

KAERI/RR-1909/98

최종보고서

62.4837

7373H

GOVP 19917397

방사선 생명과학 기술 개발
Radiation Application for
Development of Bioscience

방사선이용 생물자원 유용화
Radiation Application for
Upgrading of Bioresources

연구기관
한국원자력연구소

과학기술부

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀하

본 보고서를 “방사선 생명과학 기술개발” 과제 (세부과제 “방사선이용 생물자원유용화”)의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 4. .

주관연구기관명	: 한국원자력연구소
주관연구책임자	: 이 영 근
연 구 원	: 이 영 일
연 구 원	: 송 희 섭
연 구 원	: 김 재 성
연 구 원	: 김 진 규
연 구 원	: 천 기 정
연 구 원	: 장 화 형
연 구 원	: 한 갑 진
연 구 원	: 고 동 규

위탁연구기관명	: 배 재 대 학 교
위탁연구책임자	: 이 기 성
연 구 원	: 김 수 기
연 구 원	: 이 성 호
연 구 원	: 이 정 숙

여 백

요 약 문

I. 제 목

방사선이용 생물자원유통화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

세계적으로 많은 농림산 부산물, 목재 및 해양부산물이 무용하게 버려지거나 미이용되고 있어서 환경오염 문제가 대두되고, 인구증가에 따른 에너지 고갈 가능성이 절실하여서 생물폐자원의 재이용 연구가 요구되며, 방사선의 유익한 이용연구가 대국민 원자력의 평화적이용 홍보에 필수적이다.

○방사선이용 생물자원 이용성 제고

- : 무한한 생물폐자원이 대량 산재해 있어서 이의 유효 이용기술 연구의 유익함이 인정되고 있는 바 방사선에 의한 돌연변이를 통해 유망 분해균주 개발기술 확보 및 방사선을 이용한 청정사료화 기술연구가 필요함
- : 자연방치되는 생물폐자원을 이용함으로써 생산원가를 절감할 수 있으며, 농가의 소득확대 및 방사선기술을 도입함으로써 공정의 간소화가 유도되면 산업화 가능.

○방사선이용 산업미생물 확보 및 이용

- : 급속한 인구증가, 고도의 산업화에 따른 환경오염의 결과 공중보건

여건이 심각하게 악화되고 있어서, 신기능성 미생물 부산물을 개발함으로써 질병의 예방 및 치료를 통한 삶의 질 향상이 요구됨
 고부가가치의 신기능성 미생물 또는 부산물을 창출해냄으로써 수입대체/외화획득 및 중소기업의 성장가능성 용이
 화학산업의 기반물질 확보를 위한 최적 생물반응기 개발을 위해 방사선이용 돌연변이 유기 등을 통한 각 단계의 효소 생산균주 개발이 요구됨.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 생물자원의 방사선조사 공정 확립
 - : 생물자원에 오염된 미생물을 조사하고 방사선멸균선량을 결정
2. 생물자원 분해균주, 균이주 확보
 - : 저선량 방사선은 물론 치사량 직전의 선량 범위내에서 돌연변이를 유도하여 새로운 특성의 생물자원 분해균주를 탐색하였고, 각종 배지에서의 성장특성, 유적적 변이도 그리고 동위효소 생성능의 차이 등의 생리.생화학적 검증 실험을 하였으며, 돌연변이 유발이 가능한 최적 방사선 조사선량 선정
3. 생물자원의 방사선분해 특성연구
 - : 광학현미경 및 전자현미경 관찰을 통한 생물자원의 형태적 성상을 관찰하고, 함수율, 함수능, 미생물배양용 배지의 조성 변화, TGA 분석을 통한 화학적, 물리적 특성 파악
4. 유용균이주 발효부산물의 기능성연구
 - : 폐생물자원 발효부산물로부터의 생물활성 물질의 추출 연구
5. 생물자원이용 사료화 탐색
 - : 생물폐자원을 이용한 발효부산물의 사료화 가능성 조사

6. 방사선 및 산업미생물 병용 리그닌 분해 및 응용기술
: 자연환경으로부터 그리고 방사선이용 균주육종을 통한 리그닌 분해
우량 균주 발굴 및 이용
7. 헤미셀룰로오스 분해균주 발굴 및 이용기술
: 방사선이용 균이주육종을 통한 5탄당 분해 우량균주 선발 및 이용
8. 항진균성 및 질소고정성 균주 개발
: 자연환경으로부터 그리고 방사선이용 균주육종을 통한 균주 개발

IV. 연구개발결과

1. 생물자원의 방사선조사 공정 확립
: 총중속영양세균수는 톱밥의 경우 5.2×10^5 로 벚짚 3.7×10^8 , 왕겨 3.1×10^7 , 옥수수대 1.7×10^7 cfu/g으로 나타났으며, 30 kGy의 방사선을 조사 후 살균되었다. *Salmonella* 및 *Shigella* 속의 미생물을 포함한 중속영양세균류는 20 kGy의 방사선량으로 살균이 가능한 반면, 진균류 등은 30 kGy의 방사선을 조사하여야만 완전히 살균되었다. 실험선량과 이론선량을 고려해서 결정한 적정 멸균선량은 벚짚, 옥수수대, 왕겨, 톱밥 각각 17.7, 17.6, 15.6 그리고 20.0 kGy였다.
2. 생물자원 분해균주, 균이주 확보
: 2개의 기질 및 8종의 백색부후균을 실험한 결과 *Pleurotus sajor-caju*가 분해능이 가장 높게 나타났다. 담자포자로부터 방사선에 조사에 의해 유도된 PO-2KG-1, PO-2KG-2 그리고 PO-20KG가 분해능이 높은 *Pleurotus ostreatus*의 변이주로 확보되었다.

3. 생물자원의 방사선분해 특성연구

: 옥수수대, 왕겨 및 톱밥 모두 방사선 조사후의 흡수성이 조사전보다 떨어지는 경향을 보였다. 톱밥을 제외한 벧짚, 옥수수대 및 왕겨의 구조는 500 kGy를 조사하였을 때부터 변성이 조짐이 보이기 시작하였다. 각 시료 공히 1 MGy 및 2 MGy의 방사선을 조사하였을 때 구조의 견고성(결정성 및 중합성)이 감소되었다. 활성화에너지를 구한 결과, 113℃-127℃에서 흡열반응의 peak가 나타났다.

4. 유용균이주 발효부산물물의 기능성연구

: 알콜추출분획(70.3%) 및 DMSO분획물(78.5%)은 자실체 추출분획(86.4%)보다는 약했지만 매우 좋은 항종양성을 나타내었다. 콩의 자엽실험에서는 모든 추출물이 식물체로 하여금 병원성 감염을 방지할 수 있는 glyceollin 유도성을 갖고 있었다. 또한, IAA 유도 줄기성장 실험결과 IAA와 추출물간의 유도 상승효과가 있는 것으로 평가되었다.

5. 생물자원이용 사료화 탐색

: 조단백질함량은 모든균(P02, P03-1, P03-2)에서 대조균(50mg/g)에 비해 높았으며, 조지방은 큰 변화를 보이지 않았고, 탄수화물의 경우 P02 및 P03-1에서 58mg/g 및 62mg/g으로 높게 나타났다. 특히 P02의 경우 필수아미노산량이 고루 증가하였다. Branch amino acid 인 Ile, Leu 및 Val은 대조균에 비해 거의 모든 방사선유기균이 25% 이상 증가하였다. 무기질의 경우도 방사선유기균에서 Ca, P, Fe, Mg, S 및 Zn 함량이 대조균에 비해 높게 나타났다. Vitamin B₂의 경우 P02 및 P03-1 균주에서 높은 함량을 나타내었다.

6. 방사선 및 산업미생물 병용 리그닌 분해 및 응용기술

: 리그닌 분해능이 높은 5개의 균주를 선별하였다. 세 변이주 (P0-5, P0-6, 그리고 P0-14)는 대조군에 대해 각각 93%, 91%과 73%의 유전 유사도를 보였다. 두 변이주(P0-15와 P0-16)에서는 유전유사도가 P0-14에 대해선 각각 91%와 82%를 보였으며 대조군에 대해서는 77%와 64%에 불과하였다. P0-5 및 P0-6의 33번째 염기서열인 C가 P0-14, P0-15 및 P0-16에서는 T로 변화되었음을 알 수 있었다.

7. 헤미셀룰로오스 분해균주 발굴 및 이용기술

: 총 16 종의 검색한 균주에서 균사생장속도가 대조군의 120% 이상인 균주는 7 종이였고, 5탄당기질 분해효소 활성도(endo-1,4- β -xylanase)가 대조군의 200%에 이르는 4 종의 균주 (P0-1-6, P0-1.5-7, P0-2-14, P0-2-14-1)를 발굴하였다.

8. 항진균성 및 질소고정성 균주 개발

: 11개의 새로운 항진균활성세균을 최종적으로 추가 선별하였다. 선별한 질소고정균주가 *Rhizobium loti*와 *R. japonicum*으로 확인되었다. 균주들 중 대부분이 여러 종류의 농약에 대하여 저항성을 갖는 반면 분해능에 있어서는 균주별, 농약별로 차이를 나타내었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 방사선이용 섬유소 분해성, 리그닌분해성, 5탄당 분해성, 항진균성, 질소고정성 균주 등 산업적 유용균주의 개발로 생물폐자원 재이용에 응용이 가능하고, 환경오염 저감화 효과와 아울러 축산폐자원, 해양 폐자원 등 여타의 생물자원 재활용에 관한 연구에의 활용이 기대됨.
2. 방사선 돌연변이 유기 기술의 정착화로 유기 미생물에 대한 생리적, 유전학적 분석에 대한 연구가 동반되면 각종 유용균주의 기탁 및 특허출원이 가능하여 다수의 지적재산권을 보유하게 될 것임.
3. 발효부산물로부터의 항돌연변이성 및 식물성장촉진성 물질을 확인하였는 바, 방사선개질 기술개발과 아울러 이들을 분리, 정제, 제재화 하는 연구가 수행된다면 국민보건 향상 및 수입대체 효과가 기대되며, 또한 발효부산물의 사료화에 대해서는 가축사육 등을 통한 실질적인 연구를 수행하여 실용화에 박차를 가할 필요가 있음.
4. 미생물에 대한 방사선 돌연변이 유기기술은 환경오염 제거용·순화용, 식품·의약품, 각종 화학 기반물질을 생산해 내는 산업용 등의 미생물 개발 및 미생물제재 개발 연구에 많이 이용될 수 있을 것으로 사료됨.

S U M M A R Y

I. Title

Radiation application for upgrading of bioresources

II. Objectives

The productivity of lignocellulosic biowastes is greatly expanded along the technical improvement of agricultural industry all over the world. One of the useful methods for reusing biowastes is the cultivation of edible mushrooms. Edible mushroom could convert lignocellulosic biowastes to fruiting body which have definite nutritive and medicinal values. The bioconversion products of inedible biowastes by edible mushroom could be also useful as animal feed. Among hemicellulose, cellulose, and lignin fractions of biowastes, the lignin is the most difficult fraction to be degraded by mushroom. Thus, it is necessary to induce and/or isolate the improved strains of edible mushroom with more highly lignocellulolytic activity.

III. Scopes

1. Radiation processing for bioresources

- : Determination of the bioburdens contaminated in bioresources and optimal radiation sterilization dose
- 2. Microorganisms involved in degradation of cellulosic biowastes
 - : Searched the most feasible white-rotting fungi for the degradation of biowastes and analysed the physiological and genetical characteristics of the variants.
- 3. Radiation degradation of biowastes
 - : Morphological and physical characteristics of cellulosic biowastes were observed by the scanning electron microscopy and the TGA analysis.
- 4. Bioactive function of the fermentation byproducts using the mutants induced by radiation.
- 5. Feasibility of fermentation byproducts as a animal feed
- 6. Lignin degradation and its applicability
- 7. Hemicellulose degradation and its applicability
- 8. Isolation of antifungal and nitrogen-fixating microorganisms

IV. Results

- 1. Radiation processing for bioresources
 - : Determination of the bioburdens contaminated in bioresources and optimal radiation sterilization dose
- 2. Microorganisms involved in degradation of cellulosic biowastes
 - : *Pleurotus sajor-caju* showed the highest degradability of 2 biowastes among the observed 8 white-rotting fungi. The variants of PO-2KG-1, PO-2KG-2 그리고 PO-20KG2 were induced

from *Pleurotus ostreatus* by γ -ray radiation as highly cellulolytic fungi.

3. Radiation degradation of biowastes

: The water holding capacity of corn stover, chaff, and sawdust tended to decrease after irradiation. The three dimensional structure of corn stover, rice straw, and chaff except saw dust tended to change after 500 kGy irradiation from the SEM observation. From the activation analysis(TGA), heat absorption reaction was found at the temperature range of 113°C -127°C.

4. Bioactive function of the fermentation byproducts

: The antimutagenicity of alcohol(78.5%) and DMSO fraction (86.4%) of the fermentation extracts was promisingly acceptable even though it was less than that of the extracts of fruiting body(86.4%). In the cotyledon assay, all samples were able to induce the production of glyceollin and the synergistic effect administered together with IAA.

5. Feasibility of fermentation byproducts as a animal feed

: The protein concentration of all variants(P02, P03-1, P03-2) was higher than the control(50mg/g) and the carbohydrate concentration and the trace elements of Ca, P, Fe, Mg, S, and Zn did. Especially in P02, the concentration of essential amino acid was high.

6. Lignin degradation and its applicability

: Five mutants that were highly capable of lignin degradation were isolated after the γ -ray irradiation, the genetic

similarities of PO-5, PO-6, and PO-14 to the control were 93%, 91%, and 73%, respectively. Especially, the thirty third base of PO-14, PO-15, and PO-16 was changed from C to T.

7. Hemicellulose degradation and its applicability

: Among the 16 investigated strains, PO-1-6, PO-1.5-7, PO-2-14, and PO-2-14-1 showed 200% high xylan degradability compared to the control.

8. Isolation of antifungal and nitrogen-fixating microorganisms

: Eleven antifungal microorganisms were newly isolated. *Rhizobium loti* and *R. japonicum* were identified as nitrogen-fixating organisms. They, in general, had a tendency to grow against pesticides but had different degradabilities.

V. Recommendations

1. The radiation application techniques hereby researched are expected to be useful promisingly for the development of the industrially favorable microorganisms and the related studies.
2. The mutation induction technology by radiation could be well supported by the physiological and genetical analyses in order to meet the standardization of patents and the related.
3. From the results of the antimutagenicity and growth promoting of plant, supposed that the related isolation and purification were studied, it could improve the public health and so on.

From the results of the usage of fermentation byproducts as animal feed could be promising followed by the practical application studies.

4. The mutation induction technology of microorganism by radiation could be applied helpfully for the bioremediation of environmental pollution and the production of environment-friendly goods.

여 백

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	23
section 1 Objectives	23
section 2 Economic, social and technical importance	24
section 3 Scopes	25
Chapter 2 Achievements of the study	27
section 1 Foreign achievements	27
section 2 Domestic achievements	32
section 3 Evaluation of the researches	36
Chapter 3 Contents and results	41
section 1 Radiation processing for bioresources	41
1. Background	41
2. Materials and methods	41
2-1) Determination of microbial bioburden	41
2-2) Determination of radiation sterilization dose	42
3. Results and discussion	43
3-1) Determination of microbial bioburden	43
3-2) Determination of radiation sterilization dose	50
section 2 Survey of cellulolytic microorganisms	53
1. Background	53
2. Materials and methods	55
2-1) Isolation of cellulolytic microbes	55
2-2) Formation of mutants	56

2-3) Protein profile analysis	58
2-4) RAPD patterns of variants	60
3. Results and discussion	62
3-1) Isolation of cellulolytic microbes	62
3-2) Formation of mutants	62
3-3) Protein profile analysis	69
3-4) RAPD patterns of variants	70
section 3 Radiation degradation of biowastes	75
1. Background	75
2. Materials and methods	75
2-1) Physical degradation	75
2-2) Morphological characteristics	76
3. Results and discussion	76
3-1) Physical degradation	76
3-2) Morphological characteristics	83
section 4 Bioactive function of byproducts	89
1. Background	89
2. Materials and methods	89
2-1) Antimutagenicity test	89
2-2) Glyceollin analysis	90
2-3) Stem elongation test	90
3. Results and discussion	90
3-1) Antimutagenicity	90
3-2) Glyceollin promotion	92
3-3) Improvement of pea stem elongation	92
section 5 Fermentation products as a animal feed	97

1. Background	97
2. Materials and methods	98
2-1) Nutrient value analysis	98
2-2) Trace mineral determination	99
2-3) Vitamin analysis	99
3. Results and discussion	100
3-1) High nutrient value in byproducts	100
3-2) Trace elements	100
3-3) Vitamin content	100
section 6 Lignin degradation and its applicability	105
1. Background	105
2. Materials and methods	107
2-1) Ligninolytic ability and mycellium growth	107
2-2) RAPD patterns of variants	107
2-3) ITS2 sequence analysis	109
3. Results and discussion	109
3-1) Ligninolytic ability and mycellium growth	109
3-2) RAPD patterns of variants	111
3-3) Different ITS2 sequence	114
section 7 Hemicellulose degradation and its applicability	116
1. Background	116
2. Materials and methods	116
2-1) Isolation of xylanolytic variants	116
2-2) Determination of xylanase activity	116
2-3) Extracellular enzyme activity analysis	117
3. Results and discussion	120

3-1) Isolation of xylanolytic variants	120
3-2) Extracellular enzyme activity	123
section 8 Isolation of antifungal and nitrogen-fixating microbes	125
1. Background	125
2. Materials and methods	126
2-1) Isolation of antifungal microbes	126
2-2) Isolation of nitrogen-fixating microbes	126
2-3) Antipesticial activity	126
3. Results and discussion	127
3-1) Antifungal microbes	127
3-2) Nitrogen-fixating microbes	128
3-3) Antipesticial activity	128
Chapter 4 Evaluation of the present research	133
Chapter 5 Future prospect and recommendations	135
Chapter 6 References	137

목 차

제 1 장 서 론	23
제 1 절 연구개발의 목적	23
제 2 절 연구개발의 필요성	24
제 3 절 연구개발의 범위	25
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	27
제 1 절 외국의 경우	27
제 2 절 국내의 경우	32
제 3 절 조사연구개발사례에 대한 평가	36
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	41
제 1 절 생물자원의 방사선조사 공정 확립	41
1. 연구 배경	41
2. 재료 및 방법	41
가. 미생물오염도 측정	41
나. 방사선멸균 선량 결정	42
3. 결과 및 고찰	43
가. 미생물오염도 측정	43
나. 방사선멸균 선량 결정	50
제 2 절 생물자원 분해균주, 균이주 확보	53
1. 연구 배경	53
2. 재료 및 방법	55
가. 생물자원 분해균주 탐색	55
나. 돌연변이체 확보	56
다. 세포외 단백질의 양상비교	58
라. 변이주의 RAPD 양상 조사	60

3. 결과 및 고찰	62
가. 생물자원 분해균주 탐색	62
나. 돌연변이체 확보	62
다. 세포외 단백질의 양상	69
라. 변이주의 RAPD 양상 조사	70
제 3 절 생물자원의 방사선분해 특성연구	75
1. 연구 배경	75
2. 재료 및 방법	75
가. 물리적 풍화 특성	75
나. 형태적 특성	76
3. 결과 및 고찰	76
가. 물리적 풍화 특성	76
나. 형태적 특성	83
제 4 절 유용균이주 발효부산물물의 기능성연구	89
1. 연구 배경	89
2. 재료 및 방법	89
가. 항돌연변이성 평가	89
나. 항진균성 glyceollin 생성 제고능 분석	90
다. 완두의 줄기생장 촉진 활성 검사	90
3. 결과 및 고찰	90
가. 항돌연변이성 평가	90
나. 항진균성 glyceollin 생성 제고능 분석	92
다. 완두의 줄기생장 촉진 활성 검사	92
제 5 절 생물자원이용 사료화 탐색	97
1. 연구 배경	97
2. 재료 및 방법	98

가. 발효부산물내의 영양성분 검사	98
나. 무기질 분석	99
다. 비타민 분석	99
3. 결과 및 고찰	100
가. 발효부산물내의 영양성분 검사	100
나. 무기질 함량	100
다. 비타민 함량	100
제 6 절 방사선 및 산업미생물 병용 리그닌분해 및 응용기술	105
1. 연구 배경	105
2. 재료 및 방법	107
가. 리그닌분해능 및 균사체 성장특성 조사	107
나. 변이주의 RAPD 양상 조사	107
다. 변이주의 ITS2 염기서열 결정	109
3. 결과 및 고찰	109
가. 리그닌분해능 및 균사체 성장특성 조사	109
나. 변이주의 RAPD 양상 조사	111
다. 변이주의 ITS2 염기서열 결정	114
제 7 절 헤미셀룰로오스 분해균주 발굴 및 이용기술	116
1. 연구 배경	116
2. 재료 및 방법	116
가. 5탄당 분해 우량균주 선발	116
나. xylanase 활성 측정	116
다. 세포외 효소활성도 측정	117
3. 결과 및 고찰	120
가. 5탄당 분해 우량균주 선발	120
나. 세포외 효소활성도	123

제 8 절 항진균성 및 질소고정성 균주 개발 (위탁연구)	125
1. 연구 배경	125
2. 재료 및 방법	126
가. 항진균활성세균 선별	126
나. 질소고정균주 선별	126
다. 항진균활성세균의 농약저항성 분석	126
3. 결과 및 고찰	127
가. 항진균활성세균 선별	127
나. 질소고정균주 선별	128
다. 항진균활성세균의 농약저항성 분석	128
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	133
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	135
제 6 장 참고문헌	137

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

오늘날 세계 에너지 소비의 주종을 이루고 있는 석유, 석탄, 천연 가스 등 화석연료 자원은 재생산성이 없기 때문에 새로운 대체자원의 개발이 절실히 요청되고 있다. 재생산이 가능하고 그 축적량이 많은 섬유질 생물자원이 금후의 유용한 대체에너지 자원으로서 가장 적당한 것으로 평가되고 있다. 따라서 이들을 이용하여 편리한 형태의 에너지, 공업원료 등을 얻고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다.

