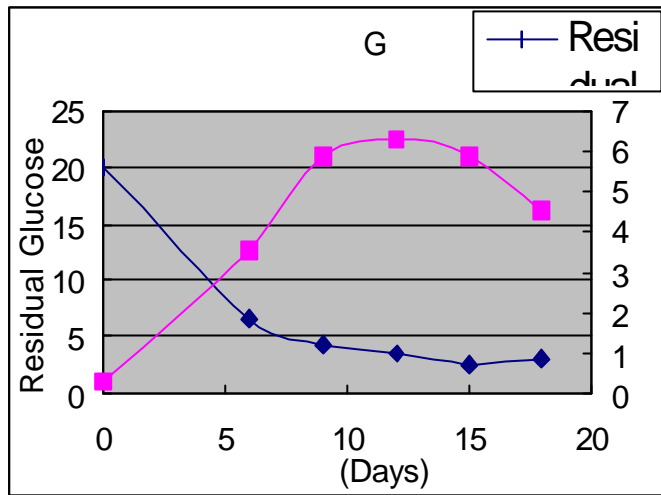


Fig3-9. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(■) produced by shiitake-G by shaking cultures

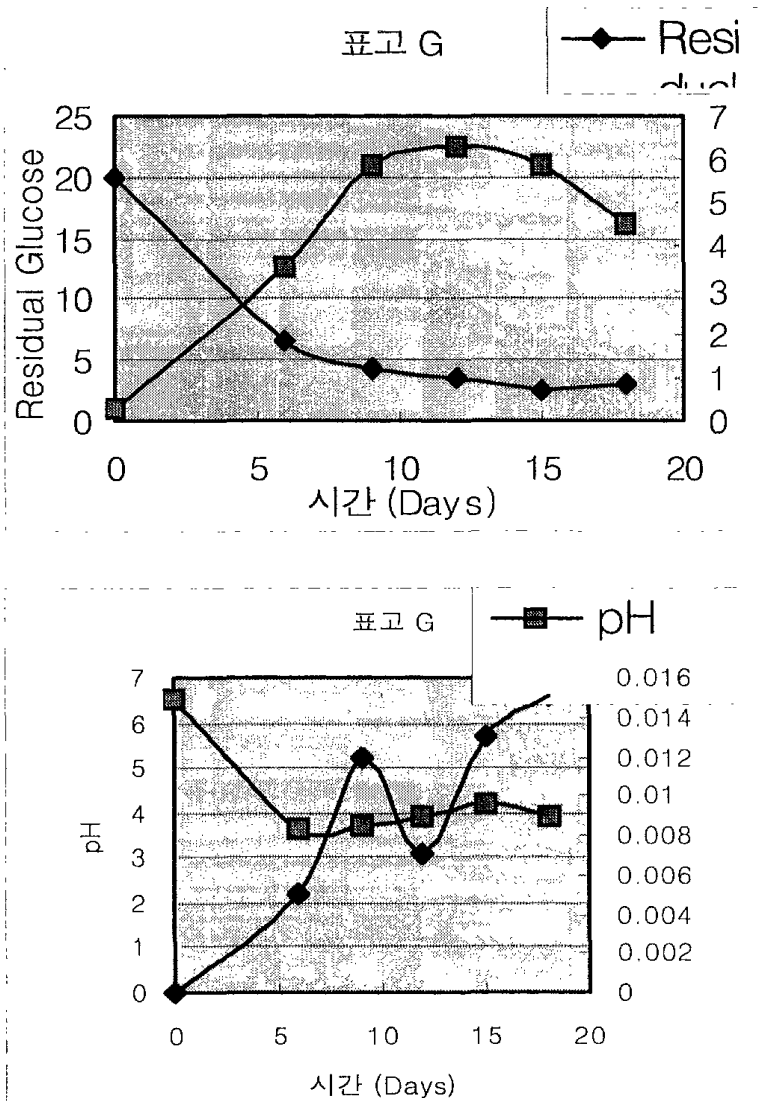


Fig.3-9. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(◆) produced by shiitake-G by shaking cultures



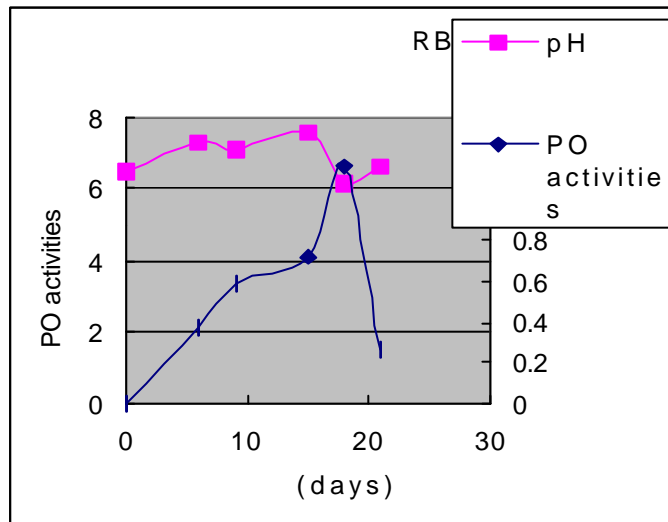
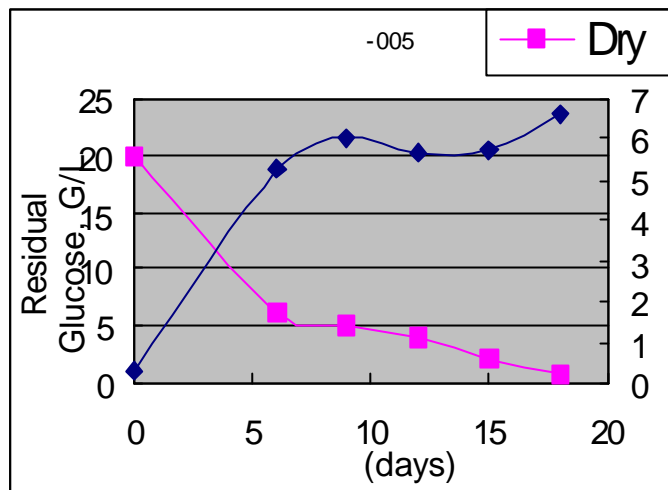


Fig3-10. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(■) produced by Japanese shiitake-005 by shaking cultures

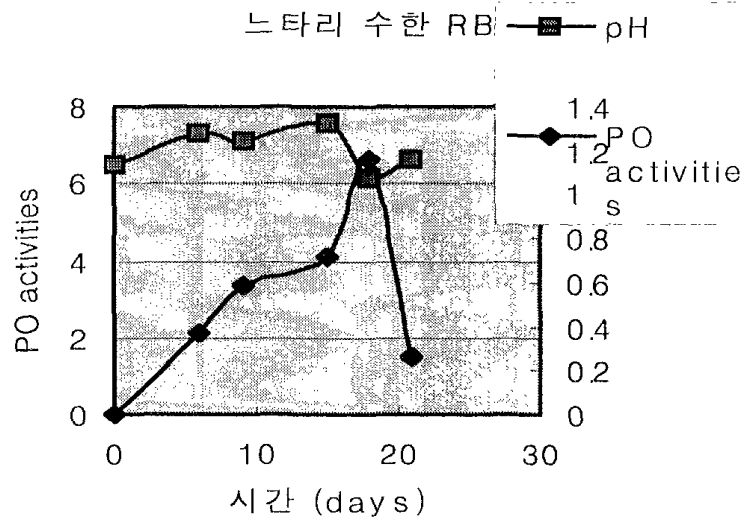
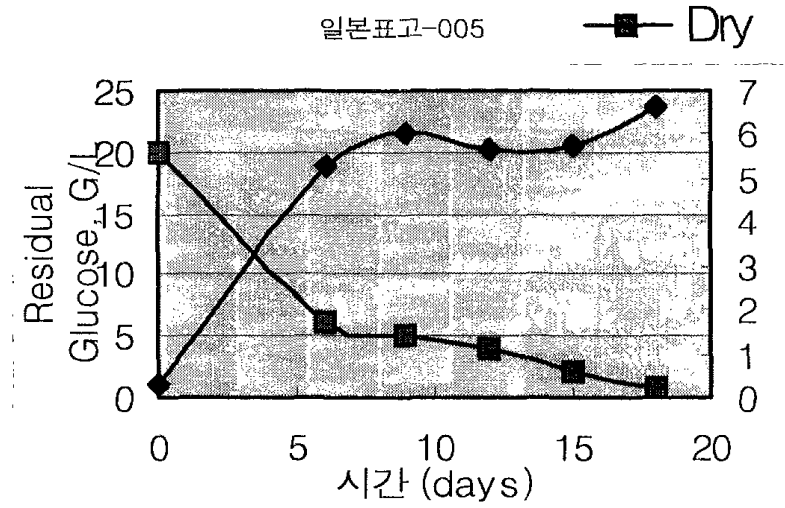


Fig.3-10. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(◆) produced by Japanese shiitake-005 by shaking cultures

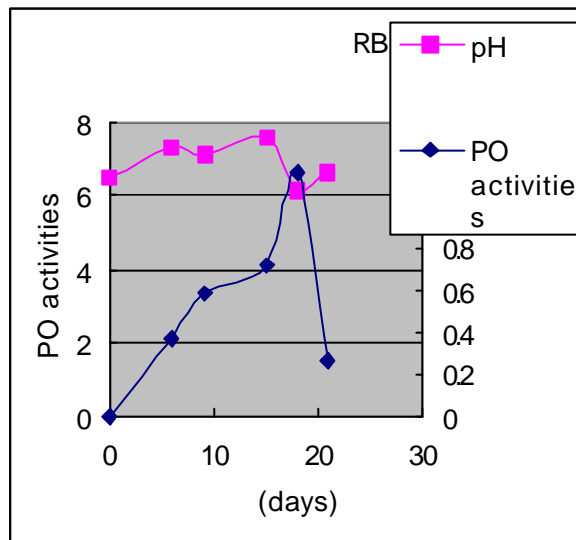
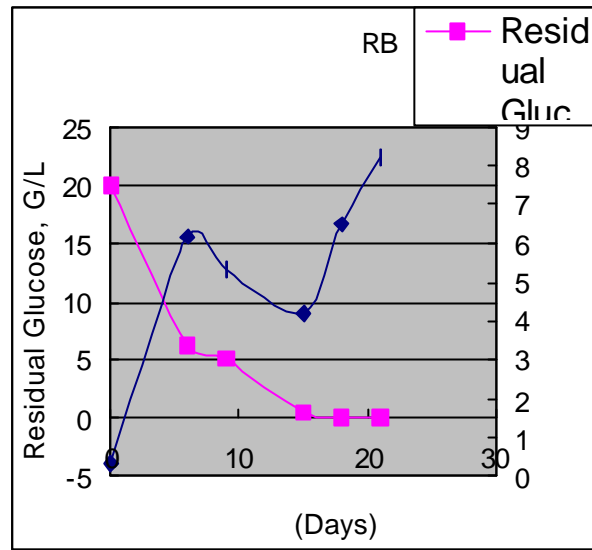


Fig3-11. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(■) produced by Oyster mushroom (SuHan)-RB byshaking cultures

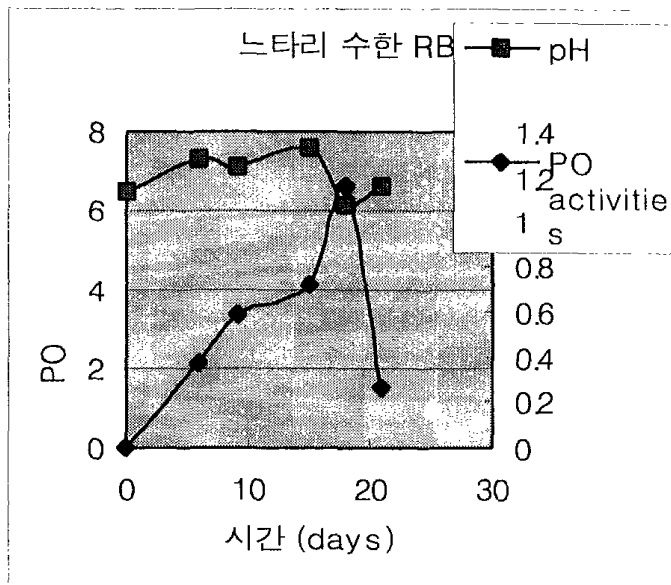
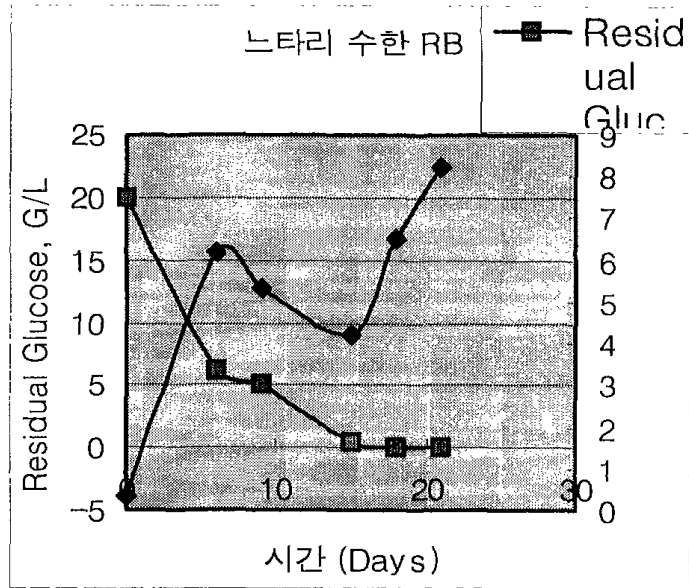


Fig.3-11. The dry weights (g/L), residual glucoses (g/L), pH's and Laccase activities(◆) produced by Oyster mushroom (SuHan)-RB byshaking cultures

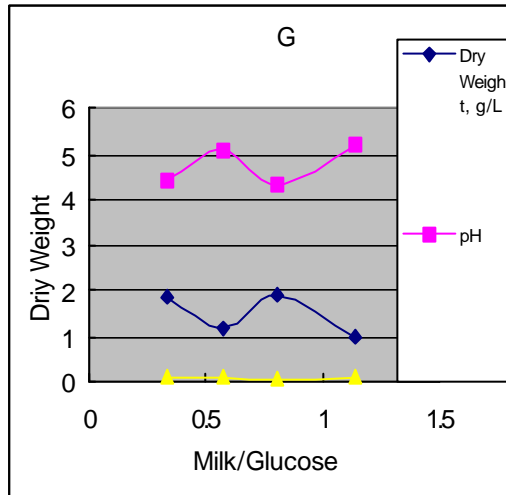
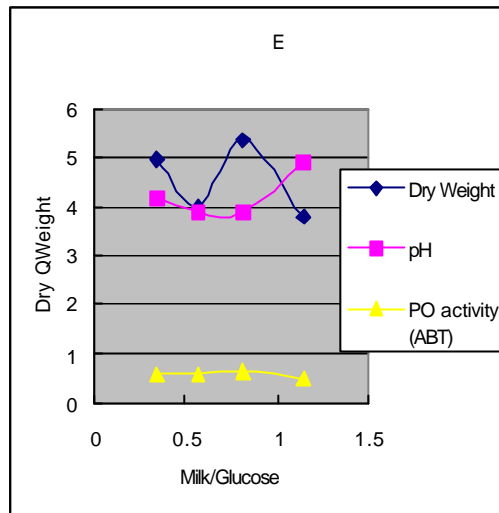
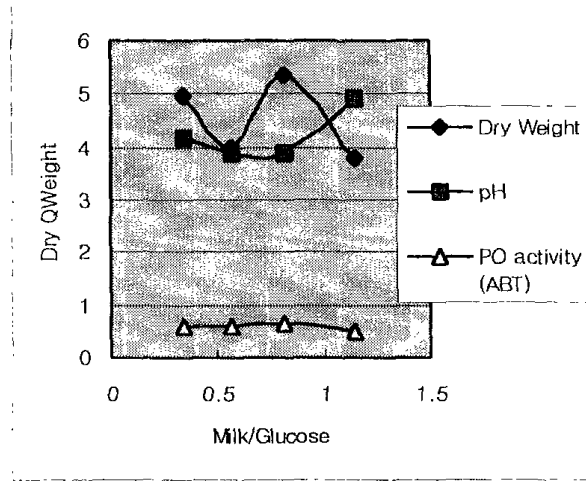


Fig3-12. The dry weights (g/L), pH's and Laccase (polyphenol oxydase activities) (ABT) produced by the three varieties of shiitake and Oyster mushroom (SuHan)-RB by the eighteen days' shaking cultures at 28 C.

표고 E



표고 G

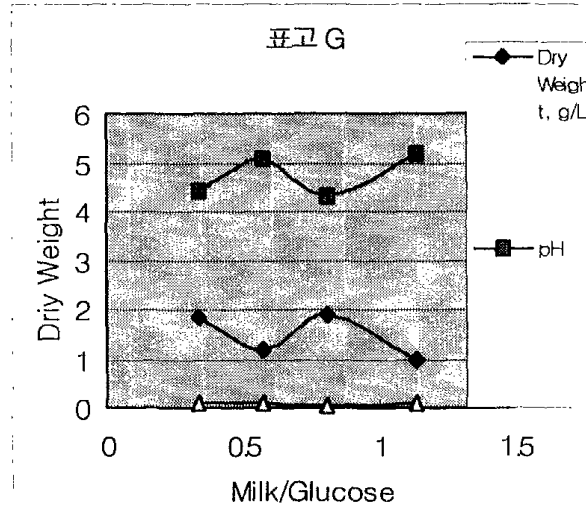


Fig.3-12. The dry weights (g/L), pH's and Laccase (polyphenol oxydase activities) (ABT) produced by the three varieties of shiitake and Oyster mushroom (SuHan)-RB by the eighteen days' shaking cultures at 28 C.

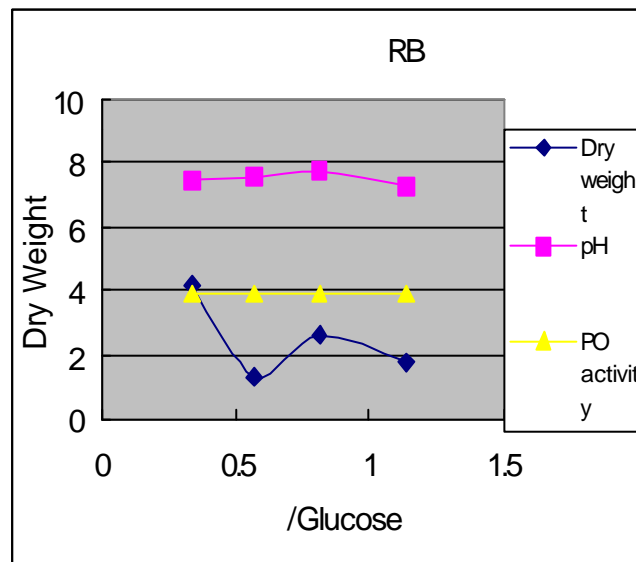
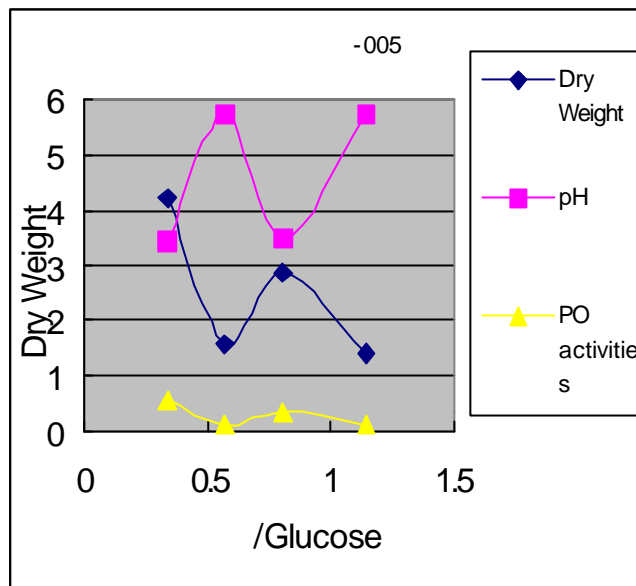


Fig3-12(continued)

균사의 건중량과 포도당 사용은 일반적으로 생리적 검사에 많이 이용된다. 산도인 pH와 Laccase측정은 균사의 상태를 조사하기 위한 방향으로 측정하였다. 우선, 산

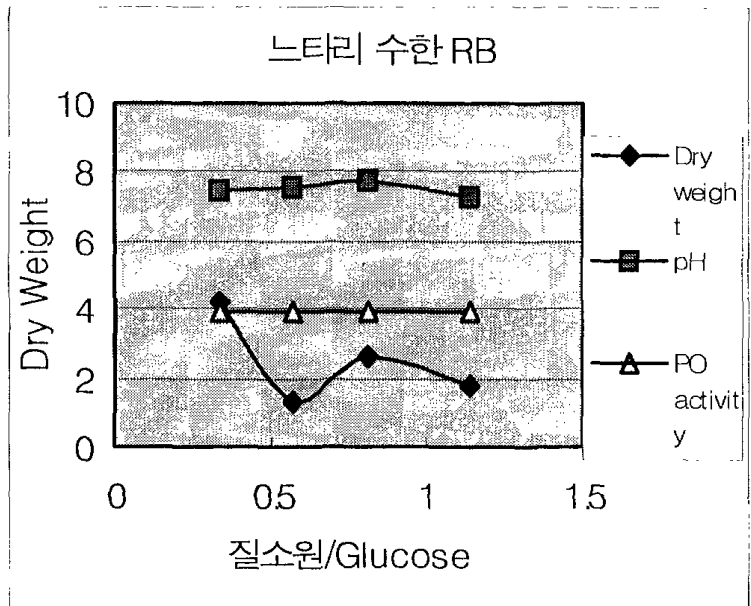
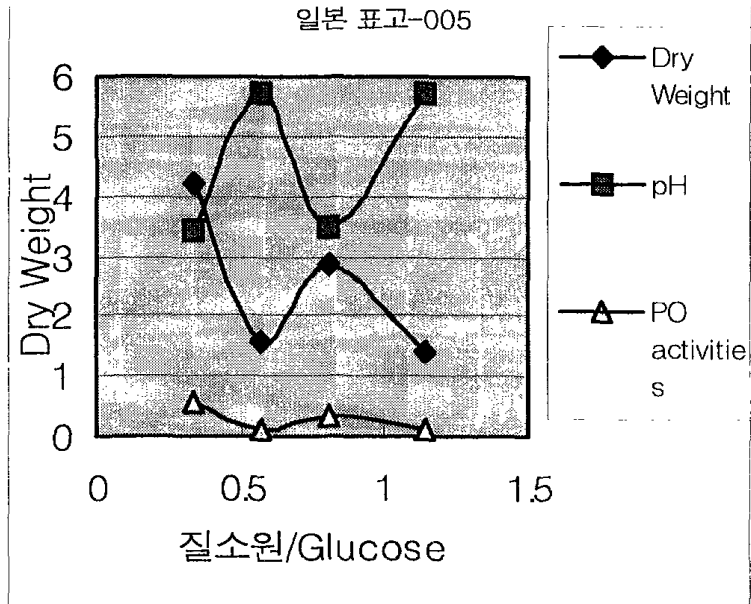


Fig.3-12(continued)



균사의 건중량과 포도당 사용은 일반적으로 생리적 검사에 많이 이용된다. 산도인 pH와 Laccase측정은 균사의 상태를 조사하기 위한 방향으로 측정하였다. 우선, 산도인 pH는 균사가 성장하면, 포도당을 이용한 유기산 배출인 즉 질소원이 모자라는 상태에서 발효가 일어나는 것은 균에서 흔히 관찰되는 내용이다. 다른 말로 균들은 TCA cycle 속의 유기산들이 배출되어서 산도가 높아지는 것으로 생각된다. 이러한 것은 일반 균배지인 PDA에서 배양하면 질소원이 모자라서 결국에 가서는 산도 pH 2.0.까지 내려 올 때가 있다. 주어진 탄수화물인 포도당이 약 20 g/L에서 5-7g/L의 건중량을 만든 것은 일반적인 균사의 성장으로 볼 수가 있고, 약 25-35 %의 에너지 효율로 계산된다. 이는 포도당이 분해되는 과정에 전부 ATP합성을 계산하면 약 45-47 %의 비율과는 낮은 편이나, 일반적인 생물에서 나오는 수치와 비슷하다. 산도에서 pH는 거의 3-5사이로 균사의 성장에 질소원의 부족이 나타났다 (Fig.3-8, Fig.3-9 & Fig.3-10). 비교 실험으로 사용된 느타리의 경우도 표고의 성장과 대동소이 하게 나타났으나, 균사의 성장과 산도인 pH가 다르게 보여, 대사과정이 표고와는 다르게 나타났다 (Fig.3-11). 여기서 Laccase activity는 균사의 굵주린 상태를 보기 위한 것으로 시간이 지남에 따라서, 또한 포도당을 없어지면서, 그 활성이 높게 나타났다. 이는 표고 균사는 15일 후에 포도당이 없는 상태에서, 느타리의 경우는 10일 이후에 Laccase 활성이 높아졌다. 이는 균사의 활동에서 기본적인 에너지 원의 부족에서 나오는 것으로 간주할 수가 있다. 접종원 액체 배양도 포도당이 완전히 사용된 후, Laccase활력이 관찰될 때에 사용하면, 균사의 induction시간도 줄이고, 직접 톱밥에서 잘 자랄 수가 있을 것으로 추측된다.

