

EMS 처리에 의한 *Ceriporia lamaritus*의 신 균주 개발 및 생물학적 활성

오시윤¹, 박동철², 김병천³, 최장원^{1*}

Development of New Strain from *Ceriporia lamaritus* by EMS Treatment and Its Biological Activity

Si Yoon Oh¹, Dong Cheol Park², Byung Cheon Kim³, Jang Won Choi^{1*}

Received: 17 March 2020 / Revised: 19 March 2020 / Accepted: 20 March 2020

© 2020 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: To develop new strains of *Ceriporia lamaritus* (*C. lamaritus*) with different functional activities, the protoplast was prepared from the mycelium of *C. lamaritus* after treatment with various concentrations of EMS and the myceliums were regenerated. As a result, lots of mutant strains were obtained, 3 strains with different phenotypic characteristics were selected and named *C. lamaritus* f1, f2, and f3, respectively. To evaluate molecular phylogenetic tree, the genomic DNAs of mutants were amplified with ITS1 and ITS4 primers by PCR, sequenced and the DNA sequences were compared with the ITS sequences of the related strains in GenBank using BLAST program. Clustal multiple alignment showed that there are a number of sequence changes in partial 18S ribosomal DNA, ITS 1 region and 5.8S rDNA between the strains, indicating that EMS treatment generated chemical, random mutations in the chromosomal DNA. A neighbor joining tree revealed that *C. lamaritus* f1 and f2 strains were clustered in the same clade, but *C. lamaritus* f3 in different clade. To investigate changes of biological phenotypes, lac-

case and antioxidant activities were studied. As a result, lacase activity of *C. lamaritus* f3 showed the highest level (2.49 u/mg) among the strains and also antioxidant activity showed 124% of the culture broth after 4 days incubation. Furthermore, the radical scavenging activities were constantly maintained during culture period. Accordingly, EMS might be efficient tool to develop new strain and utilization of the active components in the culture broth of *C. lamaritus* f3 presents the possibility of industrial application.

Keywords: antioxidant activity, *Ceriporia lamaritus*, EMS, lacase activity, phylogenetic tree

1. INTRODUCTION

Ceriporia 속 (genus) 버섯은 구멍장이 버섯목 (*Polyporales*), 유색 고약버섯과 (*Phanerochaetaceae*)에 속하는 버섯으로 polypore의 형태로 자라는 resupinate (배착형) fungi로서 산림 속에서 나무를 분해하는 버섯으로 알려져 있으며 [1], 약 80개의 분류군을 포함하며 이 중 상당수는 동아시아에서 연구 보고되었다 [2,3]. 그 중 *Ceriporia lacerata* (*C. lacerata*)는 2003년에 일본에서 처음으로 발견되었고 [4], 담자균류에 속하는 백색 부후균으로 참나무나 적송에 부생하며, 목재내 리그닌을 선택적으로 분해시켜 부후가 진행되면서 백색으로 변하는 형태학적 특징을 가지고 있다 [5]. 일반적으로 버섯류는 생장 지역에 따라 특성과 주요 성분 함량에 많은 차이가 있으며 공통적으로 서식지 온도가 낮은 지역에서 획득한 균주는 품질은 좋지만 생장 속도가 느리고, 잡균의 오염에 약하며 수

¹대구대학교 대학원 자연자원학과1

¹Department of Natural Resources, Graduate School, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

Tel: +82-53-850-6756; Fax: +82-53-850-6769

e-mail: chjowo@daegu.ac.kr

²김천대학교 외식산업학과

²Department of Food Service & Industry, Gimcheon University, Gimcheon 39528, Korea

³(주)씨엘바이오

³CLBIO CO., LTD, Seoul 06721, Korea

량이 낮은 단점이 있지만, 온도가 높은 지역에서 획득한 균주는 품질은 떨어지지만 성장 속도가 빠르고 잡균의 오염에 강하고, 생산성이 우수한 특성을 가지고 있고 이로 인해 의약적 효능에서도 많은 차이가 있다. *C. lacerata*의 경우에도 균사체 성장속도가 느려 배양기간이 길고 잡균으로 인한 오염발생으로 배양 성공률이 떨어져 산업화에 어려움이 대두되고 있다. 따라서 이를 해결하기 위하여 서식지의 환경적 요인에 따른 성장 특성 및 성분 함량이 서로 다른 6종의 *C. lacerata* 균주들을 di-mono (이핵 단핵) 교배법으로 2극성으로 대치한 후 반복적인 교배를 통하여 균사체의 성장형태가 모균주와 확연한 차이를 보이면서, 균사가 굵고, 성장속도가 매우 빠른 1개의 균주를 최종적으로 선발하여 선발하여 국제미생물명명법에 따라 *Ceriporia lamaritus* (KCTC 56671)로 등록되어 있다 (주식회사 씨엘바이오). 구멍장이 버섯류인 *C. lacerata*를 이용한 의약학적 연구로서 균사체 배양액 추출물을 사용하여 제 1형 당뇨병 쥐에서의 항당뇨 효과 [6], 또한 제 2형당뇨에서의 효과와 세포수준에서의 기전연구, 당뇨병 동물에서의 인슐린 신호 전달 상의 기전연구 [7] 등이 보고된 바 있다. 버섯류는 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 풍부한 영양과 독특한 향을 함유하고 있어 자실체 뿐만 아니라 액체배양을 통하여 생산된 균사체도 식용이 가능하여 기능성 식품 및 의약품 소재로 많이 활용되고 있다 [8]. 즉, 버섯의 균사체는 자실체와 마찬가지로 여러 가지 유용한 물질을 함유하고 있으며, 특히 균사체는 버섯 자실체와는 달리 안정적으로 대규모 용기 내에서 단기간 배양 및 산업적 생산이 가능하다는 장점이 있으며 최근 대부분의 버섯 종균은 액체 배지에서 함유된 영양성분을 이용한 생물 전환을 통해 다양한 생리활성물질을 포함하는 균사체 배양이 가능하게 되었다 [9]. 버섯 균사체를 포함한 액체 배양물은 배지의 영양성분 조성과 배양조건에 따라 항암 [10] 및 항산화 및 항당뇨 [11] 활성을 가지는 다양한 대사산물을 얻을 수 있으며 [12,13], 액체배양은 작은 공간에서 경제적으로 단기간에 균사체 대량 생산이 가능하며 자실체로부터 유용성분을 생산하는 것보다 더 효과적인 생산방법이라 할 수 있다. 현재까지 보고된 연구로는 노루궁뎅이버섯 [14,15], 표고버섯 [16], 흰목이버섯 [17] 등 다양한 버섯 균사체를 이용한 액체 배양의 최적화에 대한 연구들이 보고되었으나, *C. lamaritus*의 균사체를 이용한 액체 배양물 생산을 최적화하여 기능성 소재로서 활용하는 연구는 아직까지는 미비한 실정이다. 따라서 다양한 기능성 소재개발을 위하여 성장속도가 빠르면서 오염에 강하고 생산 수율 및 생물학적 기능이 강화된 새로운 균주개발 필요성이 제기되고 있다. 일반적으로 돌연변이 유발은 버섯 및 식물체의 여러가지 특성, 즉 개화시기 및 성장속도 조절, 신제품 개발, 스트레스 저항성, 내병성 및 생산성 증진 등을 개선하는데 사용될 수 있다. 인위적 돌연변이 유발을 위하여 여러가지 물리, 화학적 돌연변이 유발원(UV, gamma-ray, chemicals, EMS 등) 사용할 수가 있으며, 대상 물질들의 유전적 구성의 변화는 돌연변이 유발원의 특이 작용 기작에 의존하게 된다 [18,19]. 염색체 DNA상에서 여러 종

