

느타리(*Pleurotus ostreatus*)에서 방사선유기 변이주의 RAPD 양상

이영근·장화형·김원록·김진규·김재성
한국원자력연구소

RAPD Pattern of Radiation Induced Variants of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*)

Young-Keun Lee, Hwa-Hyoung Chang, Won-Rok Kim, Jin-Kyu Kim, Jae-Sung Kim (Korea Atomic Energy Research Institute, Yusung, P.O.Box 105, Taejon 305-600, Korea)

Abstract : To induce the cellulolytic variants of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), basidiospores were irradiated at the dose of 1kGy~20kGy of gamma-ray. After irradiation, activities of extracellular enzymes were determined by the method of MUF residue and genetic similarity was observed by RAPD analysis of variants. Three variants of 2KG-1, 2KG-2 and 20KG-1 were clarified as highly cellulolytic isolates. It seemed that the difference of genetic similarity among variants have derived from gamma-ray radiation. It is suggested that 3 cellulolytic variants induced by gamma-ray in this experiment could play a useful role to reuse cellulosic bioresources.

Key words : Basidiospore, Cellulolytic enzymes, Gamma-ray, *Pleurotus ostreatus*, RAPD Parttern

서 론

많은 양의 섬유소성 생물자원이 전세계적으로 산적해 있고 그 생산량이 증가하고 있으나, 이들의 대부분은 재사용 또는 유효이용이 잘 되지 못하고 있을 뿐만 아니라 심각한 환경오염을 초래하고 있는 실정이다¹⁾. 섬유소성 생물자원은 90% 이상이 cellulose, hemicellulose와 lignin으로 구성되어 있어서 산업적으로 유용한 화학물질의 원료가 될 수 있기 때문에 지난 20여년간 물리적²⁾, 화학적³⁾, 생물학적⁴⁾ 분해에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 이중 생물학적인 방법은 경제성, 재오염 유발성 등의 측면에서 다른 방법보다 양호하게 여겨져서 분해능이 우수한 세균류⁵⁾, 균류⁶⁾의 개발이 현재까지도 활발히 진행되고 있다. 특히, 자연상태에서 섬유소 분해성을 갖고 있는 식용버섯류에 대한 균주 개량에 많은 관심이 집중되고 있다^{7,8)}.

버섯류의 유전육종에는 균사체간의 교배 또는 원형질체(protoplast)의 융합⁹⁾, 외부유전자의 도입⁹⁾ 등의 방법이 사용되고 있으며, 최근에는 담자포자(basidiospore)에 대한 DNA 다형성을 확인하고^{10,11)}, UV 조사로 영양요구주를 선별하는^{12,13)} 등 그 유용성이 알려져, 담자포자를 이용해 다양한 표현형을 지닌 균주의 개량을 위한 노력이 되어지고 있으나 이온화방사선을 이용한 유용균주의 유기에 관한 연구

는 미진한 상태이다. 일반적으로 방사선은 물리적인 힘으로써 생물체내에서 이온화 반응을 유발하며 간접적으로는 세포내 소기관의 기능을 변화시키고, 직접적으로는 염색체 및 세포내 유전물질인 DNA를 물리적으로 절단하는 등¹⁴⁾ 돌연변이 유기의 유용한 방법으로 널리 알려져 있다.

변이주의 확인을 위한 섬유소 분해효소에 대하여 정성적^{15,16)}, 정량적^{17,18)} 방법이 개발되어 사용되고 있으나, 근래에 MUF(4-methylumbelliferyl) 반응기를 이용하여 spectrofluorometer로 쉽고 정밀하게 측정하는 방법이 개발되었다¹⁹⁾. MUF 방법은 균류에서 cellulase나 chitinase 등의 활성도 조사에 널리 이용되고 있어^{20,21)} 본 실험에서 적합할 것으로 생각된다. 변이주의 유전적 특징의 비교 연구는 일반적으로 genomic DNA를 대상으로 RFLP(restriction fragment length polymorphism)나 ITS(rDNA intergenic sequence) 조사에 의해 이루어졌으나 최근에는 비교적 실행이 간단하고 변별력이 뛰어난 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 방법이 개발되어 수행되고 있다. RAPD 양상을 조사함으로써 변이주간 유전적 다양성을 비교할 수 있어서²²⁾ 방사선유기 변이주의 유전적 이질성분석이 가능할 것으로 여겨진다.

