

RESEARCH ARTICLE

단핵균주간 교잡에 의한 에르고티오네인 함량이 높은 기능성 표고 균주 선발

김민준, 정연석, 장영선, 가강현*

국립산림과학원 산림생명자원연구부 산림미생물연구과

Selection of Functional *Lentinula edodes* Strains with High Ergothioneine Content using Mono-mono Hybridization

Min-Jun Kim, Yeun Sug Jeong, Yeongseon Jang, and Kang-Hyeon Ka*

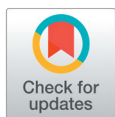
Forest Microbiology Division, Forest Bioresources Department, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

*Corresponding author: kasymbio@korea.kr

ABSTRACT

Lentinula edodes have been cultivated extensively not only in South Korea but also in other Asian countries. In terms of taste and nutrition, it is a valuable mushroom that is comparable to other mushrooms. *L. edodes* contains various physiologically active compounds that promote human health. One compound, ergothioneine, exerts a powerful antioxidant function that inhibits cellular senescence. As it is not biosynthesized by plants or animals, *L. edodes* is very important for ergothioneine supply. The *L. edodes* cultivars Bambithyang (NIFoS 3404) and Sansanhyang (NIFoS 3420) of the National Institute of Forest Science (NIFoS) had higher ergothioneine content than the other cultivars, and 11 strains were obtained using mono-mono hybridization between them. The strains were inoculated into sawdust media to obtain fruiting bodies, and the ergothioneine content of each hybrid strain was confirmed using high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Among the 11 strains, NIFoS 5108 had a higher ergothioneine content than the parental strains, Bambithyang (NIFoS 3404) and Sansanhyang (NIFoS 3420). This study revealed that it is possible to develop cultivars with improved specific functions using mono-mono hybridization.

Keywords: Ergothioneine, *Lentinula edodes*, Mono-mono hybridization



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2021 December, 49(4): 507-514
<https://doi.org/10.4489/KJM.20210049>

Received: October 08, 2021

Revised: November 26, 2021

Accepted: December 07, 2021

© 2021 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

표고는 담자균문, 주름버섯목, 표고속에 속하는 버섯으로 많은 아시아 국가와 최근 유럽 국가에서도 재배되고 있는 식용 버섯이다. 다양한 약효를 가지고 있기 때문에 표고는 전통 의학에서 뿐만 아니라 종양 치료에 사용되기도 한다[1]. 표고는 다양한 2차 대사산물인 페놀 화합물을 함유하고 있어 우수한 항산화제 역할을 한다[2]. 이와 같은 화합물 중 에르고티오네인은 생리학적 pH

에서 산화되지 않는 안정한 항산화 물질이다[3]. 이전 연구에 따르면 에르고티오네인은 스트레스에 의한 미토콘드리아 DNA 손상과 단백질 산화 및 지질 과산화를 방지하는 기능이 있다[4]. 이 뿐만 아니라 다양한 생리학적 기능 및 항산화제로서의 잠재적 역할에 관한 많은 보고가 있었다[5].

위와 같이 유용한 기능을 가진 에르고티오네인은 식물이나 동물에서는 합성되지 않고[6], 오직 세균과 곰팡이에 의해서만 생합성 되는 특징을 가지고 있다[7]. 다양한 버섯 자실체에서 에르고티오네인이 확인되었으며, 표고의 경우 g당 약 0.92 mg의 에르고티오네인 함량이 보고되었다[8]. 표고 자실체의 에르고티오네인은 함량 증가를 위해 네 가지의 다른 질소원 중 황산암모늄을 첨가한 배지에서 에르고티오네인 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었다[9].