섬유질 생물자원은 천연에서 가장 다량으로 존재하며 재생산이 가능한 유기화합물로 2차에 걸친 석유위기 이후 석유를 대체하는 공업원료로서 선진 각국에서도 주목되어 왔다. 섬유질 생물자원은 90% 이상이 cellulose, hemicellulose 및 lignin으로 구성되어 있어서 불용성일 뿐만아니라 효소분해를 받기 어려운 결정구조로 존재하여 그 분해속도가 느리고 또한 분해율도 낮아 이에 대한 개선이 요구되고 있다. 섬유소는 glucose, ethanol을 거쳐 석유화학공업의 주원료인 ethylene으로 전환이 가능하며, D-glucose잔기가 β -1,4 결합한 직쇄상 고분자이기 때문에, 일반적인 합성고분자는 물론 α -1,4 직쇄구조인 amylose 및 전분(starch)와는 상이한 입체규칙성고분자의 구조를 가지고 있다. 또한, 결정구조 부분과 섬유소의 효소분해는 섬유소의 구조적 양상에 크게 좌우되며, 리그닌과의 결합부분도 있기 때문에 화학반응도 불균일하다. 원료의 반응조건에 따라 hemicellulose를 제거한 순수 섬유질의 경우 생성물질이 다양하기 때문에 효소분해에 미치는 영향도 다르다 (배 등, 1989 ; 손 등, 1991 ; 하 등, 1991). 이와 같이 섬유소의 분해는 그 구

조적 양상에 크게 좌우되므로 분해를 촉진시키기 위해서는 적절한 전처리방법으로 섬유소의 구조를 변형시켜야한다. 이상적인 전처리 방법은 섬유소의 결정구조를 파괴함과 동시에 섬유소입자의 표면사이에 접촉이 원활히 일어날 수 있도록 섬유소 입자의 가용표면적을 증대시키는 이중 효과를 갖는 것이 바람직하다. 최근의 여러 연구에서 방사선처리기술을 도입하고 있는 데 위와 같은 난점을 해소할 수 있는 가능성을 시사해 주고 있다. 산업적인 이용도를 제고하기 위하여서는 균류의 섬유소분해 효소에 의한 생물변환과 관련된 기초적인 기작을 이해하는 게 필수이기 때문에 최근 10-15년간 많은 연구가 되어 왔고 연구의 진척이 있었으나 아직까지도 그 반응기작이 확립되지 못하였기 때문에 더 많은 연구가 필요하다. 본연구소에서는 그간 천연물질 혹은 한방약재 등으로부터 면역활성을 띠는 생물질개발에 관한 연구를 수행해 왔다. 이러한 기술을 바탕으로 균이의 균사체 또는 폐배지를 이용한 발효대사산물로부터의 신기능성 생물산물 발굴 가능성은 높다고 하겠다. 추출, 분리, 정제된 물질에 대한 방사선작용기작 연구에 대한 기초기술을 보유하고 있고, 본연구실 및 원자력병원 등에서 각종 생체적합성검사, 임상검사 등의 기술이 축적되어 있기 때문에 방사선이용 인위적 개질 혹은 고정화 등을 통한 생물질의 생산실용화가 가능할 것이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

기술적인 측면에서, 무한한 생물폐자원이 대량 산재해 있어서 이의 유효 이용기술 연구의 유익함이 인정되고 있는 바 방사선에 의한 돌연변이를 통해 유망 분해균주 개발기술 확보 및 방사선을 이용한 청정사료화 기술연구가 필요하다. 생물폐자원으로부터의 신기능성 생물산물을 확보하기 위해 방사선을 이용한 최적생산균주를 개발해야 하고 그 기능

성을 향상시키기 위한 방사선이용 구조 개질 기술이 요망된다. 화학산업의 기반물질 확보를 위한 최적 생물반응기 개발을 위해 방사선이용 돌연변이 유기 등을 통한 각 단계의 효소 생산균주 개발이 요구된다.

경제적·산업적인 측면에서, 자연방치되는 생물폐자원을 이용함으로써 생산원가를 절감할 수 있으며, 농가의 소득확대 및 방사선기술을 도입함으로써 공정의 간소화가 유도되면 산업화 가능하다. 고부가가치의 신기능성 생물산물을 창출해냄으로써 수입대체·외화획득 및 중소기업의 성장가능성이 용이하다. 화학산업의 기반물질을 확보하게 되어 에너지 고갈에 대비할 수 있으며 관련산업의 성장촉진이 필요하다.

사회·문화적인 측면에서, 세계적으로 많은 농림산 부산물, 목재 및 해양부산물이 무용하게 버려지거나 미이용되고 있어서 환경오염 문제가 대두되고, 인구증가에 따른 에너지 고갈 가능성이 절실하여서 생물폐자원의 재이용 연구가 요구되며, 방사선의 유익한 이용연구가 대국민 원자력의 평화적이용 홍보에 필수적이다. 급속한 인구증가, 고도의 산업화에 따른 환경오염의 결과 공중보건 여건이 심각하게 악화되고 있어서, 신기능성 생물산물을 개발함으로써 질병의 예방 및 치료를 통한 삶의 질 향상이 요구된다. 에너지 고갈이 임박한 추세이므로 무한한 자원인 생물폐자원을 이용 대체에너지 생산이 시급히 요구되며 방사선의 유익한 이용연구가 요망된다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 생물자원의 방사선조사 공정 확립

: 생물자원에 오염된 미생물을 조사하고 방사선멸균선량을 결정

2. 생물자원 분해균주, 균이주 확보

: 저선량 방사선은 물론 치사량 직전의 선량 범위내에서 돌연변이를

유도하여 새로운 특성의 생물자원 분해균주를 탐색하였고, 각종 배지에서 성장특성, 유적적 변이도 그리고 동위효소 생성능의 차이 등의 생리.생화학적 검증 실험을 하였으며, 돌연변이 유발이 가능한 최적 방사선 조사선량 선정

3. 생물자원의 방사선분해 특성연구

: 광학현미경 및 전자현미경 관찰을 통한 생물자원의 형태적 성상을 관찰하고, 함수율, 함수능, 미생물배양용 배지의 조성 변화, TGA 분석을 통한 화학적, 물리적 특성 파악

4. 유용균이주 발효부산물의 기능성연구

: 폐생물자원 발효부산물로부터의 생물활성 물질의 추출 연구

5. 생물자원이용 사료화 탐색

: 생물폐자원을 이용한 발효부산물의 사료화 가능성 조사

6. 방사선 및 산업미생물 병용 리그닌 분해 및 응용기술

: 자연환경으로부터 그리고 방사선이용 균주육종을 통한 리그닌 분해 우량 균주 발굴 및 이용

7. 헤미셀룰로오스 분해균주 발굴 및 이용기술

: 방사선이용 균주육종을 통한 5탄당 분해 우량균주 선발 및 이용

8. 항진균성 및 질소고정성 균주 개발

: 자연환경으로부터 그리고 방사선이용 균주육종을 통한 균주 개발

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

제 1 절 외국의 경우

1. 섬유소·리그닌 분해 기술 :

섬유질 생물자원을 구성하는 자원은 섬유소 및 hemicellulose가 lignin에 의해 단단하게 보호되어 있다. 즉, 이러한 섬유질의 구조적 특성은 효소의 가수분해를 조정하는 데 있어서 가장 중요한 요소로 작용된다. 따라서 가수분해 효율을 향상시키기 위한 적절한 전처리를 함으로써 사료화, 당화, 알콜발효, 펄프화 및 화학공업 원료로의 이용이 가능할 것으로 알려져 있다. 물리적(Ball milling, Two roll milling, Hammer milling, Vibratory rod milling, Colloid milling, Extrusion), 화학적(Phosphoric acid, Ammonia, Sodium hydroxide, Sulfur dioxide, Fe^{-2} / H_2O_2 , Cadoxen), 생물학적(White rot fungi), 조합법(Steam explosion, High-temperature milling, Alkali + ball milling, SO_2 + steaming, NO_2 + irradiation, Biomechanical pulping) 등의 각종 전처리법이 연구되고 있다(Macdonald *et al.*, 1983 ; Gharpuray *et al.*, 1983 ; Canale-parola *et al.*, 1988).

자연상태에서의 섬유소 분해균주의 탐색, 분리 및 동정 기술은 어느 정도의 기초연구가 수행되고 있는 연구실에서는 거의 대부분 가능한 상태이다. 그러나 그 분리 및 동정방법에 있어서 여러 학자들에 의해 많은 논란이 되고 있으며, 세균 및 진균의 경우 또한 섬유소분해효소의 특성이 서로 다르기 때문에 새롭게 진보된 방법을 탐구하고 있는 상태이다. 그러나 아직도 20-30년 전에 개발된 환원당 검출법, 섬유소분해 효소 검지법 등이 사용되고 있고, 또한 각종 기질에 따른 효소의 기질 특이성이 잘 고려되지 않은 방법이기 때문에 이 분야의 새로운 기술을

확립해야 할 필요가 있다. 그리고 섬유소분해효소복합체의 구성효소들이 어떻게 생성되며, 어떤 상호작용을 하는 지, 그리고 어떠한 요소가 이들의 작용을 조절하는 인자인 지 등에 대한 적절한 연구방법 역시 미비한 상태이다.

생물자원의 생물전환 공정에 가장 큰 장애물은 섬유질 물질을 oligosaccharide 또는 단당류로 분해시키는 효소의 생산 단가가 높은 것에 있다. 따라서 자연계로부터 효소를 분비하는 미생물을 탐색하여 강력하고 저렴한 섬유소 및 hemicellulose 분해효소의 생산균을 개발하는 것이 중요하다. 자연계에서는 강력한 분해효소 생성균이 있어도 섬유소와 hemicellulose 당화를 목표로 하는 데에는 생산능에 있어서 크게 부족하므로 육종에 의하여 생산능을 크게 향상시키려는 연구를 하고 있다. 아직까지는 우량균주를 육종했다는 보고는 미미하지만 잠재력이 아주 큰 protoplast fusion이나 유전자 조작에 의해 효소 고생산균주를 육종하거나, 분해가 어려운 lignin 분해균주를 자연계에서 선별해내야 하는 실정이다. 미생물이 분비하는 섬유소분해효소(cellulase)는 크게 3종류로 대별된다(Grous *et al.*, 1985). 1) EC.3.2.1.91 : β -1,4-glucan cellobiohydrolase, Avicelase, cellobiohydrolase, 2) EC.3.2.1.4 : β -1,4-glucan glucanohydrolase, Carboxymethyl cellulase (CMCase), endo-1,4-glucanase, 3) EC.3.2.1.21 : β -glucoside glucohydrolase, Cellobiase. 이들 세 가지의 복합효소중 β -1,4-glucan glucanohydrolases가 섬유소의 비결정형 부위에 작용하게 되어 비교적 저분자의 cellulose chains이 생겨나게 되는 데 이와 더불어 β -1,4-glucan cellobiohydrolase가 뒤이어 작용하여 cellobiose 및 단당류로 분리되고 최종적으로 β -glucosidase가 작용하여 glucose로 가수분해되는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 섬유소 분해성 미생물들은 다음과 같다.

Acetovibrio cellolyticus, *Aspergillus spp.*, *Cellovibrio gilvus*,
Chaetium thermophile, *Cellulomonas spp.*, *Penicillium pusillum*,
Clostridium thermocellulum, *Trichoderma viride*, *Pseudomonas*
fluorescans, *Trichoderma reesei*, *Thermonospora curvata*,
Sporotrichum thermophile, *Thermonospora fusca*, *Fusarium roseum*,
Streptomyces flavogriseus, *Sacchromyces lactis*, *Bacillus spp.*,
Alcaligenes faecalis

Lignin을 분해하는 진균류로는 담자균류의 백색부후균(white rot fungi)이 있다. 여기에 속하는 균류는 lignin 뿐만 아니라 섬유소 및 hemicellulose 도 잘 분해한다. 대표적인 종으로는 *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus versicolor*가 있다. 이들은 배지조성 및 배지내 산소농도, 보조기질의 종류, 산성도 등에 영향을 받아 lignin 분해정도를 달리한다. 이 중에서 *P. chrysosporium*은 lignin을 완전히 산화시켜 이산화탄소를 생성하는 종으로서 가장 많은 연구가 되어 왔다 (Lagrinini, 1990). 이 균주는 peroxidase 및 glucose oxidase를 분비하는 데 이들은 각각 lignin의 주된 결합을 산화시키고, 과산화수소 (H_2O_2)를 공급한다. 또한 이와 다른 분해효소인 laccase를 생산하는 *Polyporus versicolor*는 cellobiose(quinone oxidoreductase)를 분비한다. 그러나 세균류에서는 lignin을 분해하는 종이 거의 보고된 적이 없다.

2. 방사선이용 기술 :

섬유질 생물자원의 분해에 대한 많은 연구가 되어 왔는데 특히, 2차 세계 대전 후 산을 이용한 연구가 활발하였다. 그러나 고온, 고압이 필요하며 발효에 있어서 바람직하지 못한 순도를 나타내기 때문에 많은 결점이 있는 방법으로 판명되었다. 방사선을 이용한 섬유질 생물자원

의 분해는 다음과 같은 여러 가지 장점을 지니고 있다(Tanaka *et al.*, 1979 ; Kaetsu *et al.*, 1981 ; Kojima *et al.*, 1983). 1) 중합도 감소, 2) 결정도의 감소, 3) 분해산물 생성(reduced sugar, gases), 4) 물리적 강도의 감소 5) 용해성 성분의 증가 등이다. 공기중에서 톱밥(saw dust)을 방사선조사한 결과 조사선량의 증가에 따라 잘게 부서지는 성질이 향상되었다. 방사선조사한 왕겨(chaff)도 같은 크기의 대조군보다 훨씬 더 빨리 당화되었으며(saccharification), 약 70%가 glucose화되었다(Kume, 1991). 이는 방사선조사로 인하여 왕겨내의 분자가 분해되었거나 결정구조가 파괴된 결과라 여겨지고 있다. 볏짚(rice straw) 및 폐지(waste papers) 등도 유사한 결과를 보였다.

방사성동위원소를 이용해야 하는 특수성 때문에 소수의 선진국에 국한되어 섬유질 생물자원에 대한 방사선전처리법이 연구되고 있다. 따라서 자연히 투입되는 연구인력이 상대적으로 부족한 관계로 이분야의 연구기술은 그다지 높은 수준이 아니다. 우선 위의 연구를 수행하려면 방사선조사시설이 있어야 하며, 방사선조사공정에 대한 기초기술이 확보되어 있어야 하고, 섬유질 생물자원에 대한 효소 가수분해율을 향상시키기 위해서는 100kGy 이상의 고선량 하에서 조사해야만 하는 단점이 있는 데 이를 극복할 수 있는 특별한 기술이 아직까지는 개발되지 못하고 있는 수준이다.

일본에서 주축이 되고 말레이시아와 협력하여 야자수의 기름을 짜고 난 찌꺼기를 이용한 동물사료화에 관한 연구가 추진되고 있다. 2-3cm의 크기로 잘게 자른 후 미량원소가 함유되어 있는 미강, 밀기울 등을 첨가한 후, 자연오염되어 있는 미생물을 감마선 혹은 전자선가속기를 이용하여 살균시킨다. 균이 및 각종 유용 사상균류를 접종한 후 섬유질 자연자원을 탄소원으로, 공기중의 무기질소로부터 각종 아미노산을 생성할 수 있어서 균체의 단백질이 풍부한 사료를 얻어내려는 연

구가 진행되고 있다. 실제로 1996년 7월에는 소규모 시범시설을 가동하기 시작했다. 이와 관련하여 IAEA/UNDP/RCA 과제를 추진중에 있는 상태이다.

3. 균이로부터 생물활성물질 추출 :

최근 일본에서는 시즈오카대학 농예화학과 교수였던 미즈노 다카시 교수를 중심으로, 담자균류의 자실체로부터 동물에 이식한 암의 활동을 현저히 억제시킬 수 있는 다당류의 일종인 β -D-glucan을 분리해냄으로써 화제가 되고 있다. 이는 특히 숙주자체의 면역기능을 활성화시키는 제암기능을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 기존의 화학요법이 부작용이 많은 반면 작용경로가 상이함으로 인해 많은 양을 이용해도 무방하며, 암의 예방은 물론 치료가 가능하며, 암의 전이를 방해하고, 재발성이 없는 면역요법인 것으로 알려지고 있다. 그러나 균사체 및 폐배지로부터의 생물질추출 연구는 시도된 바 없다. 천연자원으로부터 새로운 기능을 갖는 생물질을 개발하기 위해 필요한 각종 분리, 추출, 정제 기술수준은 거의 정착된 단계이다. 또한 이들의 특정 생물활성 기능을 확인할 수 있는 방법들, 즉 암세포를 이식한 후의 항종양성 검사법, *Salmonella typhimurium*의 각종 histidine변이주를 이용한 항돌연변이능 검사법(Ames test), 식물의 병리를 검사할 수 있는 glyceollin분석법, 식물성장촉진 요소를 검출해 내는 cotyledon 분석법, 면역능을 검사하는 lymphocyte 배양법 등, 은 정립이 되어 있고 더 나은 기술을 연구하고 있는 단계이다.