본 실험은 식용으로 널리 애용되며 자연상태에서 섬유소 분해능을 보유하고 있는 느타리(*Pleurotus ostreatus*)의 담

Table 1. List of the substrates with 4-methylumbelliferyl for extracellular enzymes

Enzymes	Substrates
β -Glucosidase	4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside
Amylase	4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside
Exo-chitinase	4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide
Endo-chitinase	4-methylumbelliferyl-N,N'-diacetyl chitobioside
Exo-cellulase	4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside
Endo-cellulase	4-methylumbelliferyl- β -D-celotrioside

자포자에 이온화방사선을 조사하여 섬유소 분해능이 탁월한 변이주를 선발하고, 유전적 특징을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

상지대학교 생물학과 이 호용 교수가 채집, 분류한 느타리(*P. ostreatus*)를 사용하였다.

1개의 자실체로부터 담자포자를 수확하여 실험을 수행하였다. 균주의 배양에 사용된 배지는 Difco 제품을 사용하였고, MUF 반응기, DNA 추출 및 RAPD 관련 시약은 Sigma Chemical Co.의 GR등급을 사용하였다.

방사선 조사

담자포자를 citrate-phosphate(pH 6.1) 완충용액에 1x 10⁹/ml이 되도록 희석하여 1, 1.5, 2, 4, 10, 15, 20kGy의 조사선량으로 감마선(Co-60, 약 60,000Ci 용량, Atomic Energy of Canada, Ltd.)을 조사하였다. Fricke dosimetry로 측정된 조사선량은 300Gy/hr였다²³⁾.

세포외분비효소활성도 조사

방사선조사 후 45종의 균주를 선택하여 각기 100ml의 potato dextrose broth(PDB) 배양액에 30°C에서 10일간 배양하였다. 원심분리(1,000 x g)한 후 상등액내 분비효소의 활성은 MUF 반응기(Table 1)와의 반응성을 이용하여 조사하였다²⁰⁾. 단백질량은 spectrophotometer를 사용해서 280nm에서 흡광도로부터 정량하였다. 반응기질은 각각 5mM되게 methylcellosolve에 녹여 -20°C에 보관하여 이용하였다. 효소활성도를 보기위하여, 1ml의 각 시료에 25 μ M의 반응기질을 첨가하여 20°C의 암소에서 3시간 동안 반응시킨 후 나타나는 형광을 spectrofluorometer(Edinburgh FS-900CD)를 이용하여 측정하였다(excitation : 365nm, photomultiplier tube voltage : low, sensitivity : x100).

RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석

MUF 방법에 의해 선발된 변이주를 각기 100ml의 PDB

Table 2. List of the primers used in RAPD reaction

Primer	Source	G-C contents (%)	Sequences
#1	OPA-09	70	GGGTAACGCC
#2	OPA-12	60	TCGGCGATAG
#3	OPA-05	60	AGGGGTCTTG
#4	OPA-01	70	CAGGCCCTTC
#5	OPA-03	60	AGTCAGCCAC
#6	OPA-19	60	CAAACGTCGG
#7	OPF-01	60	ACGGATCCTG
#8	OPF-02	60	GAGGATCCCT
#9	OPF-03	60	CCTGATCACC
#10	OPF-05	60	CCGAATTCCC
#11	OPF-06	60	GGGAATTCGG
#12	OPF-07	60	CCGATATCCC
#13	OPF-08	60	GGGATATCGG
#14	OPF-09	60	CCAAGCTTCC

배양액에 30°C에서 10일간 배양하였다. 원심분리하여 얻은 균사체를 액체질소로 얼려서 마쇄하였다. 마쇄한 균사체 1g당 10ml의 비율로 DNA 추출용액(50mM Tris, pH 8.0, 50mM EDTA, 0.7M NaCl, 0.1% β -mercaptoethanol, 1% cetyltrimethylammonium bromide) 섞어 60°C에서 30분간 처리하였다. 이후 Graham의 방법²⁴⁾에 따라 DNA를 추출하였고 TE(pH 8.0)에 DNA 농도가 2 μ g/ μ l 되도록 녹여서 4°C에 보관하여 사용하였다. PCR 반응용액은 바이오니어사(한국)의 preMix kit에 5pmol의 random primer(Operon Tech., Inc., USA) (Table 2), 10ng의 genomic DNA 그리고 50 μ l의 증류수를 첨가하여 만들었다. PCR 반응은 Gene Amp PCR System 2400(Perkin Elmer)를 사용하여 94°C에서 5분간 DNA를 변성(denaturation)한 후, 증폭반응은 94°C에서 1분간 변성, 38°C에서 30초간 부착(annealing), 72°C에서 2분간 중합(polymerization)을 55회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 중합반응을 하였다. 증폭된 DNA band는 1% agarose gel에서 10V/cm로 전기영동하여 확인하였다. RAPD 양상을 분석하기 위해 증폭된 모든 DNA band에 일련번호를 붙이고 이로부터 Phylogeny Inference Package(PHYLIP) version 2.5를 사용하여 균주간 유전 유사도상수와 근연관계도를 구하였다.