다양한 버섯에서 교배법을 통해 기능성과 품질을 향상시키는 연구가 수행되고 있다. Di-Mon교배법의 경우 잎새버섯에서 품질이 우수하고 병재배에 적합한 품종을 육성하였으며[10] 아위느타리에서는 교잡으로 우량균주를 선발하고 재배를 통해 에르고티오네인 함량이 가장 높은 균주를 신품종으로 출원하였다[11]. 단포자 교배법을 이용한 연구의 경우 영지버섯 단핵균주간 교잡을 통해 다당류와 트리테르펜 함량이 높은 자실체를 교잡균주에서 확인하였고 표고는 형태적 특성이 우수한 계통과 산발 발생으로 노동력이 절감되고 버섯의 육질이 단단한 품종 등이 개발되었다[12-14].

본 연구는 단포자 교배법을 이용하여 에르고티오네인 함량이 높은 기능성 표고를 개발하기 위하여 시도되었다. 에르고티오네인 함량이 높은 두 가지 품종을 선발하고 단핵균주 간 교잡을 통해 교잡균주를 얻었고 이들 균주에서 자실체를 발생시켜 형태적 특성과 에르고티오네인 함량을 분석하였다.

재료 및 방법

표고 균주

표고 기능성 품종 개발을 위해 사용한 표고 품종은 밤빛향(NIFoS 3404)과 산산향(NIFoS 3420)으로 모두 국립산림과학원 보관 균주를 사용하였다. 2개의 품종을 톱밥재배하여 자실체를 얻었으며, 여기에서 단포자를 받아 멸균수로 희석하였다. Potato Dextrose Agar (PDA; Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 도말하고 배양실(25°C)에서 7일간 배양하였으며 발아된 단포자를 50개씩 분리하여 새로운 PDA 배지에 계대배양하였다. 배양실(25°C)에서 20일 동안 배양 후, 균사 생장 속도가 빠르며 균총 모양이 특이한(균사의 밀도 및 가장자리 모양) 단포자 균주를 10개씩 선택하였다. 선택한 단포자 균주는 균사체에서 꺾쇠 연결체(clamp connection) 유무를 현미경 검경(1,000배)을 통해 확인하고 100쌍의 교잡균주를 제작하였다. 한 쌍의 모균주 균사체를 0.7 cm 크기의 정사각형 조각으로 절단한 후, PDA 배지 표면에 닿게 하여 하나의 배지에 같이 접종하였다[15]. 25°C 배양실에서 20일간 균사체를 대치배양하면서 육안 관찰과 현미경 검경(1,000배)을 통해 교잡이 이루어졌음을 확인하고, 교잡된 부위를 순수 분리 및 계대배양하여 톱밥배지의 접종원으로 사용하였다.

배양 조건

본 연구에서는 모균주(NIFoS 3404, 3420)와 위에서 단핵균주간 교잡을 통해 자실체가 만들어진 표고 균주 (NIFoS 5086, 5099, 5101, 5102, 5103, 5104, 5105, 5106, 5108, 5109, 5110)를 사용하였다. 위의 13개 균주를 23°C에서 10일 동안 PDA 배지(Difco, Detroit, MI, USA)에서 배양하였고 다시 PDA 배지에 계대배양하여 23°C에서 14일 동안 균사체를 배양한 후에 톱밥배지의 접종원으로 이용하였다. 신갈나무(*Quercus mongolica*) 톱밥과 밀기울을 사용하여 4:1 (w/w) 비율로 혼합하였다. 톱밥배지의 수분 함량은 $65 \pm 5\%$ 로 조절하고 2 kg의 사각배지(20 cm × 15 cm × 10 cm) 모양으로 만든 후 121°C에서 90분간 고압멸균하였다. 만들어진 사각배지에 균사체 조각을 4개(10 mm × 10 mm)씩 접종하고 25°C에서 60일 동안 암배양 후 40일 동안 명배양하였다. 총 100일 배양 후 발생실(온도 $18 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $85 \pm 5\%$)에서 발생작업을 실시하여 버섯을 수확하였다.