제 2 절 국내의 경우

1. 섬유소분해 균주 발굴 :

*Sporotrichum cellulophilum*의 포자를 변이처리하여 glucose analog인 2-deoxyglucose 내성주를 취득하는 것에 의해 cellulase 생성 능이 높은 변이주를 얻었고, *Trichoderma reesei*를 변이시켜 cellulase 생산능을 3배 정도 향상시켰다. 열안정성과 냉각비용 절감이라는 측면에서 호열성 사상균 *Hermcascus aurantiacus*를 변이시켜 CM(carboxy methyl) cellulase가 만들어지는 보고가 있으나 CM cellulase 생성은 *T reesei*와 비슷하지만 avicellase의 역가는 낮다는 결점이 있어 더 개량할 여지가 많다. *Cellulomonas*를 변이시켜 cellulase의 합성이 해체된 변이주를 얻었고 CM cellulase 활성이 증가하였다고 보고하였다. 원형질체융합에 의한 cellulase 및 hemicellulase 활성증진 연구는 *Cellulomonas* 속을 비롯한 일부세균과 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속, *Trichoderma* 속 등의 곰팡이에서 행하여 지고 있다. 곰팡이에 있어서 원형질체형성은 균사나 포자에서 이루어지고 있는 데 균사는 핵의 형태와 수가 불균일하여 유전물질 교환과 융합주의 유전분석에 적당하지 않으므로 최근에는 포자를 이용한 원형질체 융합이 *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma reesei* 등에서 진행되어 약간의 진전이 있다. 그러나 완전한 염색체 재교환체를 얻는 데는 미비하고, 더욱이 cellulase 활성이 크게 증가된 보고는 거의 없는 실정이다. 그런데 섬유성물질을 효율적으로 이용하려면 xylan계 분해효소와 섬유소 분해효소를 동시에 강력하게 분비하는 미생물이 요구되는 데 이는 원형질체 융합으로 가능하리라 생각된다. 한편 최근에는 cellulase와 xylanase의 gene cloning을 통하여 분자수준의 구조분석, 생합성 조절기구의 규명 및 대량생산 방법 등의 연구를

수행하고 있다.

국내의 각대학, 연구소 및 사기업체의 단위연구소에서도 토양, 삼림, 섬유소성하수오니 등에 서식하고 있는 섬유소분해성 균주를 발굴하는 기술을 보유하고 있다. 또한 유전자조작을 통한 특정 균주의 섬유소분해효소 생산 또는 그의 효율향상을 도모하는 연구방법론 역시 정착단계에 있다. 그러나 유용한 균이주중에서 섬유소분해효소를 생산하는 부분에 관해서는 연구가 미흡한 실정이다. 특히, 원형질체융합법, 화학물질에 의한 돌연변이 유기법, 등을 통한 새롭고 효율성이 높은 균이주를 탐색하려는 노력이 농업기술연구소, 한국과학기술원 등에서 행해지고 있다. 그러나 방사선돌연변이 유기를 통한 원형질체융합, 섬유소분해효소의 유전자규명, 벡터에 전이, 효소의 대량생산 등에 관한 체계적인 연구는 미흡한 상태이다.

2. 생물자원의 방사선처리기술 :

국내에서는 유일하게 본연구소에서 방사선에 의한 섬유소성 하수오니 처리에 관한 연구를 수행해 왔다. 하수오니를 토양개질, 농장살포, 삼림매립, 공원매립 등의 용도로 사용하기 전에 필수적으로 병원성세균의 살균이 필요하기 때문에 매우 효과적이었다. 아울러 방사선처리를 함으로써 하수오니의 안정화, 탈수의 용이성, 탈색가능, 무취화 가능 등 많은 장점이 드러났다. 그러나 미생물에 의한 섬유소성분의 분해를 용이하게 하기 위해서는 500-1,000kGy의 방사선을 조사해야 하는 단점이 대두되었다. 따라서 본연구소에서는 방사선조사법과 기존의 전통적인 방법을 병행한 연구를 수행중에 있다. 앞으로 저선량의 방사선을 선조사한 후, 각종 섬유소성 자원에 적합하게 인위적인 풍화과정을 거치는 연구를 진행할 예정이다.

본연구소에서 방사선화학을 근간으로한 방사선조사공정 개발연구를

다년간 수행해 왔고, 감마선조사시설 2기와 전자선가속기시설 1기를 보유하고 있어서 연구원들의 경험이 누적되어 있기 때문에 방사선처리기술 연구수행을 위한 기초기술은 확보되었다고 본다. 또한 각종 생물자원에 대한 미세구조 및 화학적 특성연구의 토대가 이뤄져 있어서 방사선조사 후의 열시차분석 등을 통한 이들의 인위적풍화의 적합성 등에 관한 기술이 근간 확보될 수 있을 것이다. 생물자원의 발효 후 오염된 병원성세균 등을 사멸해서 청정한 가축사료로 이용할 수 있는 방사선조사공정 개발기술의 개발도 요망된다

3. 생물자원이용 균이재배 기술 :

대학 및 연구소의 연구결과를 토대로 하여 농촌진흥청을 중심으로 통나무를 이용한 표고버섯의 재배, 벚짚을 이용한 각종 느타리버섯의 재배, 폐솥을 이용한 느타리버섯의 재배, 토양, 계분 및 벚짚을 이용한 양송이버섯의 재배 등 비교적 활발하게 연구가 되고 있고 영세농가에 그 기술이 많이 보급되어 있는 상태이다. 그러나 대량의 배지제조에 있어서 시일이 오래 걸리며 많은 노동력이 필요하고, 또한 무용한 균의 오염이 발생하는 등 제반 해결해야할 문제점이 노출되고 있다. 그리고 재배 가능한 품종이 몇몇으로 국한되어 있어서 신품종 개발이 시급한 실정이며, 재배기간 단축 및 다수확을 위한 기초연구가 요망되고 있다.

4. 발효부산물 이용기술 :

일반 식품원료가 되는 자연자원 또는 약제로부터의 신기능성 생물산물의 개발에 관한 연구는 어느 정도 활발히 진행되고 있으나, 외국의 경우와는 달리 균이재배 후 폐배지를 이용한 유용 생물질 개발에는 매우 뒤져 있는 실정이다. 본 연구소에서는 2년여 전부터 균이에 의한 발효를 이용해서 항암성물질, 항들연변이성 물질, 항균성물질, 식물성장

촉진물질 등을 발굴해 내려는 연구를 거듭해왔다. 따라서 현재 위와 관련된 물질의 추출, 효능검증, 물질의 구조파악 및 방사선 또는 화학적 방법을 이용한 구조개질 기술이 확보된 상태이다. 우리 연구소에서는 그간 천연물질 혹은 한방약재 등으로부터 면역활성을 띠는 생물질개발에 관한 연구를 수행해 왔다. 이러한 기술을 바탕으로 균이의 균사체 또는 폐배지를 이용한 발효대사산물로부터의 신기능성 생물산물 발굴 가능성은 높다고 하겠다. 추출, 분리, 정제된 물질에 대한 방사선작용 기작 연구에 대한 기초기술을 보유하고 있고, 본연구실 및 원자력병원 등에서 각종 생체적합성검사, 임상검사 등의 기술이 축적되어 있기 때문에 방사선이용 인위적 개질 혹은 고정화 등을 통한 생물질의 생산실용화가 가능할 것이다.

제 3 절 조사연구개발사례에 대한 평가

리그닌-섬유소성 자원분해를 촉매하는 데 있어서 현 생태계내에서, 현재까지의 연구결과에 비추어 보면, 섬유소분해성 진균이 중요한 역할을 하고 있다. 즉, 영양물질을 재순환시키고, 토양의 비옥도를 유지시켜 주며, 또한 자연환경내의 탄소순환을 조절해 준다. 세균의 경우 섬유소분해효소가 세포벽에 부착되어 있는 데 이와는 달리, 한두 예외는 있지만, 진균은 세포외 섬유소분해효소를 분비하는 특징이 있기 때문에 최근에 산업적인 이용 측면에서 많은 관심이 쏠리고 있다. 이와 같이 산업적인 이용도를 제고하기 위하여서는 진균의 섬유소분해효소에 의한 생물변환과 관련된 기초적인 기작을 이해하는 게 필수이기 때문에 최근 10-15년간 많은 연구가 되어 왔고 연구의 진척이 있었으나 아직까지도 그 반응기작이 확립된 것은 아니다. 또한 β -glucosidase 및 몇몇 산화효소, 엄밀히 말해 섬유소분해효소는 아니지만, 가 섬유소분해효소의 작용에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이제까지 알려진 바로는 섬유소분해효소복합체는 글자그대로 여러 효소로 이루어져 있으며 이들이 순차적으로 혹은 서로 협력하여 섬유소분해를 수행하는 것으로 나타났다. 그러나 아직도 이들 구성효소들이 어떻게 생성되며, 어떤 상호작용을 하는 지, 그리고 어떠한 요소가 이들 의 작용을 조절하는 인자인 지 등에 대해서 불명확한 상태이기 때문에, 섬유소분해효소복합체의 순수성, 기질특이성 및 그 작용기작에 대한 더 많은 연구가 필요한 상태이다.

방사선전처리법은 섬유질 생물자원에 대한 효소 가수분해율을 향상시키나 100kGy 이상의 고선량 하에서 조사해야만 하는 단점이 있다. 이와 같이 경제적인 측면에서 볼 때 방사선조사선량을 줄일 필요가 있기

때문에 산, 알칼리 등 각종 화학물질의 첨가효과에 대한 연구가 추진 중에 있다. 벚짚의 경우 염소를 첨가한 상태에서 방사선조사하였을 때 가 대조군에 비해 효소가수분해 후 환원당 생성률이 훨씬 높게 나타난 것으로 미루어, 할로겐화합물을 병행처리할 때 방사선 조사선량을 많이 줄일 수 있을 것이다. 이와 같이 방사선조사선량을 줄이려는 연구가 시급히 요청되고 있으나 특별한 기술이 제시되지 못하고 있는 상태이다.

우리나라를 포함한 세계 도처에서 천연자원으로부터 새로운 기능을 갖는 생물질을 개발하기 위한 노력이 많이 되고 있다. 특히 고래로부터 알려져온 지방 특유의 약재 등에서부터 몇몇 신생물질을 추출하려는 연구가 활발한 상태이다. 일본, 홍콩을 중심으로 담자균류로부터 탄수화물인 면역활성물질의 발굴이 한창이다. 그러나 자실체 자체는 식량자원으로도 사용되기 때문에, 생물폐자원을 이용하여 재배한 균사체 및 폐배지를 직접 활용할 수 있다면 훨씬 더 연구의 가치 및 그 효용성이 있다고 하겠다.

1. 국·내외 기술수준 비교표

기술동향	기술수준	
	국외	국내
<ul style="list-style-type: none"> ○ 방사선이용 청정사료화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생물자원을 이용한 균이 재배 가능성 연구 확립(브라질, 일본) ○ Palm oil wastes를 이용 균이 재배 및 청정사료 생산을 위해 소규모 시설 가동('96년 7월, 말레이시아) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 톱밥, 볏짚을 이용한 몇몇 균이 재배기술 확보(농촌진흥원) ○ 방사선이용 전처리기술 및 청정사료화 연구 진행중 (원자력연)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 방사선이용 들연변이 유기를 통한 유용반응 균주 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 섬유소성 생물자원의 분해성 극대화를 위해 방사선을 이용한 전처리 기술개발 및 유용효소 생산균주 개발 (일본) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 방사선이용 들연변이 유기에 의한 생물자원 분해균주 발굴(원자력연)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효부산물 이용기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 방사선을 이용하여 균이를 조작함으로써 항암제 및 항들연변이제 개발/제품화 (3제품, 일본) ○ 방사선을 이용한 신기능성 생물산물 구조개질 유도 연구 진행 (미국) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사탕수수로부터 방사선을 이용한 항암성, 항들연변이성물질 분리/개질 기술 확보 (원자력연) ○ 생체적합성/임상검사 기술 보유 (원자력병원)

2. 주요 관련기술의 검토

국내의 일반농가에서는 느타리버섯, 양송이버섯, 표고버섯 등의 일반 버섯을 재배하는 기술이 정착되어 있기 때문에 새로이 발굴된 유용 버섯류를 쉽게 보급, 재배하게 될 것이다. 생물자원에 대한 방사선처리 기술이 확보된다 하더라도, 반핵단체 등에서 방사성동위원소를 이용한다는 점을 좋게 평가하지 않기 때문에, 일반 산업체에서 이용하는 데에는 유일한 문제점이 있을 수 있다. 그러나 그 유익성을 잘 파악해볼 때 국민의 양성적인 의식이 기대된다. 국내의 산업체(현대)에서 방사선조사설비가 가능하기 때문에 기술적으로는 실용화 하는 데 별다른 문제점이 없다. 미국의 식품의약국이 아니더라도 국내에도 화학연구소 및 국립보건원 등에서 생물질의 독성에 대한 평가를 할 수 있는 기술을 보유하고 있으며, 원자력병원을 위시한 여러 병원에서 각종 암, 종양 등의 진료, 치료기술을 보유하고 있어서 이의 실용화가 용이할 것이다.

자연계에 다량 산재해 있는 생물폐자원에 대한 방사선처리기술이 정립될 경우 공해원을 줄이고 공해물질을 생산하지 않는 생물자원재활용 및 산업화가 가능하며, 방사선을 이용한 청정사료화가 달성시 가축 생산의 원가절감 및 공중위생 측면에도 크게 기여할 것이다. 미생물반응계를 이용한 생물자원분해물에서부터 다기능성 생물활성물질의 개발이 가능하게 되어 특정 질병의 치료가 가시화 되어 국민복지에 기여할 것이다.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 생물자원의 방사선조사 공정 확립

1. 연구 배경

지구상에는 많은 양의 섬유소성 폐생물자원이 산재해 있으며(Kuhad and Singh, 1993) 그 폐해가 심각한 환경오염을 야기시키고 있기 때문에, 또한 머지 않아 다가올 에너지고갈에 대한 우려 때문에, 이의 재순환 및 재활용에 대한 관심이 고조되고 있다. 이를 위하여 분쇄 등의 물리적 전처리(Gharpuray *et al.*, 1983) 및 산, 알칼리 등의 화학적 전처리방법(Macdonald *et al.*, 1983)이 많이 제시되었다. 그러나 경제적이지 못하다는 점과 후자의 경우 2차적인 환경오염을 유발할 수 있다는 단점 때문에 차선의 방법들이 모색되고 있는 데 이중에서 특히 미생물의 발효능을 이용하는 처리법이 각광을 받고 있다. 특정 유용한 미생물로 하여금 각종 생물폐자원을 목적에 맞게 이용하기 위해서 방사선을 이용한 멸균(Malek *et al.*, 1994) 및 전분해과정에 대한 연구가 최근에 주목을 받게 되었다. 따라서 본 연구실에서는 방사선조사에 의한 생물폐자원의 적정멸균 선량을 결정하고자 하였다

2. 재료 및 방법

가. 미생물오염도 측정

시료내의 일반 미생물(총종속영양세균)의 오염도를 측정하기 위하여 NA(nutrient agar)를 이용하여 35℃에서 24시간 배양하였다. 진균류의 검지를 위해서는 Czapeck solution agar를 사용하였으며 30℃에서 40-48시간 배양하였다. 효모의 검지를 위해서 YMPG(yeast extract,

maltose, peptone, glucose) 배지를 사용하였으며, 30℃에서 72시간 배양하였다. 또한 장내세균(*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*)을 관찰하기 위해서 McConkey agar를 이용하여 35℃에서 18-48시간 배양하였다. *Salmonella* 및 *Shigella*속 (*Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter aerogenes*)의 검지에는 SS(*Salmonella* and *Shigella media*)를 사용하였으며, 35℃에서 18-48시간 동안 배양한 후 관찰하였다.

나. 방사선멸균 선량 결정

멸균검사법(USP XXII, 1990)에 따라서 SCD(soybean casein digest) 배지에 34℃에서 2주간 배양한 후 10개 이내의 시험관이 양성반응을 보인 선량을 실험선량으로 채택하였다(표 1-6). 각각의 시료를 실험선량으로 다시 방사선조사한 후 세균류, 장내세균류, 곰팡이류, mold류를 배양하였다. 본 연구소가 보유하고 있는 방사선조사시설을 이용하여 (Co-60, 약 70,000 Ci 용량, Atomic Energy of Canada Ltd.), 시료를 상온, 상압, 공기중에서 방사선 조사하였다. Fricke dosimeter로 측정된 조사선량률은 0.76 kGy/hr였다(Holms and Bery, 1970). 다른 종이라고 생각되는 콜로니를 분리하여 약 10^8 cells/ml되게 배양한 후 D_{10} 치를 구하였다($D_{10} = D / (\log A - \log B)$, D: 콜로니가 없는 선량, A: 멸균전 오염균수, B: D 선량에서의 콜로니수=0). 세균류, mold류, 진균류로 크게 그룹화하여 D_{10} 치를 얻었고(표 1-7), 시료내 이들의 빈도수와 D_{10} 치를 이용하여 다음의 식에 의해 이론선량을 구하였다.

$$\sum_{i=1}^n P_i \cdot (0.1)^{D/D_i} = (\text{SAL}) \times (\text{SIP}),$$

i : D_{10} 치의 개수, P_i : i 번째 미생물의 시료내 빈도수, D_i : i 번째 미생물의 D_{10} 치, D: 실험선량에서 생존하는 미생물의 멸균선량, SAL: Sterility Assurance Level(멸균보장치;

여기서는 멸균 후 사람과 접촉하여 사용되어질 것이 아니기 때문에 SAL= 10^{-3}), SIP: Sample item propotion (채취한 시료의 전체에 대한 비율, 여기서는 시료의 특정부위만을 사용한 것이 아님으로 SIP=1). 최종적으로 멸균선량은 실험선량에 이론선량(표 1-7에서 비롯된 위 식의 계산값 D)을 더한 값으로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 미생물오염도 측정

각각의 시료내 총중속영양세균수를 알아보기 위해 영양배지를 이용한 실험 결과를 표 1-1에 나타내었다. 표 1-1에서 보는 바와 같이 대조균의 경우 톱밥내의 오염도가 5.2×10^5 로 벚짚 3.7×10^8 , 왕겨 3.1×10^7 , 옥수수대 1.7×10^7 에 비해 제일 덜 한 것으로 나타났다. 그러나 각각의 시료 공히 20 kGy까지 방사선조사를 해도 생존균수가 있음을 알게 되었으며, 30 kGy의 방사선을 조사한 이후에야 완전히 살균됨을 알 수 있었다. 이는 일반적으로 통용되고 있는 멸균선량과 유사하다. 일본에서의 경우 드물게 벚짚에서 30 kGy를 조사해도 살균이 되지 않는 경우가 있다는 보고가 있기는 하나 한국의 환경과 다름을 알 수 있다.

톱밥의 경우 일반세균 오염도가 다른 시료에 비해 가장 낮았으나 표 2에서 보는 것처럼 진균류의 경우 20 kGy의 방사선을 조사해도 살균되지 않은 것으로 나타났다(표 1-2). 이는 벚짚에서도 유사한 결과를 보였다. 이로써 벚짚 및 톱밥내에 오염되어 있는 진균류의 경우 그 오염도는 낮으나 방사선에 대한 저항성이 어느 정도 있는 균집이 있음을 시사해 준다. 즉, 위와 같은 진균을 분리, 동정하여 방사선저항성에 대한 연구를 함으로써 그 미생물의 기원을 파악해 봄직하다고 여겨진다.

