

감마선 처리에 의한 변이주의 배양 및 균막형성 특성

김현석¹ · 오찬진¹ · 정광주¹ · 최문희³ · 신현재² · 오득실^{1*}

¹전라남도산림자원연구소

²조선대학교

³조선대학교 산업기술창업대학원

Culture and mycelium-mat formation characteristics of mutant strains by gamma-ray treatment

Hyoun-Suk Kim¹, Chan-Jin Oh¹, Kwang-Ju Jeong¹, Moon-Hee Choi³, Hyun-Jae Shin², and Deuk-Sil Oh^{1*}

¹Jeollanamdo Forest Resources Research Institute, 7 Sanpo-myeon, Naju-city, Jeollanam-do, Republic of Korea

²Department of Biochemical and Polymer Engineering, Pilmundaero 309, Donggu, Gwangju, Republic of Korea

³Department of Beauty and Cosmetology, Graduate School of Industrial Technology Startup, Chosun University, Gwangju, Korea

ABSTRACT: Mycelium composites and leathers have versatile material properties based on their composition and manufacturing process. To prepare mycelium mat for the production of mushroom leather, several strains were mutated by gamma rays. Some mutant strains, including *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, and *Schizophyllum commune* showed good hyphae growth rate and density on saw-dust media. Irradiation power (Gy), time, and height from the radiation source to the sample were examined. Based on the preliminary data obtained in this study, comprehensive research should be conducted to explore the optimal strains and culture conditions for mycelium-based leather production.

KEYWORDS: Gamma-ray Processing, Mushroom leather, Mutant strain, Mycelium-based, Culture condition

서 론

현재 가죽 시장은 환경규제 및 환경 변화로 공급량은 정체기에 있으며 가죽의 고급화, 세분화가 진행되고 있어, 앞으로는 천연가죽에서 인조가죽으로의 전환이 가속화될 것으로 예상되고 있다. 특히 바이오를 기반으로 하는 대

체 가죽이 큰 관심을 받고 있다. 바이오를 기반으로 하는 대체 가죽에는 바이오매스 섬유 가죽, 단백질 중합체, 박테리아 셀룰로오스, 버섯균사체가 있으며 이 중에서도 버섯 균사체가 가장 큰 관심을 받고 있다(Mekonnen *et al.*, 2013; Bak *et al.*, 2011).

버섯균사체를 이용한 가죽 소재(Mycelium-mat)는 다른 바이오매스 소재보다 동물 가죽과 가장 유사한 재질을 가지고 있으며, 친환경적으로 생산이 가능한 장점이 있으나 아직까지는 배양 속도가 느리며 내구성이 다소 약하다는 단점이 있어 이를 보완하기 위한 연구가 시급하다(Bak *et al.*, 2011; Field *et al.*, 1993). 버섯균사체를 이용한 가죽 소재 개발 관련 국외 연구는 균사체 대량배양을 위한 균주 및 배양 조건 등에 대한 연구가 많이 이루어져 있으며 대부분 특허로 등록하여 자세한 기술에 대하여 정보를 수집하기 어렵다. 버섯균사를 이용한 상업용 가죽이 생산 공급되려면 균사 매트 배양과 생산뿐만 아니라 가죽화 처리 기술, 염색·코팅·도장 등 제품개발을 위한 많은 후속 연구가 이루어져야 한다. 반면 국내 관련 연구는 이제 시작 단계로서 균사체 기반 복합소재 연구동향 파악 및 가능성에 대한 연구가 수행되고 있다(Kim *et al.*, 2017).

J. Mushrooms 2020 September, 18(4):393-397

<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2020.18.4.393>

Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853

© The Korean Society of Mushroom Science

Hyoun-Suk Kim(Researcher), Chan-Jin Oh(Researcher),

Kwang-Ju Jeong(Researcher), Moon-Hee Choi(Visiting Professor),

Hyun-Jae Shin(Professor), and Deuk-Sil Oh(Researcher)

*Corresponding author

E-mail : ohye@korea.kr

Tel : +82-61-338-4261

Received November 8, 2020

Revised December 2, 2020

Accepted December 16, 2020

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

방사선을 이용한 방사선처리는 교배육종의 한계와 유전자 변형 작물의 환경 및 식품 안전성 문제를 극복하는데 유용한 대안으로 제시되고 있다(Jung *et al.*, 2018). 벚섯 균사체에 돌연변이를 일으켜 목표한 변이형이나 유용한 변이형을 선발해 낼 수 있으며, 다른 육종법에 비해 신속하면서도 안정적이다(Lee *et al.*, 2017). 특히 방사선처리를 통한 육종기술은 다른 나라에서 도입한 품종이라도 돌연변이를 통해 주요한 형질이 바뀌면 국산 품종을 등록할 수 있기 때문에 방사선 육종에 많은 노력을 기울이고 있다(Kang *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2005).