자실체 특성 조사

성숙된 자실체를 배지와 매우 가깝게 절단하여 수확하였고, 전자저울(KERN, Balingen, Germany)과 캘리퍼스(Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 이용하여 특성을 조사하였다. 먼저, 수확 후 바로 자실체의 생중량을 측정하였다. 갓의 직경은 자실체의 가장 긴 부분과 짧은 부분의 중간에서 측정하였고, 갓의 두께는 대와 갓이 붙어 있는 중앙점으로 수직이 되는 지점의 높이를 측정하였다. 대의 길이는 대의 상단부 중심에서 하단부 중심점까지의 길이를 측정하였고, 대의 굵기는 대 길이의 중심점에서의 두께를 측정하였다. 주름살의 두께는 자실체를 반으로 자르고 갓부터 주름살이 시작되는 부위를 기점으로 크기를 측정하였으며, 측정을 완료한 후 자실체는 55°C의 건조기에서 3일 동안 건조시키고 건중량을 측정하였다.

에르고티오네인 함량 조사

에르고티오네인 추출은 Chen 등[16]이 사용한 방법을 바탕으로 일부 수정하여 수행하였다. 자실체 특성 조사를 완료하고 완전히 건조된 버섯을 막자사발과 막자를 이용하여 고운 가루로 만들었다. 곱게 갈린 가루 1 g을 20 mL의 차가운 추출 용액(10 mM dithiothreitol [DTT], 100 μM betaine in ethanol, 100 μM 2-mercapto-1-methyl-imidazole [MMI] in 70% ethanol)에 첨가하여 90초 동안 강하게 와류하였다. 4 mL의 sodium dodecyl sulfate (SDS)을 첨가한 후 25°C, 3,000 g에서 10 분동안 원심분리 한 뒤에 상층액을 40°C에서 5 mL로 증발시키고 0.45 μm CA 필터(3 mm, Lida, Kenosha, WI, USA)에 여과시켰다. 에르고티오네인 함량 분석은 C18 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 μm; Youngjinbiochrom, Seongnam-si, Korea)이 장착된 Ultimate3000 HPLC (Thermo Dionex, Germering, Germany)을 사용하여 분석하였다. 0.5 M의 인산염이 포함된 30% 아세토니트릴 30 mL/L와 트리에틸아민 1 mL/L가 용리제로 사용되었고, 이동상의 유속은 1 mL/min, 주입 부피는 10 μL로 수행하였다. 에르고티오네인은 254 nm의 파장에서 모니터링 하였고 Authentic L-ergothioneine (Sigma, St. Louis, USA)을 사용하여 표준 곡선을 계산하고 에르고티오네인 함량을 정량화 하였다.

결과 및 고찰

자실체 특성

모균주 2개와 11개의 교잡균주에서 자실체를 발생시킨 결과 갓, 대, 주름살 등 모든 균주의 자실체는 버섯 형태를 온전히 갖추었다(Fig. 1). 자실체의 형태적 특징은 Table 1과 같다. 대부분의 교잡균주 자실체는 모균주와 비교하여 비슷한 크기와 형태를 가졌지만 NIFoS 5099, NIFoS 5103 그리고 NIFoS 5109 자실체는 상당한 차이를 보였다. NIFoS 5099와 NIFoS 5103 균주의 자실체는 모균주 자실체에 비해 크기가 작았으며 생중량의 평균은 약 7배 이상 차이를 보였다. 반대로 NIFoS 5109 균주 자실체는 크기가 크고 생중량은 2배가량 무거웠다. 갓 색깔은 모균주인 밤빛향은 밝은 갈색이고 산산향은 다갈색이었다. 대부분의 교잡균주 자실체는 모균주와 큰 차이를 보이지 않았지만 NIFoS 5086 균주의 자실체는 밤빛향 자실체 보다 밝은 색을 띠었고 NIFoS 5106 균주 자실체는 산산향 자실체보다 조금 짙은 색깔을 띠었다. 갓 모양은 대부분 반구형이었지만 NIFoS 5109의 갓 모양은 일정하지 않고 기형인 형태를 보였다. 갓의 직경은 NIFoS 5109 균주의 자실체가 가장 크고 NIFoS 5103 자실체가 가장 작았으며, 두께는 NIFoS 5102 균주 자실체가 가장 두꺼웠고 NIFoS 5103 균주 자실체가 가장 얇았다. 대 길이와 두께는 NIFoS 5086과 NIFoS 5109 균주 자실체가 가장 길고 두꺼웠다. 자실체는 1차 발생한 것으로 생산량은 Table 2와 같다. NIFoS 5108 균주의 생산량은 2 kg 톱밥배지당 약 23.8 g으로 모균주 밤빛향과 산산향 생산량 평균보다 약 20% 높았고 NIFoS 5099 균주의 경우 2 kg 톱밥배지당 4.7 g으로 가장 낮은 생산량을 보였다. 자실체의 형태적인 특성 조사 결과를 종합하면 모균주의 자실체가 교배 균주 자실체에 비해 전반적으로 우수한 특성을 보였다.