Table 1-1. Total bioburden(CFU/g) of the bioresources selected in NA incubation

Radiation dose (kGy)	Substrate			
	Rice straw	Corn stover	Chaff	Saw dust
0	3.7×10^8	1.7×10^7	3.1×10^7	5.2×10^6
5	2.7×10^7	2.0×10^6	6.0×10^6	3.0×10^6
10	7.8×10^4	1.7×10^4	4.1×10^3	6.1×10^3
15	3.6×10^4	5.1×10^3	1.4×10^3	2.0×10^2
20	4.0×10^2	4.0×10^2	1.0×10^2	1.0×10^2
30	-	-	-	-

Table 1-2. Fungal contamination(CFU/g) of the samples by Czapeck incubation

Radiation dose (kGy)	Substrate			
	Rice straw	Corn stover	Chaff	Saw dust
0	1.1×10^8	9.2×10^6	6.9×10^6	2.7×10^7
5	9.6×10^5	4.0×10^4	8.1×10^5	6.0×10^3
10	2.7×10^4	3.0×10^3	2.2×10^3	2.0×10^2
15	8.2×10^3	4.0×10^2	8.0×10^2	4.0×10^2
20	2.9×10^3	-	-	1.0×10^2
30	-	-	-	-

Yeast의 경우 표 1-3에서 보는 바와 같이, 기본 오염율은 4개의 시료를 통해 거의 유사하게 4.6×10^6 - 3.8×10^7 CFU/g으로 나타났으며 방사선저항성 또한 유사한 것으로 나타났다. 20 kGy의 방사선 조사선량으로 살균이 충분함을 알 수 있다. 표 1-4에는 장내세균에 대한 방사선 조사효과를 나타내었다. 기본 오염도가 타 시료에 비해 1.3×10^4 CFU/g으로 적은 톱밥의 경우는 10 kGy에서, 그밖의 모든 시료들은 15 kGy에서 살균됨을 알 수 있었다. 표 1-5에서 보는 바와 같이 *Shigella*의 경우 왕겨와 톱밥에서는 발견되지 않았으며, *Salmonella* 및 *Shigella* 속의 오염이 20 kGy의 방사선조사로 제거되었음을 알 수 있었다.

이로써 *Salmonella* 및 *Shigella* 속의 미생물을 포함한 종속영양세균류는 20 kGy의 방사선량으로 살균이 가능한 반면, 진균류 등은 30 kGy의 방사선을 조사하여야만 완전히 살균되는 것을 알 수 있다.

Table 1-3. Yeast contamination(CFU/g) of the samples by YMPG incubation

Radiation dose (kGy)	Substrate			
	Rice straw	Corn stover	Chaff	Saw dust
0	3.8×10^7	2.7×10^7	4.6×10^6	2.5×10^7
5	1.0×10^5	1.5×10^6	3.1×10^5	2.0×10^3
10	9.2×10^4	2.9×10^4	6.6×10^3	-
15	2.9×10^3	5.0×10^2	3.0×10^2	-
20	-	-	-	-
30	-	-	-	-

Table 1-4. Enteric bacteria contamination(CFU/g) of the samples incubated by McConkey agar

Radiation dose (kGy)	Organism	Rice straw	Corn stover	Chaff	Saw dust
0	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.3×10^9	UC	7.3×10^6	1.3×10^4
	<i>Escherichia coli</i>	1.0×10^9	UC	2.5×10^6	8.0×10^3
	<i>Salmonella enteritidis</i>	9.7×10^7	UC	3.0×10^6	5.0×10^3
5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	7.0×10^9	2.0×10^9	5.0×10^3	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	5.0×10^2	6.0×10^2
	<i>Salmonella enteritidis</i>	3.5×10^7	-	-	-
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.8×10^4	1.4×10^4	1.0×10^2	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
15	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
20	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-

Table 1-5. *Salmonella* and *Shigella* contamination(CFU/g) of the samples incubated by SS agar

kGy	Organism	Rice straw	Corn stover	Chaff	Saw dust
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	UC	2.4×10^7	2.3×10^4	5.8×10^4
0	<i>Salmonella enteritidis</i>	UC	3.8×10^7	2.5×10^4	-
	<i>Shigella flexneri</i>	UC	2.3×10^7	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.6×10^7	2.9×10^6	-	-
5	<i>Salmonella enteritidis</i>	1.9×10^7	8.9×10^6	-	-
	<i>Shigella flexneri</i>	2.0×10^6	3.7×10^6	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	7.2×10^3	3.0×10^2	-	-
10	<i>Salmonella enteritidis</i>	9.8×10^3	2.0×10^2	-	-
	<i>Shigella flexneri</i>	1.2×10^3	-	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	1.0×10^2	-	-
15	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-
	<i>Shigella flexneri</i>	2.0×10^2	-	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
20	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-
	<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-

나. 방사선멸균 선량 결정

본 실험의 결과로 나타난 멸균선량은 멸균실패 확률이 1/1000인 경우이나(벼짚, 옥수수대, 왕겨, 톱밥 각각 17.7, 17.6, 15.6 그리고 20.0 kGy), 멸균 후 사람과 접촉되어 사용되어 지는 식품, 의약품 등의 경우 SAL을 10^{-6} 으로 치환하기만 하면 된다(본 시료의 경우 벼짚, 옥수수대, 왕겨, 톱밥 각각 25.4, 25.2, 23.2 그리고 28.0 kGy). 기존에 상용화된 ethylene oxide를 이용한 멸균법이 대상물질에 잔존하기도 하거니와 대기오염 또한 심각하기 때문에 국내에서도 금지되어 있고, 최근에 방사선멸균법이 각종 양념류, 조미료, 농산물, 의약품, 의료용품 등에 적용이 활발히 되고 있는 추세이다. 여기에서 제시된 방사선멸균선량 결정법은 위의 여러 부분에 널리 적용될 수 있을 것으로 여겨진다.

Table 1-6. Sterility test of initial bioburden on rice straw, chaff, corn stover and sawdust irradiated by gamma-ray radiation

dose(kGy)		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
	rice straw	20	16	14	12	10	8	5	2	0	0
nonsterile tubes /20tubes	chaff	20	16	14	11	10	6	2	0	0	0
	corn stover	20	15	12	10	8	4	1	0	0	0
	sawdust	20	18	17	14	12	10	7	3	0	0

Table 1-7. Grouping of 100 isolates from rice straw, chaff, corn stover and sawdust at 10, 10, 8 and 12 kGy, respectively

sample	group	population	D_{10i} value(kGy)	relative frequency(P_i)
rice straw	bacteria	53	0.951	0.53
	mold	15	1.107	0.15
	fungi	32	1.824	0.32
chaff	bacteria	60	0.951	0.60
	mold	13	1.107	0.13
	fungi	27	1.824	0.27
corn stover	bacteria	58	0.951	0.58
	mold	16	1.107	0.16
	fungi	26	1.824	0.26
sawdust	bacteria	29	0.951	0.29
	mold	9	1.107	0.09
	fungi	62	1.824	0.62

제 2 절 생물자원 분해균주, 균이주 확보

1. 연구 배경

농업 및 임업기술의 발달에 따라 벼, 밀, 옥수수, 콩, 사탕수수 등의 곡물과 산림 등 섬유소성 생물자원의 생산량이 1980년대에 연간 2×10^{12} 톤 정도였으나 최근 더욱 증가하는 추세이다(Kuhad and Singh, 1993; Ramirez-Carrillo *et al.*, 1991). 이들의 대부분은 재사용 또는 유효이용이 잘 되지 못하고 있을 뿐만 아니라 심각한 환경오염을 초래하고 있는 실정이다. 섬유소성 생물자원은 주로 cellulose(35-60%), hemicellulose(10-30%)와 lignin(4-18%) 등으로 구성되어 있어서 이의 상업적, 공업적 이용 가치가 매우 높다. 이제까지 생물자원 분해능이 높은 세균류에 대한 많은 연구가 되어 왔으나(Mateos *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993) 최근에는 균류 특히, 여러 측면에서 유익한 식용버섯에 대한 관심이 고조되고 있는 실정으로 우수한 분해능을 가진 균주의 개발이 진행되고 있다(Boominathan *et al.*, 1990; Kirk and Farrell, 1987). 일반적으로 유전육종을 위해서는 유전적으로 동일한 집단에 물리적, 화학적 처리를 하거나, 유전적으로 서로 다른 집단간의 교배를 통해서 우량한 균주를 개발해 왔으나(공 등, 1997), 분해효율이 낮고 특정산물의 생산증대를 이루기에는 한계가 있음이 인식되었다(Demain, 1976). 버섯의 경우에는 단일핵 영양균사체간의 교배를 이용하였으나, 교배형이 서로 적합성을 보이지 않는 경우와 이종간의 교잡은 균사체 상태에서 이루어지기 어렵기 때문에, 원형질체(protoplast)를 적출하여 이들을 인위적으로 융합함으로써 잡종을 얻고자 노력하여 왔다(Yoo, 1992). 원형질체를 사용하면 외부유전자의 도입도 손쉽게 이룰 수 있어 매우 유용한 방법으로 알려졌으나(Yoo and Cha, 1992) 단일

핵을 지닌 원형질체의 획득과 원형질체의 재생률이 낮은 단점이 있다. 최근에 담자포자(basidiospore)의 DNA 다형성을 확인하고(공 등, 1997; 송 등, 1996), UV 조사로 영양요구주를 선별하는(Byun *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 1988) 등 담자포자를 이용해 다양한 표현형을 지닌 유용균주의 확보를 위한 노력이 이루어지고 있으나 이온화방사선을 이용한 연구는 미진한 상태이다. 일반적으로 방사선은 물리적인 힘으로써 생물체 내에서 이온화 반응을 유발하며 간접적으로는 세포내 소기관의 기능을 변화시키고, 직접적으로는 염색체 및 세포내 유전물질인 DNA를 물리적으로 절단하는 등(Hobbs and Clellan, 1986) 돌연변이 유기의 유용한 방법으로 널리 알려져 있다.

변이주의 확인을 위한 섬유소 분해효소에 대하여 정성적(Paterson and Bridge, 1994; West and Colwell, 1984), 정량적(Kumakura, 1993; Mandels and Sternberg, 1976) 방법이 개발되어 사용되고 있으나, 근래에 MUF(4-methylumbelliferyl) 반응기를 이용하여 spectrofluorometer로 쉽고 정밀하게 측정하는 방법이 개발되었다(Chernoglazov *et al.*, 1989). MUF 방법은 균류에서 cellulase나 chitinase 등의 활성도 조사에 널리 이용되고 있어(Haran *et al.*, 1995; Gusakov *et al.*, 1991) 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 있어서(Williams *et al.*, 1990) 방사선유기 변이주의 유전적 이질성분석이 가능할 것으로 여겨진다.

본 연구는 식용으로 널리 애용되는 8종류의 버섯에 대한 생물자원분

해능을 검토하고 이중에 전세계적으로 생산량이 증가하고 있는 느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 담자포자에 대한 방사선감수성과 이에 따른 섬유소 분해능이 뛰어난 변이주를 선발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 생물자원 분해균주 탐색

2가지의 시료(사탕수수찌꺼기 및 볏짚)와 8가지의 균주 [*Hericium erinacium*(Fr.) Pers., *Pleurotus djamor*(Fr.:Fr.) Boedijn. (= *Pleurotus flavellatus*), *Ganoderma lucidum* (Leyss.:Fr.) Karst., *Auricularia auricula* (Hook.) Underw., *Lentinus sajor-caju* (Fr.:Fr.)Fr. (*Pleurotus sajor-caju*), *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quel., *Polyporus arcularius* Batsch.:Fr. (= *Flavolus arcularius*), *Coprinus cinereus* (Schaeff.:Fr.) S.F. Gray,]를 이용하여 최적 균주를 검사하였다. 시료는 40℃에서 4-5일간 말린 후 미생물오염을 제거하기 위하여 30kGy로 살균하였다. 1-2 mm의 크기로 잘게 자른 다음 3%의 미강을 첨가하고 증류수로 65%의 습도를 조절하였다. 300 ml 용량의 삼각플라스크에 균주를 접종한 후 30℃, 습도 85%로 1달간 배양하면서 주기적으로 균주의 성장을 관찰하였다.

나. 돌연변이체 확보

상지대학교 생물학과 연구실에서 분양받은 느타리(*Pleurotus ostreatus*)를 사용하였다. 자실체로부터 담자포자를 수확하여 실험을 수행하였다. 담자포자를 citrate-phosphate(pH 6.1) 완충용액에 1×10^9 /ml이 되도록 희석하여 1Gy~20kGy의 조사선량으로 감마선(Co-60, 약 60,000Ci 용량, Atomic Energy of Canada, Ltd.)을 조사하였다. Fricke dosimetry로 측정된 조사선량은 6.5Gy/hr였다(Holms and Bery, 1970). Potato-dextrose agar(PDA, Difco) 고체배지에서 배양 후 발아율을 조사하였다. 생존율은 발아된 담자포자 중 균사가 분지를 형성하는 것만을 생존포자로 판단하였다. 방사선조사 후 생존한 담자포자 중 무작위 선택한 45 균주를 표 2-1의 배지조성에 따라 만든 고체배지에 접종하여 30℃에서 6일간 배양 후 성장된 균사체의 지름을 측정하였다. 고체배지에서 cellulase, β -glucosidase, amylase와 ligninase의 활성도 조사는 Teather와 Wood(1982) 그리고 Paterson과 Bridge(1994)의 방법을 변용하였다. Cellulase의 활성은 배지를 0.1% Congo red(Sigma Chemical Co.)로 염색하여 확인하였고 β -glucosidase의 활성은 배지에 나타난 갈색대의 크기로 확인하였으며 amylase의 활성은 배지를 Lugol's iodine 용액(Sigma Chemical Co.)으로 염색하여 확인하였다. Ligninase의 활성은 배지에 나타난 투명대의 크기를 측정하여 확인하였다.

Table 2-1. Solid media composition at pH 5.6

Medium ingredient (g/l)	Medium					
	PDA	MM	LIG	GLU	AMY	CMC
MgSO ₄ -7H ₂ O		0.5	0.5	0.01	0.01	0.2
KH ₂ PO ₄		0.46	0.6			1.0
K ₂ HPO ₄		1.0		1.0	1.0	
KCl				0.5	0.5	0.2
CaCl ₂			0.054			0.2
NaNO ₃				2.0	2.0	
ZnSO ₄ -7H ₂ O			0.007	0.01	0.01	
CuSO ₄ -5H ₂ O				0.01	0.01	
MnSO ₄ -5H ₂ O			0.005			
CoCl ₂ -6H ₂ O			0.001			
Ferric citrate			0.012	0.2		
(NH ₄) ₂ tartrate			0.22			
Thiamin-HCl (μg/l)		120	100			
DL-Asparagine		2.0				
Glucose		20.0				
Sucrose				5.0		
Aesculin				3.0		
Soluble starch					10.0	
Sorbose			4.0			
Poly R-478 dye			0.2			
Carboxymethyl cellulose						10.0
PDA (Bacto)	39.0					
Agar		20.0	15.0	12.0	12.0	12.0

선택한 균주를 각기 500ml의 potato dextrose broth(PDB, Difco) 배양액에 20일간 배양하였다. 원심분리하여 균사체를 제거한 배양액 내에 분비된 세포외분비효소의 활성은 MUF (4-methylumbelliferyl)-기질 (Sigma Chemical Co.)(표 2-2)과의 반응성을 이용하여 조사하였다 (Haran *et al.*, 1995). 각 시료(균사체 배양액)내 단백질량을 spectrophotometer를 사용해서 280nm에서 흡광도로부터 정량하였다. 각 효소의 기질은 표 2-2에 나타난 바와 같다. 반응기질은 각각 5mM되게 methylcellosolve에 녹여 -20℃에서 보관하면서 이용하였다. 효소활성도를 보기 위하여, 각 시료 단백질 100 μ g이 든 1ml 반응액에 반응기질을 25 μ M되게 첨가하여 20℃의 암소에서 3시간 동안 반응시킨 후 나타나는 형광을 spectrofluorometer(Edinburgh FS-900CD)를 이용하여 측정하였다(excitation : 365nm, photomultiplier tube voltage : low, sensitivity : $\times 100$).

다. 세포외 단백질의 양상비교

균사체를 500ml의 PDB 배양액에 20일간 배양하고 원심분리하여 상등액을 수획한 후 (NH₄)₂SO₄를 이용하여 70%로 침전시켰다. 침전된 단백질추출물을 0.05M Tris-HCl buffer(pH 8.0)으로 현탁한 후 Dialysis sack(Sigma)를 이용하여 4℃에서 12시간 동안 투석시켜 얻어진 시료를 speed-Vac(Heto VR-1)으로 농축시켰다. 단백질농도는 280nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 농축된 시료를 Tris-HCl buffer(pH 6.8), 0.1% SDS, glycerol, bromophenol blue를 가한 후 가수분해시켜 전기영동용 시료로 사용하였다. 전기영동을 위한 완충용액은 0.025M Tris-glycine buffer(pH 8.3)를 사용하여 120 V로 2시간 영동하였고, 발색은 Coomassie brilliant blue(R-250, Sigma)를 사용하였다.

Table 2-2. 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-chininase	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

라. 변이주의 RAPD 양상 조사

MUF 방법에 의해 선발된 변이주를 각기 100ml의 PDB 배양액에 30℃에서 10일간 배양하였다. 원심분리하여 얻은 균사체를 액체질소로 얼려서 마쇄하였다. 마쇄한 균사체 1g당 10ml의 비올로 DNA 추출용액을 (50mM Tris, pH 8.0, 50mM EDTA, 0.7M NaCl, 0.1% β -mercaptoethanol, 1% cetyltrimethylammonium bromide) 섞어 60℃에서 30분간 처리하였다. 이후 Graham의 방법(Graham, 1994)에 따라 DNA를 추출하였고 TE(pH 8.0)에 DNA 농도가 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 되도록 녹여서 4℃에 보관하여 사용하였다. PCR 반응용액은 바이오니아사(한국)의 preMix kit에 5pmol의 random primer(Operon Tech., Inc., USA) (표 2-3), 10ng의 genomic DNA 그리고 $50\mu\text{l}$ 의 증류수를 첨가하여 만들었다. PCR 반응은 Gene Amp PCR System 2400(Perkin Elmar)를 사용하여 94℃에서 5분간 DNA를 변성(denaturation)한 후, 증폭반응은 94℃에서 1분간 변성, 38℃에서 30초간 부착(annealing), 72℃에서 2분간 중합(polymerization)을 55회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 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 유전유사도상수와 근연관계도를 구하였다.

Table 2-3. 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

3. 결과 및 고찰

가. 생물자원 분해균주 탐색

2가지의 시료(사탕수수찌꺼기 및 볏짚)와 8가지의 균주 [*Hericium erinacium*(Fr.) Pers., *Pleurotus djamor*(Fr.:Fr.) Boedijn. (= *Pleurotus flavellatus*), *Ganoderma lucidum* (Leyss.:Fr.) Karst., *Auricularia auricula* (Hook.) Underw., *Lentinus sajor-caju* (Fr.:Fr.)Fr. (*Pleurotus sajor-caju*), *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quel., *Polyporus arcularius* Batsch.:Fr. (= *Flavolus arcularius*), *Coprinus cinereus* (Schaeff.:Fr.) S.F. Gray,]를 이용하여 최적 균주를 검사한 결과를 표 2-4에 나타내었다. 검사한 균주중 *Pleurotus sajor-caju*가 양쪽 시료 모두를 기질로 잘 이용하여 전 검사기간 동안 왕성한 성장을 보였다.

나. 돌연변이체 확보

원형느타리버섯의 담자포자에 감마선조사 후 관찰한 발아율 및 생존율의 변화는 Table 2-5에 나타냈다. 대조군의 발아율은 15.0%였고 감마선조사군은 선량-의존적인 발아율의 감소를 보였다. 발아포자의 생존율은 대조군에서 95.5%였고 방사선조사군에서는 20Gy 조사군까지 100%였으나 이후 선량-의존적인 감소를 보여 2kGy 조사군에서 1%로 감소되었으며 4kGy 이상의 방사선조사군에서는 생존하지 못하였다. 그러나, 15kGy 및 20kGy의 선량으로 조사된 1×10^8 개의 담자포자 중에서는 각각 1개씩이 생존하였다.