본 연구에서는 벚섯 균사체를 가죽 소재로 활용하기 위해서는 일정 두께의 균막을 형성하여야 하기 때문에, 가죽 소재에 적합한 균주를 선발하기 위하여 방사선처리의 장점을 바탕으로 균사체에 감마선을 직접 처리하여 돌연변이를 생성하고, 그 후 변이주에 대한 독립성 검정, 배양 특성, 균막 형성 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시험균주

본 실험에 사용된 균주는 총 11개 균주로 Table 1과 같다. 시험 균주로 사용된 균주는 모두 산림자연연구소에서 보유하고 있는 균주를 사용하였으며, 실험에 사용하기 전 균의 활력을 확보하기 위하여 미리 원균으로부터 Cork-borer (*f* 5)를 이용하여 동일한 크기로 잘라낸 후, PDA (Potato Dextrose Agar)배지 증양에 접종 후 실링하였다. 실링된 배지는 항온배양기를 이용하여 25°C, 암배양 조건 하에서 2주간 배양하였다. 2주 후 배양 중인 균 선단 부분의 가장 활력이 왕성한 부분을 절취하여 PDA 배지에 다시 접종하여 배양하면서 활력을 확보한 후 실험에 사용하였다.

감마선 조사

준비된 시험 균주에 감마선을 처리하여 돌연변이를 유발하고자 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 Co-60 저준위 감마선조사장치(Gamma ray radiography equipment, Co-60, Pencil Type, MDS Nordion, Canada)를 이용하였다. 감마선 조사량은 균사체에 200 Gy 이상 양성자 빔을 조사할 경우 생존율이 감소하기 시작하였다는 Kwon 등(2006)의 보고에 따라 유용한 변이주를 최대한 확보하기 위해 균사 생존율을 고려하여 비교적 저선량에 해당하는 50, 100, 200, 300, 400, 500Gy로 조사하였다. PDA 배지에 배양된 시험 균주의 균사체에 감마선을 30 cm 높이에서 1시간 동안 처리한 후 균사생장을 억제하기 위해 4°C에서 냉장 보관하였다.

변이주 선발

균사체에 돌연변이가 발생한 균사를 선발하고자 감마선

Table 1. List of research strains

Starin-Number	Scientific name
JF00-110	<i>Lentinula edodes</i>
JF00-112	<i>Lentinula edodes</i>
JF06-01	<i>Cordyceps militaris</i>
JF06-04	<i>Cordyceps militaris</i>
JF47-01	<i>Poria cocos</i>
JF17-01	<i>Ganoderma lucidum</i>
JF65-01	<i>Agaricus arvensis</i>
JF41-01	<i>Laetiporus sulphureus</i>
JF69-01	<i>Schizophyllum commune</i>

조사가 끝난 시험 균주를 백금이로 끊어서 채취한 후 미리 만들어진 PDB (Potato Dextrose Broth) 배지(500 mL)에 접종하여 2주간 배양하였다. 배양 후 homogenizer를 이용하여 60초 동안 10,000 rpm으로 미세하게 분쇄하고, 손상된 균사의 회복을 위해 25°C에서 48시간 동안 정치 배양하였다. PDA 배지에 다시 200 µL씩 도말하여 항온기(25°C, 암조건)에서 배양하면서 육안으로 확인이 가능한 single colony를 감마선 조사선량별로 10개씩 무작위로 채취한 후 증식 배양하였다.

독립성 검정

확보된 변이주를 대상으로 하여 모 균주와 대치배양한 후 대치선 형성 여부를 확인하여 독립성을 검정하였다. 대치배양은 PDA 배지에 모 균주와 변이주를 함께 배양하여 균사의 융합 여부를 확인하여 균주 간의 유사성을 검정하는 방법이다(Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014). PDA 배지에 모 균주와 감마선 조사 후 분리한 변이주를 함께 접종한 후 항온기(25°C, 암조건)에서 배양하면서 대치선 형성 유무를 확인하여 독립성을 검정하였다.