류의 재배열은 돌연변이 유발원의 투여농도 및 처리시간에 따라 다양한 특성을 갖는 돌연변이체를 유발하며, 따라서 여러 작물, 종 또는 유전자형에 정확한 투여농도 정보를 갖는 것이 바람직한 빈도의 돌연변이체를 유도하는데 중요하다. Ethyl methanesulfonate (EMS)는 전형적으로 염색체를 무작위적으로 점돌연변이를 일으키는 아주 효과적이며 강력한 화학적 돌연변이 유발원 [20]이다. 따라서 본 연구에서는 *C. lamaritus*의 표현형적인 특성과 생물학적 기능이 강화된 신 균주를 개발하기 위하여 *C. lamaritus*의 원형질체를 유도하여 화학적 돌연변이 유발물질인 EMS를 농도별로 처리하여 계능에서 무작위 돌연변이를 유도한 후, 균사체 colony로 재분화하여 모균주에 비해 높은 성장률, 항산화 활성 및 laccase 활성 증가, flavour 등이 개선된 균주를 개발하고 대량배양에 의한 산업적 응용범위를 확장하는 것을 그 연구 목표로 한다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 균주 및 시약

본 연구에 사용된 모균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC: Korean Collection for Type Cultures)에 기탁 보존되어진 *Ceriporia lamaritus* (KCTC 56671)를 (주)씨엘바이오 (Seoul, Korea)에서 제공받아 실시하였다. *C. lamaritus* 균주 배양을 위한 배지로서 PDA (potato dextrose agar) 및 PDB (potato dextrose broth)를 Becton Dickinson사 (Sparks, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 균사체 배양은 PDA 고체 배지에서 배양하여 균사 상태로 유도한 후, 액체배양 시 균사가 자란 배지를 멸균된 칼을 이용하여 약 0.5 cm²로 작게 자른 후 PDB 액체배지 200 mL에 접종하여 28°C에서 50 rpm으로 진탕 배양하여 실험에 사용하였다. 원형질 형성을 위하여 *Trichoderma harzianum*에서 분리한 lysing enzyme (Sigma, St Louis, MO, USA) 및 Cellulase onozuka R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)를 사용하였으며, 돌연변이 유발원으로서 ethyl methanesulfonate (Sigma, St Louis, MO, USA), 또한 항산화활성 및 laccase 활성 측정을 위하여 ABTS (Sigma, St Louis, MO, USA)를 사용하였다.

2.2. *C. lamaritus*의 원형질체 나출

원형질체 나출을 위해 PDB배지 (100 ml)에서 5일 동안 배양한 *C. lamaritus* 균사체를 적당량 (20 mL)을 취하여 새로운 PDB 배지 200 mL로 옮겨 5일 동안 28°C에서 150 rpm으로 재 배양 하였다. 배양시킨 균사를 glass filter G1 (LukeGL, Namyangju, Korea)을 사용하여 균사체를 회수하고, 0.6 M sucrose로 균사체를 2회 세척한 후, lysing buffer (lysing enzyme 10 mg/mL, cellulase 10 mg/mL in 0.6 M sucrose)를 균사체의 5배 볼륨이 되도록 첨가한 다음, 28°C, 130 rpm에서 4시간 동안 배양하였다. 그 후 glass filter funnel G3 (LukeGL, Namyangju, Korea)를 이용하여 진공 여과를 통해 분해되지

얇은 균사와 세포 찌꺼기들을 제거하였고, 필터를 빠져 나온 원형질체 용액을 4°C에서 9,000 rpm으로 20 분간 원심분리하여 원형질체를 침전시켰다. 상등액은 버리고 pellet에 남아 있는 잔여 lysing buffer를 씻어주기 위해 STC buffer (0.6 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂) 500 μL을 첨가하여 pellet을 현탁하여 원심분리를 행하고 침전된 원형질체에 STC buffer를 첨가하고 현미경 관찰 후, hemocytometer로 원형질체를 계수하여 원형질체 수를 1×10^5 cells/mL이 되도록 하였다[21].

2.3. EMS 처리에 의한 *C. lamaritus* 신균주 선발

EMS 처리는 Liu[22] 방법을 약간 변형하여 사용하였다. EMS의 최종농도를 1.167 g/mL로 제조하여 원형질체 현탁액 100 μL (1×10^5 cells/mL)에 EMS를 각각 0~2% (v/v)가 되도록 처리해준 뒤 30°C, 120 rpm에서 1시간 진탕 배양시켜준 뒤 4°C, 9,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 원형질체를 침전 후 상등액은 버리고 pellet을 STC buffer에 2번 씻어준 뒤, pellet을 hemocytometer로 확인하였다. 확보된 pellet을 STC buffer 100 μL에 현탁하고 low melting PDA agar 배지 (2.4% potato dextrose, 0.8% agar powder) 7 mL에 섞어 준 뒤 0.6 M sucrose가 함유된 PDA 배지(2.4% potato dextrose, 1.5% agar powder)에 pouring 한 후, 28°C에서 7 일 동안 재분화를 위하여 배양하였다. 재분화 된 균사체들을 kanamycin (50 μg/mL) 과 ampicillin (50 μg/mL)이 함유된 MCM agar (2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.1% K₂HPO₄, 0.046% KH₂PO₄, 1.5% agar powder)배지에서 1회 더 선별하여 *C. lamaritus* 돌연변이체들을 분리하였다.

2.4. DNA 추출 및 ITS 염기서열 분석

염색체 DNA추출을 위하여 PDA 또는 PDB 배지에서 10일간 배양한 균사를 사용하였으며, DNA 추출은 Lee [23] 방법을 이용하여 추출하였다. 즉, 배양한 균사 1 g을 취하여 막자사발에 넣고 액체질소로 급냉시킨 다음, lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM EDTA (pH 8.0), 3% SDS, 1% 2-Mercaptoethanol] 500 μL를 넣어 잘 섞고, 55°C water bath에서 1시간 반응시킨 후, 12,000 rpm, 4°C에서 15분 원심분리 후 상등액을 취하였다. 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25/24/1) buffer를 첨가하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취한 후, 2 volume의 100% 에탄올과 1/10 volume의 3 M sodium acetate를 첨가하여 침전시킨 다음 원심분리에 의해DNA를 확보하였다 [24]. White 등 [25]에 의해 보고된 fungi의 ITS (internal transcribed spacer) 영역을 증폭하기 위하여 ITSP1 (TCCGTAGGTCAACCTGCGG), ITSP4 (TCCTCCGCTATTGATATGC), LROR (ACCCGCTGAACCTAAGC) primer등을 사용하였고, 증폭된DNA의 염기서열은 MacroGen (Seoul, Korea)를 통하여 분석하였다. 확인된 염기서열들은 sequencer (Gene codes Co., USA) 및 Clustal X를 이용하여 *C. lamaritus* control 서열과 alignment 후 변화된 서열을 확인하였고, 유전적 계통 분류 및 Neighbour Joining (NJ) 분석은

PAUP 4.0b version (Swofford, 2002) [26]을 이용하여 분석하였다.