Table 2-4. Growth of various fungi in sugar cane abagasse and rice straw substrated fermentation

Organism	Sugar cane bagasse			Rice straw		
	incubation period(days)					
	7	14	30	7	14	30
<i>Auricularia auricula</i>	++	+++	++++	+++	++++	++++
<i>Coprinus cinereus</i>	+	++	++++	++	+++	++++
<i>Coriolus versicolor</i>	++	+++	++++	++	+++	++++
<i>Ganoderma lucidum</i>	+++	++++	++++	+++	++++	++++
<i>Hericium erinacium</i>	+++	++++	++++	++	+++	++++
<i>Pleurotus flavellatus</i>	+++	++++	++++	+++	++++	++++
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>Polyporus arcularius</i>	+++	++++	++++	++	+++	++++

+ : little growth, ++ : fair growth, +++ : good growth, ++++ : very good growth.

Table 2-5. Germination and survival rates of the basidiospores of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray

Dose (Gy)	Germination rate (%)	Survival rate (%)	Survival ratio (%)
0	15.0±2.1	95.5±2.4	100.0
1	8.8±0.2	100.0±0.0	61.6
5	7.4±0.4	100.0±0.0	51.5
10	6.8±0.2	100.0±0.0	47.3
15	6.0±0.2	100.0±0.0	42.2
20	3.6±0.3	100.0±0.0	25.4
25	2.9±0.1	95.6±0.1	18.9
50	2.0±0.1	91.0±0.1	12.5
100	1.6±0.1	93.0±0.2	10.5
200	1.6±0.1	84.5±0.2	9.2
500	0.3±0.0	63.2±0.1	1.4
1000	0.1±0.0	42.5±0.2	0.4
1500	0.1±0.0	10.2±0.2	0.1
2000	0.1±0.0	1.6±0.1	0.0
4000	0.1±0.0	0.0±0.0	0.0

다양한 배지에서의 방사선조사된 담자 포자의 균사생장속도 및 효소활성도 조사결과를 표 2-6에 나타냈다. 총균사체생장비(TM, total mucelial growth)와 CM-cellulase, glucosidase, amylase 및 ligninase의 부분균사체생장비(PM, partial mycelial growth) 및 부분분해영역비(PZ, partial degraded zone)를 나타내었다. 대체적으로 균사생장속도 및 기질분해효소활성도는 다양한 양상을 보였으나 기질에 대하여 특이적인 변화를 나타내는 균주들도 있었다. 총 45 종의 검색한 균주에서 균사생장속도가 대조군의 60% 이하인 10 종의 균주는 기질분해효소활성도가 모든 기질에서 낮았고, 대조군의 140% 이상인 균주는 1.5KG-2, -34, 2KG-31과 -35였는데, 이 중 1.5KG-2는 모든 기질에서 대조군의 220% 이상의 균사생장속도와 기질분해효소활성도를 나타냈다.

분리한 균주들을 대상으로 액체배지내의 세포외분비효소의 활성도를 MUF-기질과의 반응성을 이용해 조사한 결과는 고체배지에서의 효소활성도 결과와 유사한 양상을 보였다. 이 중에 특이한 효소활성의 차이를 보인 균주의 수치를 표 2-7에 정리하였다. 대조군에 대한 이 균주들의 효소활성도를 비교한 결과, 2KG-1은 대조군과 비교하여 β -glucosidase 활성도가 1.83배, endo-chitinase의 활성도가 2.29배 높았다. 2KG-2는 모든 조사된 효소들의 활성도가 2배이상이었으며, 특히 β -glucosidase, exo-chitinase 및 endo-chitinase의 활성도가 대조군에 비해 각각 3.92배, 5.7배 및 5.0배로 높게 나타났다. 20KG-1은 cellulase의 활성도가 1.5배 정도였고 그외는 차이가 없거나 낮았다.

Table 2-6. Growth rate and cellulolytic activity of isolates from the basidiospores of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray

Isolates	Medium and diameter of growth (mm)												
	PDA	MM	CMC		GLU		AMY		LIG		Ratio		
	M1	M2	M3	Z3	M4	Z4	M5	Z5	M6	Z6	TM	PM	PZ
Control	31	28	27	20	16	28	25	15	13	19	1.00	1.00	1.00
1KG-1	22	22	21	27	15	27	22	7	40	0	1.03	1.23	0.74
1KG-4	30	30	31	27	24	32	20	17	5	20	1.01	1.00	1.17
1KG-5	32	40	37	28	24	27	25	15	20	25	1.29	1.33	1.15
1KG-11	20	21	21	22	17	26	11	11	11	17	0.73	0.75	0.92
1KG-13	26	49	35	25	28	27	24	13	10	20	1.25	1.22	1.03
1KG-14	20	19	20	22	15	28	12	12	10	18	0.70	0.72	0.97
1KG-30	19	25	22	23	13	25	22	17	20	20	0.88	0.97	1.03
1KG-31	35	42	35	33	20	25	25	17	4	10	1.17	1.05	1.03
1KG-33	14	20	9	22	12	20	20	17	7	15	0.59	0.60	0.90
1KG-34	12	12	10	15	8	22	11	15	12	17	0.47	0.51	0.84
1KG-35	18	25	27	26	15	22	14	8	4	17	0.75	0.75	0.89
1KG-36	14	9	19	20	8	23	8	5	6	23	0.46	0.51	0.86
1.5KG-2	58	60	62	60	32	32	42	40	55	58	2.24	2.40	2.31
1.5KG-3	30	32	30	30	22	25	25	9	3	5	1.03	1.00	0.84
1.5KG-5	36	35	36	27	25	27	21	11	10	11	1.18	1.15	0.92
1.5KG-7	27	38	36	38	23	29	21	12	8	17	1.11	1.10	1.17
1.5KG-9	30	31	30	26	18	26	22	17	22	24	1.11	1.15	1.13
1.5KG-30	12	22	23	26	15	26	20	17	26	5	0.86	1.05	0.90
1.5KG-31	8	28	8	19	5	27	7	4	16	9	0.52	0.45	0.72
1.5KG-32	16	14	15	23	9	20	15	6	3	4	0.52	0.53	0.64
1.5KG-33	25	30	35	28	18	30	27	7	7	18	1.03	1.09	1.01
1.5KG-34	30	42	37	27	22	30	47	16	20	25	1.44	1.58	1.19
1.5KG-35	24	31	30	28	20	25	28	20	5	13	1.00	1.04	1.05
1.5KG-36	29	27	42	30	24	25	11	19	7	21	1.01	1.05	1.15
1.5KG-39	24	20	35	27	16	32	10	8	22	26	0.92	1.04	1.13
1.5KG-41	16	44	20	20	10	20	9	22	5	0	0.75	0.55	0.75
2KG-1	17	12	15	21	11	20	10	7	11	17	0.55	0.59	0.79
2KG-2	30	40	40	33	9	26	13	16	5	10	0.99	0.84	1.03
2KG-3	6	7	4	23	7	20	10	8	5	0	0.28	0.33	0.62
2KG-7	6	13	10	24	7	21	11	18	10	22	0.41	0.48	1.03
2KG-8	37	6	33	26	8	15	5	9	4	7	0.67	0.63	0.69
2KG-9	29	8	33	27	11	22	28	7	4	7	0.82	0.95	0.77
2KG-11	24	32	30	24	13	25	7	10	6	20	0.81	0.70	0.96
2KG-13	21	33	38	25	8	27	26	13	7	20	0.96	0.99	1.03
2KG-14	28	26	25	25	17	25	15	5	2	0	0.82	0.74	0.67
2KG-30	19	18	13	16	11	20	12	13	10	25	0.60	0.58	0.90
2KG-31	40	64	42	31	32	32	55	20	5	12	1.73	1.68	1.15
2KG-32	26	8	33	31	3	14	5	0	2	0	0.56	0.54	0.55
2KG-34	35	40	37	28	25	30	30	18	5	15	1.25	1.22	1.11
2KG-35	23	48	48	36	30	30	55	15	40	43	1.77	2.17	1.51
2KG-37	35	40	31	26	22	29	30	10	2	0	1.16	1.07	0.79
2KG-38	15	18	22	24	11	20	14	8	3	10	0.60	0.63	0.75
2KG-39	14	12	21	20	7	25	12	8	5	16	0.51	0.57	0.84
15KG-1	17	17	17	25	10	25	13	8	17	0	0.66	0.72	0.71
20KG-1	25	25	11	13	17	25	17	14	9	17	0.75	0.84	0.84

Table 2-7. Extracellular enzyme activity in the conditioning media of four isolates from the basidiospores of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray

Extracellular enzyme activity (cps/100 μ g protein)						
Isolates	Exo-cel lulase	Endo- cellulase	β -Glucosi dase	Amyl ase	Exo-chiti nase	Endo-chit inase
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

담자균의 포자에 대한 방사선조사 후 생존율에 대하여 Zolan 등 (1988)은 *Coprinus cinereus*의 oidia포자에 방사선조사 후 포자생존율을 대조균의 생존율에 대한 상대비율로 보고하였는데, 50Gy 선량에서 90%였고 이후 선량-의존적인 급격한 감소를 보여 500Gy 선량에서는 7%, 1kGy 선량에서는 0.2%가 생존하였다. 또한, Boominathan 등(1990)은 담자균인 *Phanerochaete chrysosporium*의 conidia포자에 300Gy 선량을 조사하면 24%가 생존한다고 보고하였다. 본 연구에서 표 2-4에 나타냈듯이 발아포자의 생존율을 대조균의 생존율에 대한 비율로 전환하였을 때, 느타리버섯의 담자포자는 이미 1Gy의 저선량에서 대조균의 62%만이 생존하였고 이후 선량-의존적으로 감소해 1kGy에서 0.4%의 생존율을 보여 *C. cinereus*의 oidia포자나 *P. chrysosporium*의 conidia 포자에 비해 민감한 방사선감수성을 보였다. 민감성의 원인은 정확히 알 수 없으나 종간의 차이 또는 담자포자의 유전적 다양성에 기인할 것으로 생각된다. 각종 기질을 함유한 고체배지에서 군사성장속도와 기질분해효소활성도의 조사결과, 방사선조사균에서 선발된 균주들은 기질에 따라 다양한 양상을 보였다(표 2-6). 송 등(1996)이 버섯완전배지에서 느타리버섯 담자포자를 배양하면 포자에 따라 다양한 군사성장속도를 나타낸다고 하였는데, 본 연구에서도 대조균에서 역시 유사한 결과를 보였으며 완전배지에서의 군사성장속도에 비례하여 기질에 따라 유사한 성장속도를 보였다. 방사선조사균의 경우, 검색한 45 종의 균주들은 기질에 따라 군사성장속도와 기질분해효소활성도가 다양하였으며 이들 중, 모든 기질에서 군사성장속도 및 기질분해효소활성도가 뛰어난 균주, 1.5KG-2를 선발할 수 있었다(표 2-6). 이러한 다양성의 원인은 분해효소유전자나 발현조절유전자 혹은 분해산물의 세포내 흡수, 이동과정에 관련된 유전자의 변화 등이 방사선조사에 의해 유도된 때문으로 생각된다. 더우기, 한 종류의 기질에서 군사성장속도나 기질분해능이 변화된 균주

뿐만 아니라 두 종류 이상의 기질에서도 다양성을 나타내는 균주도 발견되어, 방사선조사효과가 특정한 유전자에만 작용하지 않으리라는 견해(Boominathan *et al.*, 1990)에 상응하는 결과라고 사료된다. 또한 섬유소 분해능이 다양한 변이주 뿐만 아니라 최소배지(MM)에서 균사생장이 급격히 제한되는 변이주도 발견할 수 있었는데, 영양요구주일 가능성이 있으므로 이를 확인한다면 각종 외부 유전자를 도입하는 형질전환체 개발에 활용할 수 있을 것이다. 본 연구에서 얻어진 분비효소의 활성도를 배지별로 비교한 결과 2KG-1, 2KG-2와 20KG-1 변이주에서 차이를 나타내었고, 2KG-2의 경우에 액체배양할 때 섬유소 분해능이 높아짐을 알 수 있었다(표 2-7). 특히 2KG-2의 경우 β -glucosidase, exo-chitinase 및 endo-chitinase의 활성이 높게 나타나는 것으로 미루어 섬유소성 생물자원의 분해에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. Boominathan 등(1990)이 이온화방사선을 조사하여 획득한 *P. chrysosporium* 변이주에서 배양조건에 따라 lignin peroxidase 동질효소(isozyme)의 수가 변화된다고 보고하였는 바 2KG-1, 2KG-2와 20KG-1 균주에서 배양조건에 따른 동질효소의 변화를 조사한다면 이들 효소의 발현에 관련된 기작을 밝히는데도 유용하리라 기대된다.

다. 세포외 단백질의 양상

서로 다른 종간에는 뚜렷한 단백질양상의 차이가 있었으며, 속이 같은 3개의 균주인 *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus flavellatus* 간에는 유사한 양상을 보였다. 그러나 *Pleurotus ostreatus*의 방사선유기 변이주인 PO-20KG, PO-2KG-1 및 PO-2KG-2에서는 wild type 과는 다른 몇 종류의 단백질이 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한 방사선유기 변이주들 간의 단백질양상은 PO-20KG보다 PO-2KG-1 및 PO-2KG-2 균주에서 몇 종의 다른 단백질이 발

현될 것으로 시사되었다.

라. 변이주의 RAPD 양상 조사

14 종류의 random primer로 실시한 RAPD 분석결과 모두 218개의 RAPD band를 조사할 수 있었다(그림 2-1). 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 표 2-8에 나타냈다. 대조군에 비해 변이주는 뚜렷한 차이를 보여 50%~52%의 범위에 속했으며 변이주간에는 49%~57%의 유사도를 보였다. 유전유사도상수를 기초로하여 얻은 근연관계도(그림 2-2)를 보면 대조군과 2KG-2, 2KG-1과 20KG가 각각 유사군을 형성하였다. 돌연변이 유기가 되지않은 자연상태의 *P. ostreatus* 담자포자간 유전유사도를 분석한 송 등(1996)의 결과를 보면 평균 73%-85%였으나 본 연구에서는 대조군에 대한 유전유사도가 50%-52%였고 3 종의 변이종간에 49%-57%의 낮은 유전유사도를 보여 방사선유기 변이주에서 유전적 이질성이 증가되었음을 시사한다. 특히, 20kGy의 선량에 의해 유기된 20KG-1의 경우 근연관계도(그림 2-2)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 조사결과는 효소활성도의 차이가 유전적인 변화에 기인하는 유전유사도의 차이와 밀접한 상관성이 있는 것임을 보

였으며, 분해효소에 대한 특정 유전자와 이의 발현에 관련된 유전자 변화를 변이주에서 확인한다면 섬유소성 생물폐자원의 재활용에 관련한 유전육종연구에 더욱 진전이 있으리라 기대된다.

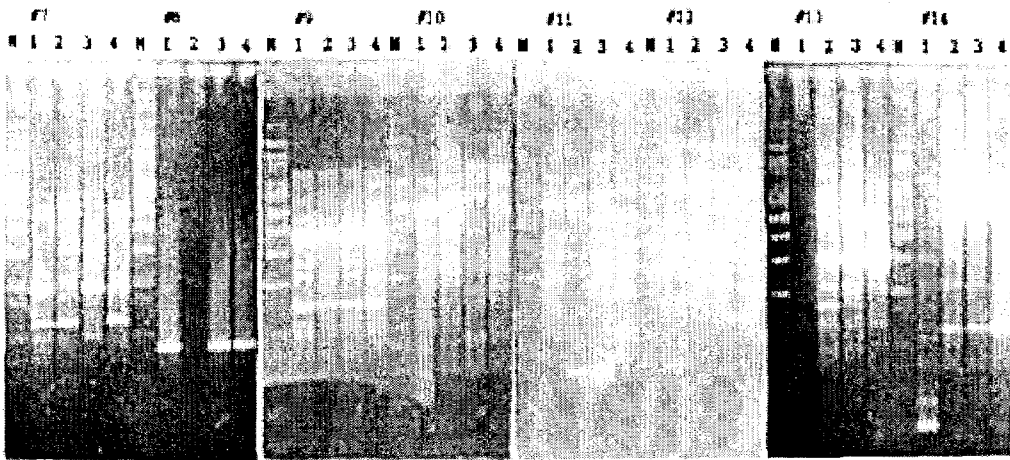
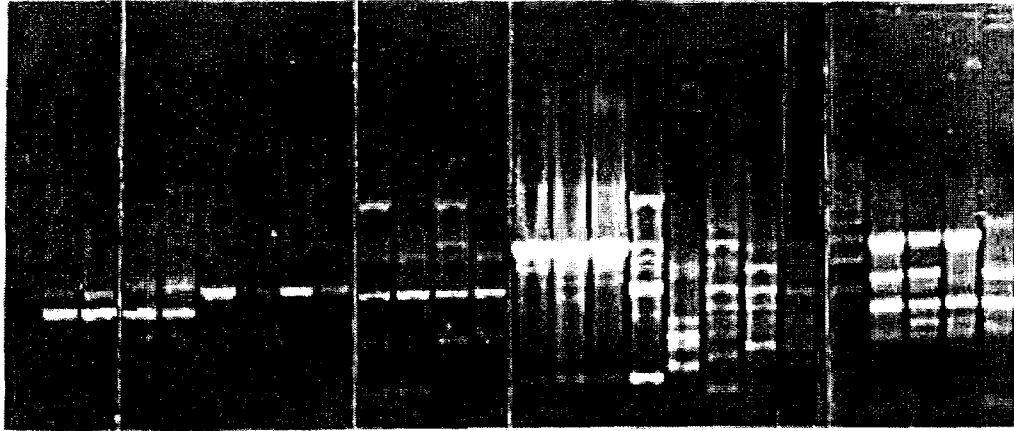


Figure 2-1. RAPD fingerprints of four isolates from the basidiospore of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-ray using fourteen different primers. M : 1kb marker, 1 : Control, 2 : 2KG-1, 3 : 2KG-2, 4 : 20KG-1, #1-#14 : primers (details as for Table 2-3).

