

감마방사선 조사에 의한 큰느타리버섯의 돌연변이 유발

김종균^{1,4} · 임선화¹ · 김일중¹ · 이윤혜² · 강희원^{1,3*}

¹한경대학교 바이오·정보기술 전문대학원, ²경기도농업기술원 버섯연구소, ³한경대학교 유전공학연구소, ⁴(주)JK 바이오테크

Mutagenesis of *Pleurotus eryngii* by Gamma Ray Irradiation

Jong-Kun Kim^{1,4}, Seon-Hwa Lim¹, Il-Joong Kim¹, Yun-Hae Lee² and Hee-Wan Kang^{1,3*}

¹Graduate School of Bio. & Information Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

²Mushroom Research Institute, GARES, Gyeonggi Province Gwang-ju 464-870, Korea

³Institute of Genetic engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

⁴JK BioTech Co. Ltd. Gyeonggi, Ansung 456-749, Korea

(Received June 8, 2012. Revised June 20, 2012. Accepted June 25, 2012)

ABSTRACT: Gamma ray irradiation mutagenesis was employed to get variants of *Pleurotus eryngii* with functionally enhanced and improved characteristics. Protoplasts released from *P. eryngii* were treated with gamma ray radiation under 0.25-1.25 KGy. Protoplast sample that showed fatality rate of 80% at the 0.25 KGy was spreaded on YPMGA (yeast, peptone, malt-extract, glucose, agar) and 500 mycelial colonies were randomly selected from the medium. Of them, 100 mutant strains with mycelial morphology and growth rate that differ to control strain were observed on PDA. The cellulase and laccase activity of 67 gamma ray-irradiated *P. eryngii* isolates with morphological variation were investigated. Among these, 5 isolates were higher cellulase. In addition, the genetic variation of the mutant strains was analyzed by PCR fingerprinting.

KEYWORDS: Gamma-ray irradiation, Mutagenesis, *Pleurotus eryngii*

큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)은 주름버섯목, 느타리버섯과에 속하는 백색부후균으로 주로 유럽 남부, 중앙아시아, 북아프리카 및 러시아 남부 등의 아열대 지방의 초원지대에 자생하고 있다(Stamets, 1993). 우리나라에서는 새송이라는 상품명으로 불리며, 자실체의 조직이 치밀하고, 탄수화물 및 필수 아미노산, 무기질 함량이 풍부하며, 지방과 열량이 낮아 건강식품으로서의 가치가 높은 식용버섯이다(Rural resources development institute, 2002). 또한 맛과 향이 좋아 소비가 꾸준히 늘어나고 있으며, 특히 다른 버섯에 비해 수분함량이 낮아 수출 상품으로서의 가치도 매우 높아 농가 소득원으로 주목받고 있다(Kang *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2001). 1995년도에 일본에서 처음 도입되어 재배되기 시작하여 2010년도 전국 생산량이 44,351M/T(Ministry for food, agriculture, forestry and fisheries republic of Korea, 2011)으로 우리나라 버섯생산량의 약 25%를 차지하고 있다. 그러나 현재까지 국내에서 재배되고 있는 큰느타리버섯의 품종은 대부분 해외로부터 도입된 품종이거나 이를 모균주로 육성한 품종이고, 국내에서 육성한 품종의 재배 비중은 매우 낮은 실정이다. 따라서 버섯 재배 농가와 시장에서 요구하는 품종 특성을 가진 다양한 형질을 개발하여 국내 육성 품종

의 재배 비중을 증가시켜 도입품종 사용에 의한 로열티 문제를 해결해야 한다. 그러나 교배 육종이나 선발 육종을 이용한 품종 개발에는 한계가 있기 때문에 그 대안으로 돌연변이 유발 육종이나 형질전환 등이 주목받고 있다. 그러나 형질전환의 경우, 유전자 조작에 의한 GMO 논란이 계속되고 있어 새로운 품종 개발을 위한 육종법으로는 제한적이다. 반면, 방사선 조사에 의한 돌연변이 유발 육종 방법은 적용방법이 비교적 단순하고, 대량의 시료에 적용이 가능하며, 특히 유전체 상에 항생제 내성 유전자와 같은 마커를 남기지 않고, 화학적 또는 자외선 조사 등에 의한 방법에 비해 유전적 변이가 뚜렷하게 나타나는 등 여러 가지 장점이 있다(Jeong and Kim, 2010). 따라서 본 연구에서는 감마방사선 조사를 통하여 큰느타리버섯의 돌연변이를 유발하고, 이들 돌연변이체의 특성을 분석하여 큰느타리버섯의 신품종 개발을 위한 육종 모본 선발에 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