2.5. 리그닌 분해효소 활성 조사

C. lamaritus 및 변이주들의 리그닌 분해효소 (laccase)의 활성을 조사하기 위하여 laccase에 대한 높은 특이성 [27,28]을 갖는ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]를 기질로 사용하여 분석하였다. 즉, ABTS agar 배지(0.2% K₂HPO₄, 0.2% KCl, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 0.0547% ABTS, 1.5% agar powder)에 0.1 g의 균사체를 중앙에 접종한 후, 28°C에서 7일동안 암배양하였다. 접종원을 중심으로 청록색의 원형 발색대가 형성되면 laccase 활성이 있는 것으로 판정하여 발색 강도를 4군으로 나누어 very weak(1+), weak(2+), moderate(3+), strong(4+)으로 판정하여 조사하였다 [29,30]. 액체배양 에서laccase 활성 분석을 위해서 균사체 같은 양을 접종하여 배양한 *C. lamaritus* 및 변이주들의 배양액을 100 μL 취하여 125 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) 800 μL와 0.25 M ABTS 100 μL를 혼합한 후, 25°C에서 5분간 반응시킨 후 420 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 배양액 내의 laccase 활성은 다음과 같이 계산되었다 [31].

$$\text{Laccase activity (unit/mg)} = \frac{\Delta \text{Absorbance} \times 10^6 \times \text{Total volume}}{\Delta \text{Time} \times \epsilon_{420} \times \text{Sample weight}}$$

$$(\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1} = 3.6 \times 10^4)$$

2.6. 항산화 활성 분석

C. lamaritus 및 변이주들의 배양액 항산화 활성은 ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)를 사용하여 radical 이온을 소거시키는 정도를 배양 일자 별로 측정하여 분석하였다 [32]. 즉, 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1 : 1 비율로 섞어준 뒤, 암실에서 16시간 반응시키고, 그 후 OD₇₃₄에서 0.7이 되도록 D.W로 희석하여 반응에 사용하였다. 제조된 ABTS⁺ 용액 900 mL과 배양액 100 μL를 45초간 섞어준 뒤 실온에서 30분 반응시킨 다음, OD₇₃₄에서 흡광도를 측정하였고 배양액의 항산화 활성은 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{Activity(\%)} = (A-B)A \times 100$$

$$(A: \text{ABTS}^+ \text{ solution}, B: \text{ABTS}^+ \text{ solution} + \text{배양액})$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 원형질체 추출 및 EMS 처리

*C. lamaritus*의 원형질체를 추출하기 위하여 균사체를 수거하여 (wet weight, 1 g) 여러 효소를 조합하여 원형질 추출 최적조건을 확립하였다. 즉, 사용된 세포벽 분해효소들을 조합은 cellulase onozuka R-10 (10 mg/mL)과 *Trichoderma harzianum*

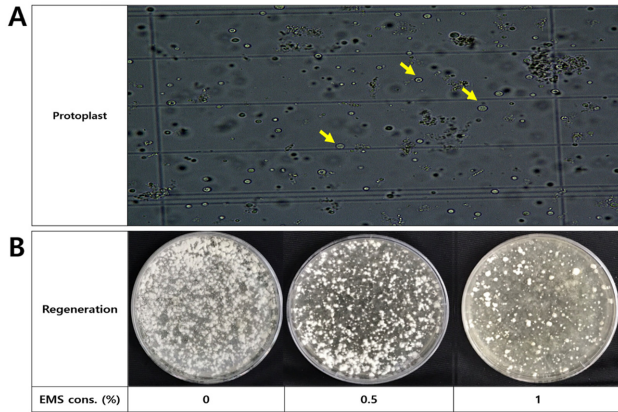


Fig. 1. (A) Protoplast formation of *C. lamaritus* after treatment of enzyme. The arrows indicate the position of the *C. lamaritus* protoplast. (B) Effect of different EMS concentrations on germination of basidiospores of *C. lamaritus* var.

의 lysing enzyme (10 mg/mL)을 혼합하여 시간 별로 균사체에 처리하여 원형질체를 나출하였을 때 2시간 이하의 짧은 처리시간에서는 원형질체 수가 mL당 1×10^3 개 이하로 형성되었고 장시간 반응 (5시간 이상)을 시키면 세포막이 파괴되어 찌꺼기가 많이 형성되어 원형질체의 안정성이 떨어지는 현상을 보였으며, 4시간 반응하였을 때 $1 \sim 1.5 \times 10^7$ cells/mL로 많은 원형질체를 얻을 수 있었다 (Fig. 1(A)). 얻어진 원형질체의 세포 수를 1×10^5 cells/mL이 되도록 조절한 후 현탁액 100 μ L (10^4 cells)에 EMS (1.167 g/mL)를 각각 0%, 0.5%, 1% 및 2% (v/v)가 되도록 처리해준 뒤 30°C에서 1시간 배양 후 처리된 EMS를 제거하여 top agar를 이용하여 PDA 배지에 pouring 하여 재분화를 유도하였다. 그 결과 Fig. 1(B)에서 보는 바와 같이 EMS를 처리하지 않은 균에서는 약 800개 정도의 균사체가 재분화 되었고, 0.5% 처리 시 420개, 1% 처리 시 180개 정도로 EMS의 처리 농도가 높아질수록 재분화 되는 균사체 수가 감소하는 것으로 나타났으며, 원형질체의 EMS에 의한 반치사선량 (LD_{50})은 0.5% 처리시 52.5%, 1% EMS 처리시 22.5%로 적절한 EMS 처리 농도는 0.5%에서 1% 이내인 것으로 보인다. 고농도의 EMS (2-5%)를 처리하였을 때는 균사체의 재분화가 거의 일어나지 않았고 (data not shown), 이는 원형질체에 EMS 처리 농도가 증가함에 따라 용량 의존적 (dose-dependent)으로 균사체로의 재분화를 방해하여 치사율을 증가시키는 것으로 보고되었다 [33].