Table 2-8. 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
Control	1.000000			
2KG-1	0.504587	1.000000		
2KG-2	0.518349	0.568807	1.000000	
20KG	0.495416	0.555046	0.490826	1.000000

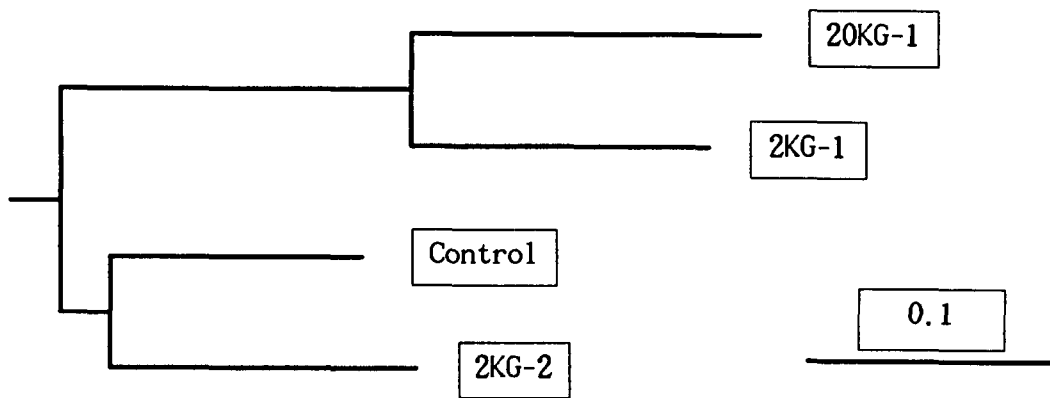


Figure 2-2. Dendrogram of genetic similarity of four isolates from the basidiospores of *Pleurotus ostreatus* irradiated with gamma-rays

제 3 절 생물자원의 방사선분해 특성연구

1. 연구 배경

제2절의 연구배경에서 언급하였 듯이 섬유소성 생물폐자원은 물리적인 구조에 기인하여, 물리적, 화학적 또는 생물학적으로 분해가 용이하지 못하다. 이와 같은 구조적인 단점을 해소하기 위해서는 우선 섬유소성 생물자원의 세부적인 구조를 파악해야 할 것으로 여겨지기 때문에 광학현미경 및 전자현미경 관찰을 통한 생물자원의 형태적 성상을 관찰할 필요가 있다. 아울러, 생물폐자원의 함수율, 함수능 및 미생물배양용 배지의 조성 변화 등을 파악함으로써 미생물의 생육 및 분해조건에 대하여 간접적으로 접근할 수 있을 것이다. 특히 우리 연구실에서는 방사선에 대한 섬유소성 생물폐자원의 형태적, 구조적 변화는 물론 TGA 분석을 통한 물리적 특성 파악에 초점을 맞추어 자연상태에서의 인위적인 풍화 가능성을 예측하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 물리적 풍화 특성

각 시료의 적정 균이에 대한 기질로서의 타당성을 타진해 보기 위하여 흡수성을 조사하였고, 물리적 풍화특성을 검사하기 위하여 TGA 분석을 하였다(TGDSC92 data analysis system). Sampling rate는 2.2초였고, 분당 2.82℃씩 온도를 증가시켰으며, 알루미늄 용기 및 공기환경하에서 검사하였다. 시료의 물성을 알아보기 위하여 각 시료에 대한 흡수율을 조사하였다. 각각의 시료를 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 kGy로 방사선조사한 후, 시료 및 시험관의 무게를 정량하고, 25 ml의 증류수를 가하였다. 16시간 동안 잘저어준 후 1 시간동안 4℃에서 14,000 rpm으로

원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 흡수율을 계산하였다. 흡수율은 시험관과 침전물의 무게에서 시험관과 원심분리전 시료의 무게를 뺀 값으로 환산하였다.

나. 형태적 특성

우리 연구소가 보유하고 있는 방사선조사시설을 이용하여(Co-60, 약 70,000 Ci 용량, Atomic Energy of Canada Ltd.), 시료를 상온, 상압, 공기중에서 방사선 조사하였다. Fricke dosimeter로 측정한 조사선량률은 0.76 kGy/hr 였다. 국내에서 산출량이 많은 벚짚, 톱밥, 왕겨 및 옥수수대를 선별하여 시료로 이용하였다. 방사선조사전/후 각각의 시료에 대한 형태적 특성을 주사현미경(JEOL JSM-5200 scanning microscope(JEOL Ltd., Japan))으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 물리적 풍화 특성

각각의 시료에 대한 물리적 풍화특성을 검사하기 위하여 TGA 분석을 한 결과를 그림 2-1 - 2-4에 나타내었다. 활성화에너지를 구하기 위해 다음의 식을 이용하였다.

$$-\ln(RH/T^2) = (E_a/k_B)(1/T) + \text{constant}$$

: RH = the rate of heating (K/hour)

T = the temperature (K)

k_B = Boltzmann's constant (0.00003617 eV/K)

E_a = the activation energy (eV)

위 식에서, $-\ln(RH/T^2)$ 를 y로, $(E_a/k_B, \text{slope})$ 를 m으로, $(1/T)$ 를 x로, constant(x-axis intercept)를 b로 간략히 치환하면, $y=mx + b$ 와 같이 표현할 수 있는 데 이 식에서 활성화에너지($E_a = \text{the activation energy}$

(eV))를 구해본 결과, 그림에서 보는 바와 같이 113℃-127℃에서 흡열 반응의 peak가 나타남을 알 수 있었다. 벚짚과 옥수수대는 123.84℃와 127.54℃에서 peak를 보였는데 그 enthalpy는 각각 -30.952 cal/g, -21.238 cal/g이었다. 또한 왕겨와 톱밥은 116.63℃와 113.95℃에서 각각 -32.06 cal/g 및 -38.84 cal/g의 enthalpy를 보였다. 이들 시료는 먼저 전리방사선인 Co-60 감마선 조사장치로, 경제선량이라 볼 수 있는 30 kGy를 조사한 시료들로서 활성화에너지를 이용한 인위적인 풍화를 유도함으로써 적정균이에 의한 분해가 용이하도록 처리가 가능할 것으로 여겨진다.

시료의 보습성을 알아봄으로써 각 시료의 적정 균이에 대한 기질로서의 타당성을 타진해 보기 위하여 흡수성을 알아본 결과를 표 3-1에 나타내었다. 벚짚의 경우 다른 시료들 보다 방사선조사전의 흡수성이 2.94 ± 0.04 g/0.45g substrate으로 제일 좋았으나 방사선 조사 후 큰 변화가 없었다. 그러나 옥수수대, 왕겨 및 톱밥 모두 방사선조사 후의 흡수성이 조사전보다 떨어지는 경향을 보임을 알 수 있었으나 유의성은 없었다.

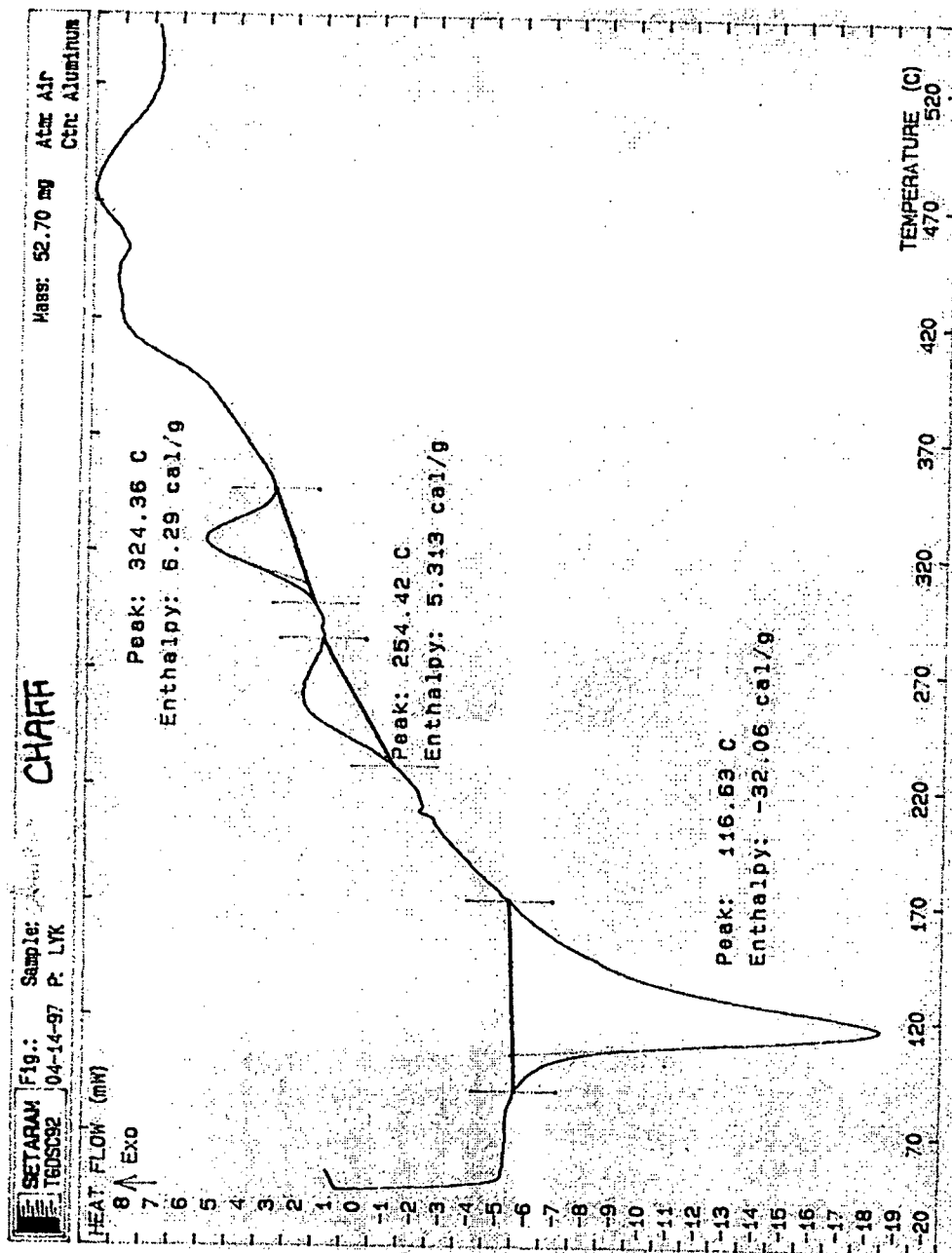


Figure 3-1. TGA analysis of rice straw after 30 kGy irradiation

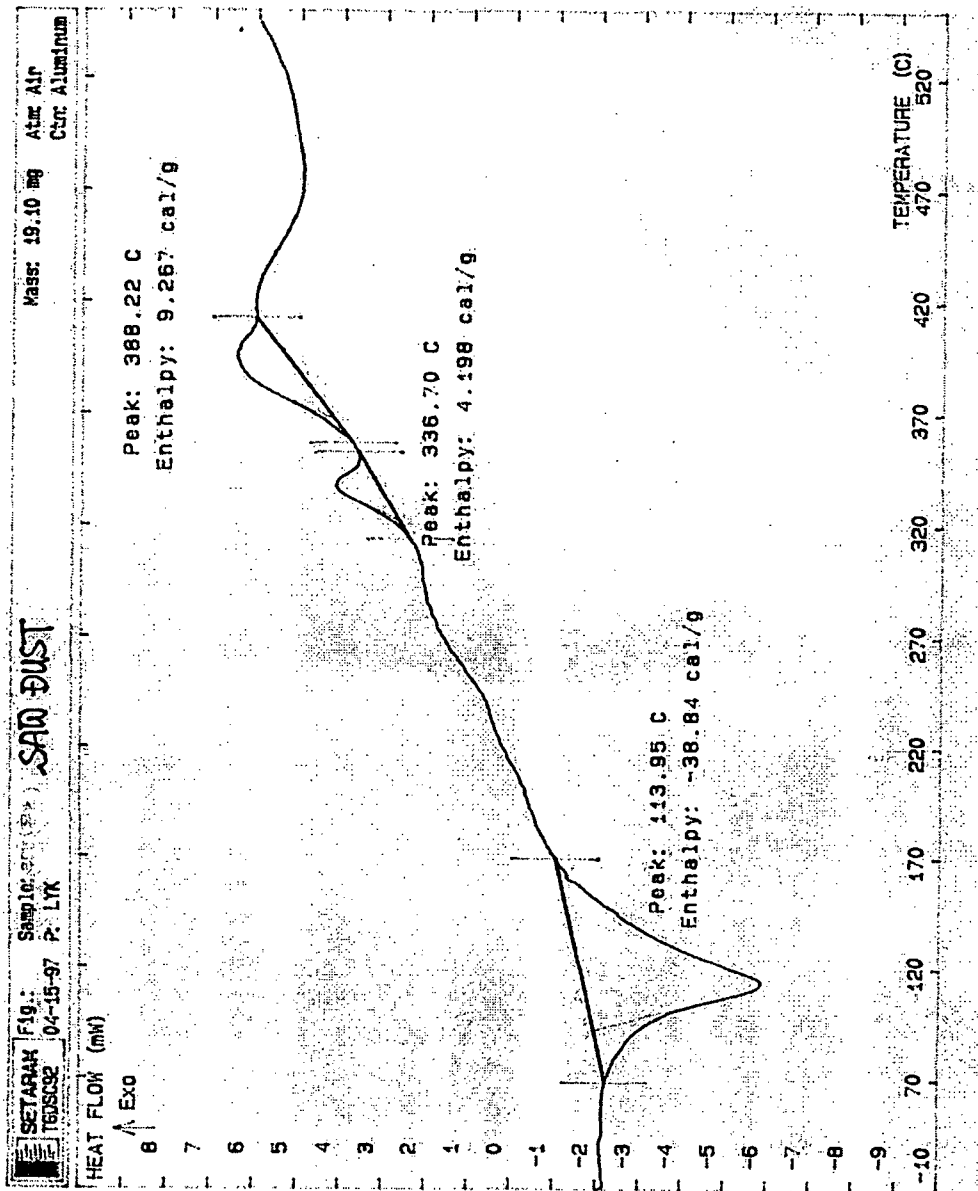


Figure 3-2. TGA analysis of corn stover after 30 kGy irradiation

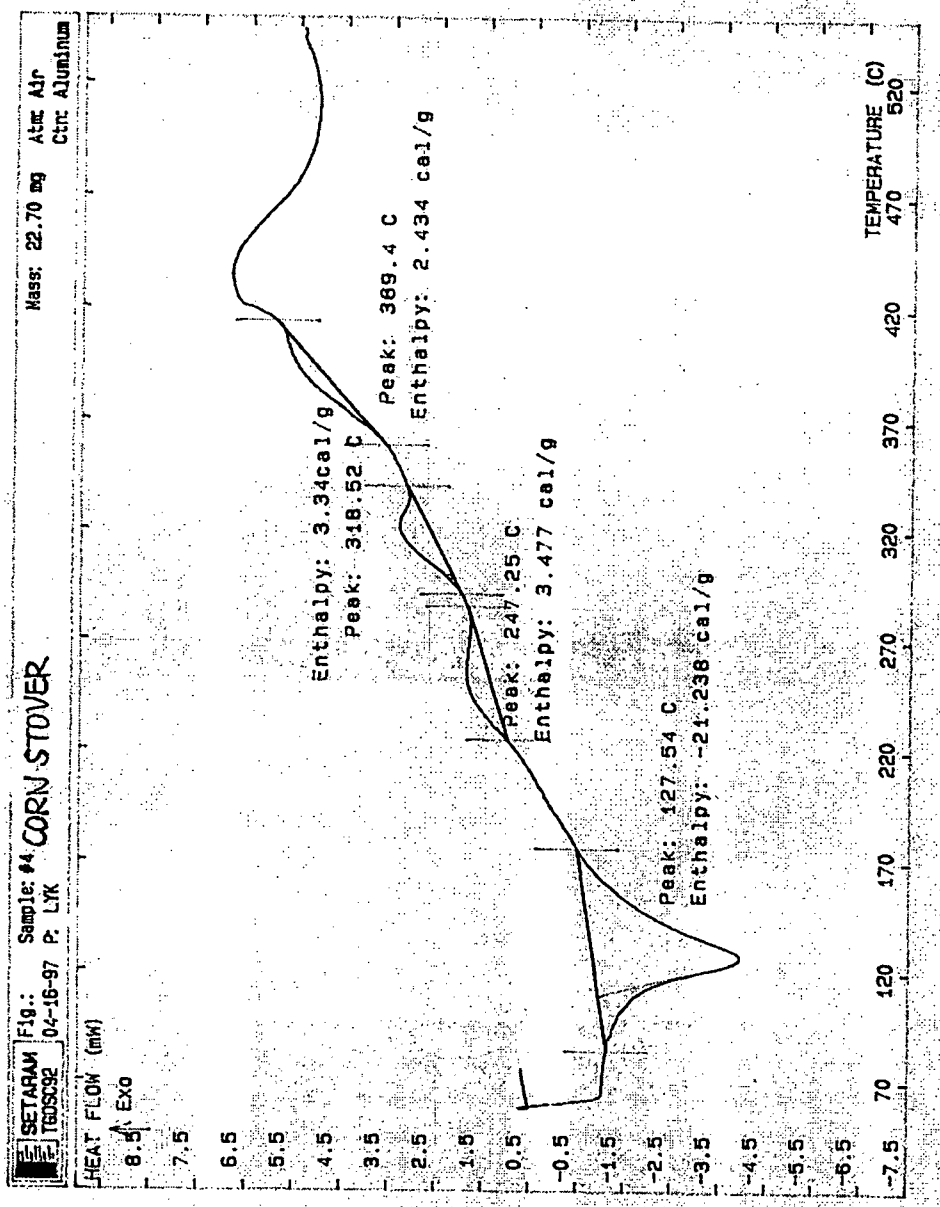


Figure 3-3. TGA analysis of chaff after 30 kGy irradiation

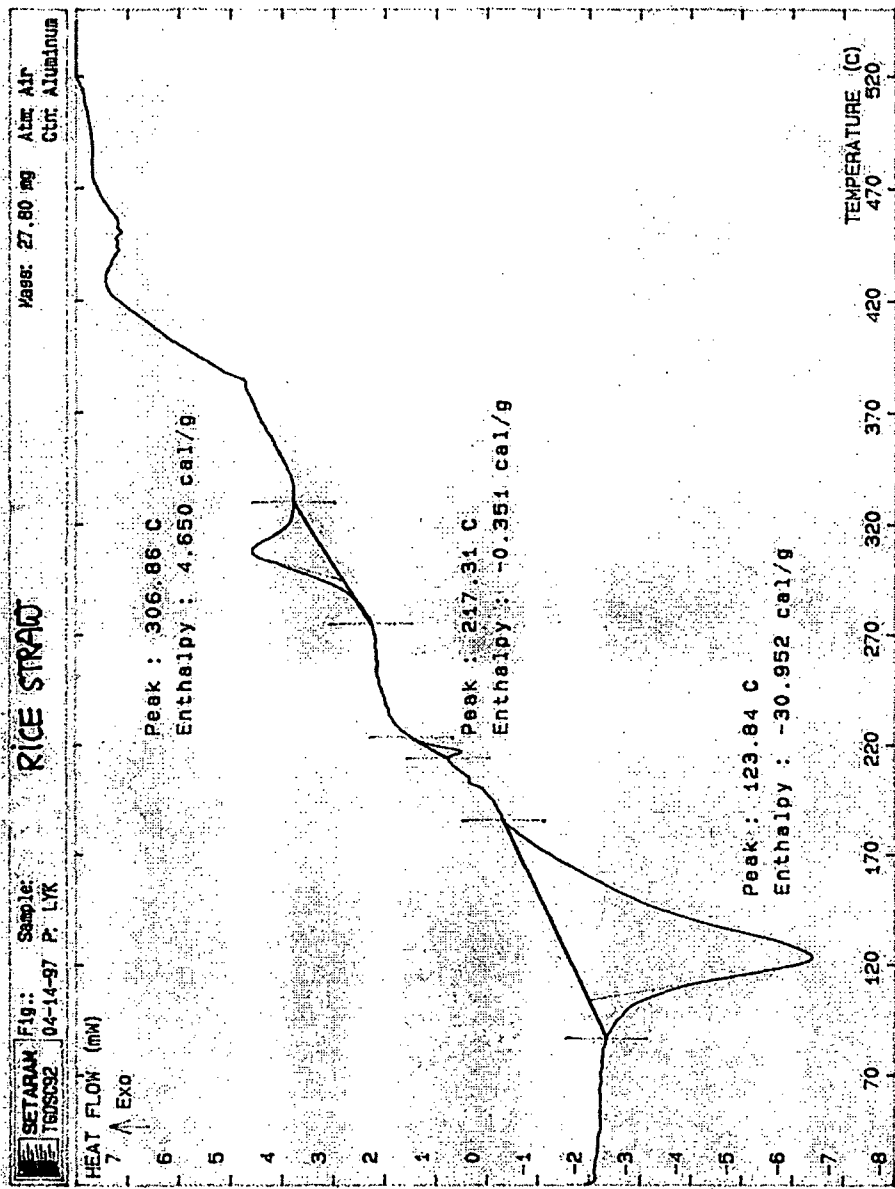


Figure 3-4. TGA analysis of sawdust after 30 kGy irradiation

Table 3-1. Water holding capacity(g/0.45g substrate) of 4 samples

Radiation dose(kGy)	Substrate			
	Rice straw	Corn stover	Chaff	Saw dust
0	2.94 ±0.04	2.55 ±0.02	1.30 ±0.01	2.52 ±0.06
5	2.98 ±0.01	2.16 ±0.04	1.15 ±0.04	2.49 ±0.08
10	2.85 ±0.01	2.14 ±0.01	0.90 ±0.01	1.88 ±0.01
20	2.95 ±0.09	2.24 ±0.06	0.92 ±0.03	1.76 ±0.02
40	2.93 ±0.02	2.24 ±0.04	0.93 ±0.04	1.80 ±0.01

나. 형태적 특성

방사선조사전. 후 각각의 시료에 대한 주사현미경 관찰결과를 그림 3-5 - 3-9에 나타내었다. 대조군과 비교했을 때 톱밥을 제외한 볏짚, 옥수수대 및 왕겨의 구조는 500 kGy를 조사하였을 때부터 변성이 조짐이 보이기 시작하였다. 각 시료 공히 1 MGy 및 2 MGy의 방사선을 조사하였을 때 구조의 견고성(결정성 및 중합성)이 감소되는 경향을 보였다. 그러나 이와 같은 고선량을 조사하기 위하여서는 고비용이 들기 때문에 이의 절감을 위한 연구가 요구된다.