#### 나. 질소원:

질소원으로 skim milk를 사용하여 일정한 량을 계산하여 액침 배양을 하였다. 여기서 질소원 량에 따른 균사의 성장을 관찰하였다 (Fig.3-13). 질소원이 비교적 탄소원 량에 비례하여 많아질 때는 pH가 높아지나, Laccase활성으로 측정한 ABT는 낮아지고 있다. 또한, 질소원이 많아지면서, 당연히 포도당 함량도 낮아져, 균사의 성장에 낮은 것을 보여주고 있는 형편이다. 여기서 각각의 그림에서3번째의 자료는 모두 포도당 함량을 높인 경우이고, 이는 질소함량과 균사의 건중량의 관계는 없는 것으로

다른 생물과는 큰 차이점이 관찰되었다. 즉 단백질 원의 첨가는 비교적로 균사의 건 중량을 증가시키고 있으나, 여기서 균사의 성장에서는 그렇게 자료가 나오지 않았다. 또한, 단백질 함량이 높아질수록 산도인 pH가 높아지는 경향이 있고, 포도당이 많을 때와 같이 유기산 생산이 적게 되는 것으로, 생산된 유기산은 모두가 단백질 혹은 건 중량원으로 사용된 것으로 생각된다. 산도인 pH와 반대로 Laccase 효소의 활성은 큰 변동이 없거나, 낮아지고 있는 형편이다. 여기서, 표고나 느타리 균의 경우는 질소원이 많아지면, 건 중량은 낮아지고, 산도인 pH가 높아지고 있다. 그와 반대로 Laccase생산도 낮아지는 것으로 나타났다. 여기서 중요한 문제는 표고나 느타리 버섯 재배에서 질소원으로 미강을 많이 사용하는데, 적은 량의 단백질 함량에서 잘 자라는 것도 이와 같은 현상으로 생각된다. 대부분의 버섯 실험에서는 미강의 첨가는 조심스럽게 증가시켜서 실험하였으며, 이는 모든 결과에서 미강의 첨가는 오염을 야기시키는 것으로 보고되었다. 본 실험에서 오염 문제와는 달리 질소원이 상대적 에너지원에 높아지면서 점차적으로 건중량이 낮아지고 있으나, 산도인 pH는 높아지는 것으로 MM배지의 성분에서 에너지원에 비하여 질소성분이 낮게 배정된 것으로 판단된다. 그러나 질소원이 많아질수록 Laccase활성이 낮아지는 것으로 보아, 질소원 첨가는 균사의 유기물(톱밥) 분해하는 능력과는 다른 것으로 판단된다. 질소원 대사와 관련된 균주인 표고와 느타리 실험에서 거의 비슷한 결과가 나와, 생리적인 연구는 느타리의 자료를 사용할 수가 있겠다.

#### 다. 첨가제:

느타리의 원형과 표고버섯(임협-1호와 산림 5호)을 중점으로 액체 배양하였다. 느타리버섯은 표고버섯 균사 배양에 관한 연구에서 대조구로 사용하여 성장 곡선을 그렸다. 표고 균사체는 산림-5 (L-6)와 임협-1 (L-1)의 품종을 사용하였으며, 여기서는 임협-1의 성장 곡선만 성장 촉진제를 첨가한 실험으로 그렸다 (Fig. 3-13). 산림-5호와 임협-1가 배양하는 성장 곡선은 거의 동일하여, 다른 것은 생략하고, 모든 자료는 15일동안 배양한 결과를 Table-3.15에 나타내었다. 우선 첨가제 없는 액체 배양은 다른 앞의 그림 (Fig.3-8 Fig.3-9 & Fig.3-10)과 같이 균사는 3-6g/L의 건중량을 생산하였다. 그리고 포도당 소비량도 12일째까지 계속하여 사용하고 있었다. 그

러나 첨가제를 첨가한 액체 배지는 균사 성장이 최소한 4-6배 정도로 많이 성장하였다. 여기서 첨가제는 약 10mL/L (10g/L)가 첨가되었기 때문에 에너지 효율로 따지면, 3-4 g/L의 효과를 볼 수가 있다. 그런데 나온 결과는 그 이상으로 3-6배의 균사 성장을 얻었다. 그리고 포도당 사용에서는 거의 동일한 사용을 보이는 반면에, 첨가제는 어떤 이용 물질로 환산하였을 때와 비교하여도, 균사 성장은 첨가제를 넣을 때에 많이 성장 하는 것이 관찰되었다. 균사체 성장은 건 중량이 3-4 g/L에 지나지 않았으나, 첨가제 첨가에 대한 것은 4-6배의 성장을 보였다 (Fig.3-13). 두 개의 품종에서 표고의 균사 성장은 모두 대동소이하여 균체의 성장은 느타리에 비하여 느렸으며, 균사 체량도 적었다. 그림 3-9에서는 임협-1버섯에서 첨가제를 첨가한 것과 대조구를 비교하여 실험하여 성장곡선으로 나타낸 것이다. 우선, 촉진제를 첨가한 표고 균사는 성장도 빠르고, 8일 이내에 느타리버섯의 균사체 성장과 거의 일치하였다. 생리적인 면에서 균사의 포도당 사용량은 서서히 이용되는 것으로 나타났다. 표고 임협-1호는 9-12일 사이에 배양된 균사는 아직 사용할 많은 포도당이 배지 속에 남아 있어, 액체 종균으로 사용 시 세균의 오염에 많은 문제가 있을 것으로 생각된다. 여기서 배양시간에서 느타리버섯의 균사는 빠른 시간 내(12일)에 성장이 건중량 15-20g/L로 올라가는 반면에 표고 균사는 서서히 증가하여 성장하는데 많은 시간이 필요한 것으로 나타났다. 이러한 조건으로 표고 균사를 액체배양을 통하여 생산하여, 툽밥 배지에 접종하였다. 또한, 다른 버섯 균들도 액체 배양을 통하여 첨가제 효과를 보았다. 몇몇의 표고 균사(임협-5와 MOK-1)를 제외하고는 균사의 성장은 2-5배가량 되었다. 이는 지방 성분이 균의 성장에 어떤 좋은 영향력을 주는 것으로 나타났다. 위의 결과에서 단백질 원과 비교에서 지질의 첨가는 버섯 액체배양에 중요한 에너지 원이 되는 것으로 생각되었다. 이는 다른 생물에서 관찰되지 않는 것이 관찰되었다. 아마 이러한 현상은 버섯 재배에 많은 도움을 주고, 특히 액체 종균 생산에도 많은 도움이 기대된다.

#### 라. 툽밥배지에 접종:

표고와 느타리 균사를 액체 배양하여, 플라스틱 병에 담은 툽밥 배지에 접종하였다. 우선 멸균된 입병 기계로 충전시킨 툽밥 배지를 멸균한 후에 접종하였다. 액체 종균

과 고체 종균을 비교 실험하였다. 모든 실험에서 균사의 성장도 잘 되었고, 오염도 거의 없었다. 그러나 액체 배양한 병은 균사가 1-2주만에 모든 병에 꽉 차였다. 특히 느타리의 경우는 성장 속도가 표고보다 더 빨라서 거의 1주일 만에 병에 균사가 꽉 차도록 자랐다. 느타리 균을 톱밥 접종한 병에는 빨간 *Neurospora*균이 오염된 병이 많았으며, 가끔은 푸른 색의 *Trichoderma*균도 관찰되었다. 표고 재배에서는 거의 다른 오염이 관찰되지 않았고, 톱밥 접종한 것에는 푸른 곰팡이가 오염되었으나, 모두 나중에는 흰색으로 변하였다. 우선 이는 모두 느타리 재배에서 나온 결과에서는 약간의 오염이 있었으나, 표고 접종에는 거의가 오염이 없었고, 모두 잘 자랐다. 표고 배지는 이러한 균의 오염은 거의 없었고, 가끔 다른 균의 오염이 있었으나, 시간이 지남에 따라서 표고 균사가 이겨서 병에 흰 균사를 꽉 채웠다. 우선 각각의 병에 다른 종균을 각각 10개씩 접종하였으나, 모두가 오염되는 것이 적고, 잘 자라서 측정의 판별이 없었다. 다만 중간 중간 관찰한 내용은 액체 종균 접종은 다른 톱밥 종균 접종에 비하여 성장이 빨랐으며, 균사도 튼튼하게 성장하는 것이 관찰되었다. 여기서 나온 내용은 아직 자실체는 형성하지 못하였다. 실험실에 발이실이 없고 인력이 모자라서 계속하여 자연의 온도로 발이를 시작하였고, 그 결과는 곧 나올 것으로 기대된다.

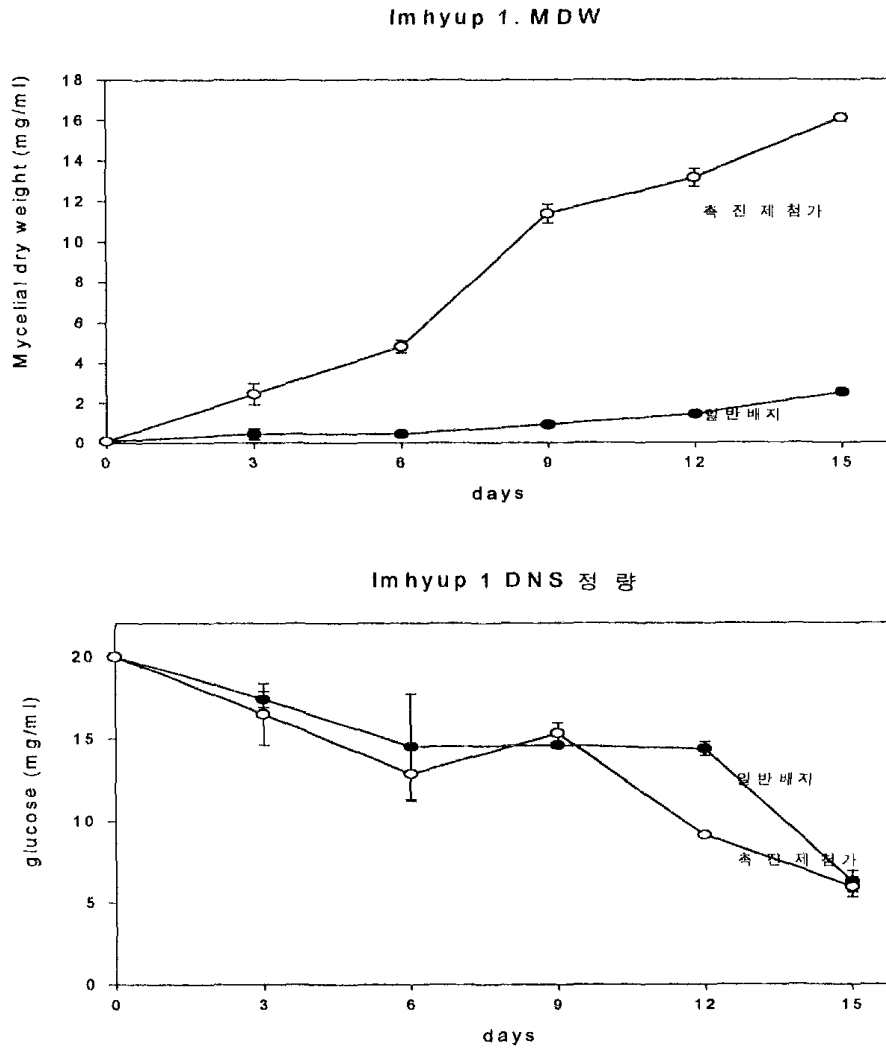


Fig.3-14. The mycelial dry weight (mg/mL; the upper) and the residual glucose (mg/mL; the bottom) produced by the shiitake Imhyup-1 by the shaking culture with without the stimulant

Table 3-15. Average growth of mycelia (dry weight, g/L) treated with the stimulant.

Varieties of shiitake	Mycelial Dry Weight (G/L) measured from the sixteen da	
	shaking cultures with or without the stimulants	
	Non treated	Treated with (0.5 v/v)
ImHyeop-1	2.97 ± 0.43	3.58 ± 1.88
ImHyeop -5	1.53 ± 0.21	1.36 ± 0.20
ImHyeop -6	2.25 ± 0.75	9.73 ± 0.63
ImHyeop -7	4.77 ± 0.68	10.30 ± 0.32
MOK-1 (Japanese)	0.46 ± 0.04	0.87 ± 0.10
만가닥버섯	2.98 ± 1.47	9.39 ± 2.08
팽이버섯	8.64 ± 0.09	16.68 ± 1.00
HukPeong-2 of oyster mushroom	6.60 ± 0.23	12.48 ± 1.17

Average value (g/L) ± Standard error for four replicates

#### 4. 결 론

표고의 접종원으로 표고를 액체 배양하여 균사의 성장과 활성도를 측정하였다. 액체배양에서 균사의 건중량과 포도당, pH 및 Laccase 활성을 조사하였다. MM배지의 조성을 이용한 결과, 표고의 균사는 약 18일간 배양한 결과 4-6g/L의 건중량을 만들고, 산도인 pH가 낮아져서, 많은 유기산을 생산하는 것으로 나타났다. 그리고 단백질 함량에 따른 균사체의 성장은 큰 차이점을 관찰할 수가 없었다. 단백질 함량이 클수록, 산도인 pH는 높아지나, Laccase 활성은 낮아졌다. 그와 반대로 균 첨가제를 첨가한 배지에서는 균사체 성장이 약 3-6배 가량 많아졌고, 균사의 활력도 왕성해졌다. 액체 배양 결과 느타리는 표고에 비하여 빠르게 성장하였고, 대사과정은 다른 것으로 나타났다. 버섯 첨가제 혼합의 효과는 일반적인 배지에 4-6배의 건중량을 증가시켰고, 이는 앞으로 버섯 재배에 중요한 자원이 될 것으로 생각된다.

## 5 참고 문헌

- Chang, ST., Buswell, JA and Miles, PG. 1993. Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers. Pp. 2.
- Chiu, SW, Ma, AM, Lin, FC and Moore, D. 1996. Genetic homogeneity of cultivated strains of shiitake(*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 100: 1393-1399.
- Hibbet, DS, Hansen K and Donoghue, M. 1998. Phylogeny and biogeography of *Lentibula* inferred from and expanded rDNA dataset. *Mycol. Res.* 102: 1041-1049.
- Kim, BG., Jeong MJ., Lee, CS., Lee, HK, Yoo. YB and Ryu, JC. 1995. Parameters affecting ploymerase chain reaction in RAPD analysis of *Pleurotus* spp.. *Kor. J. Mycol.* 23: 202-208.
- Lee, SS Kim, MH., Chang, HB., Shin, CS. and Lee, MW. 1998. *Pholiota adiposa* and its Related Species Collected from the Wild Forestry. *Kor. J. Mycol.* 26: 574-582.
- Lee, SS., Hong, SW., Jung, HC., Sung, CK., Kim, JH., Ka, KH. and Kim, HJ. 1999. The specific probes confirming the genomic DNA of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 27: 20-26.
- Lee, SS. & Sung, CK. 1997. The Mycelia isolated from the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 25: 121-129.
- Lee, TS., Bak, WC., Kang, HD., Kim, SK., Byun, BH., Yi, CK., Lee, WK. and Min, DS. 1997. Classification of Korean *Lentinula edodes* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Kor. J. Mycol.* 25: 219-225.
- Park, W. M., Ko, HG., Park, RJ, Hong, KS and Kim, GH. 1997. Differentiation of *Lentinus edodes* Isolates in Korea by Isozyme Polymorphisms and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Kor. J. Mycol.* 25:

176-190.

- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in Plants and Fungi. CRC press. pp 24-135.
- Williams, JG., Kubelik, AR., Livak, KJ, Rafalski, JA. and Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 19: 6531-6535
- Yukitaka, FN, Teruruki, M and Mitsuo, K. 1994. Fruiting body productivity of protoplast-derived clones in *Lentinula edodes*. *Mycoscience* 35: 137-139.
- Yoon, CS. 1992. Examination of parameters affecting polymerase chain reaction in studying RAPD. *Kor. J. Mycol.* 20: 315-323.
- Lee, KH, Jeong, H, Kim, YI. And Kim, BK. 1991. Production of antihypertensive constituents from *Ganoderma lucidum* IY005 by fermentation using industrial wastes. *Kor. J. Mycol.* 19: 79-84.
- Song, CH., Cho, KY. and Nair, NG. 1987. A Synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* 79: 866-876
- 박원목, 김동찬, 이종윤, 양재경, 유창현, 정원일. 1994. 침엽수 톱밥에서 표고 균사생장 촉진에 관한 연구. *한국균학회지* 22: 222-228
- 박원목, 송치현, 현재욱. 1992. 표고 버섯의 영양생리 및 기질개발. *한국균학회지* 20(1): 77-82
- 이태수, 조남석, 민두식. 1998. 액체종균 접종에 의한 표고톱밥재배 효과. *목재공학회지* 26(1): 19-28



## 제 5 절 표고벼의 육종과 이와 관련된 프로그램

### 1. 서 설

육종에 의한 식량 생산은 20세기 총아로서 녹색혁명을 이끌게 하였다. 미국의 녹색 혁명의 주축은 모두가 밀과 보리의 육종을 통하여 식물 병에 내성이 강한 품종과 생산량을 증대하는 품종을 개발하였다. 그래서, 밀 생산량은 거의 단위 면적 당 약 4배 이상의 수확을 얻을 수가 있어, 기하 급수적인 식량 생산을 이룩하였다. 우리 나라에서도 쌀 생산은 밀양과 수원의 농진청을 중심으로 점차적인 교배를 통하여 과거의 생산량에 비하여, 2-3배의 수량의 쌀을 생산하게 되었다. 최근에 와서 필리핀의 육종 연구소에서 다양한 품종을 만들고 있는 형편이다. 이러한 육종에 대한 것은 다수확을 위주로 한 결과를 요구하지만, 부수적으로 우리가 예측하지 않고, 생각할 수도 없는 유전적인 형질이 새롭게 발견되는 경우가 많았다. 그 예로 기후 환경에 적응하는 품종으로 키가 적은 dwarf 종을 만들게 되었다. 이러한 dwarf종은 육종의 목적이라 보다는 다 수확되는 개체 선발에서 나온 것으로 우리나라에서는 매년 태풍에 의한 손실을 줄이기 위한 것으로 줄기가 튼튼한 개체가 결과적으로 나온 것으로 우리나라의 기후대에 알맞은 상상하지 못한 내용의 유전적인 형질이 것을 파악하게 되었다. 여기서 나온 난장형 (dwarf)의 유전자는 우리나라의 '얇은뱅이' 밀과 같은 의미이고, 벼 육종에서 나온 결과와 동일한 내용이다. 다른 말로 유전자의 정확한 성격이나 학술적인 원리를 알 수가 없어도, 육종의 결과와 실험 과정 속에서 많은 내용의 학술적인 원리가 발견된다는 것이다. 이러한 것은 육종의 목적에 따른 내용으로 중간에 세운 가설과는 많은 면에 일치되지 않는 경우이다. 하여튼, 식물은 육종이란 것을 통하여 많은 수량을 쌀을 얻는데 노력을 하였으며, 그것은 다른 제배 기술과는 완전히 다른 방법으로 개발한 것이다. 이러한 일환으로 육종을 위한 쌀의 유전자 보관소와 유전자 파악을 위한 실험실인 International Rice Institute (IRI)가 필리핀에 만들어져서, 우리 농업에 유용하게 사용되는 실예이다. 그 후속 내용으로 germplasm 은행, 씨 은행, 유전자 은행 (gene bank) 등이 과거 70-80년대에 미국과 일본에서 많이 주장되어 설립

된 한 이유이고, 원종에 대한 유전 보존 차원에서 이루어진 내용이다. 최근에는 여러 나라에서 새롭게 나와 앞으로 육종을 위하여 필수적인 내용으로 설립되었다. 이와 반면에 버섯에 관한 것은 아직 육종에 대한 연구가 체계적으로 이루어진 것이 없다. 아직 많은 면에서 기본적인 의미를 이해하는 사람이 많지 않다.