3.2. 돌연변이체 선별

재분화 된 균사체들을 kanamycin (50 μ g/mL)과 ampicillin (50 μ g/mL)이 함유된 MCM agar 배지에서 1회 더 선별하여 *C. lamaritus* 돌연변이체들을 분리하였다. 즉, EMS를 각각 0%, 0.5%, 및 1% 처리한 원형질체를 28°C에서 배양하여 재분화 된 균사체 들 중 EMS 처리군별로 각각 40개씩 항생제 함유 MCM agar 배지에서 control 균사체 (*C. lamaritus*)와 균사체 성장속도, 밀도, 균사체 층의 두께에 따라 0.5% 처리군

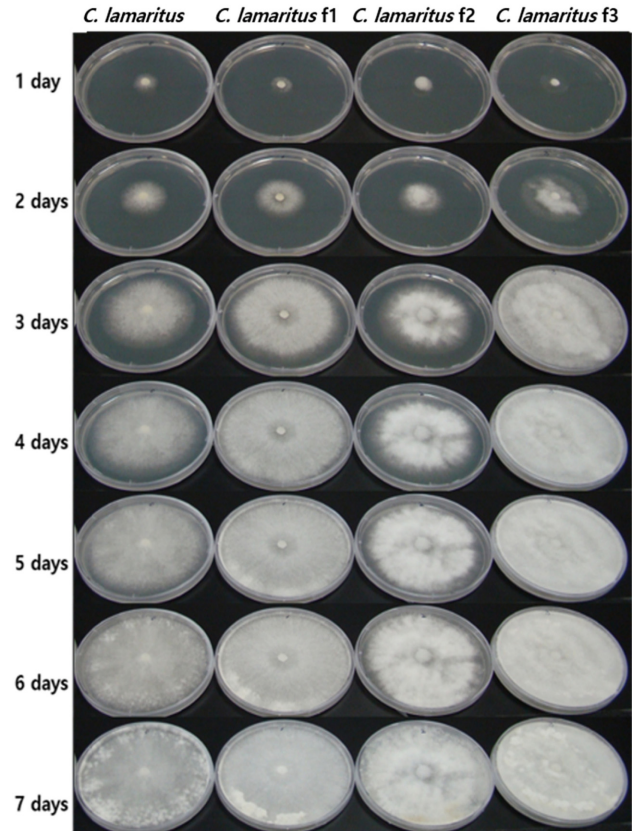


Fig. 2. Time profile of *C. lamaritus* and mutants mycelia on MCM agar plates. To examine the growth rate of each strain, the mycelium of same wet weight was spotted on the center of each plate and incubated during 7 days.

에서 2균주 (0.5-8, 0.5-11), 1% 처리군에서는 1균주 (1-41)을 선별하였다. 즉, EMS 처리군, 0.5%와 1%의 처리군을 control과 비교하였을 때 0.5% 및 1% 처리군에서 균사체의 성장속도, 밀도, 무게 (wet weight), 및 균사체층의 두께가 평균적으로 증가되는 것으로 나타났다 (Fig. 2, Table 1). 완전 성장까지 걸리는 시간은 1-41 클론의 경우 3일로 가장 빨랐으며, 균사체 밀도는 0.5-11 클론이 가장 높았고, 또한 균사체 층의 두께는 1-41 클론이 2 mm로 가장 두꺼운 층의 균사체를 유지하였다. 이와 같은 특성을 갖는 클론들, 0.5-8 클론은 *C. lamaritus* f1, 0.5-11번 클론을 *C. lamaritus* f2, 또한 1-41번 클론은 *C. lamaritus* f3로 새롭게 명명하였다 (Table 1). 이 돌연변이체들의 EMS에 의한 유전적 변화를 측정하기 위하여 각 클론들을 배양한 후 염색체 DNA를 추출하고 부분적 18S ribosomal DNA, ITS (internal transcribed spacer) 부위 및 5.8S ribosomal DNA 지역의 염기서열을 분석하였다.

3.3. 돌연변이체의 염기서열 분석 및 계통수

Nuclear ribosomal DNA (nrDNA)의 변화된 서열을 분석하기 위하여 ITS 1과 ITS 4 primer를 사용하여 각각 돌연변이체들의 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하고 증폭된

Table 1. Phenotypic characteristics of *C. lamaritus* and mutants

	Confluent growth (day)	Diameter of mycelium top layer (mm)	Wet weight (g)	Culture medium (pH)
<i>C. lamaritus</i>	6	1.5 ± 0.2	8.43 ± 0.2	4.37 ± 0.2
<i>C. lamaritus</i> f1	4	1 ± 0.2	13.14 ± 0.2	3.37 ± 0.3
<i>C. lamaritus</i> f2	7	1.5 ± 0.3	10.79 ± 0.3	3.63 ± 0.2
<i>C. lamaritus</i> f3	3	2 ± 0.4	13.84 ± 0.4	4.72 ± 0.1

The strains were incubated at 28°C in MCM solid plate and liquid medium, respectively. In solid plate, the periods of confluent growth and the thickness of mycelium were measured. Wet weights of the strains and pH of the culture medium were investigated after 7 days incubation.

DNA 조각을 정제한 다음, Macrogen (Seoul, Korea)에 서열 분석을 의뢰하여 염기서열을 확보하였다. 확보한 각각 돌연변이체들의 염기서열은 부분적인 18S ribosomal DNA, ITS1 부위 및 5.8S rRNA 서열을 포함하고 있으며, 그 서열들을 BLAST (basic local alignment search tool)를 이용하여 Genbank database와 비교하여 새로운 돌연변이체들의 균종을 분석하였다 (Fig. 3(A)). *C. lamaritus* 서열과 Genbank에 등재된 *C. lacerata* 서열 665 염기를 비교하였을 때 부분적인 18S ribosomal DNA, ITS1 부위, 5.8S rRNA 서열에서 약 34% 정도의 서열의 차이를 보이며, 또한 *C. lamaritus* 서열과 돌연변이체 f1, f2, f3의 염기서열들과도 비교하였을 때 ITS1 region에서는 거의 consensus 서열을 보이지만 그 외의 지역에서는 클론들 간에 염기서열이 상당한 차이가 있음을 확인하였다. 또한 Clustal multiple alignment program에 의해 염기서열들을 정렬하였을 때 클론들간에도 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 일반적으로 ITS 영역은 가운데 5.8S rRNA 서열을 포함하고 있으므로 균종을 대상으로 분류학적 연구에 적합하며 그 분자진화 속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 중, 속의 분류에 적합하다. 더구나 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 비교가 가능하며 이런 풍부한 정보량과 간편성으로 동일 속내의 종간 및 속간의 유연관계를 연구에 유용한 수단이 되며 또한 계통적 분류에 이용되어진다[34,35]. 유전적 계통수 (phylogenetic tree)를 그리기 위하여 각각의 돌연변이체들의 염기서열을 바탕으로 전체 분류군을 PAUP (4.0b) program (Swofford, 2002) [26]을 이용하여 체계적인 관계를 평가하기 위한 통계적 방법인 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [36]를 수행한 결과 Fig. 4(A)와 Fig. 4(B)에서 보는 바와 같은 결과를 얻었다. 염기서열 분석 결과 얻어진 Bootstrap 합의계통수 (Fig. 4(A))와 Neighbor-joining (NJ) 계통수 (Fig. 4(B))는 비슷한 양상으로 나타났고, EMS를 처리한 균주인 *C. lamaritus* f1, *C. lamaritus* f2는 유전적으로는 별 차이가 없는 매우 가까운 유연관계를 나타내었고 *C. lamaritus* f3는 다른 양상을 나타내어 독립적인 분계조를 형성하여 EMS에 의한 화학적인 돌연변이가 유발 되었음을 알 수 있다. 염기서열 변이에 기초하여 neighbor-joining (NJ) 분석결과, 총 5개의 cluster를 형성하였다. *C. lamaritus*, *Fungal endophyte* sp (EU803316.1), *Porostereum spadiceum* (JX463660.1) 이 cluster 1에 속하고 돌연변이체인 *C. lamaritus* f1과 *C. lamaritus* f2가 cluster 2를 이루었다. *C. lamaritus* f3는 다른