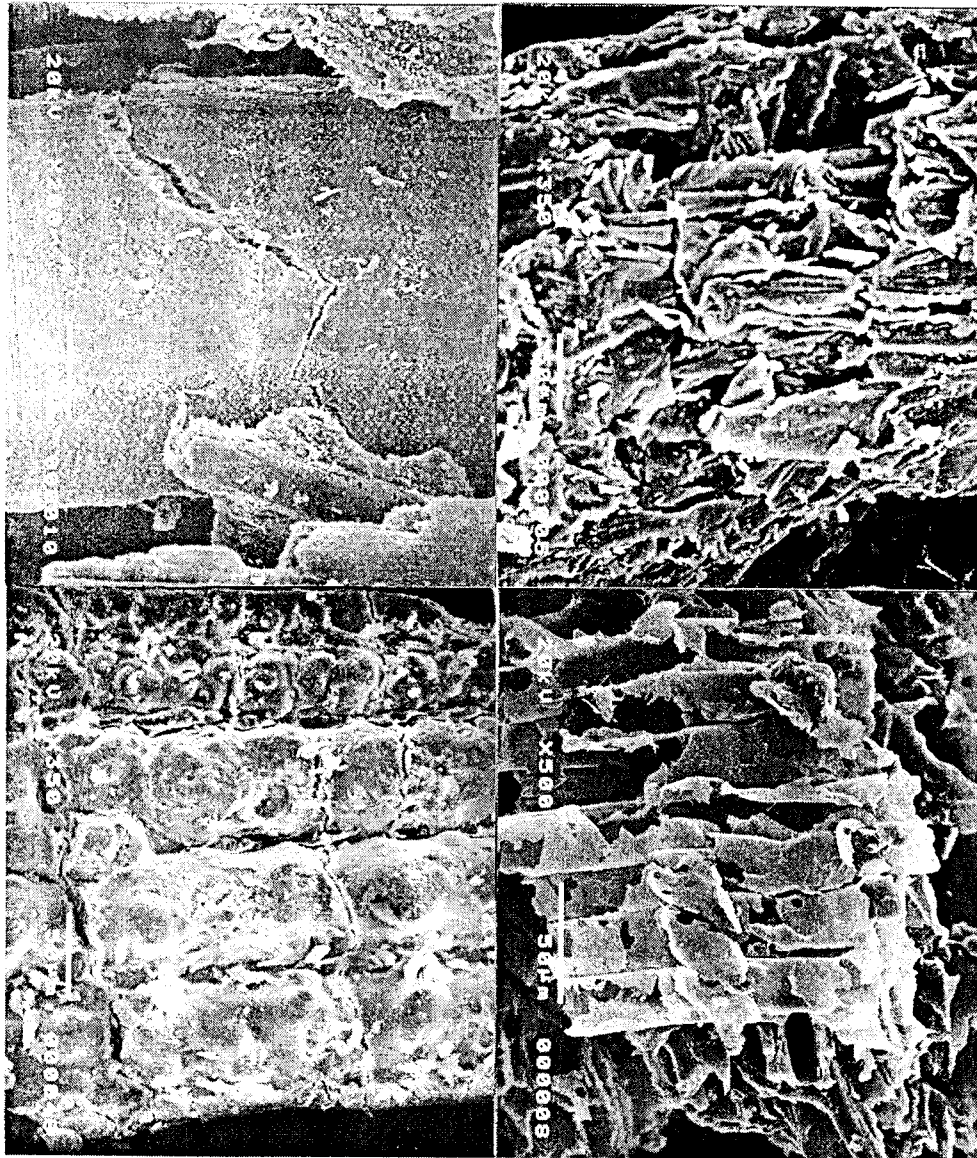


Figure 3-5. SEM observation of the control (rice straw, corn stover, chaff, sawdust : clockwise)

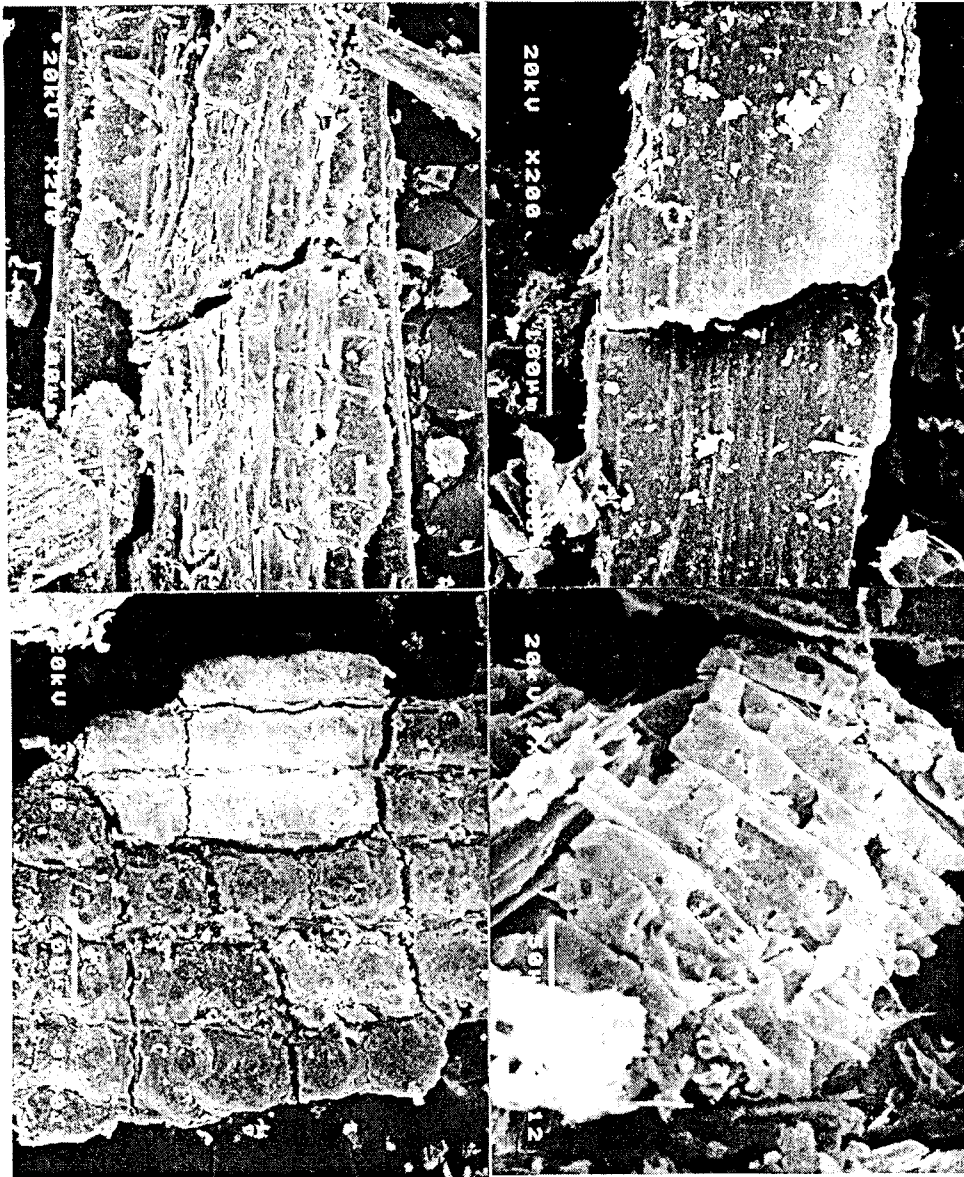


Figure 3-6. SEM observation of the 30 kGy irradiated (rice straw, corn stover, chaff, sawdust : clockwise)

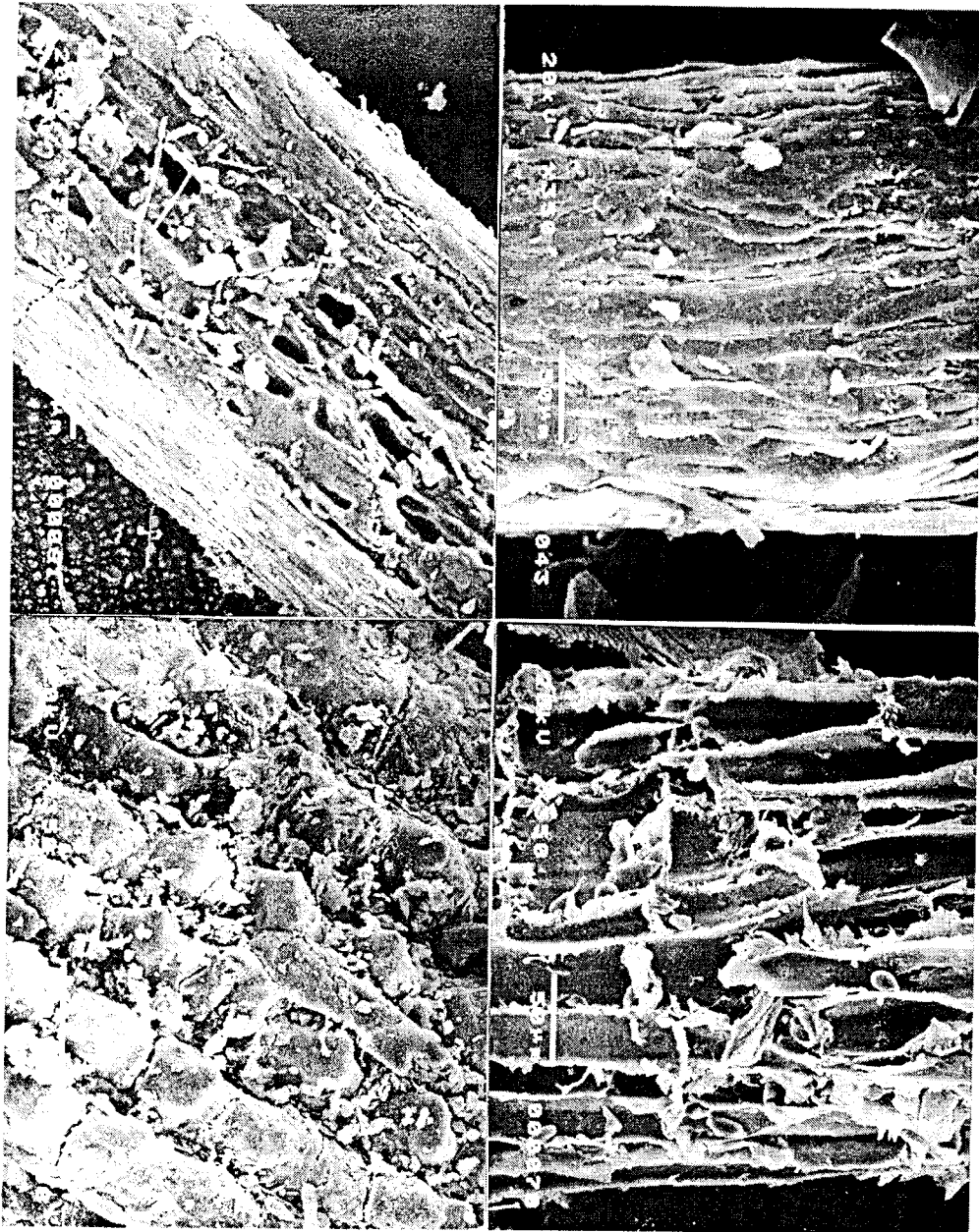


Figure 3-7. SEM observation of the 500 kGy irradiated (rice straw, corn stover, chaff, sawdust : clockwise)



Figure 3-8. SEM observation of the 1 MGy irradiated (rice straw, corn stover, chaff, sawdust : clockwise)

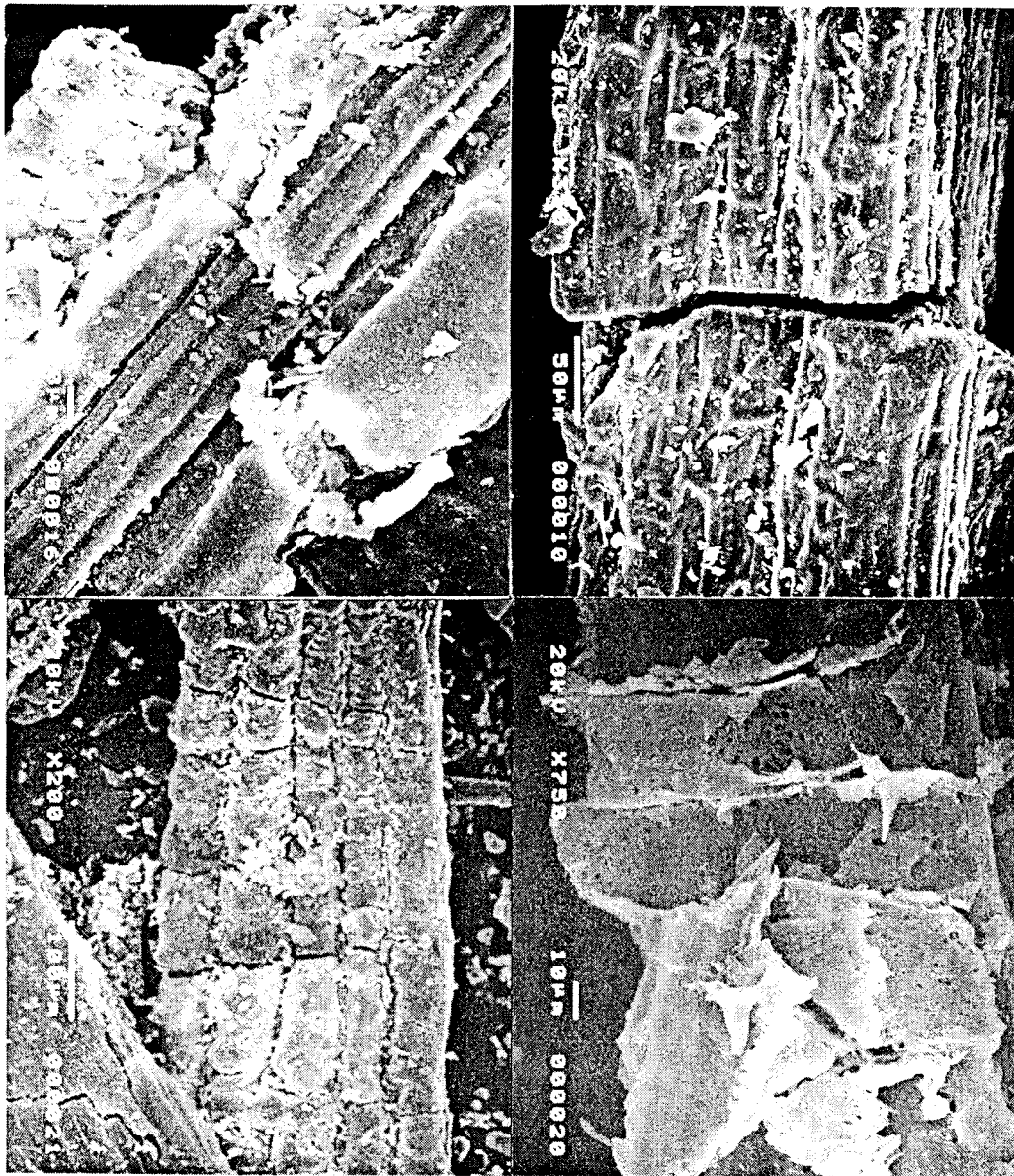


Figure 3-9. SEM observation of the 2 MGy irradiated (rice straw, corn stover, chaff, sawdust : clockwise)

제 4 절 유용균이주 발효부산물의 기능성연구

1. 연구 배경

많은 양의 섬유소성 농림부산물이 전 세계적으로 생산되고 있으나 아직까지 제대로 활용이 되지 못하고 있는 실정이다. 이는 부산물자체가 물리적, 화학적으로 생물체로 하여금 분해하는 데 장벽 역할을 하게 되고 또한 생물체에 대한 독성물질을 함유하고 있기 때문이다. 이제 까지 이의 원활한 분해를 위한 많은 노력이 되어 왔으나 여의치 못한 상황이다. 이에 우리 연구실에서는 이들 섬유소성 생물폐자원을 방사선을 이용해 유도한 적정미생물에 의한 발효공정을 거친 후 부산물에 대한 유익한 용도를 찾기 위해, 부산물의 생물활성 및 조사료로서의 효용성(제 5절)을 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

Mandel 배지에 5%의 미강과 일본의 오키나와 지방에서 수집한 sugar cane bagasse를 방사선조사해서(25kGy) 첨가한 후 *Pleurotus sajor-caju*로 배양하였다. 시료 200 g을 100℃에서 4시간 동안 물로 추출하였고, 80℃에서 3시간 동안 3회에 걸쳐서 에틸알콜 및 dimethylsulfoxide로 추출하였다. 각각의 추출물을 vacuum evaporation 시킨 후 50ml의 추출용매에 재현탁하였다. Millipore filter(0.45 um porosity)로 멸균한 후 4℃에 보관하였다.

가. 항돌연변이성 평가

항돌연변이성 검사는 Ames 방법(Ames *et al.*, 1975)을 변용하였다. *Salmonella typhimurium* TA100 및 TA98 균주를 이용하였고, back

mutation 유도는 aflatoxin B1과 S9 분획 및 furylfuramide(AF2)를 사용하였다.

나. 항진균성 glyceollin 생성 제고능 분석

콩의 자엽실험은 Sharp 등(1984)의 방법에 따랐다. 콩을 10%의 차아염소산나트륨에 넣고 10분간 소독하였다. 물로 씻은 후 암소에서 25℃, 7일 간 발아시켰다. 표면을 절개한 후 추출물과 2ml의 assay buffer (4mM CH₃COONa, 3mM Na₂CO₃)를 loading해서 암소, 26℃에서 1일간 배양하였다. 다시 80% 에틸알콜로 추출한 후 Molcul(Millipore, exclusion limit: 10,000)으로 거른 다음 HPLC로 glyceollin을 분석하였다(Matsushashi *et al.*, 1997).

다. 완두의 줄기생장 촉진 활성 검사

완두에 줄기에 대한 indole acetic acid(IAA)와 추출물의 영향은 Branca 등(1988)의 방법으로 조사했다. 일주일간 배양한 완두의 줄기를 1cm의 크기로 자른 후 IAA와 추출물을 함유한 Petri dish에 25℃, 3시간 동안 암소에서 배양 후 무게를 재었다.