큰느타리버섯균의 원형질체 분리

실험에 사용한 큰느타리버섯 균주인 '큰느타리 2호'는 경기도 농업기술원 버섯연구소에서 분양받아 사용하였다. 원형질체의 대량 나출을 위하여 Kim 등(2010)의 방법을

*Corresponding author <E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr>

사용하였다. 우선 균사의 생장을 빠르게 유도하기 위하여 PDA(Potato Dextrose Agar) plate에 배양된 균총을 코르크보러로 찍어내어 200 ml의 PD broth가 들어있는 삼각 플라스크에 넣고, 100 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 14일 후, 자라난 균사체를 수집하여 호모게나이저(Homogenizer)를 이용하여 10,000 rpm으로 30초 동안 마쇄 하였다. 마쇄된 균사체를 다시 회수하여 24시간동안 배양한 다음 원형질체 분리에 사용하였다. 균사체를 50 ml tube에 나누어 담고 4,000 rpm 으로 10분간 원심분리 하여 회수하였다. 상층액을 버리고 40 ml의 1M MgSO₄를 첨가하여 천천히 섞어주고 4,000 rpm으로 10분간 다시 원심 분리 하였다. 원형질체 나출을 위하여 0.5 M의 MgSO₄ 5 ml에 0.4 g의 Glucanex^R 200G (Novozyme Industry, Denmark)와 Cellulase R-10(Yakult Honsha, Japan) 0.2 g을 첨가하여 완전히 녹이고, 최종농도를 0.5 mg/ml이 되도록 조정하여 준비하였다. 원심분리 후, 상층액을 버리고 준비한 효소를 첨가하여 28°C에서 80 rpm으로 5시간동안 반응시키고, 1시간 간격으로 원형질체 나출을 확인하였다. 그 후, G4 Glass filter로 균사 찌꺼기를 제거한 다음 0.5 M의 sorbitol를 넣어 부피를 맞추고 4,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 다시 새 튜브에 상층액을 회수하고 1M의 sorbitol을 이용하여 4,000 rpm으로 2회 세척하고, 나출된 원형질체를 회수하여 실험에 사용하였다.

감마 방사선을 이용한 큰느타리버섯균의 돌연변이 유발

한국원자력연구소(전북 정읍)의 고준위 감마선 조사장치를 이용하여 감마 방사선을 조사하였다. 큰느타리버섯의 균사체로부터 분리한 원형질체 1.5×10^7 cell/ml를 1.5 ml tube에 넣고 0.25 K Gy에서 1.25 K Gy까지 0.25 K Gy의 간격으로 각기 다른 감마 방사선량을 처리하였고, 대조구는 0.0 K Gy로 처리하였다. 1시간 동안 방사선을 조사한 후, 0.6 M의 sorbitol이 첨가된 YPMGA 배지에 overlay하여 25°C에서 7일간 배양하였다. 배양 후, 재생된 균사체 colony를 조사하여 대조구의 재생률과 비교하였다.

방사선 조사 변이 균사체의 형태적 특성 조사

감마 방사선을 조사하여 재생된 변이체를 선발하여 배양하고, 형태적 특성을 조사하였다. 방사선 조사 후, 재생된 colony로부터 균총을 떼어 YPMGA (yeast, peptone, malt-extract, glucose, agar)배지에 배양하였다. 여기서 500개를 무작위로 선발하여 single colony를 분리하고, PDA 배지에 옮겨 28°C에서 7일간 배양한 후, 균총의 모양을 관찰하였고, 균사 생육속도를 조사하기 위하여 배양 후 5, 7, 9, 11일에 균사 생장률을 조사하였다.