독립적인 양상을 띄어 *Thanatephorus cucumeris* (KF381087.1) 와 cluster3을 이루었다. *C. lacerata* (KP297426.1), *Emmia lacerata* (MN856430.1), *Uncultured fungus* (KX761867.1), *Fungal* sp (HQ331062.1) 들은 cluster4에 속하는 것으로 나타났다. 이러한 분자계통을 나타내는 이유는 첫번째로 *C. lamaritus* 라는 같은 모균주에서 변이에 의해 분화가 되었기 때문에 *C. lamaritus* f1와 *C. lamaritus* f2가 한 cluster에 묶여졌고, *C. lamaritus* f3은 변이 분화도가 높아 다른 cluster에 묶여진 것으로 나타났고, 두번째로는 EMS를 처리한 종들이 모균주와 다른 cluster를 형성한 것으로 보아 무작위적인 화학적인 돌연변이가 발생한 것으로 보인다. 특히 ITS 서열이라는 제한적 DNA의 분석에 의해 유의적인 변이가 발생하였기 때문에 새로운 품종으로 평가 받을 수 있는 분자유전적 근거를 용이하게 얻을 수 있다고 판단되며, 따라서 버섯 원형질체에 EMS의 처리는 새로운 품종을 개발하는데 유용한 돌연변이 유발원이 될 수 있다고 사료된다.

3.4. 리그닌 분해 효소 laccase 활성조사

Laccase(benzenediol: oxygenoxidoreductase, EC 1.10.3.2)는 대부분의 균류가 생산하고 있는 세포외 효소로서 세포 밖 환경에서도 안정성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 laccase는 산림에 서식하고 있는 다양한 균류들의 생활사에 관여하고 있으며 균류의 형태나 자실체 형성, 균 포자 색소 형성, 리그닌 분해, 성분화, 식물병원균, 기타 스트레스에 대한 방어 등과 같은 중요한 기능을 담당하고 있는 것으로 보고되었다 [30]. 백색부후균인 *C. lamaritus*를 모균주로 하여 EMS 처리에 의해 얻어진 f1, f2, f3 균주들의 변화된 생물학적 활성을 조사하기 위하여 목재의 리그닌을 분해하는 효소인 laccase 활성능의 변화를 측정하였다. 즉, laccase에 대하여 높은 특이성 [27,28]을 갖는 ABTS를 포함하는 ABTS agar 고체 배지 각각 균주들의 균사체 0.1 g을 배지 중앙에 접종한 후, 28°C에서 7 일 동안 암배양하였다. 그 후 접종원을 중심으로 청록색의 원형 발색대가 형성이 되면 laccase 활성이 있는 것으로 판정하여 발색 강도를 4군으로 나누어 very weak(1⁺), weak(2⁺), moderate(3⁺), strong(4⁺)으로 표시하였다 [29,30]. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 *C. lamaritus*의 발색대 크기는 15 mm로 강도는 weak(2⁺)를 나타냈고, *C. lamaritus* f1 균주의 발색대 크기도 14 mm로 weak(2⁺) 상태의 강도를 보이며 돌연변이체 중에서는 가장 약한 laccase 활성을 나타내었다. 또한 *C. lamaritus* f2 균주의 발색대 크기는 22 mm이며 강도가