버섯의 육종은 우리나라에서 표고버섯은 임업연구원과 산림조합 중앙회에서 연구가 시도되고 있으나, 아직 교배와 유전 변이를 통한 실험은 보고된 바가 없다. 느타리 버섯은 농진청 응용 미생물실을 통하여 느타리의 원형질 융합으로 많은 품종들이 만들어졌으나, 과거에는 많은 생산을 하였으나 현재는 농가에서 사용한 예는 거의 없다. 그리고 최근에 많은 바이러스 오염과 여러 가지 퇴화된 균사 발견되어 문제가 심각한 상태이다. 표고의 육종과 개발은 대부분이 일본의 종균 회사들이 그 품종을 개발하는 기술들을 갖고 있으며, 이에 대한 공개된 육종의 방법이 아직 발표된 예가 없다. 그러나 다른 버섯균인 검은 비닐버섯 (*Pholiota adiposa*)에 관한 연구에 포자의 mating system이 bipolar 혹은 tetrapolar를 확인 실험과 이에 따른 mating한 예로 몇몇개의 일본 논문이 있다. 또한, 개인적인 Kitamoto 박사의 접촉으로 팽이버섯의 육종에 단포자의 분리와 관련된 기술과 방법들이 소개받았다. 그리고 단포자의 분리 방법으로 액체 배양을 통하여 혹은 한천 배지에 오래 동안 계대배양을 통하여 monokaryotic mycelia 을 얻어서 실험한 내용에 대한 것이 있었다. 아직 상세한 내용은 알 수가 없지만, 일본에서는 mating을 이용한 육종을 오래 전부터 시도하여 여러 가지 품종을 만든 것으로 생각되고 있다. 그러나 공개적으로 나온 발표는 거의 없었다. 최근에 유럽인들에 의하여 양송이 (*Agaricus bisporus*)에서 monokaryotic mycelia를 얻는 방법과 유용버섯의 mating system을 확인하는 연구가 많이 진행되었고, 이에 대한 논문들이 가끔 발표된 경우가 있다. 또한, 중국에서 느타리 버섯 육종에 흑형과 수한 (품종의 이름)은 단포자 분리와 교배(mating)를 통한 연구로 만들어졌다는 것을 방문 결과로 알 수 있었다. 그래서 많은 수입을 올리면, 한국에 육종center를 만든다는 계획이다. 그러나 아직까지 버섯균은 단지 자연 상태에 있는 균사나 자실체를 통하여 분리하여 다양한 재배 실험을 거쳐서 실제 사용되는 경우가 많다. 일본의 표고의 연구에서, 과거의 미국이 밀 육종 때와 같이 다양한 원산지 (origin of shiitake)의 표고버섯균을 태국, 수마트라, 파푸아뉴기니, 중국 등에서 분리하여 수집 (Fig3.1 in chapter

3.1)하는 것으로 나타났고, 균종에 관한 생물학적인 유연 관계를 파악한 논문이 가끔 발표되고 있다. 아마, 이러한 것은 표고의 종주국의 위신과 그에 걸맞는 연구를 진행하려는 시도로 보인다. 그러나 우리나라에서는 이와 같은 육종 연구가 없고, 균주의 수집은 농진청 응용미생실과 산림조합중앙회에서 이루어지고 있는 형편이다. 아직 많은 면에서 버섯에 대한 소비와 관심은 높아도 실제 응용되는 버섯 육종과 이에 알맞은 연구의 풍토는 아직 요원하다고 생각된다.

생물은 대부분이 유전자를 통한 세대를 이어가는 것으로 설명되고 있다. 부계 모계를 통한 결합으로 유전자가 명시가 되어 있으며, 이에 대한 기본적인 연구는 너무나도 뚜렷하여 다른 반대의 의견이 없는 것으로 생각된다. 가끔, 모세포 유전이 고전적인 Mendel의 유전과 다른 것으로 생각되었으나, 최근 분자생물학과 유전공학의 기법이 발달됨으로 이러한 미토콘드리아 (Mitochondria) 혹은 엽록체 (Chloroplast)의 유전으로 밝혀, DNA인 유전정보에 의한 유전을 더욱 명확하게 하였다. 결과적으로 생물은 결혼 혹은 교배를 통하여 유전되고, 좋은 형질 혹은 자연에 적응된 형질은 선택되어 살아가고 있는 형편이다. 과거 다윈이 유전과 진화에 관련된 이론, 특히 인간의 진화의 이론은 많은 면에서 부정되었으나, 다른 경제적인 작물과 동물에서 더욱 많이 사용되어 녹색혁명을 이룬 결과를 낳았기에 어떤 부정도 없다. 이미 이러한 것은 다윈은 유전과 환경적인 것을 고려하여 자연선택 (natural selection)이란 용어를 만들었다. 생물의 육종에서는 이러한 것을 통하여 인위적인 교배와 선택으로 이루어진 오랜 연구이다. 최근 버섯 육종에는 다수확의 품종과 질적으로 우수한 개체를 선발하는 작업으로 많은 연구의 인력과 기초적인 학문의 배경으로 이루어지는 내용으로 생각되어지고 있고, 본 연구는 버섯 육종에서 기본적인 연구를 통하여, 육종에 대한 가능성과 가능한 방법을 제시하여 앞으로 표고 연구에 도움되고져 하였다. 본 연구는 포자의 분리와 선발하는 방법을 심도 있게 토론함으로 앞으로의 연구자에게 큰 도움이 되고, 표고 육종 연구에 기본적인 안으로 생각된다. 또한 이러한 것을 밑바탕으로 다른 버섯 연구에 도움을 주어 앞으로 우리나라의 버섯의 생산에 조금이라도 도움이 되었으면 하는 바람이다.

## 2. 재료 및 방법

#### 가. 표고:

여러 품종의 표고를 톱밥 배지에 접종하였으며, 성장시킨 후에 발이를 유도하였다. 보통 여름에는 약간 서늘한 곳에 두면 표고 자실체가 생성되나 배양실에서는 32종의 표고 품종 모두가 거의 발이되지 않았다 (Table-3.2 in chapter 2.1). 그러나 시간이 지남에 톱밥을 야외로 옮기고, 온도가 낮아지면서 L-1 (입협-2호), L-6 (산림-5호) 및 K-1 (마곡사에서 채집된 표고 균사)의 자실체를 얻었다. 완전히 성숙된 자실체는 실험실로 옮겨, 줄기를 잘라 내고, sporeprint를 받았다. 이때 사용된 검은 색종이(인위적으로 받은 검은 색의 색종이와 유산지를 풀로 붙여 사용함)는 멸균된 것을 이용하여, 갓 부분만 위에 놓고 깨끗한 플라스틱 비이커로 덮었다. 그 후에, 3-4시간 지난 후에 포자가 떨어지면 검은 색종이 위를 관찰하여 판별하며, 약 12-24시간을 두어서 표자를 받아 단포자 분리에 사용하였다.

#### 나. 포자:

여기서 언급된 단포자는 표고 자실체에서 받은 sporeprint 에서 얻은 담자낭 포자이고, 균사체는 위의 sporeprint를 plating method로 분리된 균사체 (mycelium originated from the basidiospore)를 말하고 있다. 유산지에 받은 sporeprint 는 2-3일 내에 사용하였고, 멸균된 증류수를 사용하여 포자 수를 현미경으로 계산하여, 한 plate에 정당한 량인 20-30 개가 되도록 희석하여 사용하였다. 배지로는 일반적인 영양 배지를 사용하지 않고, 단순한 water agar에 희석한 포자 용액을 넣고, 멸균된 유리병으로 균질하게 만들어서, 포자의 발이를 시켰다. 조건이 좋을 경우는 포자가 균사를 내어서 다른 균사와 결합하는 속도가 QK르기 때문에 하루에 2번씩 관찰하여 균사의 mating 혹은 균총의 overlap이 일어나지 않도록 했다. 다른 방법으로는, 분리하는데 바쁘기 때문에 10-15 C incubator에 넣어서, 균사의 성장을 서서히 일어나도록 유도하였다. 발이된 균사는 우선 PDA에 옮겨서 성장 속도를 관찰하고, 현미경을 통하여 clamp connection이 없는 것을 확인한 후에 멸균수에 저장하여 사용하였다. 분리된 포자는 확인된 순서로 번호를 매겨서 반영구적으로 보관하였다. 단포자에서 나오는 균사는 현미경 관찰과 PCR-RAPD분석 결과를 보아 monokaryptic mycelia임을 확인하여 시도하였으나, 실패하였다.

#### 다. 분리:

sporeprint에서 얻은 포자는 여러 가지 배지에서 포자를 발이 시켰다. 이는 우선 쉽게 능력있는 유전자를 가진 균사체를 얻기 위한 실험이었다. Glucose 20g, Tryptone 2.0g, Yeast ext 2.0g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.75g, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.02g, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.02g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g/1L 넣은 배지를 기본 배지로 하여 실험을 수행하였다. 기본 배지에 Gallic acid 2.0 mM, LSA (lignosulfonic acid) 0.1% , 및 Tannic acid 0.1% 농도로 위에서 언급한 배지에 첨가하여 포자의 발아를 관찰하였다 (김등, 1986). 혹은 100g의 참나무 톱밥과 벗짚을 1L용액에 넣고 2-3시간동안 끓여서 나오는 추출 용액을 기본 배지에 넣어 선발 배지로 사용하였다. L-dihydroxyphenol alanine (DOPA)를 기질로 하여 Polyphenol oxidase (PO)의 활성을 측정하였다 (김등, 1986). 0.03M phosphate buffer(pH 6.5) 용액 2mL에 5mM DOPA를 만들고, 1mL 효소 용액을 넣어 최종 부피가 3mL가 되도록 하고. 30°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 475nm에서 OD를 측정하였으며, 0.001 OD의 변화를 1unit라고 정의하였다.

#### 라. Matings:

위에서 분리된 균사를 PDA에 배양하여 두개 혹은 네개의 균사체를 같은 PDA plate에 놓고 이들이 접촉하는 것을 관찰하였다. 우선, 2개의 담자낭 포자에서 유래된 균사는 서로 만났을 때에 몇 개의 반응으로 나타났다; 두개의 균사체가 만나는 지점에 서로 균사가 엉키지 않고, 정지된 상태로 있는 것, 두개의 균사가 서로 만나서 균사끼리 엉켜서 두터운 띠를 형성하고 나중에 가서는 갈색으로 변화하는 것, 혹은 균사가 서로 만나서 두터운 띠를 형성하지 않으나, 나중에 가서 plate 전체가 연한 갈색을 띄는 것으로 구분될 수가 있었다. 이들 중에 두 균사가 서로 만나서 두터운 띠를 형성하고 갈색으로 변화하는 것을 선발하여 교배된 균사로 정의하고 실험하였다. 나중에 이들의 교배된 균사는 다시 PDA에 옮겨서, 배양하여 조그마한 primordium 혹은 자실체 형성을 관찰하여, 균사는 보관한 후에 다음 실험에 임하였다. 또한 이 균사는 다시 미강이 20%가 포함하는 톱밥 배지에 접종하고 배양하여 표고 생산량을 조사하였다.

마. 분해실험: 일반적으로 교배에서 얻어진 균사를 다양한 나무 기질에 배양하여, 나무의 리그린 혹은 섬유소원의 분해량을 측정하는 실험이었다. 수종의 종류는 아까시나무, 굴참나무, 갈참나무, 미류나무, 소나무, 오리나무 조각 위에서 언급된 교배된 균사를 접종하여 수종의 물질 이용량을 측정하여 균사의 성격을 파악하고자 하였다: 1) Water agar (국산 한천, 2%), 2) Milk powder 5.7g/L을 이용하여 표고 균사의 성장이나 유전적인 차이점을 파악하기 위하여 실험을 하였다. 위의 물질을 각각 만들어진 배지에 나무 조각들 멸균하여 약 3개월 동안 배양하여 균사에 의하여 사용된 무게 손실 (weight loss)을 중심으로 측정하여 균사의 생리적인 특징을 파악하였다. 이때 나온 자료는 여러 반복을 통하여 교배된 균사체가 어떤 차이점이 있는지 일반적인 통계 분석인 ANOVA분석을 통하여 그 결과를 정리하였다.

#### 마. 발이:

액체로 배양된 균사체를 톱밥 배지에 접종한 것을 3-4개월 동안 배양하여, 그대로 실온에서 방치하였다. 그 후, 표고 배양 배지는 점점 갈변화가 일어나서 표면이 모두 갈색으로 변한 것을 보관하여, 물 담그거나 혹은 인위적으로 습기를 공급하는 발이실에서 자실체 형성을 관찰하였다. 자연적으로 자실체 발이실이 없어, 그냥 계절의 변화에 따른 것만 관찰하였다. 현재 10월 중순경에 모든 발이 처리를 하여 자실체 형성을 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

우리나라의 표고 버섯육종은 산림조합 중앙회에서 많은 균주를 보유하고 있고, 자실체에서 균주를 분리하는 방법 외에는 기초연구가 별로 이루어진 것이 없다. 단지 원목 재배의 기술이 전통적인 관행으로 사용되고 있고, 톱밥 배지를 이용한 버섯 생산은 아직 실험 중에 있는 형편이다. 이러한 환경에서 표고의 균사 (품종)와 자실체에서 분리한 조직 균사의 유지와 생산 실험도 단 몇 명에 의하여 이루어지고 있는 형편이다. 표고의 자실체 형성, 단포자 분리, 교배 (mating), 균사의 분해 능력에 대한 기본적인 자료도 없는 형편이다.

단포자는 소량의 배지를 통하여 하루에 100-1000개 정도의 포자에서 나오는 균사 (monokaryotic mycelia)를 얻을 수가 있으나, 이들을 분석하여, 어떤 성격을 갖고, 생리적인 특징과 재배적인 특징이 구분되는 어떤 기준이 있어야 연구의 실험이 쉬운 편이나, 불행하게도 이에 대한 자료나 정보를 얻지 못하였다. 일본에서 균사의 성장이 빠른 것이 다른 균사보다 더 많은 표고들 낸다는 정보 혹은 유전자에 관련된 생화학적인 내용의 정보가 있다고 하였으나, 이 또한 수집하려고 노력하였으나 얻지 못하였다. 그리고 수집된 표고 품종의 균사에 중온성과 저온성의 차이점이 어떻게 구별되고, 어떤 유전자가 작용하는지에 대한 자료가 없고 그냥 말로만 구분할 뿐이다. 본 실험에서는 이러한 기초적인 내용을 밑바탕으로 단포자 (basidiospore)분리와 단포자 균사체 (monokaryotic mycelia)을 확인하는 방법을 개발하였고, 이들을 교배시키는 동안에 일어나는 생리적인 변이들은 관찰하여 보고하는 바이다. 이미 이러한 자료는 일본 표고 연구가들이 많이 연구하여, 알려진 내용으로 생각되나, 아직 공식적으로 발표한 논문은 없다. 단순히 monokaryotic 혹은 dikaryotic mycelia 의 구분도 힘든 일이었다. 그리고 단포자가 분리되면 수많은 균사나 만들어지나 이에 대한 단포자의 능력을 파악하여, 선발하는 기본적인 배지가 필요한데, 이에 대한 생리적인 원리가 밝혀진 것이 없다. 이러한 환경에서 표고의 육종의 연구는 상당히 힘든 일이었다.

#### 가. 포자 분리:

기본적인 배지를 통하여 포자들은 최소한 30-100개 정도로 분리하였다. 우선, 발아가 빨리 되는 것을 위주로 하여, 단 포자에서 성숙한 균사를 분리 하였다. 주로 L-6 (산림-5호) 와 L-1 (임협-1)인 상업성이 높은 균사를 이용하여 자실체를 형성시켜 포자를 분리하였다. 또한 야외에 분리된 K-1 (마곡사)도 야생 표고의 종류로 실험에 사용하였다.

현미경 관찰로 담자낭과 담자낭 포자를 확인하고, 한 담자낭 (basidium)에 4개의 포자가 달리는 것을 관찰하였고, 또한 증류수로 희석된 포자를 관찰한 후에 plating method로 포자를 분리 실험하였다. 분리된 균사는 포자가 한 plate에 많을 때는 균사끼리 서로 엉겨서 분리할 수가 없었다. 그래서 40-50개의 포자가 포함되는 용액을 현미경 검경을 통하여 만들어서, plating하였다. 그리고, 시간이 오래 경과하면, 균사

Table 3-16. Mycelia isolated from the basidiospores of the three different basidiocarps..

Varieties	Mycelium <sup>a</sup>	Growth, mm <sup>b</sup>	Mating type <sup>c</sup>	Remark
K-1 (collected from ) MaKokSa (80.3 ± 4.0) <sup>d</sup>	K-1- 2	40.4	Ab	채집한 균주
	K-1- 3	51.6	aB/ab ?	
	K-1- 4	60.8	Ab	
	K-1- 5	49.2	AB	
	K-1- 8	44.5	AB	
L-1 (ImHyeop-1) (47.2 ± 7.2) <sup>d</sup>	K-1- 17	39.9	Ab/aB ?	
	L-1- 17	40.7	ab	입협-1호
	L-1- 26	60.9	AB	
	L-1- 27	45.0	ab	
	L-1- 28	47.2	AB	
	L-1- 217	44.6	not determined	
	L-1- 4	-	not determined	
	L-1- 5	-	not determined	
L-6 (SanLim-5) (80.4 ± 1.) <sup>d</sup>	L-1- 6	-	not determined	
	L-6- 3	42.0	AB	산림-5호
	L-6- 5	-	ab	
	L-6- 6	29.7	ab	
	L-6- 8	33.3	ab	
	L-6- 12	43.8	AB	
	L-6- 13	33.3	not determined	
	L-6- 14	43.9	not determined	
	L-6- 15	26.1	Ab ?	
	L-6- 17	29.6	not determined	
	L-6- 21	123.1	dicaryotic	
L-6- 101	19.5	not determined		
L-6- 204	22.4	aB ?		

<sup>a</sup>The mycelium originated from the single basidiospores.

<sup>b</sup>The relative value as a growth of mycelium in the sawdust solid medium (Rice bran (20% w/w)) for 21 days' inoculation

<sup>c</sup>Mating type proposed as assumed if K-1-2 is the 'ab'.

<sup>d</sup>The relative value as a growth of mother mycelium in the sawdust solid medium (Rice bran (20% w/w)) for 21 days' inoculation

의 성장이 높아서 균사끼리 엉겨서 단포자 분리에 실패할 경우가 많았다. 그리고 많은 경우에 세균의 오염이 많이 되고 있으나, 이는 무시하고, PDA에 옮겨서, 균사의



성장이 어느 정도가 되었을 때에 균사의 clamp connection를 확인하였다. 확인된 단포자 균사 (monokaryotic mycelia) 과 다음 mating 실험을 위하여 반영구적인 용액에 보관하였다. 우선, 분리된 포자에서 나온 균사는 Table 3-16과 같이 분리된 순서로 1, 2 번을 매기고, 이들을 톱밥 배지에 접종하여 성장을 측정하였다. 각각의 모 균주인 K-1은 성장이 80.3mm이고, 수집된 포자의 균사는 약 40-61 mm의 톱밥에 성장 정도를 나타냈었다. L-1균과 L-6균도 같은 방법으로 균사의 성장을 관찰하였다. 여기서 나온 mating type은 주어진 포자 균사 내에서 이루어졌다. 그래서 대표적인 한 line인 (K-1-2)를 ab로 가정한 후에 다른 것과 교배한 결과를 놓고 유추하여 만들었다. 다른 선발된 포자인, L-1균과 L-6균도 동일한 방법으로 mating type를 결정하였다 (Table 3-15).

단포자 분리배지로 앞에서 언급한 기본 배지에 lignin과 관련되는 Gallic acid, LSA (lignosulfonic acid) 및 Tannic acid 를 첨가하여 단포자를 plating하였다. 3-4일 동안 상온에 배양한 결과 포자가 흰색의 점으로 나타났으나, 배지 속에 있는 성분을 분해하는지에 관한 것은 알 수가 없었다. 그러나 뒤에 있는 두 성분인 LSA (lignosulfonic acid)과 Tannic acid는 한천을 물렁물렁하게 만들어서 단 포자를 plating 하는 데는 문제가 있었다. Gallic acid는 붉은 색을 띠는 배자로 사용하기가 좋았으나, 균사가 성장함에 따라서 어떤 분해라던가 어떤 생리적인 반응을 보여주지 않았기 때문에 계속하여 사용할 수가 없었다. 여기서 수많은 포자를 분리할 수는 있어도, 어떤 포자가 이 실험의 육종에 우수한 것인가를 판정하여 선별한 포자 균사를 얻을 수 있다면 많은 량의 실험이 줄어들고, 짧은 시간 내에 많은 결과를 얻을 수가 있다. 이러한 내용은 실험의 양과 시간을 단축하는 방법으로 많은 시험을 통하여 얻어지는 기술이다. 일본의 연구에서 단포자 균사가 빨리 성장하는 것이 톱밥 배지에 좋고 좋은 결과를 낼 것으로 설명한 논문도 있었다. 그러나, 이는 단지 일반적인 의견에 가까운 내용의 실험으로 어떻게 사용할 지와 우리 실험에서 옳은 결과가 나올 지가 의문이다. 각각의 선발된 포자 균사들 이용하여 균사끼리 mating을 시켰다 (Table 3-18). Mating type에서는 다른 연구에서 나오는 결과와 비교하여, 구별하기가 힘든 것이 많았다. 두개의 균사체가 만나는 지점에 서로 균사가 엉키지 않고, 정지된 상태로 있는 것은 같은 Mating type인 경우와 dikaryotic mycelia를 만났을 때 나오는 형상이다. 일반적으로

같은 균사를 다른 쪽에 놓으면 균사가 성장하면, 서로 만나지 않고 격리된 선을 만들어서 같은 균임을 확인할 수가 있다. 이는 같은 조건에 큰 동일한 균사의 경우에 흔히 일어나는 내용의 것들이다. dikaryotic mycelia 균사 (예; L-6-21)는 monokaryotic mycelia와 같이 성장하면, 균사의 성장 속도가 빠르고, 다른 균사를 감싸고, 성장을 저지시킨 경우가 많다. 이때 균사가 자란 형태는 너구리의 눈과 같은 plate가 되는데, dikaryotic mycelia는 주로 배경으로 전체 plate에 퍼져 있고, monokaryotic mycelia는 눈알과 같이 격리되어 분리된 형태의 성장이 보인다. 여기서 사용된 L-6-21은 단포자로 관찰된 포자로 보았으나, 실험의 결과는 dikaryotic mycelia 로 나타났다. Mating 된 경우는 두개의 균사가 서로 만나서 균사끼리 엉켜서 두터운 띠를 형성하고 나중에 가서는 갈색으로 변화하는 것으로 전형적인 mating된 형태이다. 이와 같은 것은 거의 많은 경우가 관찰할 수가 없었고, 균사가 서로 만나서 두터운 띠를 형성하지 않으나, 나중에 가서 plate 전체가 연한 갈색을 띄는 것으로 구분될 수가 있다. 특히 균사끼리 만나고, 서로 반응하는 데는 복잡한 것이 있는 것으로 두터운 장벽을 형성되지 않아도, 균사끼리 엉켜서 전체가 갈색으로 변화하는 경우가 많았다. 두 균사의 반응에서 잘 반응이 되지 않고 나중에 갈변화되는 것은 다르게 표현하였다. 그리고, 많은 경우에는 전형적인 형태의 mating type가 이론대로 나오지 않았다. 다른 품종의 균사끼리 반응에서는 복잡하게 나타났다. 아마 같은 품종에서 한 자실체 내에서 포자는 어떤 중요한 tetrapolar system을 가지고 있으나, 다른 품종의 포자와 결합할 때는 다른 양상의 것을 보이고 있다. 특히, K-1-5은 L-6 균의 모두와 결합하여 배지에 갈색을 내고, 조그만 primordium를 형성하는 것을 관찰하였다. 품종이 다른 경우에는 서로의 성과 관련 없이 mating이 일어나는 것으로 보였다. 이는 다른 균의 mating 실험에서 특히 느타리, 팽이, 검은 비닐버섯에서 나온 결과이기도 하다. 여기서 나온 각각의 포자는 다른 어떤 반응을 하기 때문에 품종끼리 교배는 다른 어떤 식물의 육종보다 더 쉬운 것으로 생각된다.