방사선 조사 변이체의 자실체 형성 및 형태적 특성 조사

균사의 생육속도가 빠르고, 형태적으로 변이가 없는 균

주 100개를 선발하여 자실체를 형성시키고, 형태적 특성을 조사하였다. 선발된 균주의 자실체 형성을 위하여 각각의 균주를 PDA 배지에 배양한 후, agar block을 떼어 미송톱밥, 콘코브, 밀기울, 미강, 대두피(50:25:15:10:1)를 혼합한 배지에 접종하였다. 배양실의 온도를 24°C, 습도를 70%로 유지하면서 30일간 배양하고 균 굵기를 실시하여 발이를 유도하고, 노화균을 제거하였다. 다시 17°C의 온도에서 90% 이상의 습도 조건으로 18일간 배양하여 자실체를 형성시켰다. 이를 수확하여 대의 길이와 형태, 무게(g/병) 등 자실체의 형태적 특성을 조사하였고, 대조구로는 큰느타리 2호를 사용하였다.

방사선 조사 변이 균사체의 효소활성 검정

자실체를 형성시킨 변이체 중에서 대의 길이가 길고, 수확량이 증가되거나 대조구와 큰 차이가 없는 변이체 67개를 선발하여 cellulase와 laccase 효소 활성을 검정하였다. Cellulase 활성조사는 Miller(1959)의 방법을 변형하여, DNS(Dinitrosalicylic acid) 환원당 측정으로 조사하였다. 선발된 변이체를 PDA 배지에 배양하고, 자라난 균사체를 코르크 보러로 5개씩 절단하여 0.1% CMC(carboxymethyl cellulose)가 첨가된 20 ml의 PD broth가 들어있는 삼각 플라스크에 접종하여 7일간 진탕 배양하였다. 1%의 CMC가 들어있는 acetate buffer(pH 5.0)에 배양액 60 µl를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 DNS 용액(DNS 1%, phenol 0.2%, sodium sulfate 0.05%) 500 µl를 첨가하여 90°C에서 15분간 반응시킨 다음 550 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. Laccase 활성은 Buswell 등(1995)이 제시한 방법으로 37°C에서 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ABTS를 산화하는 방법으로 조사하였다. 균사체 배양액 600 µl를 0.1 M의 sodium acetate buffer (pH 5.0) 300 µl과 100 µl의 ABTS를 포함하는 반응용액에 첨가하여 실온에서 30분 반응하고, spectrophotometer로 420 µnm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Genomic DNA 분리 및 PCR 핵산지문 분석

감마 방사선 조사 큰느타리버섯 균주 중에서 형태적 특성과 생육이 양호하고, 효소 활성에 특징을 보인 25개 균주를 최종 선발하여 genomic DNA를 분리하고, PCR 핵산지문 분석을 수행하였다. Genomic DNA를 분리하기 위하여 14일간 PDA에서 배양한 균총을 직경 5 mm로 잘라 20 ml의 PD broth배지에 옮긴 후 14일간 진탕배양하고, 균사체를 걸러내어 동결건조 하였다. 동결 건조한 균사체를 이쑤시개로 곱게 마쇄한 다음 추출용 완충액(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) 400 µl와 1 µl의 Proteinase K(20 mg/ml)를 첨가하여 잘 섞어주었다. 이 혼합액에 2× CTAB buffer를 400 µl 첨가하여 65°C에서 30분간 방치하고,

chloroform:isoamylalcohol(24:1)을 넣고 혼합한 후 12,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 DNA를 침전하였다. 70% ethanol로 DNA를 세척하고, 진공 건조한 후 TE buffer에 용해하였다.

UFPF primer는 Universal Fungal PCR Fingerprinting 핵산지문 Kit(JK BioTech.)를 구입하여 제공된 protocol에 준하여 수행하였다. UFPF-primer를 이용한 기본적인 PCR반응 조건은 100 ng의 DNA 5 µl에 10 × PCR buffer (10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin) 5 µl와 UFP-primer(20 pmol) 1 µl, 2.5 mM dNTP 4 µl, HQ Taq polymerase(JK BioTech.) 0.5 µl를 넣어 PCR 반응액을 만들었다. PCR fingerprinting primer는 JK BioTech.에서 구입한 2종류의 primer (UFPF2, UFPF4)를 사용하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA는 1.5%의 agarose gel 상에서 50 V 전압으로 1시간 30분 동안 전기영동 한 뒤 ethidium bromide에 염색하여 UV lamp하에서 PCR 다형성을 분석하였다.