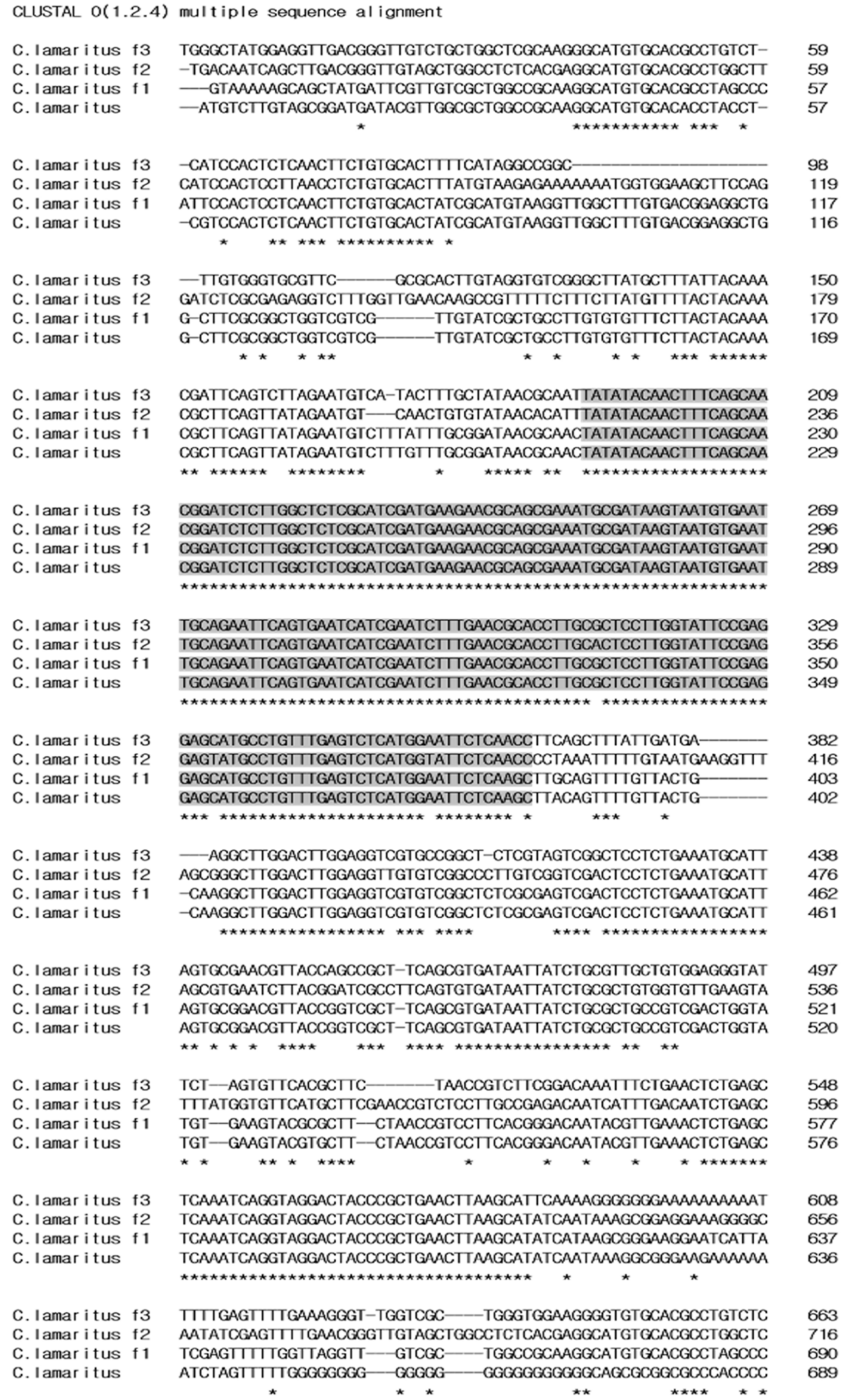


Fig. 3. Clustal multiple sequence alignment of *C. lamaritus* mutants. Chromosomal DNAs of the strains were isolated and the regions of partial 18S rRNA, ITS, and 5.8S rRNA were amplified using ITS 1 primer by PCR. Nucleotide sequences of the strains were analyzed using Clustal omega program.

moderate(3⁺)로 두번째로 높은 laccase 활성을 나타낸 반면, *C. lamairtus* f3 균주의 경우 발색대 크기가 24 mm로 가장 크고 발색강도는 strong(4⁺)으로 가장 높은 laccase 활성을 나타내었다. 형성된 청록색 환의 반지름은 *C. lamaritus* (15 mm)를 기준으로 *C. lamaritus* f2의 경우 22 mm, *C. lamaritus* f3의 경우 24 mm로 laccase 활성이 모균주 보다 46-60%까지 크게

증가한 것으로 나타났다. ABTS는 다른 페놀계 기질과는 달리 인체에 암을 유발시키지 않는 비발암원성 산화환원 지시제로 알려져 있으며 [29], laccase와 반응 시 청록색으로 발색되어 효소 활성을 쉽고 빠르게 육안으로 확인할 수 있는 특성이 있어 균류 돌연변이체들의 생물학적 활성의 변화를 우선적으로 측정하기 위한 좋은 기질임을 확인하였다. 균사체

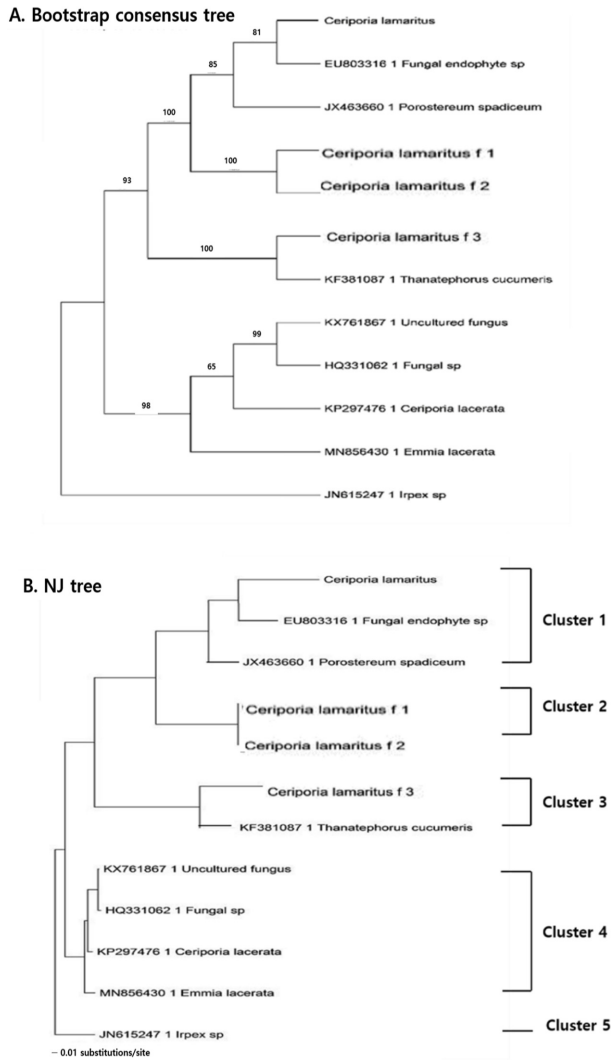


Fig. 4. (A) Bootstrap consensus tree by UPGMA using PAUP (4.0b) program based on ITS sequences of mushroom. This tree showed the various dissimilarities on the genetic variation. (B) The phylogenetic tree based on ITS sequence by Neighbour joining (NJ) method. This showed classification of 5 clusters. *C. lamaritus* f1 and f2 were same cluster but *C. lamaritus* f3 was classed into different cluster.

액체배양에 의한 배양액의 laccase 활성 분석을 위해서 같은 균사체 같은 양을 접종하여 배양한 *C. lamaritus* 및 변이주들의 배양액을 취하여 sodium acetate buffer (pH 5.2)와 ABTS 100 μ L를 혼합하여 반응시킨 후 420 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다 [31]. Fig. 5에서 보는 바와 같이 모균주인 *C. lamaritus*는 1.76 unit/mg, *C. lamaritus* f1은 1.74 unit/mg으로 증가하지 않았고, *C. lamaritus* f2는 1.87 unit/mg, *C. lamaritus* f3는 2.49 unit/mg로서 모균주보다 1.06 배 및 1.41배 각각 증가한 것으로 나타났다. 고체배지와 액체 배지에서 laccase 활성은 균주에 따라서 일치하는 것으로 나타났다지만, laccase 활성과 균사체 성장과의 관계는 비례적인 관계가 아닌 것으로 나타났다 (Table 1 & Fig. 5). 즉, ABTS agar plate 상에 laccase 활성이 크게 나타났다고 하여 반드시 균사체도 크게 성장한 것은 아니기 때문에 균사체 성장률에 따른 효소 활성의 변화 또는 효소 활성과 균체량과의 상관관계를 균주별로 구명하는 연구가 필요할 것으로 본다. EMS 처리에 의해 백색부후균인 *C. lamaritus*의 리그닌 분해능이 증가함으로써 laccase 관련 유전자 및 조절부위에 관여하는 인자들의 유전적 변화에 의해 laccase 효소의 발현이 증가 되는 것으로 판단된다 [37].