여기서 서로 결합시켜서 균사를 채집한 것인 영어 A, B, C, - G로 표시하였다. 여기서 갈색화된 조직에서는 조그만 덩어리 같은 것 (크기 2-4 mm) 이 형성되어 primordium으로 생각하였다. 그런데, 시간이 지남에 따라서 G는 한천 배지에서 3-6mm 크기의 자실체를 만들었다. 또한 앞장에서 G는 언급한 실험에서 액체 배지에

서 자실체를 만들었다 (see Chapter 2.4). 이에 대한 균사는 아직 자실체를 형성하는 지 또한 여러 가지의 배지에서 잘자라고, 많은 수량의 버섯을 내는지에 관한 연구는 필요한 것으로 아직 요원한 실험들이 남아 있다. 여기서 균사체가 결합하는 것을 명확히 파악한 것은 K-1균에서 K-1-5(K-1-2 결합과 L-균에서 L-6-3(L-6-5과 L-6-3(L-6-6이 명확하게 관찰되었다. 두 균사 사이에서는 K-1-5(L-6-5가 발견되었다. 이 균들은 위탁 연구과제에서 필요한 pDH-10를 삽입하기 위하여 보내졌다 ((는 교배 혹은 mating을 의미함).

Table 3-17. Mating between two basidiospores collected from the basidiocarps

	Mycelia (type) <sup>a</sup>	K-1- <sub>2</sub>	K-1-5 <sub>7</sub>	K-1-1	L-6-3	L-6-5	L-6-6 <sub>21</sub>	L-6-4	L-6-20
K-1	K-1-2, (ab)	⊙				(F)			
	K-1-5 <sup>d</sup> , (AB)	+ <sup>b</sup>	⊙			(B)	(D)	(E)	(G)
	K-1-17 (aB/Ab)	+ <sup>b</sup>	+ <sub>±</sub>	⊙			(G)		
L-6	L-6-3, (AB)				⊙				
	L-6-5 <sup>d</sup> , (ab)				+ (A) <sup>c</sup>	⊙			
	L-6-6, (ab)	+			+	-	⊙		
	L-6-21, (dikaryo)		+	+	+ <sub>±</sub>	-	-	⊙	
	L-6-204, (aB/Ab)				+ <sub>±</sub>	-	-	+ <sub>±</sub>	⊙

<sup>a</sup>Mating type proposed

<sup>b</sup>The states of mating; +: mating, ±: questionable but browning in barrier, -: not mated but separated

<sup>c</sup>The dikaryotic mycelium resulted from the matings

<sup>d</sup>The mycelia selected and sent for the injection works of pDH-10

#### 나. 표고 균사 선발;

우선, 일차 연구된 내용을 변형시켜서 특수 배지를 사용하여 어떤 환경에서도 빨리 성장하는 단포자를 분리하고, 이는 유전적으로 우리가 원하는 유전자를 가진 것인지 파악해야겠다. 이러한 의미에서 이러한 단포자 분리에 대한 실험은 상당히 어려워 표준적인 방법의 확립이 필요하다. 표고버섯의 포자에 관한 자료는 단 몇 개의 논문에서 유전적인 형질에 관한 것이 나와 있고, 어떤 범주 내에서 균사 선발이 이루어지는

아직 밝혀진 바가 없다. 그러나 균사의 성장 속도는 표고 생산에 관여되고 오염원으로부터 저해작용을 적게 받는다는 이론이 있으며, 그 외 균사의 특성을 판별할 수 있는 유전적인 특성은 아직 발표되지 않고 있다. 그러나 위의 실험으로 톱밥 재배에 관련되는 빠른 조건에서 생산한다면 간단하게나마 6개월 기간으로 표고의 균사의 능력을 쉽게 파악될 것으로 생각된다.

#### 다. 균사의 능력파악:

현재 분리된 단포자로 합성하였거나 혹은 교배된 균사는 전부 12개가 선발되었다. 일본 팽이버섯을 mating방법으로 육종한 Kitamoto 박사는 단포자 분리된 표고 버섯 3개의 균주를 본 실험을 위하여 비교 실험하기 위하여 보내왔다. 이 균들은 아직 어떤 좋은 능력이 있는지는 잘 알 수가 없고, 어느 정도 선발된 균사로 생각되어진다. 본 실험실에서 만들어진 균사는 12개로 액체배양 과정과 톱밥 배양 과정을 거쳐서 균사의 성장과 어떤 반응을 보이는 것을 기록하였다 (Table-3.17). 우선 선발된 균주는 액체배양 결과와 톱밥 배지 결과를 보고 그 환경에서 잘 자라는 것을 관찰하였다 (Table-3.18). 액체 배양에서 잘 자라는 것과 고체 배양에 잘 자라는 것을 선택하여 갈참나무 소나무 미루나무 아까시나무 미루나무를 분해하는 능력을 관찰하였다. 여기서 나오 자료는 상대적인 값으로 아까시나무에서는 소나무에 비하여 분해력이 높은 것으로 나왔다. 이는 과거 아까시 나무가 쓸모없는 나무로 알려져 있으나, 앞으로 톱밥 생산에서 미루나무와 아까시나무 톱밥을 사용한다면 좋고 많은 표고를 수확할 수 있기 때문에 실험의 대상 수종으로 포함시켰다 (Table 3-10 & 3-11 ). 아까시나무에는 표고-E와 표고-G가 분해력이 높았으며, 갈참나무 미루나무에 분해율이 높게 나왔다. 이러한 균은 앞으로 육종 연구에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다. 또한, 소나무 톱밥은 분해가 낮은 편이다. 대부분의 균들은 10% 이내로 분해되고 있으나, 표고-005의 경우는 다른 수종에서 나무 분해율은 낮게 나왔으나 소나무에서는 높게 나왔다. 이러한 자료는 유전인자가 서로 다른 균들이 lignocellulose의 구성이 소나무와 참나무가 다르다는 것이 확연히 나타난 결과이다. 이러한 결과를 기준으로 7개의 균주와 일본 균주 3개를 이용하여 수종 분해 률을 조사하였다 (Table 3-18).

Table 3-18. The diploid mycelia synthesized from matings

Mark	Mycelia	Shaking culture		Sawdust culture		Degradation of wood-chips <sup>c</sup>			
		color <sup>a</sup>	growth	5/3 (	6/13	갈참	아까시	소나무	루
(A)	L6-5×L6-3	brown	w <sup>b</sup>	dead <sup>b</sup>	d	not <sup>b</sup>			
(B)	K1-5×L6-5	brown	w	g	g <sup>b</sup>	327	308	0715	287
(C)	K1-5×L6-204	brown	w	w	w	not			
(D)	K1-5×L6-6	brown	w	w	w	not			
(E)	K1-5×L6-21	white	g	g	g	275	353	0825	429
(F)	K1-2×L6-6:	brown	w	d	d	not			
(G)	K1-17×L6-6	white	g	g	g	275	353	0825	429
(H)	K1-5×L6-3	White ?	g	c <sup>b</sup>	w	273	243	0986	350
(I)	L1-5×L6-13	white	g	c	w	208	278	0768	417
(J)	K1-4×L6-3	brown	w	g	g	213	209	000	384
(K)	K1-4×L6-15	Brown ?	w	- <sup>b</sup>	-	333	247	0578	422
(12)	K4-5×L6-15	dead		d	d	not			
(13)	Kitamoto-110	white	g	g	g	254	226	0942	391
(14)	Kitamoto-005	white	g	g	g	244	326	0939	323
(15)	Kitamoto-096	white	g	g	g	242	241	138	360
(16)	Ohga균주 19	Not tested							

<sup>a</sup>The color of mycelial pellet at shaking culture

<sup>b</sup>Dead (d), week growth (w), good growth (g), contaminated (c) not measured (-), non-selected for this work (not).

<sup>c</sup>Relative values of degradation rate on each wood-chips

Table 3-19. The degradations of wood-chips by the dikaryotic mycelium made in Table 3-18

VARIETY	Wood-chip	Average values of degradations		
		Water Agar	Milk Agar	Replicate (N)
1.00	갈참나무	.258412	.441660	2
표고-B	오리나무	.399974	.551747	2
	아까시나무	.341787	.503621	2
	미루나무	.526042	.337012	2
	굴참나무	.367923	.488276	2
	갈참나무	.277646	.436296	2
2.00	갈참나무	.277646	.436296	2
표고-E	오리나무	.324747	.424103	2
	아까시나무	.317780	.477255	2

		.317780	.477255	2
	미루나무	.634301	.633362	2
	굴참나무	.316230	.417447	2
3.00	갈참나무	.273136	.483656	2
표고-G	오리나무	.390657	.397607	2
	아까시나무	.518916	.427703	2
	미루나무	.635523	.654429	2
	굴참나무	.375681	.354692	2
4.00	갈참나무	.284879	.472080	2
표고-H	오리나무	.326824	.599159	2
	아까시나무	.349146	.303292	2
	미루나무	.443084	.583333	2
	굴참나무	.338143	.328928	2
5.00	갈참나무	.252615	.322490	2
표고-I	오리나무	.378728	.374286	2
	아까시나무	.270076	.501672	2
	미루나무	.544211	.707143	2
	굴참나무	.345001	.373192	2
6.00	갈참나무	.214286	.413937	2
표고-J	오리나무	.264444	.377630	2
	아까시나무	.225239	.348906	2
	미루나무	.401139	.752381	2
	굴참나무	.288106	.429498	2
7.00	갈참나무	.255669	.716137	2
표고-K	오리나무	.296794	.677934	2
	아까시나무	.269695	.404820	2
	미루나무	.559341	.700735	2
	굴참나무	.289512	.548028	2
8.00	갈참나무	.235290	.521284	2
표고-110	오리나무	.408823	.499283	2
	아까시나무	.341299	.320671	2
	미루나무	.522003	.651732	2
	굴참나무	.369361	.446995	2
9.00	갈참나무	.251626	.403733	2
표고-96	오리나무	.344444	.480909	2
	아까시나무	.354531	.277246	2
	미루나무	.481338	.600379	2
	굴참나무	.349200	.304460	2
10.00	갈참나무	.270024	.430929	2
표고-005	오리나무	.452381	.489125	2

	아까시나무	.403144	.513699	2
	미루나무	.354167	.616667	2
	굴참나무	.377529	.438716	2
Total	갈참나무	.257358	.464220	20
	오리나무	.358782	.487178	20
	아까시나무	.339161	.407889	20
	미루나무	.510115	.623717	20
	굴참나무	.341669	.413023	20
	Total	.361417	.479205	100

Table 3-20. Anova of the dikayotic mycelia (variety) and degradation of wood-chip (wood) in water agar

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.037	49	2.116E-02	2.407	.001
Intercept	13.062	1	13.062	1485.701	.000
VARIETY	.145	9	1.616E-02	1.838	.084
WOOD	.677	4	.169	19.240	.000
VARIETY * WOOD	.215	36	5.967E-03	.679	.887
Error	.440	50	8.792E-03		
Total	14.539	100			
Corrected Total	1.476	99			

<sup>a</sup>R Squared = .702 (Adjusted R Squared = .410)

Table 3-21. ANOVA of the dikaryotic mycelia (VARIETY) and degradations of wood-chip (WOOD) in Milk agar.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.462	49	2.985E-02	1.894	.013
Intercept	22.964	1	22.964	1457.077	.000
VARIETY	.235	9	2.606E-02	1.653	.126
WOOD	.613	4	.153	9.720	.000
VARIETY * WOOD	.615	36	1.709E-02	1.084	.391
Error	.788	50	1.576E-02		
Total	25.214	100			
Corrected Total	2.250	99			

<sup>a</sup>R Squared = .650 (Adjusted R Squared = .307)

**라. 변인 설명:**

우선, 이해를 돕기 위하여, 유전의 변이와 통계처리에서 변이의 관계에 관한 것을 우선 정리해야겠다. 각각의 수종에서 유전자 다른 균사들을 배양하여 분해 률을 얻는 것은 균사가 배지의 환경적인 요인과 유전적인 요인을 구분하여 설명하여야 겠다. 본 실험에 나온 ANOVA 검사에서는 여러 가지의 오차가 나오는데, 이들을 정리한다면

단  
여기서

$$\sigma_{Total}^2 = \sigma_{genetic}^2 + \sigma_{wood}^2 + \sigma_{interaction\ between}^2 + \sigma_{replicates}^2$$

$\sigma_{Total}^2$  = 전체 실험적인 오차

$\sigma_{genetic}^2$  = 유전적인 변이에서 오는 오차 (VARIETY = .145)

$\sigma_{wood}^2$  = 수종에서 오는 오차 (균주에 따른 수종의 분해능력과 유전적인 효소의 생산 능력 WOOD = .677)

$\sigma_{interaction\ between}^2$  = 수종과 유전적인 변이의 상호작용에서 오는 오차 (Variety\*wood = .215)

$\sigma_{replicates}^2$  = 반복에서 실험적인 오차 (실험적인 오차; Error = .440)



으로 표현된다 (Table 3-20). 여기서 나온 값을 비교 설명하면 Water agar 환경에서는 수종의 효과 ( $(^2_{wood})$ )가 상당히 크기 때문에 다른 균주의 효과 ( $(^2_{genetic})$ )와 이들의 상호작용의 효과 ( $(^2_{interaction\ between})$ )가 적게 나온 것이고, 반복적인 실험에 나온 효과 ( $(^2_{replicates})$ )도 크게 나왔기에 이러한 결과를 얻었다. 그러나 다른 실험에서 느타리 버섯 (Appendix.4)이나 노루궁뎅이 버섯 (Appendix.6)의 경우는 수종인 WOOD와 품종의 효과가 뚜렷하게 나타났다. 같이 병행한 실험에서 문제는 해석에서 문제는 있지만, 실험적인 오차를 적게하기 위한 실험보다는 표고의 유전적인 성격을 정리하고 지나 가야 할 것으로 생각된다. 비록 우리나라에서 보유하고 있는 여러 가지의 표고 균주는 많은 면에 유전적인 연구가 많이 진행되었거나, 수종 분해에 대한 기본적인 최소한 나무 분해에 대한 유전자 상당히 안정되어져 있다는 것이 여기서 나온 분석을 해석한 결과이다. 이는 아직 많은 실험을 통하여 더 많은 자료를 얻어야 하겠지만, 표고 균주는 느타리나 노루궁뎅이 버섯에 비하여 고정된 유전자를 갖고 있다고 설명할 수가 있겠다. 비록, 표고는 단순한 순수한 원목에 많이 선발 실험을 하였고, 다양한 수종으로 재배가 시도되지 않은 면은 표고의 균사가 기질에 대한 상호 의존적인 분화 (special differentiation)가 많이 진행되었다고 생각된다. 느타리의 경우는 단포자 분리에서 수종에 따른 균주의 변이가 환경보다 더 많은 영향력을 가진 것은 기질의 다양화로 또한 유전자가 고정되지 않은 관계로 새로운 품종을 얻는 데는 안성맞춤으로 생각된다. 현재 표고의 육종 연구에서 이러한 원시적인 형태의 표고 품종이 육종 연구에 상당한 도움될 것으로 생각된다. 여기서 표고-J가 가장 나무 분해율이 낮은 것으로 변이가 심하는 것으로 나타났고, 이는 앞으로의 표고 생산과 관련되어 더 시켜야 할 내용이라고 생각된다. 비록 자실체 형성과 자실체 생산량은 실험 중에 있으나, 현재까지는 표고-E, G, 및 K가 좋은 유전자를 가진 표고 균주로 생각된다.

**마. 육종 programming:** 우리나라에서는 버섯 육종에 관한 기본적인 계획은 없는 것으로 아직도 Table 3-22와 같은 총체적인 내용으로 실험을 진행하고 있지는 않다, 다만 각각의 연구소마다 균주 보관인 gene pool만 생각하고 있고, 이도 연구비 신청을 위한 기본 작업으로 진행되고 있는 실정이다. 그래도 다행은 각각의 연구소인 산림조합중앙회나 농진청 응용 미생물과에서는 수집을 중요한 것으로 생각하고 있는 것

이다. 표고는 다른 버섯에 비하여 재배와 발이 과정이 복잡하고 길지만, 균사의 유전적인 것이 상당히 안정되어져 육종에는 많은 도움이 될 것으로 생각된다. 육종의 목적은 병충해가 적고 고품질의 생산량을 많이 생산하는 것이 목적이다. 그리고 많은 생산성이 높은 버섯이라도 값 싼 기질을 이용할 수 있는 것이라야 좋은 균주가 될 수 있다. 포자 선발 과정에서 우선, 미래의 어떤 나무가 혹은 톱밥이 많이 생산되고 값싸게 공급되겠는가 하는 것이 가장 큰 문제이다. 이는 임학과 혹은 산림자원학과에서 우리나라의 수종에 대한 연구가 필요하고, 저렴한 가격에서 생산되는 수종을 쓸 수 있는 쪽으로 표고의 육종은 진행되어져야 한다고 생각된다. 여기서 수종으로 아까시 나무와 미류나무는 흔히 우리나라에 흔한 나무지만 표고버섯 재배에는 거의 사용된 적이 없다. 최근에 참나무는 모든 버섯 재배에 사용되고 있으므로 그 단가가 거의 10배나 상승하여 버섯 생산에 큰 차질을 주고 있다. 더욱더 문제는 이러한 참나무 톱밥도 구하기가 어렵고, 다른 혼합된 톱밥으로 버섯 생산이 균일하게 할 수 없는 점이 큰 문제이다.

Table 3-22. Breeding procedures for *Lentinula edodes*

Breeding Methods		Descriptives
A	Gene Pool	보관된 포자는 진공 건조통 혹은 5%의 glycerol 용액에 보관하여 영구 보관함 이는 포자의 보관 방법으로 균사가 생화학 혹은 생리적으로 손실 없이 보관되는가 관찰하여 앞으로 표고 품종 보관에 사용할 예정에 있다. 여기서 많은 유전자 풀(gene pool)을 이용하는 방법으로 유전자의 보관이 중요하다
B	Basidiocarps	표고의 품종에 따른 상수리 톱밥에 자실체를 얻어서 포자를 보관한다. 이는 품종에 따른 성장 속도를 측정하고, 자실체가 생성되는 과정을 관찰하며, 톱밥배지에서 포자체가 발이되는 품종을 선발함, 또한 자실체의 특성을 관찰하여 중요한 성격을 이해한다
C	Plating method	water agar 혹은 lignin agar에 포자를 휘석 방법으로 plating 함 (이는 주어진 조건의 배지에서 잘 성장하고 발아가 잘 되는 균사를 선발하는 과정이고, 표고버섯 재배에 조건에 따른 환경 조건을 변형키므로서 우리가 원하는 유전자를 지닌 포자를 선발하는 방법으로 agar는 조건에 따라서 변형될 수가 있음)

D	Selecting	분리된 포자는 보관되고, lignocellulose 배지에 성장하여 단포자 (basidiospore)의 성장 속도 및 분해력을 측정한다 (이는 가장 어려운 부분으로 우리가 표고재배에서 어떤 조건의 균사를 원하는가를 파악하여, 이러한 능력을 갖는 균사를 clonig하는 방법으로 선발의 기준점이 되는 것이다)
E	Mating	분리된 단포자의 균사는 균사의 성을 파악하여 대비되는 균사와 교배시킴 (아직 표고 단포자에서 성의 구별은 상당히 어렵고, 실험실적인 조건에서 구별하기가 힘들고, 단포자 교배에서 여러 경우에 아주 복잡한 반응이 나타나고 있다. 이마 현재 품종으로 사용되는 균사들은 여러 가지 복잡한 과정을 통하여 혼합교배시킨 것으로 간주된다.)
F	Cultivation	주어진 조건인 톱밥 배지에 재배 (액체 종균 생산과 발이과정 관찰)
G	Evaluations	상업성과 버섯의 특성을 관찰하여 evaluation함
H	hypothetical and imaginary method	

이러한 환경에서 알려진 아까시나무와 미루나무의 수종은 톱밥의 배지에 좋은 재료 물질로 값싸게 생산할 수 있는 나무들이다. 여기서 톱밥의 수종에 대한 자료가 얻어지면, 과정 (C in Fig.6)에서 포자 선발에 관한 것만 바꾸면 쉽게 목표한 육종의 과정이 진행될 수가 있겠다. 과정 (D)는 수종이 선택되는 대로 단포자의 능력을 확인하여 과정 (E)로 가든지 혹은 과정 (D+E)를 합쳐서 선별하여는 것이 실험의 성격에 따라서 달라질 수가 있을 것으로 생각된다. 그 후 과정은 톱밥에 자실체를 얻어 표고의 식품의 용도 (건 표고와 생 표고 생산)으로 전환한다면 좋을 것으로 생각된다. 여기서 나온 자료에서는 재배자와 산림 관련자들과 충분한 토론을 거쳐서 표고 육종과 관련된 기본적인 연구가 진행되어야 된다고 생각된다. 육종은 다른 생리나 분자 생물학적인 연구와 달라 종합적인 자식이 필요한 연구이다. 이러한 연구에는 소비자도 생산된 표고의 육질과 맛에 대한 의견도 필요하고 재배자의 어려운 고충도 육종을 해결할 수가 있을 것으로 생각된다. 여기에 짜여진 계획은 수종에 대한 중요성을 두고 계획한 것으로 육종의 목적이 다를 때는 다르게 할 수가 있다.