결과 및 고찰

원형질체를 이용한 방사선 돌연변이체 유발조건 확립

큰느타리버섯 원형질체에 각기 다른 선량의 감마방사선을 처리하고 균사체 재생률을 조사한 결과, 0.25 KGy에서 약 80% 이상의 치사율을 나타내었고, 0.5 KGy에서는

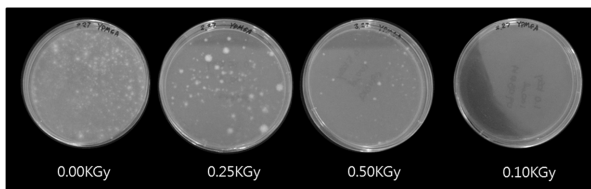


Fig. 1. Regeneration on YPMGA medium of gamma-ray irradiated protoplasts with different intensity.

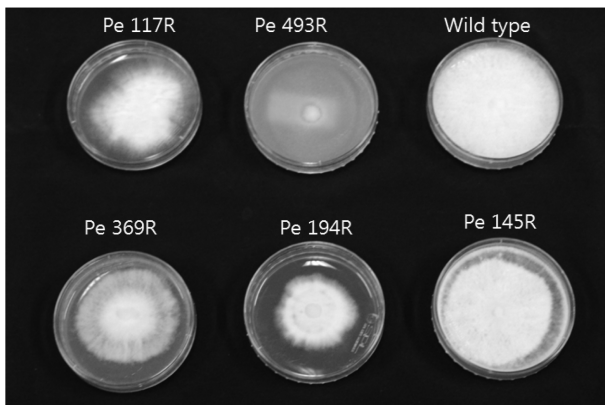


Fig. 2. Cultural characteristics of gamma-ray irradiated *P. eryngii* isolates on PDA medium.

치사율이 급격히 증가하여 95% 이상의 치사율을 보였으며, 0.75 KGy 이상 처리 구에서는 균사체 colony가 재생되지 않았다(Fig. 1). 이상의 결과로 볼 때 큰느타리버섯의 원형질체를 이용한 방사선 유기는 0.25 KGy 선량에서 유효한 변이체를 얻을 수 있는 것으로 생각된다. 반면 느티만가닥버섯의 원형질체의 방사선 유기는 1.0~1.2 KGy 선량에서 유효한 변이체를 얻은 것으로 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 2011). 따라서 방사선을 이용한 돌연변이 유발을 위해서는 버섯의 종에 따라 최적 조건이 다른 것으로 판단되며, 다양한 버섯을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

방사선 조사 변이 균사체의 형태적 특성 및 균사 생장율

감마 방사선을 조사한 변이체를 무작위로 500개 선발하여 PDA 배지에 배양하여 형태적 특성을 조사한 결과, 대체적으로 대조균주와 유사한 균사 생장능을 보였다(Fig. 2). Pe117R, Pe369R, Pe194R 변이체는 생장이 매우 느리고, 기중균사가 매우 적은 형태로 나타났으며 Pe145R 변이체는 균총의 가장자리에 결이 생기는 특이한 형태가 관찰되었다. 그러나 90% 이상의 변이체가 대조균주와 형태적, 배양적 특성이 유사한 것으로 나타났다. 또한 배양 5~11일까지의 균사생장율을 조사한 결과, 약 30%의 변이체에서 대조균주보다 10% 이상 빠르게 성장하는 것이 관찰되었고, 일부 변이체의 경우 균사생장이 20~30%까지 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이 중 균사 생육속도가 빠르고, 형태적으로 변이가 없는 균주 100개를 선발하여 자실체를 형성시켰다.

방사선 조사 변이체의 자실체 형성 및 형태적 특성

감마 방사선을 조사한 변이체 중에서 대조구에 비해 균사 생육속도가 빠르고, 균총의 형태에 변이가 없는 균주를 100개 선발하여 자실체를 형성시켰다. 이들 자실체를 수확하여 형태, 대의 길이 및 직경, 무게 등을 조사하였다(Fig. 4). 대조구인 '큰느타리 2호'의 자실체와 비교한 결과, 약 40개의 변이체에서 대의 길이와 무게가 대조구

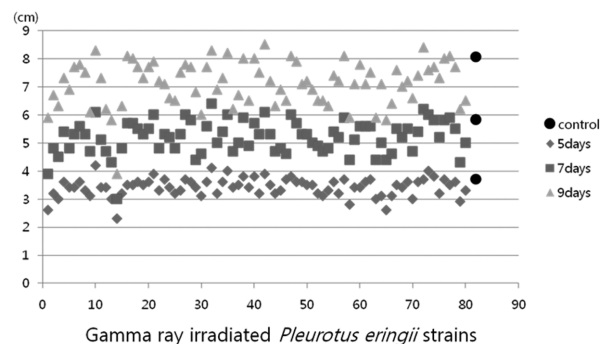


Fig. 3. Growth rate of gamma-ray irradiated *P. eryngii* isolates.