Table 1. Fruiting body characteristics of *Lentinula edodes* on sawdust bag cultivation.

Strains	Weight (g)	Cap diameter (mm)	Cap thickness (mm)	Stipe length (mm)	Stipe thickness (mm)	Dry weight (g)
NIFoS 3404	49.3±20.1b	66.0±10.2ab	17.2±5.1ab	50.3±11.8abc	15.7±4.3bcd	4.5±1.7bc
NIFoS 3420	35.0±19.6bc	57.7±12.1bc	16.8±6.2ab	33.6±7.4bcd	12.9±4.4bcde	3.6±2.2bc
NIFoS 5086	59.7±6.3ab	73.5±9.0ab	17.6±3.8ab	60.9±2.2a	17.0±0.1b	5.9±1.2ab
NIFoS 5099	6.8±5.7c	29.3±8.7d	10.5±3.2b	25.6±11.4d	6.9±2.1e	0.9±0.6c
NIFoS 5101	40.1±16.2b	61.8±10.6ab	15.6±3.4ab	41.5±10.0abcd	12.8±2.0bcde	4.4±1.8bc
NIFoS 5102	24.9±7.7bc	51.0±7.6bcd	20.4±2.4a	24.6±4.2d	8.8±1.4de	2.4±0.7bc
NIFoS 5103	4.2±2.6c	32.4±12.9cd	10.3±3.9b	28.1±12.0d	9.3±6.9de	0.9±0.9c
NIFoS 5104	23.7±7.8b	51.6±6.8bcd	15.3±2.7ab	29.8±5.2cd	11.6±2.3bcde	2.0±0.7bc
NIFoS 5105	23.3±10.2bc	55.4±12.7bcd	15.5±3.3ab	31.8±9.7bcd	10.4±2.0cde	2.4±1.1bc
NIFoS 5106	45.5±5.0b	63.6±11.8ab	14.4±2.0ab	39.4±10.7bcd	16.3±0.7bc	4.0±1.5bc
NIFoS 5108	47.8±41.8b	58.4±19.5abc	17.6±4.7ab	38.2±9.9bcd	14.3±3.2bcd	4.9±4.5bc
NIFoS 5109	92.5±44.8a	84.7±24.7a	15.5±2.3ab	52.0±9.0ab	27.3±4.1a	9.4±5.2a
NIFoS 5110	28.6±9.7bc	53.0±9.4bcd	13.3±2.3ab	37.9±8.0bcd	9.7±1.8cde	2.9±0.9bc

Parent strains: NIFoS (3404, 3420); Hybrid strains: NIFoS (5086, 5099, 5101, 5102, 5103, 5104, 5105, 5106, 5108, 5109, 5110); NIFoS: National Institute of Forest Science.

Values are presented as mean±standard deviation (n ≥ 3). In each strain, means with different letter are significantly different (p < 0.05).

Table 2. Fruiting body yield of *Lentinula edodes* on sawdust bag cultivation.