#### 4. 결 론

표고 자실체에서 뽑은 포자을 이용하여 mating 실험을 하였고, 이들이 서로 mating 될 때는 여러가지 반응 보였으나, 품종이 다른 포자끼리는 어떤 tetrapolar적인 특성이 보이지 않고 반응하였다. 여기서 다양한 mating을 통하여 7개의 균사를 만들고, 다른 알려진 3개의 균사를 갖고 실험하였다. 선발된 7개의 균사는 알려진 균사와 비교할 때에 액체 배양과 톱밥 배양 상태를 보고 선별하여 여러가지 수종의 나무의 분해력을 조사 검토하였다. 표고의 유전자는 다른 느타리나 노루궁뎅이에 비하여 상당히 유전적으로 안정된 균으로 크게 차이점이 있는 균사를 찾기가 힘들었다. 그러나 선별된 균주에 따라서 수종의 분해력이 각각 다른 형태로 나타났으며, 앞으로 자실체 형성에 관한 실험자료가 있어야 되겠지만, 연구에 큰 도움될 것으로 기대된다. 앞에서 실험한 여러 가지 자료를 이용하여, 즉 표고 품종의 계통분류 혹은 생물학적인 근원관계, 표고 발이 관련된 발현 유전자, 톱밥 배양에서 표고의 생리적인 반응 및 액체 배양에서 표고 균사의 성장에 대한 연구 결과를 이용하여 간단한 표고 육종의 programming 을 제시하였다. 앞으로 버섯 육종에 필요한 자료로 필요에 따른 다른 모델을 세울 수 있겠다.

## 5. 참고문헌

- Chiu, SW, Kwan, HS, and Cheng, SC. 1993. Application of arbitrarily-primed polymerase chain reaction in molecular studies of mushroom species with emphasis on *Lentinus edodes*. In **Genetics and Breeding of Edible Mushroom**. Edited by Shu-Ting Chang, John A Buswell, and Philip, G. Miles. Gordon and Breach science. Publishers. U.S.A
- Chung, KS. 1982. Studies on Constituents and Culture of the Higher Fungi of Korea (II). *Kor. J. Mycol.* 10: 33-39.
- Cook, DEL., Kennedy, DM., Guy, DC, Russell, J, Unkles, SE. and Duncan, JM. 1996. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 100: 297-303.
- Damaj, M, Jabaji-Hare, SH. and Charesst, PM. 1993. Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology* 83: 864-871.
- Erlich, HA., Gelfand, DH. and Sninsky, JJ. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651.
- Fukuda, M. and Tokimoto, K. 1991: Variation of isozyme patterns in the natural population of *Lentinus edodes*. *Proc. Jpn. Acad.* 67: 43-47.
- Ginterava, A. and Janotkova, O. 1975. A Simple method of isolation and purification of cultures of wood-rotting fungi, *Folia Microbiol.* 20: 519-520.
- Ikuo, A. 1979. Cytological studies on *Pholiota*. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 17:1-18.
- Ikuo, A. and Kimito, M. 1968. The mating system in some Hymenomycetes II. The mating system in *Favolus arcularius* (BATSCH ex FR.) AMES, *F. mikawai* (LLOYD) IMAZ., *Pholiota adiposa* (FR.) QUEL. and *Pleurotus cornucopiae* (PAUL. EX PERS.) ROLL. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 7:51-58.

- Ikuo, A. Atsuko, T, and Yukiko, S. 1980: The optimal and critical temperatures for growth of *Pholiota adiposa*. **Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan)** 18:107-113.
- Itavaara, M. 1988. Identification of shiitake strains and some other basidiomycetes: protein profile, esterase and acid phosphatase zymograms as an aid in taxonomy. **Transactions of the British Mycological Society** 91: 295-304.
- Kawamura, N. and M. Goto. 1980. Biochemical characteristics of the isolates of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). **Reports of the Tottori Mycological Institute. 18:** 217-224.
- Khush, RS, Morgan, L, Becker, E, and Wach, M. 1991. A genetic linkage map for *Agaricus bisporus*. In **genetic and breeding of Agaricus**. Pp 73-80. Edited by LJLD Van sven. Pudoc. Wageningen, Netherlands.
- Kim, HK., Park,YH., Cha,D.Y. and Chug,H.C. 1987. Studies on the Artificial cultivation of *Lentinus edodes* on sawdust media. **Kor. J. Mycol.** 15(1): 42-47.
- Lee, S.S., Kim, M.H., Shin, C.S., Chang , H.B., and Lee, M.W. 1998. Collections of *Pholiota adiposa* isolates in Ko rea. **Korean J Mycology** 26: 574-582.
- Lee, S.S., Kim, M.H., Shin, C.S., Chang, H.B., and Lee, M.W. 1988. Collection of *Pholiota adiposa* isolates in Korea. **Korean J Mycology** 26: 574-582.
- Lee, SS, Lee, JW, Hong, SW, and Cho, NS. 1999. Cultivation of several mushrooms using chestnut peels as an agricultural by-products. **Mokchae Konhak** 27: 78-86.
- Lee, SS. 1991. The role of rice bran employed in the traditional spawn sawdust medium. **Korean J. Mycol.** 19: 47 - 53.
- Lee, TS, Bak, WC, Kang, HD, Kim, SK, Byun, BH, Yi, CK, Lee, WK, and Min, DS. 1997. Classification of Korea *Lentinula edodes* strains by Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) markers. **Kor. J. Mycol.** 25: 219-225.
- Lee,S.S. and Choi,K.J. 1995. Solid cultures of *Lepista nuda*. **Kor. J. Mycol.** 24: 274-279.

- Park ,Y.H., Kim,Y.S. and Cha, D.Y. 1978. Investigation on Artifical Culture for New Edible Wild Mushroom. *Kor. J. Mycol.* 6: 25-28.
- Park, WM, Ko, HG, Park, RJ., Hong, KS, and Kim, GH. 1997. Differentiation of *Lentinus edodes* Isolates in Korea by Isozyme Polymorphisms and Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Analysis. *Kor. J .Mycol.* 25(3): 176-190.
- Park, YH, Kim, YS, and Cha, DY. 1978. Investigation on Artifical Culture for New Edible Wild Mushroom. *Kor. J. Mycol.* 6: 25-28.
- Peberdy, J.F., Aidah, M.H. and J. Jia. 1993: New Perspectives on the Genetics of *Pleurotus*. In Mushroom Biology and Mushroom Pruducts. pp 55-62. Edited by S.T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu. The Chinese University Press.
- Peberdy, JF, Aidah, MH. and Jia, J. 1993. New Perspectives on the Genetics of *Pleurotus*. In **Mushroom Biology and Mushroom Pruducts**. pp 55-62. Edited by ST Chang, JA Buswell and SW Chiu. The Chinese University Press.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, and Maniatic, T. 1989. Molecular cloning-A Laboratory manual. 2nd eds. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. see p 6.1-6.19.
- Vosberg, H. 1989. The polymerase chain reaction. An improved method for the analysis of nucleic acid. 잡지명 *Nucleic Acid. Res.* 83: 1-15.
- Williams, JGK, Kubelik, AR, Livak, KJ, Pafalski, JA, and Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Res.* 19: 6531-6535.
- Zervakis, G., Sourdis, J. and Balis, C. 1992: Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 98: 329-341.
- 김양섭. 1979. 식용버섯 자원 개발. 야생식용버섯 분포조사. 농기원연구보고서. see Pp 337-353.
- 박완희 1991. 원색도감 한국의 버섯. (주)교학사.

박용환. 1997. 최신 버섯학. 한국버섯원균영농조합. Pp. 21-24.

박원목, 김동찬, 이종윤, 양재경, 유창현, 정원일. 1994. 침엽수 톱밥에서 표고 균사생장 촉진에 관한 연구. 한국균학회지 22: 222-228

박원목, 송치현, 현재욱. 1992. 표고 버섯의 영양생리 및 기질개발. 한국균학회지 20(1): 77-82

이지열. 1988. 원색 한국 버섯 도감. 아카데미서적.

이태수, 조남석, 민두식. 1998. 액체종균 접종에 의한 표고톱밥재배 효과. 목재공학회지 26(1): 19-28.

차동렬, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯재배 기술. 상록사. Pp 417-426.

차동렬, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯재배 기술. 상록사. Pp 417-426.



## 제 4 장 임산버섯 생육단계별, 품종별 유전자 발현양상 분석 및 형질전환 기술 탐색

### 제 1 절 서 설

표고버섯은 최근에 약리적 효과가 현저함이 인정되면서 국내외적으로 그 수요가 격증하고 있다. 그러나, 대부분의 품종은 일본에서 도입 재배되고 있으며 국내에서의 품종 개발 연구는 미미한 상황이다. 또한 그 유전적 특성이 잘 규명되어 있지 않다. 특히, 최근 일본의 Rice Genome Project나 미국 Monsanto 社의 유전자 변형 옥수수 등의 GMO (genetically modified organism) 연구에서 알 수 있듯이, 전세계적으로 유전자 조작을 통한 농림산물의 개량이 이루어지고 있으며 새로운 기술의 발전에 힘입어 새로운 형질을 가진 경쟁력 있는 작물이 계속 탄생하고 있다. 또한 표고는 그 품종 등록 및 유전적인 연구가 필요한 상태에 있다.

따라서, 분자유전학적 접근은 버섯 재배에 큰 도움이 될 수 있을 것이다. 예를 들어, 버섯 재배에 있어서 자실체 형성은 핵심이라고 할 수 있으므로, 이를 유전자와 연계시켜 연구하거나, 특정유전자를 분리하거나 기능을 분석하여 이를 형질 전환에 의해 다른 품종으로 이식할 수 있다면 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 이러한 연구는 유전학과 관련된 분자 생물학 연구의 한 예로써 중요하며, 앞으로 표고 생산에 크게 이바지 할 것으로 생각된다. 특 본 연구에 시료 확보와 유전 분석을 위한 cDNA합성은 기초적인 연구로 누구나 분자 생물학적인 연구전에 필요한 내용이다. 이후 알려진 유전을 이용하여, 특정한 유전자의 삽입과 형질 전환 연구는 우리가 개발한 표고균주에 marker표시 및 유용한 유전자 삽입으로 식량 생산에 큰 도움이 될 것으로 생각된다. 이러한 의미에서 본 연구는 위탁 연구로 협동과제 연구와 함께 앞으로 표고의 산업과 유전자 연구에 필수적인 시작 연구로 생각된다.

## 제 2 절 시료 확보 및 cDNA 합성

### 1. 연구개발 목표

임산 버섯의 mycelium, pin-head, fruit body의 각 life cycle 단계별, 품종별 발현되는 유전자의 total RNA를 분석하여 역전사 반응에 의해 cDNA fragment를 합성하고 PCR 증폭, cDNA cloning하여 유전자의 발현 양상을 분석하는 것이 본 연구의 목표이다. 또한 수확 후 품질을 떨어뜨리는 proteolytic activation 유전자의 knock-out 기술 개발과 자실체의 성장에 작용하는 유전자를 찾고, 활성이 높은 promoter의 선발과 vector 개발을 통하여 목적하는 유전자를 도입시켜 발현시키는 형질전환 기술을 창출하는 것이 본 연구의 최종목표이다. 이 목표를 수행하기 위하여 우선 시료용 버섯, 균주 확보 및 균사체 배양, 그리고 cDNA 클론화가 필요하다. 이를 위하여 mycelium, pin-head, fruit body에서 total RNA의 추출 및 분리, 역전사 반응에 의한 cDNA fragment 합성, 합성된 cDNA를 template로 하여 Polymerase Chain Reaction (PCR) 을 통하여 증폭하였고, 이에 덧붙여 버섯의 유전자 도입에 의한 형질전환에 사용될 vector를 개발 시험하였다.

### 2. 연구개발 내용

#### 가. 시료용 버섯 균주 확보:

교원대학교 생물학과 이상선 교수님 연구실에서 종합적으로 수집 및 보관을 하고있으며, 실험에 이용하기 위한 균주 (산림 4호, 산림 5호) 를 plate 상태로 받아서 액체 배양 및 톱밥 배양 등으로 실험에 이용하였다. 보관된 균은 일반적인 균사 배양으로 PDA (Difco)를 사용하고, 계속하여 계대 배양하였으며, 필요에 따라서 다른 배지를 사용하였다.

나. 균사체 배양 :

액체 배양은 Bioneer에서 제작된 CellFurm™ 3B을 이용하였다. 먼저 액체배지는 20g Glucose, 2g yeast extract, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2g Peptone을 1L 증류수에 녹인 후 20분간 15 psi의 압력으로 멸균한다. 액체배양은 모두 2L의 액체배지를 사용했으며, 약 8-9일간 배양하였다. 액체배양에 사용된 균주는 산림4호와 삼림5호였으며, 배양과정은 먼저 100ml의 액체배양을 거친 후 이를 이용하여 Fermentation하였다. 균사가 뭉치는 문제를 해결하기 위해 공기량을 0.5 vvm (volume volume)에서 약 2.3 vvm 늘려가며 배양을 하였다. 또한 2-3일에 한번씩 하루 4-5회씩 약 600-1000 rpm으로 2-3분간 액체배지를 agitation해서 뭉쳐진 균사를 조각내어 좀 더 잘 자라도록 하였다. 톱밥배양의 경우 상수리 톱밥 80%와 미강 20%를 질량 대 질량 비율로 섞은 후, 물을 약 70%넣어서 플라스틱 용기에 넣은 후 멸균하였다. 멸균 후 여기에 배양한 산림 4호와 산림 5호를 첨가하여 배양하였다. 약 1달간 배양 후 발이를 시키기 위해 물을 추가로 첨가하고, 온도를 약 15℃로 낮추어 주었다. 실험과정 동안 액체 배지 안의 pH를 조사하였는데 시간이 경과될수록 산성화가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이같은 이유는 균사가 방출하는 물질로 인하여 배지의 산성화가 진행된 것으로 판단된다. ( Fig. 4-1)

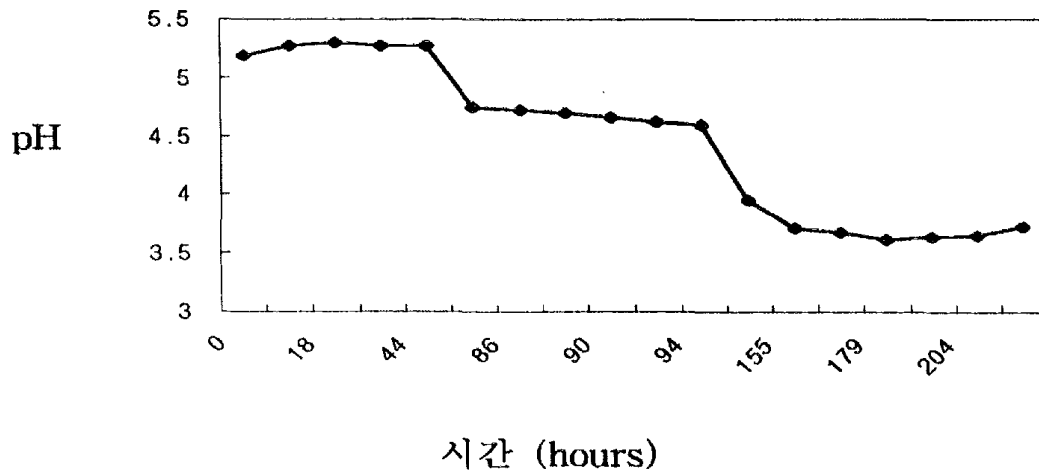


Fig. 4-1. pH change of broth with the culture time (hours)

#### 다. Total RNA 분석;

Differential display reverse transcription-polymerase chain reaction (DDRT-PCR) 실험을 위한 total RNA를 분리하기 위해 균사체를 액체배양하였다. 배양된 균사체는 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액은 배양액을 버리고, 침전물은 균사체만을 이용하여 total RNA 분리 과정에 들어갔다. 자실체의 경우는 톱밥배지를 이용하여 성장시키고 여기에 물과 온도충격을 주어 발이가 되도록 하였다. 발이된 자실체는 잘게 잘라서 막자사발 안에 넣은 후 액체질소를 첨가하여 곱게 갈았다. 분말화된 자실체를 1.5 ml 시험관에 넣은 후 total RNA 분리를 시작하였다. 위에서 분리된 균사체와 자실체에 500 ul의 Lysis buffer (4 M Guanidium thiocyanate: Phenol (1:1))를 첨가하여 5-10회 tube를 뒤집어 잘 섞어준 다음 4 °C에서 10분간 방치하였다. 여기에 350 ul의 Chloroform을 넣어 다시 5-10회 tube를 뒤집어 잘 섞어준 다음 4 °C에서 10분간 방치하였다. 원심분리기로 12,000 rpm, 4 °C 하에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 상등액을 새 tube로 옮긴 다음 여기에 동량의 isopropanol을 넣어 잘 섞은 후 -20 °C에서 1시간 반응시켰다. 12,000 rpm, 4°C 하에서 15분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻은 다음, 상등액을 버리고 70 % ethanol을 이용하여 1분간 씻어주었다. 57 °C 배양기에서 약 10분간 pellet을 말리고, 여기에 DEPC가 첨가된 3차 증류수를 30 ul 넣어 녹였다.

이와 같이 분리된 total RNA 약 1 ug을 AccuPower™ RT PreMix (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM dNTP, 20 unit Reverse transcriptase, 10 unit RNasin, Bioneer corp.)에 넣고, 여기에 oligo-dT (17mer) primer (Bioneer corp.) 20 pmole을 넣은 다음 20 ul까지 DEPC-D.W.로 채웠다. 57 °C에서 약 5분간 denaturation 과정을 거친 다음 42 °C에서 1시간동안 cDNA 합성과정을 수행하였다. cDNA가 합성된 다음 94 °C에서 5분간 반응시켜 reverse transcriptase (RTase)의 활성을 제거시켰다. 이와 같이 합성된 cDNA fragment 약 5 ul를 1.5 % agarose gel을 이용하여 확인하였다.

합성된 cDNA 용액 20 ul 중에 1 ul씩을 AccuPower™ PCR PreMix (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 1 unit thermostable DNA polymerase, Bioneer corp.)에 넣고, 여기에 arbitrary primer (AP1-AP6,

Bioneer corp. ) 를 2 ul (20 pmole) 첨가한 후, 나머지 17 ul를 증류수로 채웠다. PCR 기기 (Bioneer corp.)를 이용하여, 94 °C에서 5분 간 pre-denaturation 과정을 거친 다음, 94 °C에서 1분, 45 °C에서 1분, 72 °C에서 1분을 1회로 하여 30 번을 반복시켰다. 마지막으로 72 °C에서 10 분간 post-polymerization과정을 수행하였다. 이렇게 증폭된 cDNA fragment들은 분석을 위하여 acrylamide gel에서 electrophoresis를 수행하고자 아래와 같이 준비하여 분석하였다. 위에서 준비된 cDNA fragment를 분석하기 위해 4 % polyacrylamide gel을 이용하였다. 먼저 삼각플라스크에 240 g의 Urea를 넣고, 여기에 10×TBE ( 1L안에 108 g Trizma base, 55 g boric acid, 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 가 들어있는 용액) 50 ml과 40% acrylamide solution ( 1L 안에 380 g acrylamide와 20 g *N,N'*-methylene bisacrylamide가 들어있는 용액 ) 100 ml을 넣고 나머지를 D.W. 로 1 L까지 채워 4 % polyacrylamide gel을 만들었다. 다음으로 유리판을 준비하여 물로 잘 씻어서 말린 후, 한쪽 유리판에는 Binding solution (Bioneer corp.) 을 1 ml 뿌려 골고루 유리판에 묻혀주고, 나머지 한쪽판에는 coat solution (Bioneer corp.)을 1 ml 뿌려 골고루 유리판에 묻혀주고 5 분간 방치시켰다. 1 ml의 70 % ethanol을 양 유리판에 뿌린 후 kimwipes 휴지로 잘 닦아내었다. 이 같은 과정은 2 번 반복하였다.

이같이 준비된 유리판을 이용하여 유리판을 spacer로 끼워 겹치고, 여기에 위에서 준비한 4 % acrylamide 용액 30 ml에 10 % ammonium persulfate 90 ul와 TEMED 24 ul를 넣어 잘 섞은 후 유리판에 부어주었다. 1 시간 동안 gel이 만들어지도록 방치하였다. 준비된 gel을 전기영동장치에 걸어서 약 25 mA로 30 분간 pre-running 과정을 수행하였다. PCR 용액 20 ul에 8 ul의 STOP solution ( 95 % deionized formamide, 0.5 % Bromophenol Blue, 0.5 % Xylene cyanol, 10 % NaOH )을 넣고, 5 분간 끓여서, 얼음에 식혔다. 이 용액을 2 ul씩 gel에 loading하였다. 약 2 시간 전기영동 후 분석을 위하여 silver staining 과정에 들어갔다.

전기영동이 끝난 gel을 떼어 내어 coating 용액을 처리한 유리판을 제거한 후 10 % acetic acid 용액 1 L에 30 분간 담구어 넣었다. 이때 천천히 shaking하였다. 그 다음 1 L, 3차 증류수로 3분간 3차례 gel을 씻어 주었다. 이 과정 중에 silver staining solution을 준비하였다. 이것은 1 g의 silver nitrate ( $AgNO_3$ )를 1 L의 3차 증류수에

녹인 다음 1.5 ml의 37 % formaldehyde (HCOH) 를 넣어서 준비한다. 이 용액을 washing이 끝난 gel판에 부어 천천히 흔들면서 30분 동안 staining시켰다. Staining이 끝나면 3차 증류수 1 L로 5 초간 washing한 후 developing 용액에 담구어 DNA staining을 중지하였다. Developing solution은 40 g의 sodium carbonate에 1 L의 3차 증류수를 넣고, 4 °C로 온도를 낮춘 다음, developing 과정에 들어가기 바로 전에 37 % formaldehyde 용액 1.5 ml과 sodium thiosulfate (0.5 g / 50 ml) 0.2 ml을 넣어 준비하였다. Developing 과정이 모두 끝나면 10 % acetic acid 1 L를 넣어 5분간 반응을 종결시킨 후, 3차 증류수 1 L로 10 분간 washing하여, 공기 중에 gel을 말린다. 이 같은 과정을 거쳐 아래와 같이 균사체와 자실체에서 각기 다르게 발현되는 유전자를 검색할 수 있었다 (Fig. 4-2).

#### 라. cDNA Fragment 합성:

cDNA를 합성하기 위한 total RNA를 분리하기 위해 균사체를 액체배양하였다. 배양된 균사체는 12,000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다. 상층액은 배양액을 버리고, 침전물은 균사체 만을 이용하여 total RNA 분리 과정에 들어갔다. 자실체의 경우는 톱밥배지를 이용하여 성장시키고 여기에 물과 온도충격을 주어 발이가 되도록 하였다. 발이된 자실체는 잘게 잘라서 막자사발 안에 넣은 후 액체질소를 첨가하여 곱게 갈았다. 분말화된 자실체를 1.5 ml 시험관에 넣은 후 total RNA 분리를 시작하였다. 위에서 분리된 균사체와 자실체에 500 ul의 Lysis buffer ( 4 M Guanidium thiocyanate : Phenol (1:1) ) 를 첨가하여 5-10 회 tube를 뒤집어 잘 섞어준 다음 4 °C에서 10분간 방치하였다. 여기에 350 ul의 Chloroform을 넣어 다시 5-10 회 tube를 뒤집어 잘 섞어준 다음 4 °C에서 10분 간 방치하였다. 원심분리기로 12,000 rpm, 4 °C 하에서 10 분간 원심분리하여 단백질을 제거하였다.