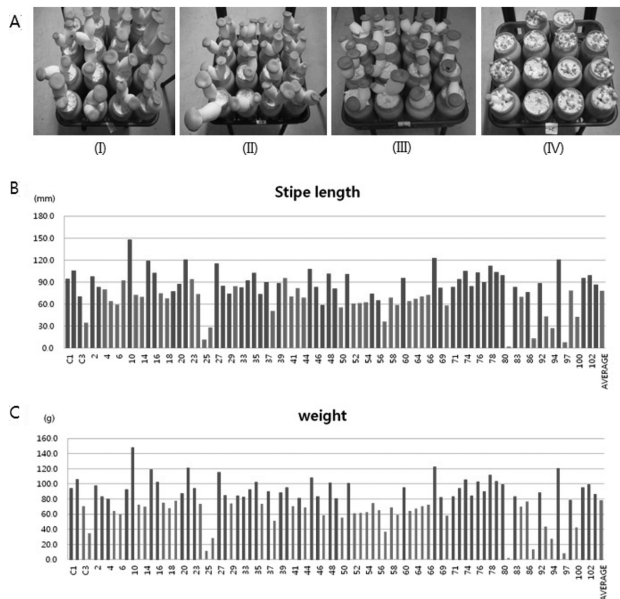


Fig. 4. Morphological characteristics of fruiting bodies of gamma ray-irradiated *P. eryngii* on sawdust cultivation. (A), morphological characteristics of fruiting bodies; (I), *P. eryngii* wild-type (Keunneutari No. 2); (II), similar-growth; (III), rapid-growth; (IV), late-growth. (B) and (C), stipe length and weight of fruiting bodies of gamma ray-irradiated *P. eryngii* isolates, respectively.

에 비해 증가된 것으로 나타났다(Fig. 4B와 4C). 그러나 형태적으로는 대조구와 크게 차이하지 않았다. 느티만가닥버섯을 대상으로 감마 방사선을 조사하여 돌연변이를 유발시킨 이전의 연구에서는 갓과 대의 색깔과 형태, 길이, 무게 등에 따라 6개의 그룹으로 나뉘어 형태적으로 매우 다양하게 나타난 바 있다(Kim *et al.*, 2011). 이는 버섯 종류에 따른 차이로 생각되며, 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 한편, 대조구에 비해 형질이 우수한 변이체에 대해서는 유용성분 분석이나 유전적 특성 분석 등을 통해 우량 품종 육종을 위한 모본으로 사용 가능한 균주로 선발할 수 있을 것으로 생각된다.

방사선 조사 변이 균사체의 효소활성 검정

일반적으로 큰느타리버섯, 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*), 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)과 같은 백색부후균은 목질계 섬유소를 분해할 수 있는 고효율의 다양한 효소를 분비하는 것으로 알려져 있다(Revankar and Lele, 2006; Husaini *et al.*, 2011). 본 연구에서는 체계적인 효소 탐색을 위하여 감마 방사선 조사 변이체 중 자실체를 형성시킨 100개 균주 중 67개 균주를 무작위로 선발하여 3반복으로 cellulase와 laccase의 효소 활성을 조사하였다(Fig. 5). Cellulase 활성능의 경우, 변이체 균주에 따라 약간의 차이는 있었으나 대체적으로 유사한 효소 활성을 보였으며, laccase의 경우도 균주 간 특이할 만한 활성 증가를 보이