3.5. 돌연변이체의 항산화 활성 분석

일반적으로 버섯류는 높은 영양적 가치 [38]를 지니며 또한 질병 예방의 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 여러 질병의 원인이 되는 free radical 및 활성산소를 제거하는 항산화 활성을 가지고 있으며, 또한 버섯 자실체 및 균사체로부터 다당류, terpenoids, 스테로이드류, cytokine 활성 촉진제, 이차대사산물 등과 같은 활성 성분들이 분리되어 생물학적 활성 검정에 관련된 많은 연구들이 보고되었다 [39,40]. 따라서 *C. lamaritus* 모균주와 돌연변이체인 *C. lamaritus* f1, f2, f3 균주의 항산화활성을 비교하기 위하여 각 균주의 균사체를 MCM 배지에 접종하여 8일동안 배양하면서 배양기간 (2-8 일)에 따른 항산화 활성을 측정한 결과, 배양일수 2, 4, 6, 8일을 기준으로 할 때 항산화활성은 *C. lamaritus*의 경우 각각 116.28%, 52.14%, 13.71% 및 22.28%로 시간이 지남에 따라 감소하였고, *C. lamaritus* f1은 104.28%, 41.14%, 15.71%,

	<i>C. lamaritus</i>	<i>C. lamaritus</i> f1	<i>C. lamaritus</i> f2	<i>C. lamaritus</i> f3
Agar medium activity				
Diameter (mm)	15	14	22	24
Culture medium activity (unit/mg)	1.76 \pm 0.12	1.74 \pm 0.1	1.87 \pm 0.14	2.49 \pm 0.13

Fig. 5. Laccase activities of *C. lamaritus* and mutants on ABTS agar and culture medium. Each strain with same wet weight was spotted on the center of MCM agar plate containing ABTS as a substrate. Chromogenic intensities were examined for laccase activity.

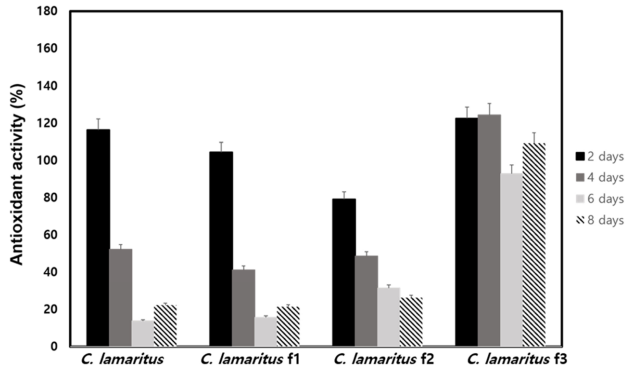


Fig. 6. Antioxidant activities of *C. lamaritus* and mutants in culture broth. ABTS radical scavenging activities of the culture broth from submerged culture of *C. lamaritus* and mutants were measured during 8 days incubation.

21.42% 이고, *C. lamaritus* f2의 경우도 79.43%, 48.57%, 31.42%, 26%로 배양기간 동안 계속 감소하는 경향을 보였다. 반면에 *C. lamaritus* f3의 경우 122.42%, 124.28%, 92.85%, 109.14%로 4일 배양 시 항산화 활성이 가장 높았고 6일째 조금 감소하다가 8일째 다시 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 6). 위와 같은 ABTS⁺ decolorization assay 방법은 ABTS의 양이 온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 감소되는 원리에 기초한 방법으로 potassium persulphate와 ABTS의 산화에 의해 라디칼을 형성시킨 후, 각각의 시료에 의한 자유 라디칼 소거능을 측정함으로써 항산화능을 확인할 수 있었다 [32]. 종합적으로 볼 때 *C. lamaritus* f3의 경우 모균주인 *C. lamaritus* 보다 항산화능이 월등히 개선되었고 또한 식품원료로 활용하기 위하여 EMS 처리에 의해 얻어진 *C. lamaritus* f3의 독성효과는 간접적인 유사실험에 의해 유전적인 변화 이외에는 없는 것으로 입증이 되었고 [41] 산업적인 응용 가능성 보여 주었지만 배양액 내에서 활성적으로 작용하는 항산화 물질 및 폴리페놀 성분에 대한 분리 및 특성 분석은 앞으로 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

4. CONCLUSION

본 연구는 기능이 개선된 *C. lamaritus*의 새로운 품종을 개발하기 위해 화학적 돌연변이원인 EMS를 사용하여 수행되었다. *C. lamaritus*의 원형질체를 나출한 뒤, EMS를 농도별 (0-2%, v/v)로 처리하여, 가장 효과적인 돌연변이체 형성을 보인 0.5%와 1% 처리농도에서 선발된 돌연변이 균주 *C. lamaritus* f1, f2, f3와 모균주인 *C. lamaritus*의 균사체로부터 DNA를 추출하여 부분적 18S ribosomal DNA, ITS1 부위 및 5.8 ribosomal DNA의 염기서열을 규명하였고 Blast 및 clustal 정렬에 의해 균주 간에 많은 부분에서 염기서열의 변화가 일어났으며 Bootstrap 합의계통수와 Neighbor-Joining (NJ) 계통수 분석에 의하면 *C. lamaritus* f3은 변이 분화도가 가장 높아 다른 cluster에 묶여진 것으로 나타났으며 EMS를 처리한 중

들이 모균주와는 다른 cluster를 형성한 것으로 보아 무작위적인 화학적인 돌연변이가 발생한 것으로 보인다. 또한 백색 부후균의 특징인 laccase 활성을 조사한 결과 모균주인 *C. lamaritus* (1.76 unit/mg) 보다 돌연변이 균주인 *C. lamaritus* f2 (1.87 unit/mg)와 *C. lamaritus* f3 (2.49 unit/mg) 균주들의 laccase 활성이 증가한 것으로 나타났다. 항산화활성을 측정 한 결과 독립적인 분계조를 이룬 *C. lamaritus* f3 균주의 활성이 4일째 배양액에서 124.3%로 가장 높은 활성을 나타내었고, 배양기간 동안 일정한 항산화 활성을 보였다. 이상의 연구결과는 EMS가 버섯의 품종계량을 위한 수단이 될 수 있음을 보여주며 성장률, 리그닌 분해효소 및 항산화 활성 등이 크게 증가한 *C. lamaritus* f3 균주 배양액의 활성 성분들을 활용하여 산업적 응용 가능성을 보여준다.