톱밥배지내 배양 및 균막형성 특성 조사

독립성이 검정된 균주를 대상으로 하여 톱밥배지에서 배양 및 균막형성 특성을 조사하였다. 톱밥배지는 참나무 류톱밥과 미강을 8:2 (v/v)로 혼합한 후 수분을 60% 내외로 조절하였다. 배양용기(15 × 15 × 10 cm)는 균사의 원활한 배양을 위하여 뚜껑에 0.2µm의 가스교환 필터(*f* 20 mm)를 6개씩 부착한 후 사용하였다. 준비된 배양용기에 톱밥배지를 500 g씩 넣은 후 고르게 다져주고 Autoclave를 이용하여 고압 멸균(121°C, 90분)하였다. 멸균이 완료된 배지를 냉각실(무균조건, 10°C)에서 충분히 식히고 미리 준비된 변이주별 액체접종원을 이용하여 20 ml씩 접종한 후 배양실(25°C, 암조건)에서 배양하였다.

1차 배양이 완료된 후 배양용기에서 배양이 완료된 톱

Table 2. Number of variant according to Gamma-ray irradiation by Strain

	<i>L. edodes</i> -1	<i>L. edodes</i> -2	<i>C. militaris</i> -1	<i>C. militaris</i> -2	<i>P. cocos</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>A. arvensis</i>	<i>L. sulphureus</i>	<i>S. commune</i>	<i>M. arffinis</i>	<i>F. fraxinea</i>
50Gy	3	3	3	1	-	3	3	3	3	3	3
100Gy	3	3	-	-	2	3	3	3	3	3	1
200Gy	3	3	2	1	3	3	3	3	3	3	2
300Gy	-	3	-	-	3	2	3	3	-	2	3
400Gy	-	2	1	1	3	3	3	3	3	3	2
500Gy	-	-	-	1	-	-	2	3	3	-	2

밥배지를 털어낸 후 잘게 부순 다음 다시 배양용기에 넣어 배양실(25°C, 암조건)에서 배양하면서 균막 형성을 촉진시킨 후 일주일 간격으로 균막형성 특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

변이주 선별

감마선을 50, 100, 200, 300, 400, 500 Gy 로 처리한 시험 균주별로 균사체를 채취하여 PDB 배지에서 배양한 후 PDA 배지에 도말하여 배양한 결과 수많은 colony가 발생하였으며, 그중 균주별로 10개씩 성장속도가 빠른 colony를 확보하였다. 그 후 모 균주와 대치배양을 통해 독립성을 검정한 결과 표고버섯(*Lentinula edodes*)-1 9개, 표고버섯(*Lentinula edodes*)-2 14개, 동충하초(*Cordyceps militaris*)-1 6개, 동충하초(*Cordyceps militaris*)-2 4개, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 14개, 복령(*Poria cocos*) 11개, 흰주름버섯(*Agaricus arvensis*) 17개, 치마버섯(*Schizophyllum commune*) 15개, 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus*) 18개, 아까시재목버섯(*Perenniporia fraxinea*) 13개, 메꽃버섯붙이(*Microporus vernicipes*) 14개 균주에서 대치선 형성이 확인되었다(Table 2). 균주별로 방사선 조사량에 따른 변이주 발생 특성이 상이하였으며, 동일한 종인 *L. edodes*-1과 *L. edodes*-2 사이에서도 다른 경향을 보였다.

동일한 균사체에 동일한 조건의 감마선을 처리했는데도 돌연변이가 균사체 전체에 발생하는 것이 아니라 균사 조각에 따라 다르게 발생하였으며, 이는 버섯의 균사체는 수많은 균사 세포로 이루어져 있기 때문에 감마선에 대한 균사 세포마다 감수성이 각각 달라 돌연변이의 발생 부위에도 차이가 있는 것으로 추측된다. 또한 버섯을 비롯한 식물체에 방사선을 처리하게 되면 뉴클레오티드 혹은 DNA 배열의 결실(deletion), 삽입(insertion) 혹은 재배열(re-arrangement) 등에 의해 돌연변이가 일어나는데 대부분은 결실에 의한 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2006; Kim et al., 2006; Bae et al., 2020).

따라서 감마선에 대한 민감도는 버섯 균주에 따라 다르게 나타나는 것으로 판단되며, 앞으로 버섯 품종 및 종류에 따라 유용한 변이체를 얻을 수 있는 방사선의 적정조건 설정 및 표준화에 대한 연구가 필요하며 방사선을 이