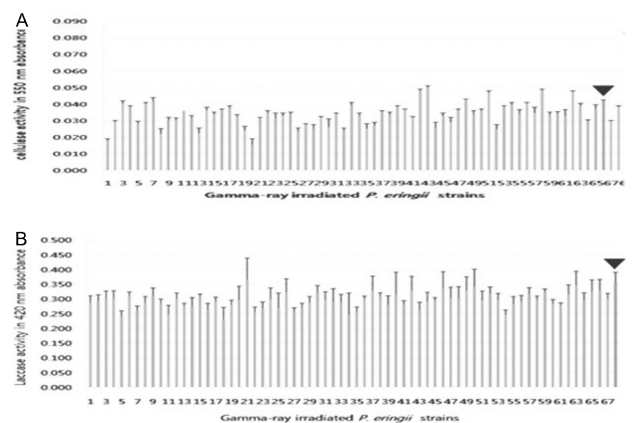


Fig. 5. The cellulase (A) and laccase (B) activity of gamma ray-irradiated *P. eryngii* isolates. Black arrowheads indicate the cellulase(A) and laccase(B) activity of *P. eryngii* wild type(Keunneutari No. 2).

지는 않았다. 그러나 일부 균주에서는 비교적 높은 활성을 보인 것으로 조사되어 다수의 균주 분석에 의해 cellulase 및 laccase 활성이 높은 균주를 분리할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 cellulase 활성이 높은 균주는 생장이 빠르고, 자실체의 무게가 증가된 것으로 나타나 생산량 증가를 위해 이용 가능할 것으로 생각된다. Lee 등 (2002)은 방사선을 조사한 일반 느타리버섯(*P. ostreatus*)으로부터 laccase 활성이 증가한 균주를 분리하여 유전자 분석을 실시한 바 있으나 본 연구에서는 laccase 활성에 큰 차이는 없었다.

PCR 핵산 지문 분석에 의한 방사선 조사 큰느타리버섯 균주의 유전적 변이 검출

감마 방사선을 조사한 큰느타리버섯 균주를 대상으로 UFPF2 primer와 UFPF4 primer(JK BIO TECH)로 PCR 핵산 지문 분석을 실시한 결과, 7번과 17번 균주에서 PCR 다형성을 나타내었다(Fig. 6). 특히 본 연구에 사용한 UFP primer는 큰느타리버섯의 변이체 선발에 매우 유용하게 이용될 수 있는 것으로 사료 된다. 7번과 17번의 균사체는 형태적으로 별다른 차이를 보이지 않았으나 DNA 수준에서 변이가 발생하였음을 알 수 있다. 이는 형태적 특성을 결정짓는 색깔, 균사체 형태, 균사 생장율에 관여하는 유전자에는 영향을 주지 않았음을 의미한다. 감마방사선을 조사한 느티만가닥버섯 변이체의 PCR 핵산 지문 분석에서 대조구와 다형성에는 차이가 없었으나 자실체의 크기와 색깔 등이 우수한 균주가 선발되었으며, 이것은 유전적으로 큰 차이는 없으나 표현형적으로 차이가 나타날 수 있기 때문이라고 하였다(Kim *et al.*, 2011). 또한 감마방사선을 조사한 느타리버섯 균사체에서 유발된 돌연변이체에서 세포외효소 활성이 대조구에 비해 높은 균주를 분리하였으나, 자실체 형성과 생장률에는 대조구와 차이가 없는 것으로 보고된 바 있다(Lee *et al.*, 2000). 본 연

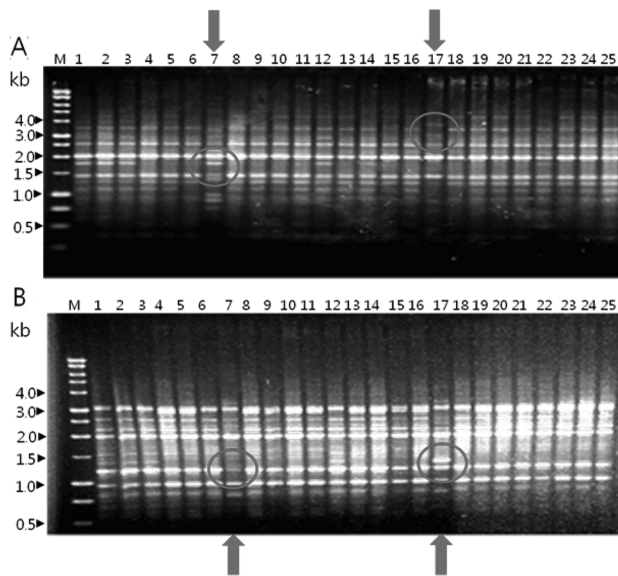


Fig. 6. UFPF-PCR profile of gamma ray-irradiated *P. eryngii*. (A), UFPF-2 primer; (B), UFPF-4 primer. M: 1kb marker, lane 1: *P. eryngii* wild type (Keunneutari No. 2), and lane 2-25: gamma ray-irradiated mutants.