상층액을 새 tube로 옮긴 다음 여기에 동량의 isopropanol을 넣어 잘 섞은 후 -20 °C에서 1시간 반응시켰다. 12,000 rpm, 4 °C 하에서 15 분 간 원심분리하여 RNA pellet을 얻은 다음, 상층액을 버리고 70 % ethanol을 이용하여 1분 간 씻어준다. 57 °C 배양기에서 약 10 분간 pellet을 말리고, 여기에 DEPC가 첨가된 D.W.를 30 ul 넣어 녹였다.

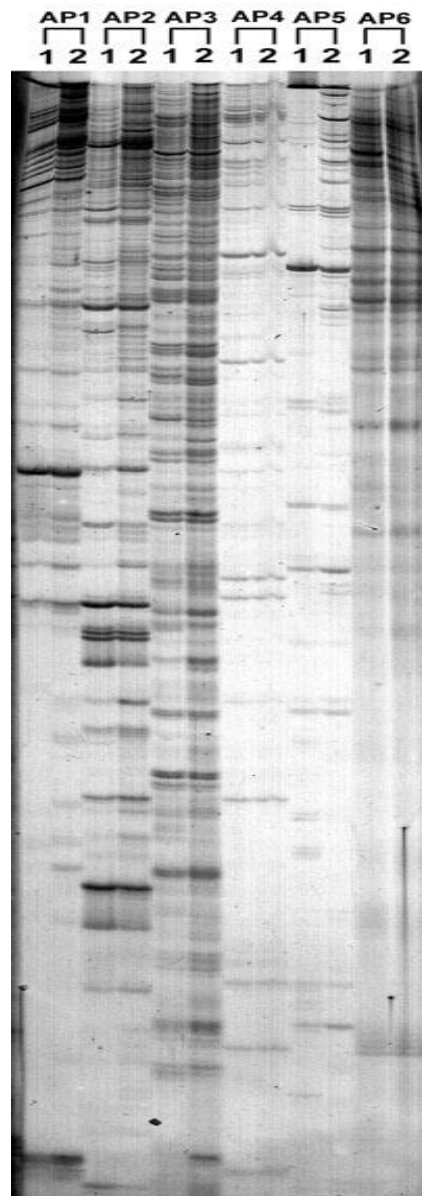


Fig. 4-2. The photography of DDRT-PCR: the mark 1) DDRT of total RNA from mycelium; and 2) DDRT of total RNA from fruit body with the different AP primers.

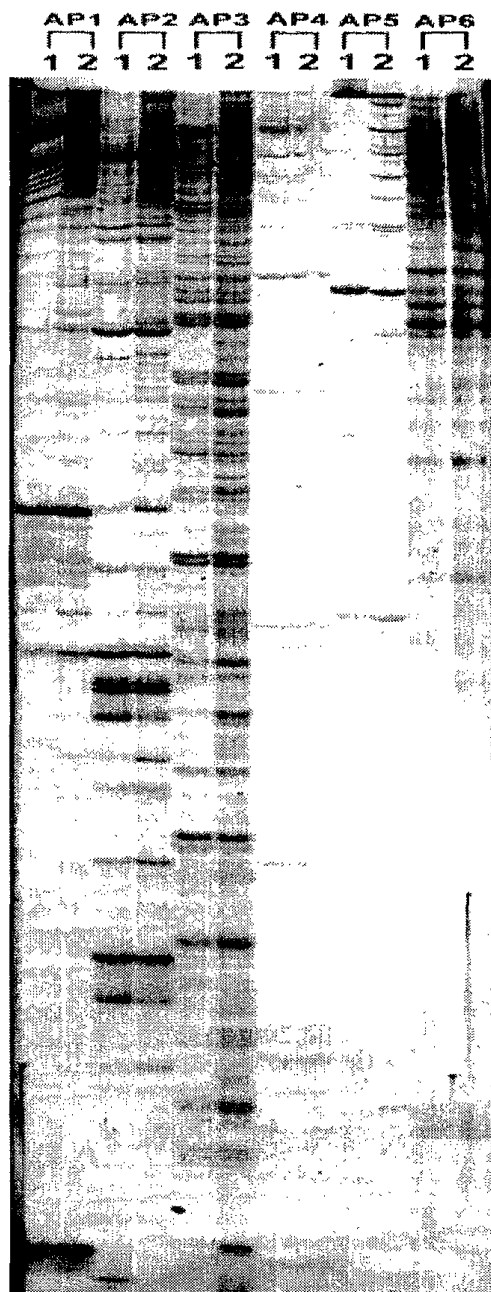


Fig. 4-2. The photography of DDRT-PCR: the mark 1) DDRT of total RNA from mycelium; and 2) DDRT of total RNA from fruit body with the different AP primers.



이와 같이 분리된 total RNA 약 1 ug을 *AccuPower*<sup>TM</sup> RT PreMix ( 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM dNTP, 20 unit reverse transcriptase, 10 unit RNasin, Bioneer corp. ) 에 넣고, 여기에 oligo-dT (17mer) primer (Bioneer corp.) 20 pmole을 넣은 다음 20 ul까지 DEPC-D.W.로 채웠다. 57 °C에서 약 5분간 denaturation 과정을 거친 다음 42 °C에서 1시간동안 cDNA 합성과정을 수행하였다. cDNA가 합성된 다음 94 °C에서 5분간 반응시켜 reverse transcriptase ( RTase) 의 활성을 제거시켰다. 이와 같이 합성된 cDNA fragment는 이후 'cDNA PCR 증폭' 에 이용되었다.

**마. cDNA PCR 증폭;**

cDNA의 PCR 증폭을 위해 다음 3 종류의 primer가 design되었다. 이중, oAnc-lacc는 cDNA fragment의 3'-end에 ligation되는 anchor로 기능하는데, 3'-end가 amine group으로 blocking되어 있어 anchor 사이의 self-ligation을 방지한다. oAnc-Com2와 oT11-NotI은 PCR에 기능하는 primer들로 5'-end가 phosphorylation되어 있어 이후 vector로의 ligation이 용이하다.

	<p><b>oAnc-lacc : 5'-TCC CTT TAG TTG AGG GTT AAT AAG CCG CCG CGT CET GAC TCG GAG CCG-3'</b></p> <p><b>oAnc-Com2 : 5'-TCC CAG TCA CGA CCG GG-3'</b></p> <p><b>oT11-NotI : 5'-GGC GCG GCT TTT TTT TTT T-3'</b></p>
	<p>버섯에서 분리된 total RNA에서 <i>AccuPower</i><sup>TM</sup> RT PreMix (Bioneer corp.)를 이용하여 cDNA fragment를 합성하였고, 이 fragment의 3'-end에 anchor (oAnc-lacc) 를 T4 DNA ligase ('Bioneer corp. )를 이용하여 ligation 하였다.</p>

이와 같이 ligation한 용액 10 ul 중 1 ul 씩을 *AccuPower*<sup>TM</sup> PCR PreMix ( 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 1 unit Thermostable DNA polymerase, Bioneer corp.)에 넣고, 여기에 oAnc-Com2와 oT11-NotI을 2 ul (20 pmole) 씩 첨가한 후, 나머지, 15 ul를 D.W.로 채웠다. PCR 기

기 (Bioneer corp.)를 이용하여, 94 ℃에서 5분간 pre-denaturation 과정을 거친 다음, 94 ℃에서 1분, 58 ℃에서 1 분, 72 ℃에서 1 분을 1 회로 하여 30 번을 반복시켰다. 마지막으로 72 ℃에서 10 분 간 post-polymerization 과정을 수행하였다 (Fig. 4-3).

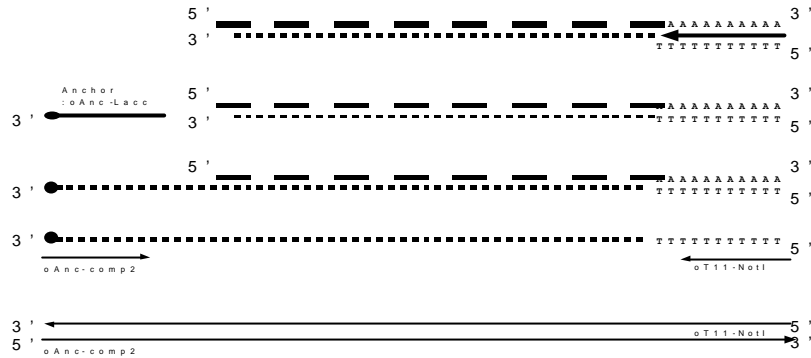


Fig. 4-3. Schematic diagram of RT-PCR

이렇게 증폭된 cDNA fragment를 1.0 % agarose gel ( 1× TAE ) 에서 100 V로 10 분 정도 electrophoresis하여 그 결과를 확인한 결과, 100 bp에서 3 kB 에 이르는 cDNA가 증폭되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-4).

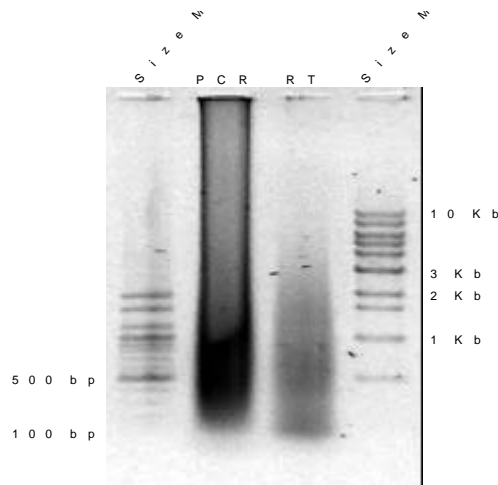


Fig. 4-4. cDNA amplification by RT-PCR

### 3. 연구 결과 및 결론

기 (Bioneer corp.)를 이용하여, 94℃에서 5분간 pre-denaturation 과정을 거친 다음 94℃에서 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1 회로 하여 30 번을 반복시켰다 마지막으로 72℃에서 10 분 간 post-polymerization 과정을 수행하였다 (Fig. 4-3).

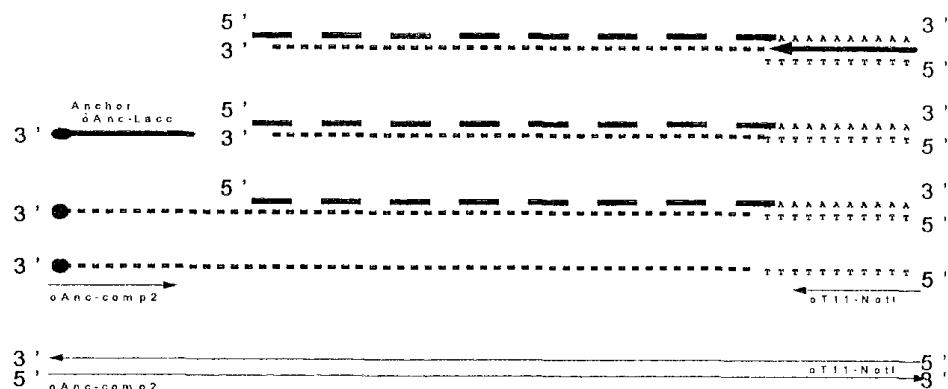


Fig. 4-3. Schematic diagram of RT-PCR

이렇게 증폭된 cDNA fragment를 1.0 % agarose gel ( 1× TAE ) 에서 100 V로 10 분 정도 electrophoresis하여 그 결과를 확인한 결과, 100 bp에서 3 kB 에 이르는 cDNA가 증폭되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-4).

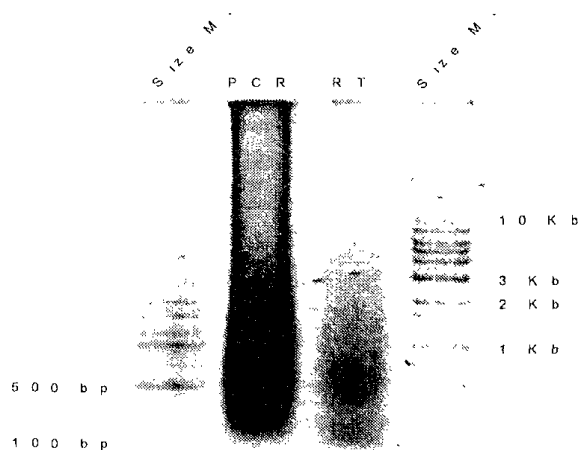


Fig. 4-4. cDNA amplification by RT-PCR

### 3. 연구 결과 및 결론

표고 버섯의 각 조직에서 발현되는 유전자를 분석하고자 하였다. 이를 위해 표고균주 산림 4호와 산림 5호를 각각 톱밥배양과 액체배양을 하였다. 톱밥배양은 자실체를 발이시키기 위한 것으로 약 1달간 배양한 후 물을 추가로 첨가하고 온도충격을 주었다. 액체배양은 CellFarm™ 3B를 이용하였고, 약 8-9일간 공기량을 0.5 vvm에서 약 2.3 vvm 늘려가며 배양을 하였다. 실험과정 동안 액체 배지안의 pH를 조사하였는데 시간이 경과될수록 산성화가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이같은 이유는 균사가 방출하는 물질로 인하여 배지의 산성화가 진행된 것으로 판단된다. 유전자 분석을 위하여 톱밥배지에서 발이된 자실체와 액체배양된 균사체로부터 guanidium thiocyanate와 phenol을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 이와 같이 분리된 RNA를 template으로 하여 oligo-dT primer를 이용하여 cDNA를 합성하고, 다시 arbitrary primer를 이용하여 DDRT-PCR을 하였다. 이 반응물을 acrylamide gel에 loading하여 전기영동한 후, Silver staining을 하여 그 결과를 분석하였다. 같은 과정을 거쳐 아래와 같이 균사체와 자실체에서 각기 다르게 발현되는 유전자를 검색할 수 있었다

## 제 3 절 cDNA 클론화 및 특정 유전자 Screening

### 1. 연구개발 목표

본 연구에서는 앞 단계에서 PCR로 증폭된 cDNA를 이용하여 버섯의 유용한 유전자를 screening하고자 하므로 이를 위하여 우선, 증폭된 cDNA를 적절한 vector에 cloning하였다. 과제의 근본적인 목적인, 자실체의 성장에 작용하는 유전자를 찾고, 활성이 높은 promoter의 선발하여 목적하는 유전자를 도입시켜 발현시키는 형질 전환 기술을 창출하고, 수확 후 품질을 떨어뜨리는 proteolytic activation 유전자의 knock-out 기술을 개발하는, 다음 단계의 연구를 위해 cDNA library를 만들어 이 목적에 부합하는 유전자를 screening하고자 하였다.

### 2. 연구개발 내용

#### 가. cDNA Vector Cloning:

cDNA Fragment를 vector에 넣기 위해, terminal deoxynucleotidyl transferase (Gibco BRL.) 를 이용하여, vector의 3'-end에 dCTP를 tailing 하였고, 증폭된 cDNA fragment의 3'-end는 dGTP를 tailing하였다. Vector를 tailing하기 위해 *Sma*I restriction enzyme을 처리한 blunt-ended pUC19 plasmid를 DNA *PrepMate*<sup>TM</sup> II (Bioneer corp. )를 이용하여 정제하였다. 이 plasmid 3 ug을 terminal deoxynucleotidyl transferase reaction buffer ( 100 mM potassium cacodylate, pH 7.2, 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DTT )에서 50 uM dCTP와 15 unit의 terminal deoxynucleotidyl transferase를 넣고 최종 부피 50 ul로 37 °C에서 30분간 반응하였다. Insert로 작용하는 cDNA를 tailing하기 위해 증폭된 cDNA 3 ug을 terminal deoxynucleotidyl transferase reaction buffer (100 mM potassium cacodylate, pH 7.2, 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DTT )에서 50 uM dGTP와 15 unit의 terminal deoxynucleotidyl transferase를 넣고 최종 부피 50 ul로 37 °C에서 30분간 반응하였다. Tailing이 정상적으로 되었는지를 확인하기 위한 control 실험으로 vector로 사용

한 *SmaI*-digested pUC19 1 ug을 50 uM dCTP와 200 pM biotin-14-dCTP (Gibco BRL.) 를 이용하여 확인하였다.

Nylon membrane ( S&S )을 10 cm ×10 cm 크기로 자른 후, 3차 증류수에 충분히 적신 후 3MM paper ( Whatman ) 위에 올려 놓고 완전히 말렸다. Biotin-14-dCTP 로 labeling된 sample을 PipetMan을 이용하여 spotting한 후, 80 °C에서 1시간동안 baking하여 DNA가 membrane 표면에 crosslink되도록 하였다. 0.3 % blocking buffer ( 0.1 % skim milk, 0.3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.45 mM NaCl ) 로 2분간 shaking하여 3 번 씻어주어 crosslink되지 않은 DNA를 제거하였다. 이후 3 % blocking buffer ( 1 % skim milk, 3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4.5 mM NaCl )로 65°C에서 30분간, 상온에서 1시간 반응시켜 DNA crosslink되지 않은 membrane을 blocking하였다. TBS buffer ( 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl )로 2분간 3번 씻어주어 blocking buffer를 제거하였다. 다시 membrane을 0.3 % blocking buffer 에 담그고 Streptoavidin-Alkaline phosphatase conjugate ( Roche ) 1/5000 volume을 첨가한 후, 상온에서 15분간 shaking하며 반응하였다. 다시 0.3 % blocking buffer로 한 번, alkaline phosphatase buffer ( 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub> )로 5 분 간 2 번 씻어준 후, 물기를 제거하였다. 다시 membrane을 10 ml AP buffer 에 담근 후, 33 ul BCIP ( Roche )와 66 ul NBT ( Roche )를 첨가한 후, 발색반응이 나타나면 바로 꺼내어 stop solution ( 5 mM EDTA, pH 8.0, 1×PBS ) 에 넣어 반응을 정지시킨 후, 3차 증류수로 씻고 그 결과를 확인하였다 (Fig. 4-5).

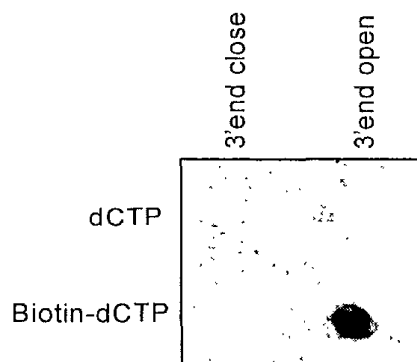


그림 4-5. DNA dot blotting

#### 나. Host Cell Transformation :

cDNA Library를 만들기 위해 버섯의 각 조직에서 total RNA를 추출하였다. 재료가 되는 RNA의 추출은 일반적으로 사용되고 있는 방법을 따라서 수행하였다. 액체질소로 표고버섯의 각 조직을 동결한 후에 막자사발을 이용하여 조직을 분쇄하고 CTAB과 acidic phenol을 사용하여 total RNA만을 정제하였다 (Fig. 4-6).

갓 자루 원기 균사

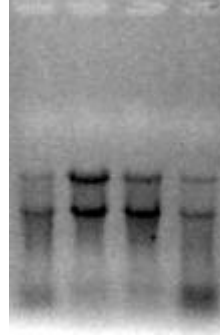


Fig.4-6. Total RNA from the pileus, stipe and primordium and mycelia of *L. edodes*.

순수하게 정제된 RNA와 *AccuPower<sup>TM</sup>* RT-PreMix ( Bioneer corp. )를 사용하여 cDNA의 first strand를 합성하였다. 2 ug의 표고버섯 total RNA를 사용하였으며 반응은 42 ℃에서 60분 간 수행하였다. 사용된 Primer는 Clontech사의 SMART IV<sup>TM</sup> Oligonucleotide (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3')가 anchor로 CDSIII/3'PCR Primer (5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3')가 first strand의 primer로 사용되었다. 위와 같이 준비된 cDNA를 PCR 반응으로 증폭하였다. 반응은 cDNA 용액 0.5ul를 *AccuPower<sup>TM</sup>* PCR PreMix (Bioneer corp.)에 넣어 30 cycle (94 ℃ 15초, 68 ℃ 1분, 72 ℃ 4분)동안 반응하였다. 이 때 사용한 PCR Primer는 5'PCR Primer (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3')와 CDSIII /3'PCR Primer (5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T)<sub>30</sub> N<sub>1</sub>N-3')이다. 증폭된 cDNA fragment를 agarose gel electrophoresis를 하여 확인한 결과, 500 bp 에서 10 Kb까지 double-strand cDNA가 증폭된 것을 알 수 있다 (Fig. 4-7).

#### 나. Host Cell Transformation :

cDNA Library를 만들기 위해 버섯의 각 조직에서 total RNA를 추출하였다. 재료가 되는 RNA의 추출은 일반적으로 사용되고 있는 방법을 따라서 수행하였다. 액체질소로 표고버섯의 각 조직을 동결한 후에 막자사발을 이용하여 조직을 분쇄하고 CTAB과 acidic phenol을 사용하여 total RNA만을 정제하였다 (Fig. 4-6).

갓 자루 원기 균사

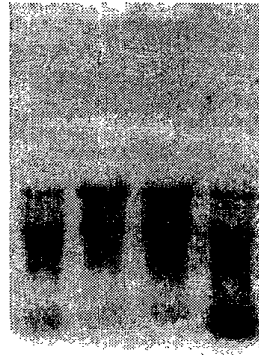


Fig.4-6. Total RNA from the pileus, stipe and primordium and mycelia of *L. edodes*.

순수하게 정제된 RNA와 *AccuPower*<sup>TM</sup> RT-PreMix ( Bioneer corp. )를 사용하여 cDNA의 first strand를 합성하였다. 2 ug의 표고버섯 total RNA를 사용하였으며 반응은 42 °C에서 60분 간 수행하였다. 사용된 Primer는 Clontech사의 SMART IV<sup>TM</sup> Oligonucleotide (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3')가 anchor로 CDSIII/3'PCR Primer (5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3') 가 first strand의 primer로 사용되었다. 위와 같이 준비된 cDNA를 PCR 반응으로 증폭하였다. 반응은 cDNA 용액 0.5ul를 *AccuPower*<sup>TM</sup> PCR PreMix (Bioneer corp.) 에 넣어 30 cycle (94°C 15초, 68°C 1분, 72°C 4분)동안 반응하였다. 이 때 사용한 PCR Primer는 5'PCR Primer (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3') 와 CDSIII /3'PCR Primer (5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T)<sub>30</sub> N<sub>1</sub>N-3') 이다. 증폭된 cDNA fragment를 agarose gel electrophoresis를 하여 확인한 결과, 500 bp 에서 10 Kb까지 double-strand cDNA가 증폭된 것을 알 수 있다 (Fig. 4-7).