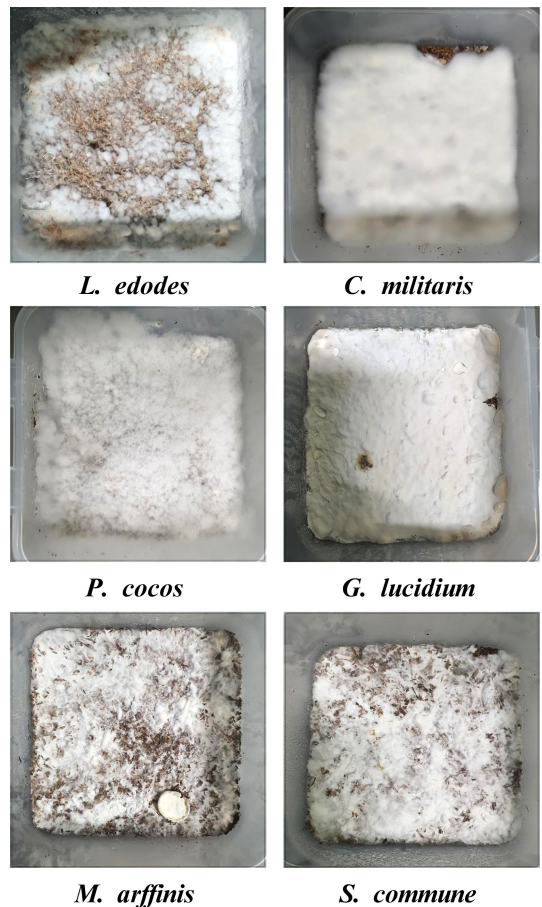


Fig. 1. Characteristic of mycelial growth of primary culture in sawdust media.

용한 육종이 효율성이 높고 안정적인 방법으로 확립될 것으로 사료된다.

변이주의 톱밥배지 배양 및 균막형성 특성

선별된 변이주는 톱밥배지에서 배양특성이 다양하게 나타났다. *L. edodes*은 약간의 균막을 형성하였지만, *L. edodes* 특성상 균막을 증가시키지 않고 갈변되었다. *C. militaris*와 *P. cocos*의 경우 균막을 다소 형성하였지만 밀

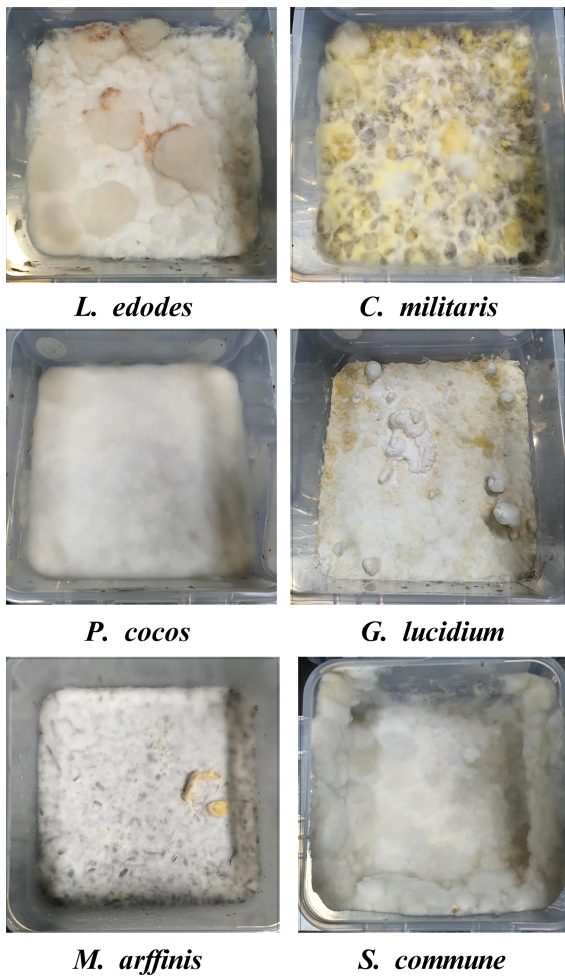


Fig. 2. Characteristic of mycelial growth of secondary culture in sawdust media.

도가 매우 낮아 압축했을 경우 거의 남아있지 않았다. *G. lucidum*과 *A. arvensis*은 균막을 약간 형성하였으며, 균막이 다른 버섯에 비해 다소 질긴 성향을 보였다. *L. sulphureus*, *S. commune*, *M. svernicipes*, *P. fraxinea*의 경우에는 균막을 거의 형성하지 않았다.