Strains	Yield (g/2 kg)
NIFoS 3404	55.1 ± 9.5
NIFoS 3420	38.5 ± 9.1
NIFoS 5086	23.8 ± 32.8
NIFoS 5099	4.7 ± 4.9
NIFoS 5101	43.1 ± 11.1
NIFoS 5102	19.7 ± 11.3
NIFoS 5103	10.5 ± 20.4
NIFoS 5104	23.8 ± 2.5
NIFoS 5105	23.0 ± 7.1
NIFoS 5106	9.1 ± 20.3
NIFoS 5108	31.4 ± 33.5
NIFoS 5109	42.1 ± 63.9
NIFoS 5110	28.9 ± 3.6

Parent strains: NIFoS (3404, 3420); Hybrid strains: NIFoS (5086, 5099, 5101, 5102, 5103, 5104, 5105, 5106, 5108, 5109, 5110); NIFoS: National Institute of Forest Science.

Values are presented as mean±standard deviation (n = 5).

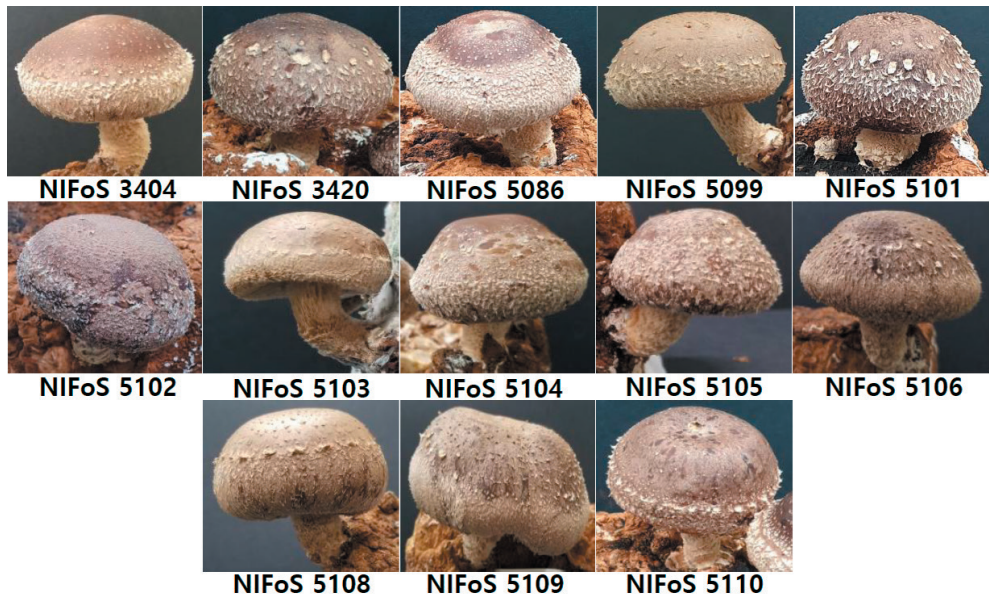


Fig. 1. Morphological characteristics of fruiting bodies of *Lentinula edodes* on sawdust bag cultivation. Parent strains: NIFoS (3404, 3420); Hybrid strains: NIFoS (5086, 5099, 5101, 5102, 5103, 5104, 5105, 5106, 5108, 5109, 5110). NIFoS, National Institute of Forest Science.

버섯의 에르고티오네인 함량

에르고티오네인 생합성 경로는 *Mycobacterium smegmatis*에서 처음으로 밝혀졌으며[17], 균의 종류에 따라 생합성경로는 조금의 차이를 보이기도 한다[18]. 팽이버섯의 에르고티오네인 생합성에는 3가지 효소가 관여하며, FvEgt1은 methyltransferase와 sulfoxide synthase로 히스티딘을 hercynlcysteineiteine sulfoxide (Hersul)으로 축매화하고 FvEgt2와 FvEgt3는 cysteine desulfurase으로 HerSul을 에르고티오네인으로 전환한다[19]. 표고에서는 아직 에르고티오네인을 생합성하는 유전자에 대해서 밝혀지지 않았으며 앞으로 분자 매커니즘에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