결 과

방사선유기 변이주 선발

방사선조사 후 45종의 변이주를 대상으로 세포외분비효소의 활성도를 MUF-반응기 방법으로 조사한 결과 특이한 효소활성의 차이를 보인 균주의 수치를 Table 3에 정리하였다. 대조군에 대한 이 균주들의 효소활성도를 비교한 결과, 2KG-1는 대조군과 비교하여 β -glucosidase 활성도가 1.8배, endo-chitinase의 활성도가 2.3배 높았다. 2KG-2는

Table 3. Extracellular enzyme activity in the conditioning media of four isolates from the basidiospores of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray

Strain	Extracellular enzyme activity (cps/100 μ g protein)					
	Exo-cellulase	Endo-cellulase	β -Glucosidase	Amylase	Exo-chitinase	Endo-chitinase
Control	129	94	302	104	1321	439
2KG-1	68	43	554	52	455	1004
2KG-2	238	166	1184	210	7527	2195
20KG-1	150	207	260	168	1187	197

cps: counting per second

Table 4. Genetic similarity coefficient matrix among four isolates from the basidiospores of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray based on RAPD markers

Isolates	Control	2KG-1	2KG-2	20KG-1
Control	1.000000			
2KG-1	0.504587	1.000000		
2KG-2	0.518349	0.568807	1.000000	
20KG-1	0.495416	0.555046	0.490826	1.000000

모든 조사된 효소들의 활성도가 2배 이상이었으며 특히, β -glucosidase, exo-chitinase 및 endo-chitinase의 활성도가 대조군에 비해 각각 3.9배, 5.7배 및 5.0배로 높게 나타났다. 20KG-1은 cellulase의 활성도가 1.5배정도였고 그외는 차이가 없거나 낮았다.

변이주간 유전유사도

14 종류의 random primer로 실시한 RAPD 분석결과 모두 218개의 RAPD band를 조사할 수 있었다(Fig. 1). Primer 모두 독특한 DNA 다형성을 나타내었고 0.2-10Kb에 이르는 다양한 크기의 band를 보였으며 하나의 band만 보이는 primer(#8)와 특정균주에서 band를 나타내지 않는 primer(#8과 #13)도 있었다.

RAPD 양상에 의해 분석된 균주간 유전유사도 상수를 Table 4에 나타냈다. 대조군에 비해 변이주는 뚜렷한 차이를 보여 50%~52%의 범위에 속했으며 변이주간에는 49%~57%의 유사도를 보였다. 유전유사도상수를 기초로하여 얻은 근연관계도(Fig. 2)를 보면 대조군과 2KG-2, 2KG-1과 20KG가 각각 유사군을 형성하였다.

고 찰

세포외효소활성도를 측정하기 위해 기존의 방법들에 비해 정성적, 정량적으로 정밀한 측정이 가능하다는 MUF 반응기 방법¹⁹⁾을 이용한 결과 방사선유기 변이주일 것으로 생각되는 2KG-1, 2KG-2와 20KG-1의 변이주를 선발하였



Fig. 1-a. RAPD fingerprints of four isolates from the basidiospore of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray using fourteen different primers. M : 1kb marker, 1 : Control, 2 : 2KG-1, 3 : 2KG-2, 4 : 20KG-1, #1-#6 : primers (details as for Table 2).

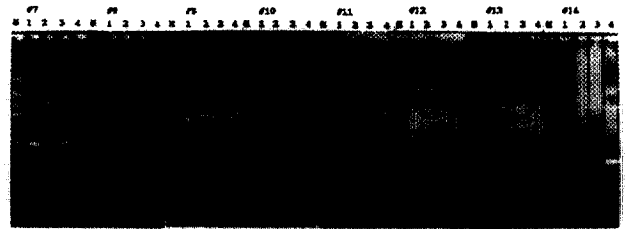


Fig. 1-b. RAPD fingerprints of four isolates from the basidiospore of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray using fourteen different primers. M : 1kb marker, 1 : Control, 2 : 2KG-1, 3 : 2KG-2, 4 : 20KG-1, #7-#14 : primers (details as for Table 2).