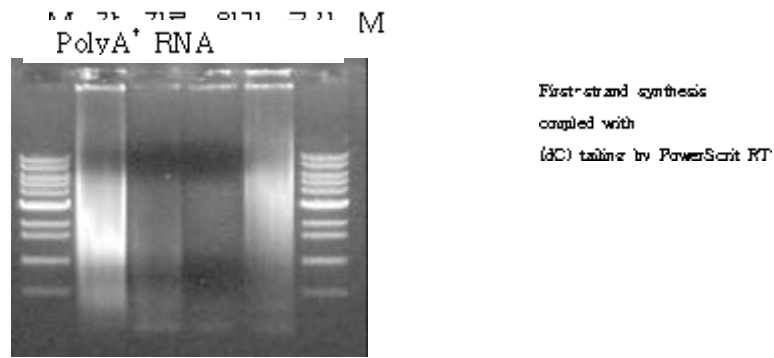


Fig. 4-7. cDNA amplification by SMART technique

위와 같이 증폭된 cDNA를 클론화하기 위하여  $\lambda$ TriplEx2 ( Clontech ) phage vector 에 manual에 따라 ligation하였다 (Fig. 4-8). 이 후, *in vitro* packaging은 Packagene<sup>®</sup> Lambda DNA Packaging System ( Promega )을 사용하여 제품 manual 에 따라 이루어졌다. 결과 버섯의 네 조직, 갓, 자루, 원기, 균사의 cDNA를 insert로 가지고 있는  $\lambda$ phage library가 Strain이 XL1-Blue인 *E.coli* 에 형질전환되었다.

#### 다. Proteolytic Activation Gene 분리:

위와 같이  $\lambda$ TripleEx2 를 이용하여 만든 cDNA library에서 proteolytic activation gene을 위해 우선  $\lambda$  phage plaque을 template으로 gkdu plaque PCR을 하였다. PCR 을 위하여 먼저 각 plaque을 20 ul의 SM buffer ( 0.1 M NaCl, 0.01 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05 M Tris · Cl, pH 7.5, 0.01% gelatin )로 옮긴 후, 이 중에 1 ul 씩을 AccuPower<sup>™</sup> PCR PreMix (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP, 1unit thermostable DNA polymerase, Bioneer corp.) 에 넣고, 여기에 두 primer (  $\phi$ Triple-f : 5'-CTC CGA GAT CTG GAC GAG-3';  $\phi$ Triple-r : 5'-TAA TAC GACTCA CTA TAG GGC-3' ) 를 2 ul (20 pmole) 첨가한 후, 나머지 15 ul를 증류수로 채웠다.

M 잣 자루 원기 균사

M

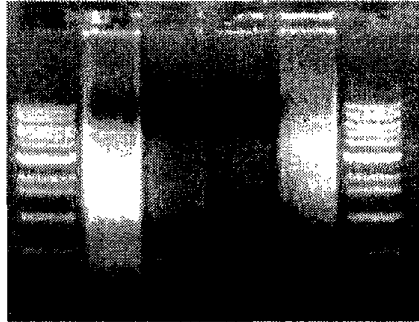


Fig. 4-7. cDNA amplification by SMART technique

위와 같이 증폭된 cDNA를 클론화하기 위하여  $\lambda$ TriplEx2 ( Clontech ) phage vector 에 manual에 따라 ligation하였다 (Fig. 4-8). 이 후, *in vitro* packaging은 Packagene<sup>®</sup> Lambda DNA Packaging System ( Promega )을 사용하여 제품 manual 에 따라 이루어졌다. 결과 버섯의 네 조직, 잣, 자루, 원기, 균사의 cDNA를 insert로 가지고 있는  $\lambda$ phage library가 Strain이 XL1-Blue인 *E.coli* 에 형질전환되었다.

#### 다. Proteolytic Activation Gene 분리:

위와 같이  $\lambda$ TriplEx2 를 이용하여 만든 cDNA library에서 proteolytic activation gene을 위해 우선  $\lambda$  phage plaque을 template으로 gkdu plaque PCR을 하였다. PCR 을 위하여 먼저 각 plaque을 20 ul의 SM buffer ( 0.1 M NaCl, 0.01 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05 M Tris · Cl, pH 7.5, 0.01% gelatin )로 옹근 후, 이 중에 1 ul 씩을 AccuPower<sup>™</sup> PCR PreMix (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP, 1unit thermostable DNA polymerase, Bioneer corp.) 에 넣고, 여기에 두 primer ( oTriple-f : 5'-CTC CGA GAT CTG GAC GAG-3'; oTiple-r : 5'-TAA TAC GACTCA CTA TAG GGC-3') 를 2 ul (20 pmole) 첨가한 후, 나머지 15 ul를 증류수로 채웠다.



Fig. 4-8. Flow chart of the SMART cDNA Library Construction Kit protocols

PCR 기기 (Bioneer corp.) 를 이용하여, plaque을 깨뜨리기 위해 94℃에서 10분간 pre-denaturation 과정을 거친 다음, 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분을

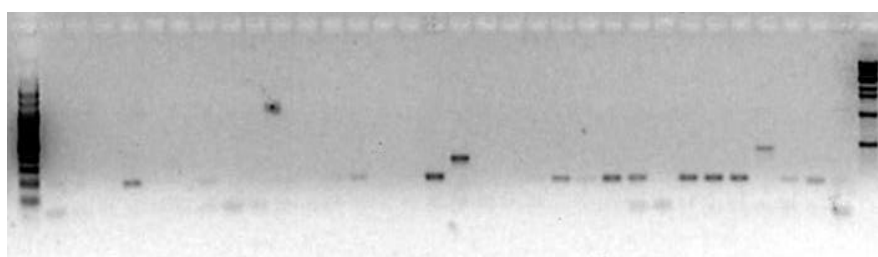


Fig. 4-9. Plaque PCR

Plaque PCR 결과, 의미 있어 보이는 clone들을 염기 서열분석하여, 가능성이 있는 sequence를 찾을 수 있었다.

```

1  ggggaaaato attttoogat ttttoaaaggo tooatthttgg aogggggttg
51  atogtgtaot ogtogtaato gootgotaga aaaogatgoa tggatgoooo
101 aooaaooatt gotgogaa

```

이 sequence를 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 의 BLAST server를 통해 'Translated BLAST Searches'를 수행한 결과, *Pseudomonas aeruginosa*의 'O-sialoglycoprotein endopeptidase'와 sequence가 60% 가량 일치함을 확인할 수 있었다.

#### 라. Fruiting Body의 Highly Expression Gene 분리:

DDRT-PCR 실험을 통해 Fruit body에서 특이적으로 발현되는 유전자를 찾고자 하였다. 이를 위한 total RNA를 분리하기 위해 각 조직을 잘게 잘라서 막자사발 안에 넣은 후 액체질소를 첨가하여 곱게 갈았다. 분말화된 조직을 1.5 ml 시험관에 넣은 후 total RNA 분리를 시작하였다. 이렇게 분말화된 각 조직에 500 ul의 Lysis buffer (4 M Guanidium thiocyanate: Phenol (1:1)) 를 첨가하여 5-10회 tube를 뒤집어 잘 섞어준 다음 4 ℃에서 10분간 방치하였다. 여기에 350 ul의 Chloroform을 넣어 다시 5-10회 tube를 뒤집어 잘 섞어준 다음 4 ℃에서 10 분 간 방치하였다. 원심분리기로

1회로 하여 30 번을 반복시켰다. 마지막으로 72 °C에서 10 분간 post-polymerization 과정을 수행하였다. 이렇게 증폭한 후, 1% agarose gel에서 분석하였다 (Fig . 4-9).

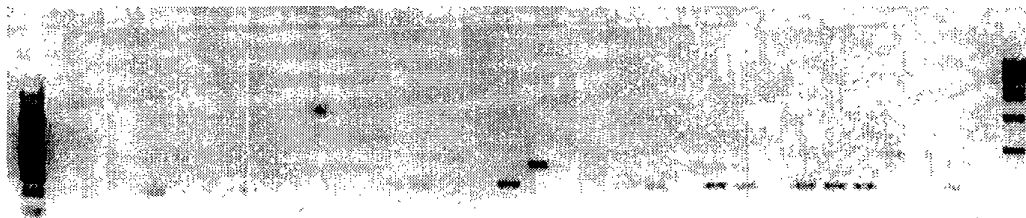


Fig. 4-9. Plaque PCR

Plaque PCR 결과, 의미 있어 보이는 clone들을 염기 서열분석하여, 가능성이 있는 sequence를 찾을 수 있었다.

```
1  ggggaaaatc attttccgat ttttcaaggc tccattttgg acggggggttg
51  atcgtgtact cgtcgtaatc gcctgctaga aaacgatgca tggatgccca
101 accaaccatt gctgcgaa
```

이 sequence를 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 의 BLAST server를 통해 'Translated BLAST Searches'를 수행한 결과, *Pseudomonas aeruginosa*의 'O-sialoglycoprotein endopeptidase'와 sequence가 60% 가량 일치함을 확인할 수 있었다.

#### 라. Fruiting Body의 Highly Expression Gene 분리:

DDRT-PCR 실험을 통해 Fruit body에서 특이적으로 발현되는 유전자를 찾고자 하였다. 이를 위한 total RNA를 분리하기 위해 각 조직을 잘게 잘라서 박자사발 안에 넣은 후 액체질소를 첨가하여 곱게 갈았다. 분말화된 조직을 1.5 ml 시험관에 넣은 후 total RNA 분리를 시작하였다. 이렇게 분말화된 각 조직에 500 ul의 Lysis buffer (4 M Guanidium thiocyanate: Phenol (1:1) ) 를 첨가하여 5-10회 tube를 뒤집어 잘 섞

어준 다음 4 °C에서 10분간 방치하였다. 여기에 350 ul의 Chloroform을 넣어 다시 5-10회 tube를 뒤집어 잘 섞어준 다음 4 °C에서 10 분 간 방치하였다. 원심분리기로 12,000 rpm, 4 °C 하에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 상등액을 새 tube로 옮긴 다음 여기에 동량의 isopropanol을 넣어 잘 섞은 후 -20 °C에서 1시간 반응시켰다. 12,000 rpm, 4 °C 하에서 15분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻은 다음, 상등액을 버리고 70 % ethanol을 이용하여 1분간 씻어주었다. 57 °C 배양기에서 약 10분간 pellet을 말리고, 여기에 DEPC가 첨가된 DW를 30 ul 넣어 녹였다.

이와 같이 분리된 total RNA 약 1 ug을 *AccuPower*<sup>TM</sup> RT PreMix ( 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM dNTP, 20 unit reverse transcriptase, 10 unit RNasin, Bioneer corp.) 에 넣고, 여기에 oligo-dT (17mer) primer 20 pmole를 넣은다음 20 ul까지 DEPC-DW로 채운다. 57 °C에서 약 5분간 denaturation과정을 거친다음 42 °C에서 1시간동안 cDNA 합성과정을 수행하였다. cDNA가 합성된 다음 94 °C에서 5분 간 반응시켜 reverse transcriptase의 활성을 제거시켰다. 합성된 cDNA 용액 20 ul 중에 1 ul씩을 *AccuPower*<sup>TM</sup> PCR PreMix ( 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 1 unit thermostable DNA polymerase, Bioneer corp.)에 넣고, 여기에 arbitrary primer (AP1 - AP6, Bioneer corp.) 를 2 ul (20 pmole) 첨가한 후, 나머지 17 ul를 증류수로 채웠다. PCR 기기 (Bioneer corp.) 를 이용하여, 94 °C에서 5분간 pre-denaturation 과정을 거친 다음, 94 °C에서 1분, 45 °C에서 1분, 72 °C에서 1분을 1회로 하여 30 번을 반복시켰다. 마지막으로 72 °C에서 10 분간 post-polymerization 과정을 수행하였다.

증폭된 cDNA fragment를 분석하기 위해 4 % polyacrylamide gel을 이용하였다. 먼저 삼각플라스크에 240 g의 Urea를 넣고, 여기에 10×TBE (1L안에 108 g Tris base, 55 g boric acid, 40 ml 0.5 M EDTA, pH8.0 가 들어있는 용액) 50 ml과 40 % acrylamide solution (1 L안에 380g acrylamide와 20g *N,N'*-methylene bisacrylamide 가 들어있는 용액) 100 ml을 넣고 나머지를 D.W.로 1L까지 채워 4 % polyacrylamide gel을 만들었다. 다음으로 유리판을 준비하여 물로 잘 씻어서 말린 후, 한쪽 유리판에는 Binding solution (Bioneer corp.)을 1 ml 뿌려 곧고루 유리판에 묻혀 주고, 나머지 한쪽판에는 coat solution (Bioneer corp.)을 1 ml 뿌려 곧고루 유리판에

문혀주고 5분간 반응시켰다. 1 ml의 70 % ethanol을 양 유리판에 뿌린후 kimwipes 휴지로 잘 닦아내었다. 이 같은 과정을 2 번 반복하였다.

이같이 준비된 유리판을 이용하여 유리판을 spacer로 끼워 접쳤다. 여기에 위에서 준비한 4 % acrylamide 용액 30 ml에 10 % ammonium persulfate 90 ul와 TEMED 24 ul를 넣어 잘 섞은 후 유리판에 부어주었다. 1 시간 동안 gel이 만들어지도록 방치하였다. 준비된 gel을 전기영동장치에 걸어서 약 25 mA로 30 분간 pre-running 과정을 수행하였다. PCR 용액은 20 ul에 8 ul의 STOP solution (95 % deionized formamide, 0.5 % Bromophenol Blue, 0.5 % Xylene cyanol, 10 % NaOH, Bioneer corp.)을 넣고, 5 분간 끓여서, 얼음에 식혔다. 이 용액을 2 ul씩 gel에 loading한 후, 약 2시간 전기영동 하고 silver staining 과정에 들어갔다. 전기영동이 끝난 gel을 떼어 내어 coating 용액을 처리한 유리판을 제거한후 10 % acetic acid 용액 1L에 30분간 담구어 넣었다. 이때 천천히 shaking하였다. 그 다음 1 L 3차 증류수로 3 분 간 3 차례 gel을 씻어주었다. 이 과정중에 silver staining solution을 준비하였다. 이것은 1 g의 silver nitrate를 1 L의 3차증류수에 녹인 다음 1.5 ml의 37 % formaldehyde를 넣어서 준비하였다. 이 용액을 washing이 끝난 gel 판에 부어 천천히 흔들면서 30분 동안 staining시켰다. Staining이 끝나면 3차 증류수 1 L로 5 초간 washing한 후 developing 용액에 담구어 DNA를 염색하였다. Developing solution은 40 g의 sodium carbonate에 1 L의 3차 증류수를 넣고, 4 °C로 온도를 낮춘 다음, developing 과정이 들어가기 바로 전에 37 % formaldehyde용액 1.5 ml과 sodium thiosulfate ( 0.5 g / 50 ml) 0.2 ml을 넣어 준비하였다.

Developing 과정이 모두 끝나면 10 % acetic acid 1L를 넣어 5분간 반응 종결시킨 후, 3차 증류수 1L로 10분간 washing하여, 공기중에 gel을 말린 후, 분석하였다.

그 결과, 원기에서 특이적으로 발현되는 band가 발견되었다. (Fig. 4-10).



Fig. 4-10. DDRT-PCR.

위에서 분리된 fragment 50 ng과 pGEM-T easy vector (Promega corp.) 100 ng을 T4 DNA ligase (Bioneer corp.)를 이용하여 ligation한 후, JetGene (Bioneer corp.)을 이용하여 *E. coli* competent cell인 DH12s 에 electroporation하였다. 이 때 사용한 조건은 전기장의 세기는 12kV/cm, RC-time은 4.5 msec였다.

AccuPower® DNA Sequencing Kits (Bioneer corp.)를 이용하여 원기에서 특이적으로 발현되는 유전자 조각을 가지고 있는 clone으로부터 sequencing한 후, sequence의 homology 조사를 위해 National Center for Biotechnology Information (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 의 BLASTN program을 이용하였다. 비교 분석 결과, 이 sequence는 현재 GenBank에 등록되어 있는 sequence들과 일치하지 않아, 아직까지는 밝혀지지 않은 유전자로 판단된다

```

1  gatgtgagga agggtttcct ggcaattgta ttaatccagg agtaagtcca
51  tcttaaaacc agtcctaagg ggtcaataag gaaatatatt attaaattta
    갯 자루 원기 균사
101 tatattcctg atggtt
    
```

Modified northern hybridization of unfractionated RNA immobilized by slot blotting 방법 (Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) 을 통해서 DDRT-PCR 결과를 다시 한 번 확인하였다. 이 때 Blotting 결과를 검증하기 위한 positive control로 버섯의 각 조직에서 고르게 발현된다고 알려져 있는 18s ribosomal RNA fragment를 함께 blotting하여 비교하였다. 결과로 갯



(Pileus), 자루 (Stipe), 원기 (Primodium), 균사체 (Mycelium) 네 조직에서 18s ribosomal RNA를 고르게 발현이 되지만, DDRT-PCR을 통해 원기에서만 발현된다고 추정되는 유전자는 blotting 실험에서도 원기에서만 강하게 signal을 보이는 것을 알 수 있다 (Fig. 4-11).

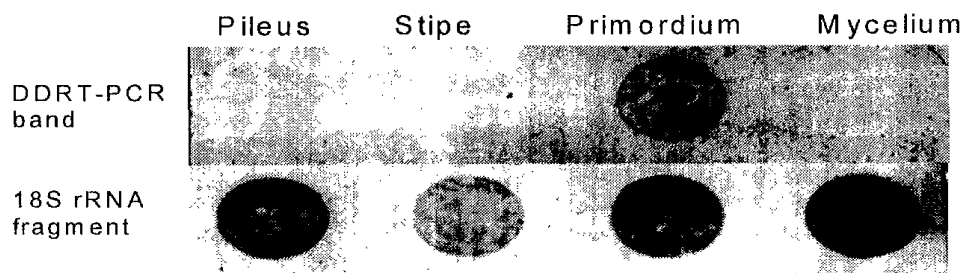


Fig. 4-11. Northern Hybridization of the unfractionated RNA Immobilized by the slot blotting

이 결과를 해석해 보면, 이 sequence가 갓, 자루, 원기, 균사체의 네 가지 조직 중 원기에서만 발현되는 것은 이 유전자가 직접적, 혹은 간접적으로 발아와 관련이 있음을 알 수 있다.

### 3. 연구개발 결과 및 결론

PCR로 증폭된 cDNA를 클론화하기 위해 우선 버섯의 갓, 자루, 원기, 균사체 조직에서 total RNA를 분리하였고, 이를 SMART technique을 이용하여  $\lambda$  phage library를 만들어 screening한 결과, 'proteolytic activation gene'을 찾았다. 또한 DDRT-PCR한 결과, 원기에서 특이적으로 발현되는 유전자를 발견하였고, 이를 terminal deoxynucleotidyl transferase를 이용하여 dCTP와 dGTP를 tailing하는 방법으로 cloning하고 그 염기서열을 분석하였다. 이 유전자를 다시 RNA dot blotting 방법으로 원기에서만 발현된다는 것을 확인하였다. 따라서, 이 유전자는 버섯의 발아 과정에 관계하리라 예상된다. 나온 내용의 실험을 다시 제3-2에서 더 상세한 실험들이 진행되

었다. 각각의 fraction에서 발견된 표고의 발현 유전자에서는 많은 경우에 다른 유전자와 공유됨이 확인되었고, 대부분이 세균성보다는 진핵 생물과 관련된 유전자들이 발견되었다. 또한, 균의 Yeast의 호흡기인 미토콘드리아의 유전자와 일치한 결과를 내어, 원기 형성에는 호흡과 관련된 내용으로 실제 연구와 일치하는 결과를 얻었다.

## 제 4 절 버섯의 형질전환 기술 개발

### 1. 연구개발 목표

세균이나 식물에서의 눈부시게 유전자 조작 기술의 발달에도 불구하고 표고 버섯을 비롯한 식용 담자균류 (Basidiomycetes)에서는 아직 적합한 유전자 조작 tool이 개발되지 않은 실정이다. 현재 전세계적으로 유전자 조작을 통한 농림산물의 개량이 이루어지고 있으며 새로운 기술의 발전에 힘입어 새로운 형질을 가진 경쟁력 있는 작물이 계속 탄생하고 있으므로 버섯에 유용한 유전자를 삽입하는 기술의 개발을 시급하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 버섯에서 이용할 수 있는 vector를 선별하고, 또한 버섯에서 유전자를 발현시킬 수 있는 promoter를 찾고, 형질전환된 버섯이 그 성질을 계속 유지할 수 있는 특정 marker를 찾고자 하였다. 이를 바탕으로 하여 electroporation 방법을 통하여 버섯의 형질전환을 시도하고 특정 유전자를 knock-out 시키는 방법을 시도하였다.

또한, 이러한 연구는 표고 균사에 직접 삽입하여 표고 균주의 인식과 다른 유전자의 삽입에도 중요한 것으로 생각된다. 현재 시중에서 사용되는 여러 가지의 균주에 어느 것이 일본의 표고이고 우리의 표고 균들이 개발된 것에 대한 표사가 없다. 이러한 방법을 통하여 균의 표사를 한다면, 앞으로 균주의 품종 분쟁에 많은 도움이 될 것으로 생각된다. 또한 많은 유전자의 삽입은 이러한 방법으로는 어렵지만, 소수의 적은 유전자, 유전 실험에서 분리하는데 필요한 marker를 위한 것을 삽입하여 앞으로의 연구에 중요한 것으로 생각된다. 여기서 만들어진 pDH25은 *Aspergillus nidulans*에서 사용한 플라스미드로 앞으로 표고의 균사에 사용 여부를 확인하는 방버으로 사용되었다.