선발된 변이주를 대상으로 하여 톱밥배지에서 1차 배양한 후 2차 배양 특성을 조사한 결과, 1차 배양과 다소 다른 경향을 나타내었다. *L. edodes*는 1차 배양과는 달리 균막 형성이 더 왕성하게 이루어졌으며, *C. militaris*의 경우 균막의 두께는 얇아졌으나 균밀도가 높아지면서 변색이 발생되었다. *P. cocos*은 1차 배양과 2차 배양에 큰 차이가 없었으며, *M. vernicipes*와 *P. fraxinea*은 1차 배양보다 2차 배양에서 균밀도가 향상되면서 균막 형성을 하였다. 특히 *P. fraxinea*은 균사가 배양용기 벽을 타고 올라오는 현상인 Wall-growth가 두드러져 이를 억제시킬 방안이 필요하다. *G. lucidum*을 포함한 *L. sulphureus*, *S. commune*에서는 균막 형성이 이루어지지 않고 자실체가 발생하였

다(Fig. 1, 2). 자실체를 발생할 경우 균막 형성을 위한 에너지를 자실체 형성에 소비하기 때문에 균막 형성을 위해서는 자실체 발생을 억제하기 위한 방안이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 버섯 가죽 소재를 발굴하고자 방사선 처리를 통한 균주별 변이주 선발 및 변이주의 톱밥배지내 배양 및 균막형성 특성을 조사하였다. 방사선 처리에 따라 균주별로 돌연변이 특성이 다양하게 조사되었다. 변이주의 톱밥배지내 배양 특성은 모든 변이주에서 균밀도 및 배양 속도가 빨랐으며, *L. edodes*, *G. lucidum*, *A. arvensis*, *P. fraxinea*의 변이주에서 균막 형성이 양호한 것으로 조사되었다. 본 실험 결과를 기초로 하여 균막 형성을 위한 최적 균주 및 조건 탐색을 위한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) ‘산림과학기술 연구개발사업(2020191B10-2022-BA01)’의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Bae EJ, Kim CY, Yoon JH, Sung CH, Jin EJ. 2020. Dwarf mutant induction by irradiation of gamma-ray in Korean lawngrass (*Zoysia japonica*). *Weed Turf Sci* 9: 53-62.
- Bak WC, Ka KH, Kim WS, Ko HG, Koo CD, Hong GS, Min, KT, Oh DS, Ryu SR. 2011. Forestry mushroom sphere product of study presentation. *Korea Forest Res Instit* 116: 34-42.
- Bak WC, Yoon KH, Ka KH, Kim MK, Ryu SH, Park H, Kim SS. 2011. Development of excellent strains and cultivation techniques of forest mushrooms. *Korea Forest Res Instit* 30-109.
- Field JA, de Jong E, Feijoo-Cost, G, de Bont JA. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol* 11: 44-49.
- Jung YJ, Kim JM, Park SC, Cho YG, Kang KK. 2018. Current status of new plant breeding technology and its efforts toward social acceptance. *J Plant Biotechnol* 45: 299-305.
- Kang SY, Kim SH, Ryu J, Kim JB. 2020. Brief history, main achievements and prospect of mutation breeding in Korea. *Korean J Breed Sci* 52: 49-57.
- Kim DS, Kim YW, Kim KJ, Shin HJ. 2017. Research trend and product development potential of fungal mycelium-based composite materials. *KSBB J* 32: 174-178.
- Kim GJ, Koh CC, Gi GY, Choi KJ, Song HS. 2006. In vitro mutant induction by irradiation of gamma-ray in *Rosa hybrida hort*. *Hortic Sci Technol* 24: 497-502.
- Kim JB, Yu DW. 2014. Genetic variation of local varieties and mutants groups induced by gamma ray in *Hypsizigus marmoreus*. *J Mushrooms* 12: 181-186.

- Kim JB, Yu DW. 2014. Genetic variation in mutants induced by gamma ray in *Hypsizigus marmoreus*. *J Life Sci* 24: 1174-1179.
- Kim JK, Lim SH, Kim IJ, Lee YH, Kang HW. 2012. Mutagenesis of *Pleurotus eryngii* by gamma ray irradiation. *Kor J Mycol* 40: 93-97.
- Kwon HJ, Kong WS. 2006. Proton beam sensitivity of basidiospore and mycelium in *Pleurotus ostreatus*. *Kor J Mycol* 34: 34-38.
- Lee JW. 2006. Application and prospect of food irradiation for providing the safe food materials. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 11: 12-20.
- Lee SM, Kim YG, Park HC, Kim KK, Son HJ, Hong CO, Park NS. 2017. Properties of the silkworm (*Bombyx mori*) Dongchunghacho, a newly developed Korean medicinal insect-borne mushroom: Mass-production and pharmacological actions. *J Life Sci* 27: 247-266.
- Mekonnen T, Mussone P, Khalil H, Bressler D. 2013. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *J Mater Chem A* 1: 13379-13398.
- Park IS, Kang SY, Kim DS, Song HS. 2005. Seed germination and seedling growth of *Rhododendron* species by gamma rays irradiation. *J Kor Flower Res Soc* 13: 116-120.