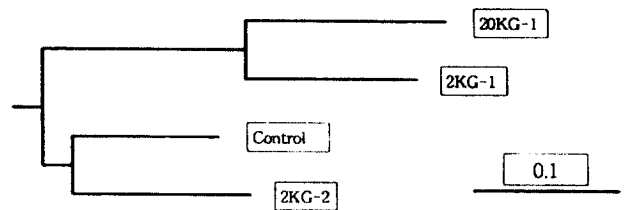


Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity of four isolates from the basidiospores of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray.

다. 선발된 3종의 변이주는 특정 효소의 활성도가 높거나 (2KG-1과 20KG-1) 검색한 모든 효소의 활성도가 높은 (2KG-2)것으로 나타나 섬유소성 생물자원의 분해에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 2KG-2 변이주의 경우 분석한 각각의 효소활성도가 대조군에 비해 2배 이상이었으며, β -glucosidase, exo-chitinase 및 endo-chitinase의 활성도가 대조군에 비해 각각 3.9배, 5.7배 및 5.0배로 매우 높게 나타나 이 균주의 각종 유전자 발현 및 그 응용에 대한 연구가 기대된다.

Boominathan 등²⁰⁾이 이온화방사선을 조사하여 획득한 *P. chrysosporium* 변이주에서 배양조건에 따라 lignin

peroxidase 동위효소(isozyme) 수가 변화된다고 하기도 하였는데 2KG-1, 2KG-2와 20KG-1 균주에서 특징적인 여러 동위효소에 대한 연구도 더 필요하다고 생각된다.

돌연변이 유기가 되지않은 자연상태의 *P. ostreatus* 담자포자간 유전유사도를 분석한 송 등¹¹⁾의 결과를 보면 평균 73%~85%였으나 본 연구에서는 대조군에 대한 유전유사도가 50%~52%였고 3종의 변이종간에 49%~57%의 낮은 유전유사도를 보여 방사선유기 변이주에서 유전적 이질성이 증가되었음을 시사한다. 특히, 20kGy의 선량에 의해 유기된 20KG-1의 경우 근연관계도(Fig. 2)에서 보듯이 가장 큰 유전적 이질성을 보여 방사선조사가 유전자 변화와 효소활성도 변화에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 특히, 변이주의 RAPD 양상 조사결과 유전표시인자(genetic marker)로 유용할 것으로 기대되는 고유한 band를 얻을 수 있어 변이주의 유전자지도 작성 등 보다 정밀한 유전적 특성연구에 활용될 수 있을 것이다.

본 연구결과 방사선조사에 의해 유기된 3종의 변이주에 대한 세포외효소활성도와 RAPD 양상의 조사 결과는 효소활성도의 차이가 유전적인 변화에 기인하는 유전유사도의 차이와 밀접한 상관성이 있는 것임을 보였으며, 분해효소에 대한 특정 유전자와 이의 발현에 관련된 유전자 변화를 변이주에서 확인한다면 섬유소성 생물폐자원의 재활용에 관련한 유전육종연구에 더욱 진전이 있으리라 기대된다.

적 요

이온화방사선을 이용하여 느타리(*Pleurotus ostreatus*)의 담자포자(basidiospore)로부터 섬유소 분해능이 뛰어난 변이주를 유도하고자 본 실험을 수행하였다. 담자포자를 감마선조사 후 MUF(4-methylumbelliferyl) 반응기를 이용하여 세포외분비효소의 활성도를 측정하였다.

방사선유기 변이주에서 RAPD(random amplified polymorphic DNA)의 양상을 조사하여 유전유사도를 분석하였다. 검색한 45종의 균주들은 MUF의 기질에 따라 다양한 기질분해도를 보였으며, 이 중에서 섬유소 분해능이 뛰어난 3개의 변이주 2KG-1, 2KG-2와 20KG-1를 선발하였다. RAPD 양상을 통해 조사한 변이주의 유전유사도는 대조군에 대해 50%~52%였고, 변이주간에는 49%~57%로 나타나 방사선조사에 의해 유전적 다양성이 증가되었음을 알 수 있었다. 본 연구에서 방사선조사에 의해 유기된 변이주는 섬유소성 생물폐자원의 재활용에 있어서 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Kuhad, R.C. and Singh, A. (1993). Lignocellulose

biotechnology: current and future prospects. Crit. Rev. Biotechnol., 13 : 151-172.