### 2. 연구개발 내용

#### 가. Vector 선별:

현재까지 표고버섯에서 형질전환에 적합한 plasmid는 알려져 있지 않다. 따라서, 버

첫과 비교적 가까우면서도 연구가 잘 되어 있는 *Asperzillus nidulans*의 형질 전환에 성공적으로 적용이 된 pDH25 vector (Fig. 4-12)를 이용하여 표고버섯의 형질 전환을 시도하였다. pDH25는 *A. nidulans*의 tryptophan promoter ( P<sub>trpC</sub> )와 terminator ( T<sub>trpC</sub> )를 가지고 있으며, 그 사이에 hygromycin resistance gene ( hph )을 가지고 있어서, 버섯의 형질전환과 그 유지에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

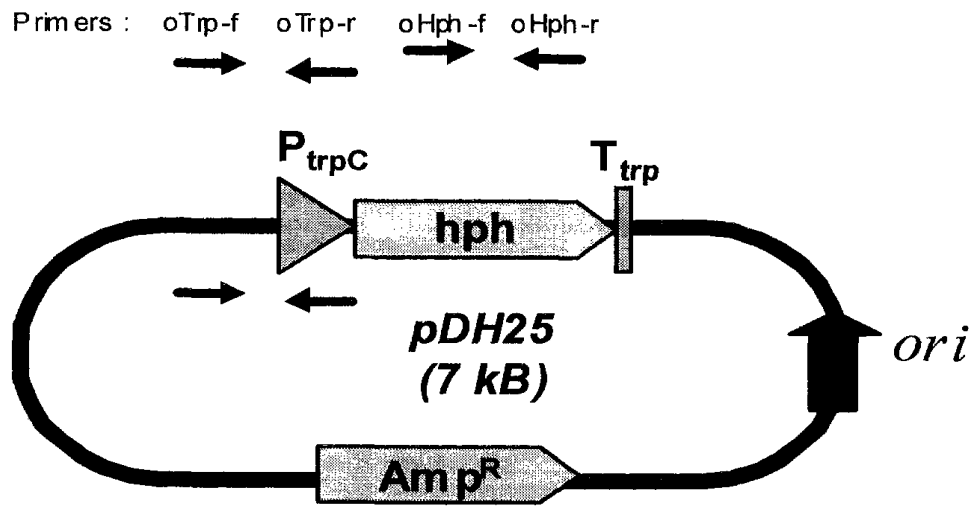


Fig.4-12. Gene map of vector pDH25

#### 나. Promoter 개발:

NCBI의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide.html/>)에 등록되어 있는 nucleotide sequence와 medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)에 등록되어 있는 논문들, 그리고, 미국 특허청 site ( <http://www.uspto.gov/>) 등을 검색해 보았으나 표고버섯에서 작동할 수 있는 promoter에 관한 정보를 찾을 수 없었다. 그래서, 버섯의 형질전환에 사용할 pDH25가 가지고 있는 *A. nidulans*의 tryptophan promoter가 표고버섯에서 역할을 할 수 있는지 확인해보고자 하였다. 이를 위하여 일반적으로 유전자발현여부를 조사하는 데 사용하는 green fluorescent protein (GFP)의 유도체인 EGFP를 이용하여 특정 파장의 빛 (488 nm)의 빛을 쬐어 주었을 때 형광을 나타내는지 확인하고자 이를 cloning하였다 (Fig. 4-13).

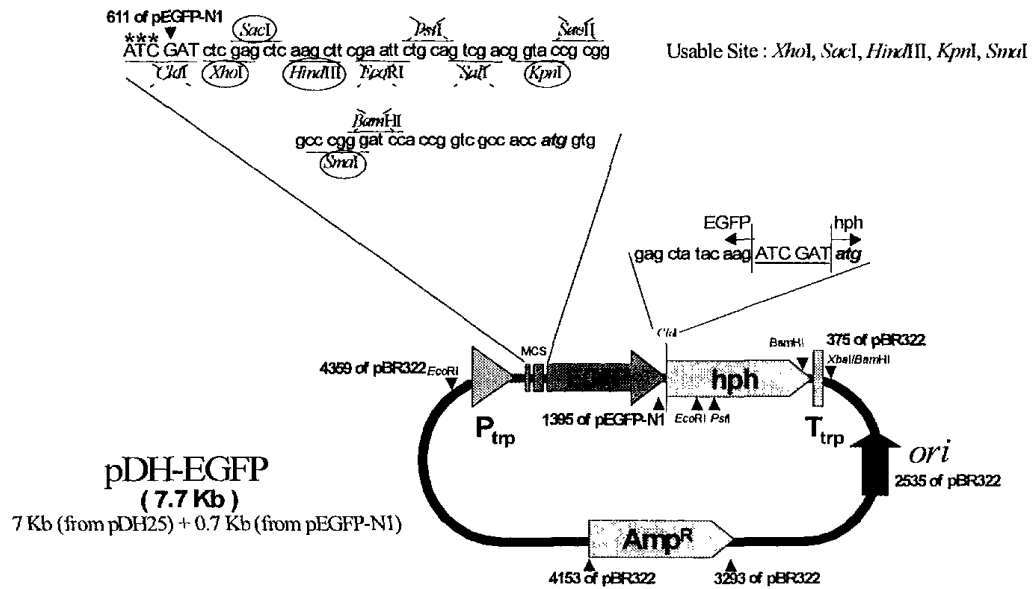


Fig. 4-13. Gene Map of Modified pDH30 with EGFP (indicated the GFP & MCS; multi cloning site)

그리고, 형광 발현 여부를 조사하기 위하여 편광형광현미경으로 EGFP를 가지고 있는 pDH25로 형질 전환된 표고버섯의 균사를 조사한 결과, 예상대로 형광을 발현함을 알 수 있었다 (Fig. 4-14). 다시 말해, *A. nidulans*의 tryptophan promoter가 표고버섯에서 정상적으로 작동할 수 있다는 결과를 얻었다. 여기서 얻어진 결과로 pDH 25에서 몇 개의 유전자를 삽입하여, 예로 형광 물질 (우선, 균사를 구별하기 위한 실험으로) 은 앞으로 연구에 필요한 것으로 생각된다. 그리고 항생제로 균에 작용하여 얻어진 것은 우선 형질 전환된 균 분리로 필요한 것이다. 이러한 vector는 여기서 pDH 30로 명명하였고, 앞으로 표고의 균에 대한 표시와 다른 것을 파악하기 위한 실험은 진행될 것으로 생각된다.

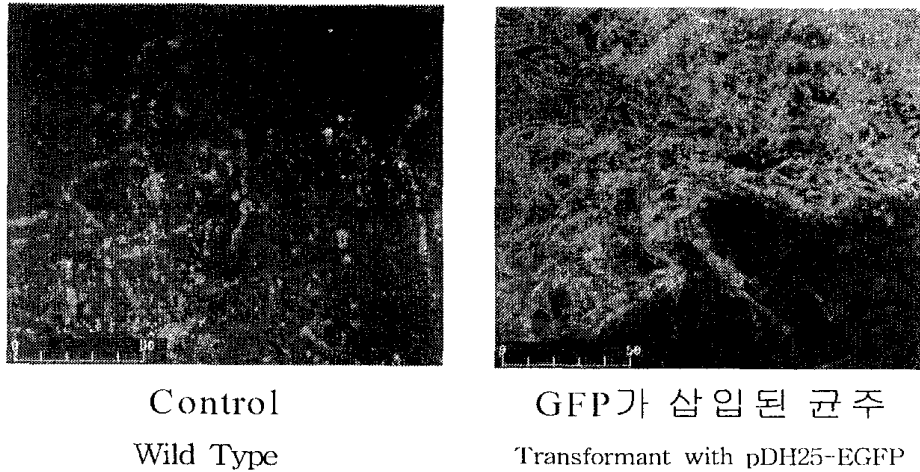


Fig. 4-14. Fluorecence under the polarized fluorescent microscope

#### 다. Medium Selective Marker 선발:

표고버섯의 형질 전환을 위해서는 형질 전환을 위해 도입한 vector가 버섯 내에 계속 유지되어야 한다. 대부분의 형질 전환 실험에서는 이를 위하여 영양분생성고갈주 (auxotroph mutant)를 host 균주로 이용하거나, host 균주의 성장을 저해하는 항생제 (antibiotics)를 이용한다. 본 실험에서는 *A. nidulans*가 가지고 있는 hygromycin B resistance gene ( hph )에 착안하였다. Hygromycin B는 prokaryotes와 eukaryotes 모두에서 단백질 합성을 저해하여 성장을 저해한다. 이를 이용하여 형질전환되지 않은 야생형의 표고버섯의 균사체와 pDH25로 형질전환된 표고버섯의 균사체를 hygromycin B가 100ug/ml의 농도로 있는 배지위에서 배양하여 보았다 (Fig. 4-15). 그 결과, hygromycin B resistance gene ( hph )이 selective marker로 작용할 수 있음을 확인하였다.

#### 라. Transforming DNA Delivery 기술 개발:

Vector pDH25를 표고버섯의 균사에 electroporation한 결과 hygromycin 배지에서 성장하는 다수의 표고 버섯 균주(strain)을 확인 하였다. Electroporation 조건에 따른 형질 전환된 균주의 수를 나타낸다. 이 결과에 의하면 RC-time은 10 msec으로 하고 전기장의 세기를 2-4 kV/cm 로 하였을 때 최적의 electroporation이 되는 것으로

타났다 (Table 4-1).

Table 4-1. Transformation efficiency according to Electric field (E) and RC-time(t)

Sample	E(kV/cm)	t (msec)	CFU* (per ug)
1	2	9.4	500
2	4	9.2	1100
3	6	9.5	350
4	8	10.0	1000
5	12	10.6	150
6	2	10.0	1750
7	4	10.0	400
8	6	8.9	300
9	8	9.6	950
10	12	9.2	500

\* CFU : colony-forming unit

Hygromycin 배지에서 선정이 된 5 개의 strain을 배지에 다시 접종하여 배양을 한 결과 성장속도는 다르나 모두 성장을 하였다 (Fig. 4-15). 또한 hygromycin 이 없는 배지에서 1 주일 이상 배양을 한 후에 다시 hygromycin 배지에 접종을 하였을 때 성장을 하는 것으로 보아 pDH30 vector는 표고 버섯에 안정하게 남아 있는 것으로 여겨진다.

#### 마. Gene Knock-out 기술 탐색:

위와 같이 pDH25를 이용하여 표고버섯이 성공적으로 형질전환되었다. Plasmid를 이용하여 형질전환을 하는 경우, plasmid가 host 균주 내에 독립적으로 존재하기도 하고, 혹은 host 균주의 chromosomal DNA에 recombination 방법을 통하여 삽입되어 안정적으로 유지되기도 한다. 특히 버섯등의 균류 (fungal kingdom) *E. coli*나 *Bacillus* 등의 bacteria와는 달리 recombination이 매우 잘 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 형질전환 실험에서 pDH25의 경우 어떤 상태로 존재하는 지를 확인하기 위하여 우선 glass bead를 이용하는 전통적인 방법으로 형질전환된 버섯의 균사체로부터

total DNA를 추출하였으나, plasmid는 확인할 수 없었다. 그래서, 추출된 total DNA를 template으로 하여 PCR을 하였다.

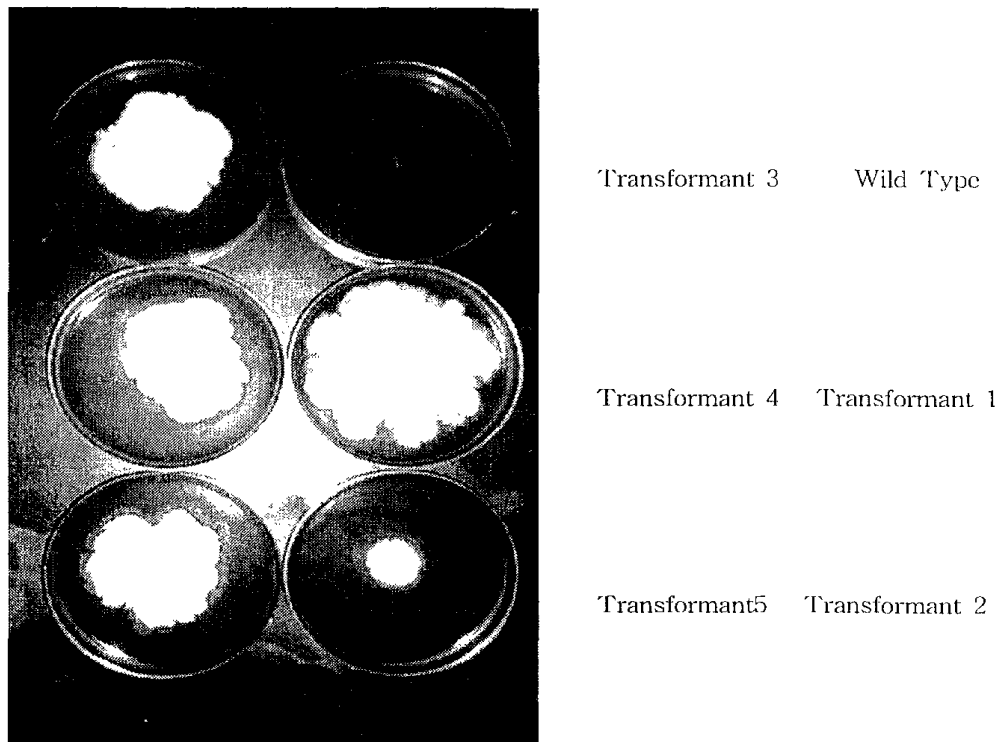


Fig. 4-15. The *Lentinus edodes* mycelium transformed with pDH25

추출된 total DNA 100 ng을 *AccuPower*<sup>TM</sup> PCR PreMix (50 mM Tris-HCl (pH8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 1 unit thermostable DNA polymerase, Bioneer corp.)에 넣고, 여기에 pDH30의 tryptophan promoter를 detection할 수 있는 primer oTrp-f (Fig. 4-12) 와 oTrp-r (Fig. 4-12) , 그리고, hygromycin B resistance gene을 detection할 수 있는 oHph-f (Fig. 4-12) 와 oHph-r (Fig. 4-12) 을 각각 20 pmole 씩 첨가한 후, 나머지를 증류수로 채워 전체 반응 부피를 20 ul로 맞추었다.



oTrp-f : 5'-GGC TGG AGC TAG TGG AGG TC-3'  
 oTrp-r : 5'-CGA AGC GCT TGG GTA GAA TA-3'  
 oHph-f : 5'-TGG ATA TGT CCT GCG GGT AA-3'  
 oHph-r : 5'-CGT CAG GAC ATT GTT GGA GC-3'

PCR 기기를 이용하여, 94℃에서 5분간 pre-denaturation 과정을 거친 다음, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1회로 하여 30 번을 반복시켰다. 마지막으로 72℃에서 10 분간 post-polymerization 과정을 수행하였다. 그 결과 반응물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다 (Fig. 4-16).

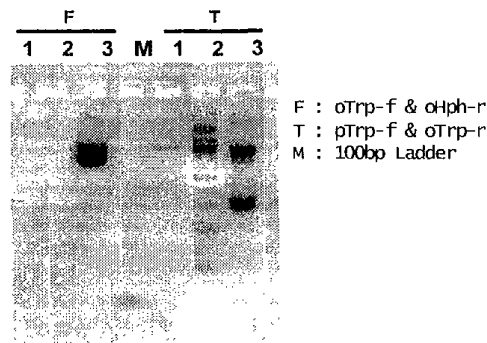


Fig. 4-16. Detection of pDH30 from total DNA by PCR

결과, 예상대로 800-900 bp 와 300-400 bp에서 각각 PCR band를 확인할 수 있었다. 따라서, pDH25 plasmid는 버섯의 chromosome에 존재한다는 것을 알 수 있었다. 버섯의 tryptophan 대사에 관계하는 유전자부분과 pDH30의 P<sub>trpC</sub> 와 T<sub>trpC</sub>에서 homologous recombination에 의해 연결되었고, 그 결과, 버섯 자체의 tryptophan 유전자는 pDH30의 것으로 대체되었으며 일종의 knock-out이 일어났다. 아직 이에 대한 유전적인 연구로 세대를 거쳐 가면서 이러한 유전자가 그대로 남아 있는지는 아직 더 많은 실험을 통하여 결과를 얻어야 겠다. 현재의 연구 결과는 이러한 것이 계속하여 계대 배양을 통하여 일어난다는 것만 밝혔다.

### 3) 개발 연구의 결과 및 고찰

세균이나 식물에서의 눈부시게 유전자 조작 기술의 발달에도 불구하고 표고 버섯을 비롯한 식용 담자균류 (Basidiomycetes)에서는 아직 적합한 유전자 조작 tool이 개발되지 않은 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 버섯에서 이용할 수 있는 vector로써 *A. nidulans*에서 사용되던 pDH25를 선발하였고, green fluorescent protein을 여기에 cloning하여 pDH25가 가지고 있는 tryptophan promoter가 표고버섯에서도 정상적으로 작동함을 확인할 수 있었다. 또한 pDH25는 항생제인 hygromycin B에 저항성을 나타낼 수 있는 hph 유전자를 가지고 있는데, 이는 형질전환이 계속 유지될 수 있도록 해주는 selection marker로 작용할 수 있을 것이다. pDH25를 이용한 형질전환 실험 결과, 최적의 electroporation 조건은 전기장의 세기는 2-4 kV/cm, RC-time은 10 msec 임을 알 수 있었다. 또한, 형질전환 결과 pDH25 vector는 버섯의 chromosome에 삽입되었다는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 표고의 tryptophan 유전자에서 pDH25와 homologous recombination이 되었기 때문이며, gene knock-out이 가능함을 보여준다.

일단 연구된 pDH 30은 pDH25에서 유래되었으나, 표고버섯의 분자 생물학적인 연구를 통하여 얻어진 플라스미드로 쉽게 전기장, gene gun를 통하여 삽입할 수가 있었다. 이 플라스미드의 특징은 균과 다른 세균성 생물에 저항성을 갖는 항생제인 ampicillim과 hygromycin로 균사의 marker로 표시한 것으로 앞으로의 연구에 중요한 도구로 생각되고 있다. 또한 비록 관찰하는 데는 어려움은 있고, 복잡한 기기가 필요하지만 그래도 편광 형광 물질의 유전자 (EGFP)를 삽입하여, 도구를 통한 눈으로 쉽게 관찰할 수 있도록 하였다. 이는 쉽게 유전자 파악과 균사에 표시 기법으로 중요한 것으로 생각된다. 우선, 개발된 표고의 균사에 이것을 삽입하는 표고의 인식이 쉽게됨으로 다른 품종의 균사와는 구별하기 위한 방법이기도 하다. 최근에 느타리 산업에서 바이러스 문제와 함께 균사의 품종 문제로 법적 논란이 제기되고 있는 현실에 이러한 기술은 분쟁을 없애주는 하나의 방법으로 생각된다.

주로, 적은 유전자를 삽입하기 위한 방법으로 트린스포존 (transposon)인 site (inverted site; IS)를 통하여 외래의 유전을 넣을 수가 있다. 여기에 해당되는 pDH 30

은 tryptophan 유전자로 이용하고자 하였다. 여기서 언급된 pDH 30에서 tryptophan 유전자는  $P_{trpC}$  와  $T_{trpC}$ 에서 표고의 본 유전자를 갖고 있는 IS region를 확인하여 knock-out기술을 개발하여, 그 가능성을 파악하고자 한 것이다. 이는 현재 문제가 되고 있는 GMO와 관련되는 것으로 사회에 많은 문제를 야기시킬 수 있다. 여기서 사용된 site는 최소한 tryptophan 유전자에 관련된 필수아미노산 생산과 관련된 것으로 앞으로 표고 생산과 관련된 유전자의 파괴에 중요한 구실을 할 것으로 생각된다. 한 예로 버섯은 빠른 시간에 자실체가 흐물 흐물해지는 것은 포자를 많이 퍼뜨리기 위한 방법으로 세포 내의 autolysis 유전자가 작동하기 때문이다. 이러한 유전자의 파괴는 과일과 버섯의 보관성을 오래 유지하기 위한 것으로 토마토 생산에 우랑균에 사용한 한 예이다. 이것은 앞으로 버섯 과제에서 필요한 것으로 오래 동안 보존을 위한 아주 조그만 기초적인 연구의 일환으로 생각된다. 연구된 결과는 표고의 유전자와 pDH 30은 서로 유전자들이 integration하는 것으로 나타났다.

## 참고 문헌

1. 박원목, 고한규, 박노조, 홍기성, 김규현. 1997. Isozyme Polymorphism 및 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Pattern에 의한 표고버섯 품종간 비교. 한국 균학회지 25(3) : 176 - 190.
2. An, G. 1986. Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. Plant Physiol. 81 : 86 - 91
3. Benfey, P. N. and Chua, N. H. 1989. Regulated gene expression in transgenic plants. Science 244 : 174 - 181
4. Camerini - Otero, R. D. and Hsieh, P. 1993. Parallel DNA triplexes, Homologous recombination and other homology - dependent DNA interaction. cell 73 : 217 - 223
5. Christou, P. 1992. Genetic transformation of crop plant using microprojectile bombardment. Plant J. 2 : 275 - 281
6. Davies, K. M. and Grierson, D. 1989. Identification of cDNA clones for tomato mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene. Planta. 179 : 73 - 80
7. Dopico, B., Lowe, A. L., Wilson, I. D., Merodio, C. and D. Grierson. 1993. Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and lowtemperature storage. Plant Mol. Biol. 21 : 437 - 449.
8. Elliott, T.T. 1995. Science and Cultivation of Edible Fungi, Balkenna, Netherlands.
9. Francois Guidet. 1994. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analysis. Nucleic Acids Res. 22(9) : 1772 - 1773
10. Frost, R. R. and Passmore, E. L. 1980. Mushroom Viruses: are- appraisal. phytopath., j. 98 : 272 - 284
11. Gray, J., Picton, S., Sabbeer, J., Schuch, W. and D. Grierson, 1992. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with Antisense genes. Plant Mol. Biol. 19 : 69 - 87
12. Geoge, C. A., Gerald, H. J., Susan, M., Winnell, N., Steven, S., Arthur, K. W., and

- William, F. T. 1996. High - Level Transgene Expression: Effects of a strong Scaffold Attachment Region from Tobacco. *Plant cell* 8 : 899 - 913
13. Ito, T. 1978. Cultivation of *Lentinus edodes*. in "The biology of Cultivation of edible mushroom." Eds. S. T. Chang and W. A. Hayes. Academic Press. N. Y., San Francisco, London. pp. 461 - 473
  14. Kangiu Yu and K. P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.* 20 (10) : 2606
  15. Kulkarmi, R. 1991. DNA Polymorphisms in *Lentinula edodes*, the shiitake mushroom *Appl. and Environ. Microbiol.* 57 : 1735 - 1739.
  16. Kwan, H., S. Chiu, K. Pang. and S. Cheng, 1992. Straintyping in *Lentinus edodes* by polymerase chain reaction. *Expt. Mycol.* 16 : 163 - 166
  17. Matzke, M. A., and Matzke, A.J.M 1991. Differential inactivation Loci containing homologous sequences. *Plant Mol. Biol.* 16 : 821 - 830
  18. Roland, S. B., Rose - Marie, H., Monique, T., and Frederick, M. J. 1996 Decreased Susceptibility to Viral Disease of  $\beta$  - Glucanase - Deficient Plants Generated by Antisense Transformation. *Plant cell* 8 : 1001 - 1011.
  19. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold. Spring Harbor Laboratory Press.
  20. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. U. 1990. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genomic markers. *Nucleic Acid Res.* 18 : 6531 - 6535
  21. Williams, J. G. K., Kubelik, A., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 19 : 6532 - 6535.
  22. Yamamura, Y. and Cochrane, K. W. 1976. A selectiv inhibitor of myxovirus from shiitake (*Lentinus edodes*). *Mushroom Science* 9(1) : 495 - 507
  23. Yii - Mattila, Y., Paavanen, S., Hannukkala, A., Paarikka, P., Tahvonen, R. and Karjalainen, R. 1996. Isozyme and RAPD - PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. *Plant Pathology*, 45 : 126 - 134