REFERENCES

- Permpornsakul, P., S. Prasongsuk, P. Lotrakul, D. Leigh, D. Y. Kobayashi, S. H. Wu, T. Imai, and H. Punnapayak (2016) Two new records of the resupinate polypore fungi, *Ceriporia cystidiata* and *Macrohyphoria dictyopora* in Thailand. *Sci Asia*. 42: 171-177.
- Dai, Y. C., S. H. Wu, and W. N. Chou (2002) Two new polypores (Basidiomycota) from Taiwan. *Mycotaxon*. 83: 209-216.
- Jia, B. S., L. W. Zhou, B. K. Cui, B. Rivoire, and Y. C. Dai (2014) Taxonomy and phylogeny of *Ceriporia* (Polyporales, Basidiomycota) with an emphasis of Chinese collections. *Mycol. Prog.* 13(1): 81-93.
- Hiroto, S., M. Nitara, K. Shuhei, H. Tsutomu, S. Kokki, and K. Ryuichiro (2003) A new species, *Ceriporia lacerata*, isolated from white-rotted wood. *Mycotaxon*. 86: 335-347.
- Hong, C. Y., K. S. Gwak, S. Y. Lee, S. H. Kim, H. S. Jeong, and I. G. Choi (2001) *Ceriporia* sp. ZLY-2010 in biodegradation of polychlorinated biphenyls: extracellular enzymes production and effects of cytochrome P450 monooxygenase. *Kor. J. Wood Sci Tech.* 39: 469-480.
- Kim, J. E., H. J. Kim, and S. P. Lee (2012) Hyperglycemic effect of submerged culture extract of *Ceriporia lacerata* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Sci Biotechnol.* 21: 1685-1693.
- Shin, E. J., J. E. Kim, J. H. Kim, Y. M. Park, S. K. Yoon, B. C. Jang, et al. (2015) Hypoglycemic effect of submerged culture of *Ceriporia lacerata* mycelium. *Kor. J. Food Preserv.* 22: 145-153.
- Jang, M. R., J. E. Seo, J. H. Lee, M. S. Chung, and G. H. Kim (2010) Antibacterial action against food-borne pathogens by the volatile flavor of essential oil from *Chrysanthemum morifolium* flower. *Kor. J. Food Nutr.* 23: 154-161.
- Tang, Y. J., L. W. Zhu, H. M. Li, and D. S. Li (2007) Submerged culture of mushrooms in bioreactors-challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol. Biotechnol.* 45(3): 221-229.
- Lee, Y. S., J. B. Kim, S. R. Shin, and N. W. Kim (2016) Analysis of nutritional components of *Lepista nuda*. *Kor. J. Food Preserv.* 13: 375-381.
- Shon, M. Y., K. I. Seo, S. Y. Choi, N. J. Sung, S. W. Lee, and S. K.

- Park (2006) Chemical compound and biological activity of *Phellinus baumii*. *Kor. J. Soc Food Sci Nutr.* 35: 524-529.
12. Manjunathan, J. and V. Kaviyarasan (2011) Optimization of mycelia growth and antimicrobial activity of new edible mushroom, *Lentinus tuberregium* (Fr.) Tamil Nadul. *J. India Int Pharm Tech Res.* 3: 497-504.
 13. Song, T. Y. and G. C. Yen (2002) Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J. Agric Food Chem.* 50: 3322-3327.
 14. Jung, J. H., K. E. Lee, and S. Y. Lee (2006) Cultural characteristics and scale-up for submerged cultivation of *Hericium erinaceum* through air-lifted jar fermenter system. *Kor. J. Biotechnol Bioeng.* 21: 103-109.
 15. Park, C. K., Q. Tu, J. H. Cho, K. W. Yu, H. S. Jeong, H. Y. Lee, and J. H. Jeong (2010) Optimum conditions for the culture of *Hericium erinaceum* in a jar fermenter with the addition of ginseng extract in the liquid medium. *Kor. J. Food Sci Technol.* 42: 82-89.
 16. Lee, B. W., G. H. Im, D. W. Kim, K. M. Park, S. H. Son, and T. H. Shon (1993) Cultural characteristics and pilot scale fermentation for the submerged mycelial culture of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Appl Microbiol Biotechnol.* 21: 609-614.
 17. Chang, H. Y., C. Lee, S. W. Choi, and J. W. Yun (2008) Liquid culture condition of *Tremella fuciformis* mycelia. *J. Mushroom Sci.* 6: 27-31.
 18. Parry, M. A., P. J. Madgwick, C. Bayon, K. Tearall, A. Hernandez-Lopez, M. Baudo, et al. (2009) Mutation discovery for crop improvement. *J. Exp Bot.* 60: 2817-2825.
 19. Meinke, D. W., J. M. Cherry, C. Dean, S. D. Rounsley, and M. Koornneef (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science.* 282: 679-682.
 20. Okagaki, R. J., M. G. Neffer, and S. R. Wessler (1991) A deletion common to two independently derived waxy mutations of maize. *Genetics.* 127: 425-431.
 21. Sun, H. R. and M. K. Kim (2014) Protoplast isolation and genetic transformation of *Polyporus brumalis*. *Kor. J. Microbiol.* 50: 372-375.
 22. Lee, J., H. W. Kang, S. W. Kim, C. Y. Lee, and H. S. Ro (2011) Breeding of new strains of mushroom by basidiospore chemical mutagenesis. *Mycobiol.* 39: 272-277.
 23. Lee, S. M. (1988) A rapid high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet Newsl.* 35: 23-24.
 24. Kim, J. B. and D. W. Yu (2014) Genetic variation in mutants induced by gamma Ray in *Hypsizygus marmoreus*. *J. Life Science.* 24: 1174-1179.
 25. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor (1990) *PCR Protocols and Applications : A Laboratory Manual*. 1st ed., pp. 315-322. Academic press, Cambridge, NY, USA.
 26. Swofford, D. L. (2001) PAUP-Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Ver.4.0 b2. Acad Press, Sunderland, MA.
 27. Crowe, J. D. and S. Olsson (2001) Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl Environ Microbiol.* 7: 2088-2094.
 28. Kalmis, E., I. Yasa, F. Kalyoncu, B. Pazarba, and A. Kocyigit (2008) Ligninolytic enzyme activities in mycelium of some wild and commercial mushrooms. *J. Afr Biotechnol.* 7: 4314-4320.
 29. Niku-Paavola, M. L., L. Raaska, and M. Itävaara (1990) Detection of white rot fungi by a non-toxic stain. *Mycol Res.* 94: 27-31.
 30. Jeon, S. M. and K. H. Ka (2014) Mycelial growth and extracellular enzyme activities of wood-decaying mushroom strains on solid media. *Kor. J. Microbiol.* 42: 40-49.
 31. Lee, S. M., J. W. Lee, B. W. Koo, M. K. Kim, D. H. Choi, and I. G. Choi (2007) Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Biotech Bioeng.* 97: 1516-1522.
 32. Emad, A. S. and M. M. S. Sanna (2013) Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *J. Indian Geo-Marine Sciences.* 42: 556-564.
 33. Bahram, B. T., R. P. Hamid, J. M. Matin, and J. Javad (2014) Chemically and physically induced mutagenesis in basidiospores of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. *Int J. of Advanced Res.* 2: 915-921.
 34. Pryor, B. M. and R. L. Gilbertson (2000) Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* 104(11): 1312-1321.
 35. Nilsson, R. H., E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg, and K. H. Larsson (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics.* 4: 193-201.
 36. Sokal, R. R. and C. D. Michener (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ of Kansas Sci Bull.* 38: 1409-1438.
 37. Lim, S. H., A. M. Kwak, G. J. Min, S. S. Kim, S. Y. Lee, and H. W. Kang (2014) Decolorization efficiency of different dyes by extract from spent mushroom substrates of *Pleurotus eryngii*. *Kor. J. Microbiol.* 42: 213-218.
 38. Sadler, M. (2003) Nutritional properties of edible fungi. *Nutr Bull.* 28: 305-308.
 39. Yang, J. H., H. C. Lin, and J. L. Mau (2002) Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.* 77: 229-235.
 40. Ra, K. S. and J. W. Choi (2010) In vitro evaluation for antioxidant activities of culture broth of *Tremella fuciformis*. *KSBB J.* 25: 55-61.
 41. Sega, G. A. (1984) A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Elsevier.* 134: 113-142.