구에서는 대조구에 비해 cellulase 효소 활성이 높고, 대의 길이가 길며 생산량이 증가된 변이체가 선발되었다. 이러한 변이체는 향후 우량품종 육성을 위한 육종 모본으로서의 이용가능성이 있으며, 다양한 효소 활성과 유전자 분석 등 이에 대한 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적요

본 연구는 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)에 감마 방사선을 조사하여 형태적, 생리적 특성이 향상된 새로운 큰느타리버섯 품종을 개발하기 위하여 수행되었다. 큰느타리버섯에서 분리한 원형질체에 0.25-1.25 KGy의 감마 방사선을 조사하였다. 원형질체는 YPMGA 배지에서 80%의 치사율을 나타냈고 이들 중 무작위로 500개의 변이체를 선발하여 PDA 배지에 배양하였다. 그 결과, 대부분의 변이체가 대조구와 비슷한 형태와 생장률을 나타냈으며, 이 중 100개의 변이체가 대조구와 약간의 차이를 보였다. 67개 변이체에 대해 cellulase 활성과 laccase 활성을 조사하였다. 그 결과, 대체적으로 대조구와 유사한 효소 활성을 나타내었고, 5개의 변이체가 대조구에 비해 더 높은 cellulase 활성을 나타내었다. 또한 감마 방사선 조사 변이체의 유전적 변이를 조사하기 위하여 UFPF-PCR을 이용하여 다형성을 조사하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 특화작목 연구개발과제 (PJ007834200902)와 농림수산식품기술기획평가원 생명산업기술개발사업(111163031SB010)에 의하여 이루어진 결과의 일부분이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Buswell, J. A., Cai, Y. and Chang, S. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Lett.* 128: 81-88.
- Cho, S. H., Lee, S. D., Ryu, J. S., Kim, N. G. and Lee, D. S. 2001. Changes in quality of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) during modified atmosphere storage. *Korean J. Post-harvest Sci. Technol.* 8: 367-373. (in Korean).
- Husaini, A., Fisol, F. A., Yun, L. C., Hussain, M. H., Muid, S. and Roslan, H. A. 2011. Lignocellulolytic enzymes produced by tropical white rot fungi during biopulping of *Acacia mangium* wood chips. *J. Biochem. Tech.* 3: 245-250.
- Jeong, H. and Kim, K. R. 2010. Strain improvement based on ion beam-induced mutagenesis. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38(3): 235-243. (in Korean).
- Kang, M. S., Kang, T. S., Kang, A. S., Shon, H. R. and Sung, J. M. 2000. Studies on mycelial growth and artificial cultivation of *Pleurotus eryngii*. *Korean J. Mycol.* 28: 73-80. (in Korean).
- Kim, J. K., Kim, J. H., Kong, W. S. and Kang, H. W. 2010. Selection of high efficient enzyme for protoplasts isolation from mushrooms. *Kor. J. Mycol.* 38(1): 21-24. (in Korean).
- Kim, J. K., Moon, D. H., Seo, G. S. and Kang, H. W. 2011. Mutagenesis of *Hypsizygus marmoreus* by gamma ray irradiation. *Kor. J. Mycol.* 39(3): 231-234. (in Korean).
- Lee, Y.-K., Chang, H.-H., Kim, J.-S., Jang, Y. S. and Lee, H. Y. 2002. Gamma radiation induced mutational spectrum of laccase gene in *Pleurotus ostreatus*. *Korean J. Environ. Biol.* 20(4): 316-324.
- Lee, Y.-K., Chang, H.-H., Kim, J.-S., Kim, J. K. and Lee, K.-S. 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. *Radiation Physics and Chemistry* 57(2): 145-150.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Ministry for food, agriculture, forestry and fisheries republic of Korea. 2011. The actual output of special crop. pp. 10.
- Revankar, M. and Lele, S. S. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochemistry*. 41: 581-588.
- Rural Resources Development Institute. 2002. Food composition table. pp. 154. (in Korean).
- Stamets, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. Hong Kong. pp.304-308.