본 연구에서 모균주와 교잡균주 자실체의 에르고티오네인 함량은 모균주 밤빛향과 산산향이 kg당 498 mg과 582 mg으로 대부분의 교잡균주 자실체의 에르고티오네인 함량이 낮았지만 NIFoS 5101 균주의 자실체는 kg당 535 mg으로 밤빛향보다 높았으며 NIFoS 5108 균주 자실체의 에르고티오네인 함량은 kg당 700 mg으로 산산향의 kg당 582 mg 보다 약 20% 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). NIFoS 5108 교잡균주에 사용된 단포자 균주는 3404 n-9와 3420 n-3으로 3404 n-9의 경우 교잡균주 11개 중 4개 균주의 모균주로써 다른 균주에 비해 높은 확률로 교배되었다. 단포자 3404 n-9는 우량한 형질을 가진 육성 균주를 만들 확률이 높을 것으로 판단된다.

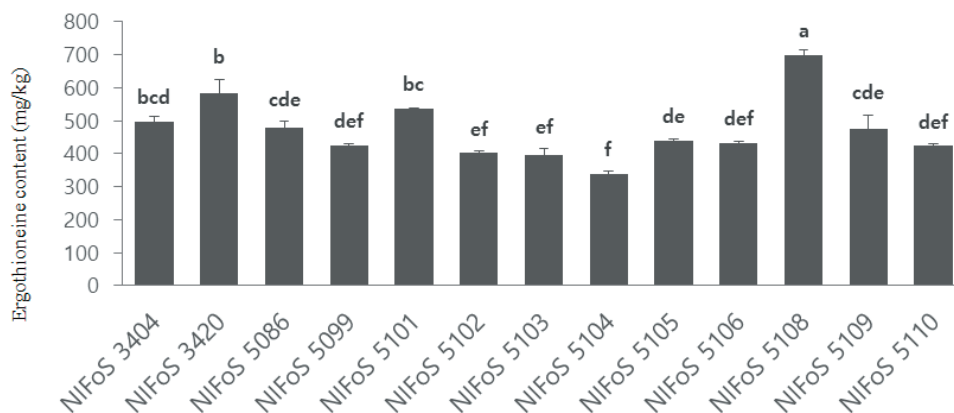


Fig. 2. Ergothioneine contents of fruiting bodies of *Lentinula edodes* on sawdust bag cultivation. Parent strains: NIFoS (3404, 3420); Hybrid strains: NIFoS (5086, 5099, 5101, 5102, 5103, 5104, 5105, 5106, 5108, 5109, 5110). Mean of three independent replicates are shown with error bars (SD). In each strain, means with different letters are significantly different ($p < 0.05$). NIFoS, National Institute of Forest Science.

교배법을 통한 에르고티오네인 함량이 높은 품종 개발은 아위느타리에서 수행되었다. 수량성과 형태형성이 좋은 단포자를 분리하여 Di-Mon 교배법으로 우량계통을 선발하여 3년간 생산력 검정시험을 거쳐 고품질 우량계통을 선발하고 에르고티오네인을 분석하여 수량 및 형태 형성 그리고 에르고티오네인 함량이 높은 균주를 특허 출원하였다[11]. 영지버섯에서는 단포자 교배법을 이용하여 다당류와 트리테르펜 함량이 높은 자실체를 교잡균주에서 확인하였다. 단핵균주간 교잡의 핵 DNA 양상은 많은 계통에서 양친핵이 공존하는 것으로 보고 되어 왔다[20,21]. 또한 이 핵균주 생성에 있어 일부 특성은 단포자 균주의 영향이 높게 반영되며 단포자 균주는 자실체의 발생과 생산량에 영향을 준다는 것이 보고되었다[22]. 또한 이전 연구에서 우량하다고 판단되는 교잡균주에 특정 단포자 균주가 반복적으로 포함된 것으로 볼 때 버섯 품질에 영향을 끼치는 것을 확인할 수 있었다[15]. 본 연구에서 단포자 교배법으로 표고 교잡균주를 얻었고 자실체를 생산하여 에르고티오네인 함량을 측정하였다. 그 결과 NIFoS 5101 교잡균주와 NIFoS 5108 교잡균주 자실체에서 모균주와 비슷하거나 높은 에르고티오네인 함량을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이를 통해 표고의 단포자교배에서도 모균주의 특정 형질이 유전되는 것을 확인할 수 있었다.