2. Awaf, V.A., Chahal, D.S. and Charbonneau, R. (1995). Effect of irradiation, as a pretreatment, on bioconversion of corn stover into protein-rich mycelial biomass of *Pleurotus sajor-caju*. Radiat. Phys. Chem., 46 : 1299-1302.
3. Gharpuray, M.M., Lee, Y.H. and Fan, L.T. (1983). Structural modification of lignocellulosics by pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis. Biotechnol. Bioeng., 25 : 157-172.
4. Kirk, T.K. and Farrell, R.L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol., 41 : 465-505.
5. Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R. and Horikoshi, K. (1993). Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. Appl. Environ. Microbiol., 59 : 2311-2316.
6. Gerber, P.J., Heitmann, J.A. and Joyce, T.W. (1997). Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*. Bioresource Technol., 61 : 127-140.
7. Boominathan, K., Balachandra Dass, S., Randall, T.A. and Reddy, C.A. (1990). Nitrogen-deregulated mutants of *Phanerochaete chrysosporium* - a lignin-degrading basidiomycete. Arch Microbiol., 153 : 260-265.
8. Yoo, Y.-B. (1992). Interspecific hybridization between *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus florida* following protoplast fusion. Kor. J. Mycol., 20 : 118-126.
9. Yoo, Y.-B. and Cha, D.-Y. (1992). Gene transfer in edible fungi using protoplasts. In : Genetics and Breeding of Edible Mushrooms, S.T.Chang, J.A.Buswell and P.G.Miles, eds., Gordon and Breach Science Publisher, New York, p. 157-192.
10. Kong, W. -S., Kim, D. -H., Kim, Y.-H., Kim, K. -S., You, C. -H., Byun, M. -O., and Kim, K. -H.(1997). Genetic variability of *Flammulina velutipes* monosporous isolates. Kor. J. Mycol. 25(2):121-129.
11. Song, Y. -J., Jeong, M. -J., Kim, B. -G., Rho, Y. -D., Ryu, J. -C., and Yoo, Y. -B.(1996). Genetic variability of *Pleurotus ostreatus* monospore isolates by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. Kor. J. Mycol. 24(3):186-205
12. Byun, M.-O., Chung, J.-C., You, C.-H., Cha, D.-Y. and Lee, D.-H. (1997). Transformation of *Pleurotus*

- sajor-caju* by complementation of PABA requiring mutant. *Kor. J. Mycol.*, 25 : 233-237.
13. Yoo, Y.B., Park, Y.H. and Chang, K.Y. (1988). Induction of Auxotrophic Mutants and Back Mutation in *Pleurotus*, Res. Rep. Rural Development Administration, FPUM-30, Korea, p. 133-140.
 14. Hobbs, C.H. and McClellan, R.O. (1986). Toxic effects of radiation and radioactive materials. In : *Toxicology. The Basic Science of Poisons*, C.D.Klaassen, M.O.Amdur and J.Doull, eds., 3rd ed., Macmillan Pub., New York, p. 669-705.
 15. Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D. (1994). *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*, IMI Technical Handbooks No. 1, CAB International, Wallingford, p. 19-31.
 16. West, P.A. and Colwell, R.R. (1994). Identification and classification of Vibrionaceae: an overview. In : *Vibrios in the Environment*, R.R.Colwell, ed., Jhon Wiley & Sons, Inc., New York, p. 285-363.
 17. Kumakura, M. (1993). Dose-dependency of radiation on enzyme production in *Trichoderma reesei*. *Radiat. Environ. Biophys.*, 32 : 41-46.
 18. Mandels, M. and Sternberg, D. (1976). Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment.*, 54 : 259-267.
 19. Chernoglazov, V.M., Jafarova, A.N. and Klyosov, A.A. (1989). Continuous photometric determination of endo-1,4-beta-D-glucanase (cellulase) activity using 4-methylumbelliferyl-beta-D-cellobioside as a substrate. *Anal. Biochem.*, 179 : 186-189.
 20. Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet, I. (1995). New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.*, 99 : 441-446.
 21. Gusakov, A.V., Protas, O.V., Chernoglazov, V.M., Sinitsyn, A.P., Kovalysheva, G.V., Shpanchenko, O.V. and Ermolova, O.V. (1991). Transglycosylation activity of cellobiohydrolase I from *Trichoderma longibrachiatum* on synthetic and natural substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1073 : 481-485.
 22. Williams, J.G., Kubelik, K.,A.R., Livak, K.J., Rafalaski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.*, 8 : 6531-6535.
 23. Niels, W.H. and Roger, J.B. (1970). *Manual on Radiation Dosimetry*, Miracle Dekker Inc., New York.
 24. Graham, G.C. (1994). A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques*, 16 : 49-50.