표고의 에르고티오네인 함량은 다른 버섯의 에르고티오네인 함량과 비교했을 때 비교적 낮은 수치를 보였다[8,23]. Jang 등[9]은 표고 자실체의 에르고티오네인 함량을 높이기 위하여 네가지의 다른 질소원 질산암모늄, 황산암모늄, 질산나트륨 그리고 히스티딘을 첨가한 배지에서 자실체를 생산하였다. 황산암모늄을 첨가한 배지 자실체의 에르고티오네인 함량은 증가를 나타낸 반면, 에르고티오네인 생합성 과정의 전구물질인 히스티딘을 첨가한 경우 오히려 에르고티오네인의 함량이 감소된 것을 확인하였다.

Ka 등[15]이 단포자 교잡을 통해 얻은 약 1,600개의 교잡계통 중 365개 계통에서 버섯이 발생하였으며 65개의 우량 후보 계통을 선발하였다. 본 연구에서도 총 100개의 교잡균주 조합 중 선발된 균주는 모두 11개이며 순수한 생산량과 자실체 특성을 가지는 균주 1개, 모균주 보다 높은 에르고티오네인을 함량을 가지는 균주 1개로 많은 교배 균주 중 실제로 선발할 수 있는 균주의 비율은 높지 않았다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 단포자와 교잡균주 균사체 단계에서 버섯 발달에 관여하는 유전자 또는 목적 물질을 생산하는 특정 유전자 발현 수준 확인 등의 분자생물학 연구가 병행된다면 보다 능률적으로 기능성 품종 개발 연구를 수행할 수 있을 것이다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Golden Seed Project of ‘Breeding of new strains of shiitake for cultivar protection and substitution of import [213007-05-5-SBH10]’ provided by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ministry of Oceans and Fisheries, Rural Development Administration and Korea Forest Service.

적요

본 연구에서는 단포자 교배를 통해 교잡균주를 만들고 자실체를 발생시켜 형태적 특성과 에르고티오네인 함량을 조사하였다. 자실체의 형태적 특성과 생산량을 함께 고려한다면 교잡 균주 중 NIFoS 5101 균주의 자실체가 순수하게 확인되었다. 자실체 에르고티오네인 함량 조사 결과 모균주 평균이 540 mg/kg이었고 교잡균주 자실체 평균은 459 mg/kg으로 확인되었다. 대부분의 교잡균주 자실체는 모균주보다 낮은 에르고티오네인 함량을 보였지만 NIFoS 5101 균주 자실체는 모균주인 밤빛향보다 높게 측정되었으며 NIFoS 5108 균주 자실체 두 가지 모균주 밤빛향과 산산향보다 20%가량 높은 것을 확인할 수 있었다. 자실체의 형태적 특성과 에르고티오네인 함량 분석 결과를 종합하면 NIFoS 5101 균주가 교잡균주 중 가장 순수한 결과를 나타냈다.

REFERENCES

1. Muszyńska B, Pazdur P, Lazur J, Sulowska-Ziaja K. *Lentinula edodes* (Shiitake)–biological activity. *Int J Med Rev* 2017;27:189-95.
2. Mau JL, Lin HC, Song SF. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res Int* 2002;35:519-26.
3. Hartman PE. Ergothioneine as antioxidant. *Meth Enzymol* 1990;186:310-8.
4. Paul B, Snyder S. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant.

- Cell Death Differ 2010;17:1134-40.
5. Cheah IK, Halliwell B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2012;1822:784-93.
 6. Melville DB, Eich S, Ludwig ML. The biosynthesis of ergothioneine. *J Bio Chem* 1957;224:871-7.
 7. Melville DB, Eich S. The occurrence of ergothioneine in plant material. *J Bio Chem* 1956;218:647-51.
 8. Kalaras MD, Richie JP, Calcagnotto A, Beelman RB. Mushrooms: a rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. *Food Chem* 2017;233:429-33.
 9. Jang Y, Park J, Ryoo R, Park Y, Ka KH. Ergothioneine contents of shiitake (*Lentinula edodes*) fruiting bodies on sawdust media with different nitrogen sources. *Kor J Mycol* 2016;44:100-2.
 10. Kong WS, Yoo YB, Jhune CS, You CH, Cho YH, Park YH, Kim KH. Cultivation and characterization of commercial strain. *J Mushroom* 2007;5:1-6.
 11. Shin PG, Oh MJ, Kim ES, Oh YL, Jang KY, Kong WS. Cultivation of 'ergo', a functional mushroom variety with enhanced ergothioneine content. In: 2016 Summer Conference; 2016 Jun 9-10; Jeonju-si, South Korea. The Korean Society of Mushroom Science; 2016. p. 190.
 12. Liu SR, Ke BR, Zhang WR, Liu XR, Wu XP. Breeding of new *Ganoderma lucidum* strains simultaneously rich in polysaccharides and triterpenes by mating basidiospore-derived monokaryons of two commercial cultivars. *Sci Hort* 2017;216:58-65.
 13. Kim JH, Kang YJ, Baek IS, Shin BE, Choi JI, Lee YS, Lee Y, Jeoung YK, Lee YS, Chi JH. Characteristics of Newly Bred *Lentinula edodes* Cultivar 'Hwadam' for Sawdust Cultivation. *Kor J Mycol* 2020;48:125-33.
 14. Park Y, Jang Y, Ryoo R, Lee B, Ka KH. Breeding and cultural characteristics of newly bred *Lentinula edodes* strain 'Sanjanghyang'. *Kor J Mycol* 2019;47:143-52.
 15. Ka KH, Ryoo R, Jang Y, Park Y, Jeong YS, Kang JJ, Heo G, Jeon SM. Characteristics of fruiting bodies formed upon monohybrid cross of *Lentinula edodes* strains. *Kor J Mycol* 2019;47:173-9.
 16. Chen SY, Ho KJ, Hsieh YJ, Wang LT, Mau JL. Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT* 2012;47:274-8.
 17. Seebeck FP. *In vitro* reconstitution of mycobacterial ergothioneine biosynthesis. *J Am Chem Soc* 2010;132:6632-3.
 18. Yu YH, Pan HY, Guo LQ, Lin JF, Liao HL, Li HY. Successful biosynthesis of natural antioxidant ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae* required only two genes from *Grifola frondosa*. *Microb Cell Factories* 2020;19:1-10.
 19. Yang X, Lin S, Lin J, Wang Y, Lin JF, Guo LQ. The biosynthetic pathway of ergothioneine in culinary-medicinal winter mushroom, *Flammulina velutipes* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms* 2020;22:171-181.
 20. Yoo YB, Kim IY, Kong WS, Jang KY, Oh SJ, Jhune CS. Strain improvement of *Pleurotus ostreatus* using self-fertility monospore isolate. *J Mushroom* 2006;4:48-52.
 21. Kong WS, Yoo YB, Jhune CS, Jang WB, Choi JS, Kim KH. Characterization of a new brown commercial strain. *J Mushroom* 2008;6:115-20.
 22. Ha BS, Kim S, Ro HS. Isolation and characterization of monokaryotic strains of *Lentinula edodes* showing higher fruiting rate and better fruiting body production. *Mycobiology* 2015;43:24-30.
 23. Ito T, Kato M, Tsuchida H, Harada E, Niwa T, Osawa T. Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms. *Food Sci Technol Res* 2011;17:103-10.