3. 결과 및 고찰

가. 항돌연변이성 평가

Salmonella typhimurium TA100과 TA98에 대한 AF2의 back mutation은 각각 $2,136 \pm 465.1$ cfu(colony forming unit) 및 131.7 ± 40.5 cfu였다. AF2 실험에서는 물추출물, 알콜추출분획 및 DMSO분획물 모두 항돌연변이성을 나타내었는데, TA100에 대해서는 각각 63.6%, 70.3% 및 78.5%였고, TA98에 대해서는 -6.7%, 95.6% 및 45.5%로 나타났다(표 4-1).

Table 4-1. Effects on *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98 of which back mutation initiated by AF2

	TA100		TA98	
	cfu/plate	%inhibition of mutation	cfu/plate	%inhibition of mutation
control	2,136.0 ± 465.1	0.0	131.7 ± 40.5	0.0
water extract	777.3 ± 76.6	63.6*	194.0 ± 62.0	-6.7
Et-OH extract	634.7 ± 40.8	70.3*	8.0 ± 3.3	95.6**
DMSO soluble alcohol extract	459.0 ± 105.0	78.5*	99.0 ± 20.6	45.5*

Values represent mean±SD of revertants per plate triplicately.

* : p<0.05, ** : P<0.01.

Aflatoxin B1 실험에서는 물추출분획에서는 항돌연변이성이 없었으나 알콜추출분획 및 DMSO 분획에서는 TA100에 대해서 각각 28.7% 및 37.2%를 보였고, TA98에 대해서는 각각 49.2% 및 80.9%의 항돌연변이성을 보였다(표 4-2). Zhuang 등(1993)이 자실체의 추출물이 Sarcoma 180 세포실험에서 86.4%의 항종양성을 갖는다고 보고한 것보다는 미약하나 발효부산물 추출물로부터도 항돌연변이성이 좋게 나타남을 알 수 있었다.

나. 항진균성 glyceollin 생성 제고능 분석

콩의 자엽실험에서는 모든 추출물이 식물체로 하여금 병원성 감염을 방지할 수 있는 glyceollin 유도성을 갖고 있었다. 알콜분획물에 있어서 glyceollin FN1(190.42 ± 16.30) 과 FN2(80.95 ± 8.45)가 많이 나타났으며, DMSO분획물의 경우는 대조군보다 오히려 낮게 나타났다(표 4-3). 앞으로 이에 대한 원인물질 및 그 기작에 대한 연구가 요망된다.

다. 완두의 줄기생장 촉진 활성 검사

IAA 유도 줄기생장 실험에서는 양성반응을 보인 모든 실험군, 즉 IAA를 함께 첨가한 실험군에서 높은효과가 나타나 IAA와 추출물간의 유도 상승효과가 있는 것으로 평가되었다(표 4-4, 표 4-5).

Table 4-2. Effects on *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98 of which back mutation initiated by Aflatoxin B₁

	TA100		TA98	
	cfu/plate	%inhibition of mutation	cfu/plate	%inhibition of mutation
control	381.3 ± 23.2	0.0	849.3 ± 104.6	0.0
water extract	497.3 ± 51.1	-30.4	908.0 ± 94.5	-6.9
Et-OH extract	271.7 ± 31.5	28.7	431.3 ± 115.0	49.2*
DMSO soluble alcohol extract	239.3 ± 62.8	37.2	162.0 ± 29.0	80.9**

Values represent mean ± SD of revertants per plate triplicately.

* : p<0.05, ** : P<0.01.

Table 4-3. HPLC analysis of glyceollin elicitation

	glyceollin FN3(ng)	glyceollin FN2(ng)	glyceollin FN1(ng)
control	ND	ND	ND
water extract			
10 μ l	55.28 \pm 7.35	33.32 \pm 4.86	134.21 \pm 17.30
100 μ l	34.03 \pm 8.04	49.63 \pm 12.33	151.63 \pm 12.84
1ml	ND	29.19 \pm 7.58	186.03 \pm 22.15
Et-OH extract			
10 μ l	38.65 \pm 5.68	80.95 \pm 8.45*	190.42 \pm 16.30*
100 μ l	38.39 \pm 8.24	81.51 \pm 5.79*	183.11 \pm 12.75
1ml	ND	87.96 \pm 10.41*	187.99 \pm 15.47
Et-OH extract DMSO soluble			
10 μ l	66.58 \pm 11.32	ND	25.00 \pm 6.13**
100 μ l	ND	ND	ND
1ml	25.11 \pm 9.28	ND	ND

Glyceollin FN1(fraction number 1) is the concentration of retention time of 5.78min, glyceollin FN2(fraction number 2) of 6.30min, glyceollin FN3(fraction number 3) of 9.52min. Data represent mean \pm SD, * : p < 0.05, ** : p < 0.01(based on the value of water extract), n=3. ND means peak was not detected.

Water extract and Et-OH extract from 200g of sample were resuspended into 50ml of solvents respectively after vacuum concentration.

Table 4-4. Effects on pea stem elongation without IAA

	FW ₀	FW _t	ΔFW	100x(C-T)/C (%)
water extract				
control(1ml)	0.314	0.334	0.020	
100μl	0.321	0.374	0.053	-165.0
1ml	0.278	0.312	0.034	-70.0
Et-OH extract				
control(1ml)	0.300	0.324	0.024	
100μl	0.289	0.326	0.037	-54.2
1ml	0.303	0.304	0.001	+95.5
Et-OH extract (DMSO soluble)				
control(1ml)	0.270	0.302	0.032	
100μl	0.307	0.350	0.043	-34.4
1ml	0.268	0.272	0.004	+87.5

FW₀ : fresh weight, FW_t : fresh weight after incubation,
 $\Delta FW = FW_t - FW_0$ (increase in fresh weight),
 $100x(C-T)/C(\%) =$ percent inhibition.

Table 4-5. Effects on pea stem elongation with IAA

	FW ₀	FW _t	ΔFW	100x(C-T)/C(%)
water extract				
control(1ml)	0.278	0.303	0.025	
100μl	0.306	0.388	0.082	-228.0
1ml	0.311	0.357	0.046	-84.0
Et-OH extract				
control(1ml)	0.302	0.313	0.011	
100μl	0.305	0.388	0.083	-654.5
1ml	0.314	0.317	0.003	+72.7
Et-OH extract (DMSO soluble)				
control(1ml)	0.321	0.340	0.019	
100μl	0.307	0.341	0.034	-78.9
1ml	0.326	0.327	0.001	+94.7

FW₀ : fresh weight, FW_t : fresh weight after incubation,

ΔFW = FW_t - FW₀ (increase in fresh weight),

100x(C-T)/C(%) = percent inhibition.

제 5 절 생물자원이용 사료화 탐색

1. 연구 배경

식생활이 변화되면서 육류의 소비는 점차 감소하고 단백질의 좋은 급원이 되는 버섯의 소비량은 10년동안 2배이상 증가되었으며 생산량 전량이 소비되고 있어 앞으로 계속 증가될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 그러나, 버섯을 키우고 난 폐배지가 재활용이 되지 않고 버려지고 있어 환경문제에 대한 인식이 점차 증가되고 환경규제가 심해지는 오늘날 심각한 문제가 아닐 수 없다. 버섯은 성장시 성장기질을 생분해하여 생물자원을 향상시킬 뿐 아니라 분해생성물을 에너지원으로 사용하여 식물폐기물에서 번식할 수 있는 잠재적 생합성 능력을 가지고 있다. 또한 반추가축은 사람 혹은 단위 동물이 이용할 수 없는 농업폐기물을 조사료로 이용함으로써 자원활용성을 높이고 고가의 곡류사료를 대체할 수 있어 수입곡물 및 사료비 인상 등을 고려할 때 경제성이 높아지고 생산비 절감을 할 수 있어 매우 매력적이라 할 수 있다. 배지와 조사료로 주로 사용되는 옥수수대, 벚짚등 농업폐기물은 cellulose, hemicellulose, lignin등이 함유되어 있고 lignin은 cellulose polymer를 싸고 있어 cellulose, hemicellulose의 이용을 저해하므로 물리적, 화학적 전처리로 lignin을 분해시킬 경우 cellulose가 효소에 대한 민감성이 증가되어 가수분해가 증가된다는 것이 여러 연구에 의해 보고되었다. 그러나, 물리적 방법으로 분해시킬 경우 많은 에너지가 필요하고 화학적으로 할 경우 주변환경오염을 유발하며, 이런 방법은 비용이 높기 때문에 현실적으로 사용이 어렵고 cellulose생산과 효소에 의한 가수분해과정 또한 복잡하여 기술적, 경제적인 측면에서 많은 문제가 발생한다. 보고에 의하면 백색 부후균의 균사는 농업폐기물 중 lignocellulose, cellulose, hemicellulose 등을 영양분으로 사용하여 성장하기 때문에 농업폐기물의 섬유소를 분해시켜 소화율을 증가시켰으며, 고체발효를 통해 lignocellulosic물질 중 lignin을 선

택적으로 분해하므로 반추동물이 cellulose를 충분히 에너지로 쓸 수 있도록 하기 때문에 반추동물의 소화율을 증가시키는 데 널리 이용되어져 왔다고 보고하였다(Adamovi *et al.*, 1998). 특히, 백색부후균의 일종으로 느타리 버섯으로 알려진 *Pleurotus* spp. 는 섬유소 분해시 필요한 ligninase, laccase, cellulase 등 복합효소를 가지고 있어 버섯이 생성되는 동안 농업폐기물을 쉽게 소화될 수 있도록 도와준다(Bisaria *et al.*, 1993). 또한 버섯을 배양하기 전의 물질에 비해 자유당, 단백질, 회분의 함량은 증가한 반면 lignin양은 감소하였다고 보고되었다(Patrabansii and Madan, 1997). 반추동물이 적당한 양의 조사료가 함유되지 않은 사료를 다량 급여할 경우 반추위에서 발효속도가 신속하게 진행되어 반추위 내의 pH가 급속히 저하되고 섬유소(cellulose, hemicellulose)를 분해하는 미생물이 줄어들고 전분분해 미생물이 증가되어 급성 소화불량이나 식용감퇴를 초래하게 되며, 각종 대사성 질병과 번식장애를 유발시켜 가축의 수명을 단축시키는 요인이 된다.

따라서 본 연구는 버섯이 성장하는 동안 농업폐기물을 유용한 자원으로 생물자원을 향상시키고, lignin을 분해하여 반추동물의 소화력을 증가시키기 위하여 버섯 재배시 폐배지의 영양소를 분석한 후 반추동물의 조사료로서의 적합성에 대해 알아보려고 하였다. *P. ostreatus*를 방사선 조사를 하여 얻은 변이주를 멸균 옥수수배지에 접종하여 배양·버섯수확 후 배지의 영양소 성분을 분석함으로써 반추동물의 조사료로서의 가치가 있는지 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 발효부산물내의 영양성분 검사

방사선유기 들연변이주를 발효한 후 부산물내의 영양성분을 시험하였다. 시료 10g을 acetate포화용액과 증류수를 넣어 마쇄한 후 여과하

였다. 이 용액에 sodium oxalate를 넣어 증류수로 500ml까지 채웠다. DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)용액을 첨가하여 끓는 물에 넣어 5분간 가열한 후 진한 갈색이 되면 540nm에서 흡광도를 측정하여 시료 100g당 환원당의 함량을 glucose양으로 계산하였다. 조단백질은 Auto Kjedadl방법에 의해 분석하였다. 각 시료의 단백질은 분석한 N양에 단백질 계수 6.26를 곱하여 표시하였다. 조지방을 Folch법에 의해 시료 1g을 cholroform과 methanol을 섞은 혼합액을 넣어 섞은 후 생리식염수를 넣어 하룻동안 방치시켰다. 분리된 지질층을 건조시킨 후 무게를 재어 시료 1g당 %지방으로 나타내었다. 각 시료의 아미노산 분석은 시료를 PICO-tag방법에 의해 HCl을 첨가하여 110℃에서 24시간 동안 가열하여 가수분해시킨 후 가수분해된 시료의 HCl같은 성분을 제거시킨 후 다시 건조시켜 분석하기 위한 phenylthiocarbamyl유도체로 만들었다. PITC-derivatized free amino acid을 30cm Pico-Tag Free amino acid column(3.9x300mm)으로 140mM sodium acetate(6% acetonitrile)를 균등화 한 후 Waters HPLC system조건을 적용시켜 시료 400 μ l 중 10 μ l를 flow rate를 1ml/min, 40℃, 흡광도 254nm에서 60% acetonitrile로 분리하여 측정하였다.

나. 무기질 분석

무기질 분석은 XRF(X-Ray Fluorescence spectrometer, 독일 Siemens 사 SRS-303)를 사용하여 25℃, 3kW에서 출력하였다.

다. 비타민 분석

비타민 B₂는 HPLC(water 470 Fluorescence Detector, Colum : Zorbax ODS 4.6mm x 25cm)를 사용하였으며 비타민 C는 HPLC(water 486 Absorbance Detector, Colum : μ -Bondapak NH₂ 3.9mm x 30cm)를 사용

하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 발효부산물내의 영양성분 검사

각 시료의 3대영양소인 단백질과 탄수화물, 지방의 성분을 분석한 결과를 살펴보면 대조군인 P01과 비교할 때 조지방과 탄수화물의 경우 모든 군이 비슷한 함량을 나타내었으며, 조단백질의 경우 2배 정도 증가되었다(표 5-1). 대조군인 P01와 비교했을 때 다른 군의 아미노산함량은 모두 증가했으며 특히 P015는 대조군에 비해 2.6배가 증가하였다(표 5-2). 근육의 발달에 주로 사용되는 BCAA(branch amino acid)인 Ile, Leu, Val은 대조군에 비해 거의 모든 군이 25%이상 증가했으며 특히 P014와 P016은 가장 많이 증가했으나 P015는 val을 제외한 두가지 아미노산은 대조군과 거의 비슷하게 나타났다.

나. 무기질 함량

전체 무기질 함량은 대조군에 비하여 변이주의 함량이 증가되었으며, 특히 Ca, Mg, Si, Zn은 모든 군이 대조군에 비해 많은 양이 증가했으나, Mn 및 Cu는 대조군과 함량이 거의 비슷하거나 낮았다(표 5-3). 뼈를 구성하는데 중요한 무기질인 Ca과 P의 비율은 P05, P06, P016이 가장 이상적이었으며, P014는 대조군의 절반에 미치지 않았다.

다. 비타민 함량

비타민 B₂함량을 살펴보면 대조군에 비해 P05의 값이 비슷하고 나머지 군은 현저히 낮았다(표 5-4). 또한, 비타민 C의 함량은 대조군에서는 검출되지 않았으나 P014, P015, P016에서는 높게 나타났다. 이로써 발효부산물의 사료로서의 높은 효용성을 보여주었다.

Table 5-1. Nutrient energy of waste media

	P01	P05	P06	P014	P015	P016
carbohydrate*	46	36	47	58	62	52
lipid*	70	50	60	70	60	50
protein*	69	89	88	138	116	104
Total Energy (kcal/g)	1.09	0.95	1.08	1.41	1.25	1.07

* mg/1 gram of sample

Table 5-2. Essential amino acid and nonessential amino acid amounts of waste media

Sample(μ mol /g)	P01	P05	P06	P014	P015	P016
Arg	1.87	5.56	2.75	7.96	2.77	3.73
His	3.34	6.67	4.34	11.68	4.35	5.90
Ile	9.28	13.60	11.32	23.36	9.33	15.28
Leu	15.50	23.17	19.81	37.87	15.02	26.76
EAA Lys	2.70	5.08	3.34	10.44	1.27	5.27
Met	1.02	1.64	1.43	3.68	1.22	2.18
Phe	5.87	10.04	7.28	14.20	6.24	10.48
Thr	12.18	19.55	14.61	30.36	13.58	21.01
Tyr	0.54	1.48	1.08	3.32	1.04	1.77
Val	14.12	21.88	17.90	35.74	142.82	23.42
Total EAA	66.42	108.67	83.87	178.61	197.64	115.80
Cys	4.59	5.21	4.02	5.38	2.91	5.57
Asp	23.89	24.14	28.80	48.04	13.41	34.94
Glu	28.46	46.13	37.41	74.35	21.74	48.49
Ser	18.33	29.71	21.74	45.92	18.99	31.61
NEAA Gly	21.81	41.37	24.95	52.05	22.80	37.23
Ala	25.69	38.91	32.37	62.13	18.99	44.76
Pro	17.13	37.82	21.30	58.29	29.89	37.70
Cys2	0.20	0.32	0.41	0.75	0.46	0.71
Trp	0.10	0.43	0.31	0.85	0.50	1.77
Total NEAA	140.19	224.04	171.32	347.76	129.69	242.79
Total AA	206.61	332.71	255.19	526.37	327.34	358.59

Table 5-3. Mineral concentration of waste media

Sample(%)	PO1	PO5	PO6	PO14	PO15	PO16
Ca	0.64	0.94	0.88	0.74	0.76	1.18
P	0.75	0.95	1.01	1.24	1.18	1.08
K	1.22	1.47	1.82	1.81	2.07	2.12
Cl	0.36	0.41	0.39	0.38	0.39	0.48
Fe	0.06	0.07	0.05	0.10	0.06	0.13
Mg	0.06	0.07	0.08	0.09	0.08	0.09
S	0.15	0.22	0.21	0.24	0.20	0.25
Mn	0.02	0.02	ND	0.02	0.02	0.03
Br	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Cu	0.01	0.01	0.01	ND	0.01	0.01
Zn	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Si	0.93	1.89	0.87	1.03	0.94	1.45
Total	4.22	6.07	5.34	5.67	5.73	6.84
Others	95.78	93.93	94.66	94.33	94.27	93.16

Table 5-4. Vitamin concentration of waste media(ppm/g)

	P01	P05	P06	P014	P015	P016
B ₂	4.7	4.8	4.3	1.6	1.5	1.6
C	ND	ND	ND	281	398	486

제 6 절 방사선 및 산업미생물 병용 리그닌분해 및 응용기술

1. 연구 배경

주 구성성분이 lignocellulose인 생물폐자원(biowastes)이 전세계적으로 산적해 있고 그 생산량이 증가하고 있으나, 이의 구조적인 복잡성과 난분해성 때문에, 많은 분야의 연구에도 불구하고 이들의 재활용 혹은 유효이용이 잘 되지 못하고 있을 뿐 만 아니라 심각한 환경오염을 초래하고 있는 실정이다(Kuhad and Singh, 1993). 이러한 생물폐자원은 90% 이상이 cellulose, hemicellulose와 lignin으로 구성되어 있어서 산업적으로 유용한 화학물질의 원료가 될 수 있기 때문에 지난 20여년간 물리적(Awafo *et al.*, 1995), 화학적(Gharpuray *et al.*, 1983), 생물학적(Kirk and Farrell, 1987) 분해에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 이중 생물학적인 방법은 경제성, 재오염 유발성 등의 측면에서 다른 방법보다 양호하게 여겨져서 분해능이 우수한 세균류(Nakamura *et al.*, 1993), 균류(Gerber *et al.*, 1997)의 개발이 현재까지도 활발히 진행되고 있다. 특히, 자연상태에서 lignocellulose 분해성을 갖고 있는 식용버섯류에 대한 관심이 집중되고 있다(Boominathan *et al.*, 1990; Yoo, 1992). 식용버섯은 lignocellulose를 이용하여 영양가 높고 의약품으로 활용성이 뛰어난 식용의 자실체를 만들어 낸다(Jwanny *et al.*, 1995). 또한, 식용버섯의 재배에 사용된 생물폐자원의 발효부산물 은 본 보고서의 제4절 발효부상물의 기능성 연구결과에서 보였 듯이 항돌연변이성, 항진균성, 식물의 성장촉진성이 있는 물질을 함유하고 있을 뿐 만 아니라 제5절 사료화 탐색 연구결과에서 처럼 그 자체로도 가축의 조사료로써 활용이 가능할 정도의 높은 무기질 및 비타민 함량과 영양성분이 포함되어 있어 식용버섯의 재배는 생물폐자원의 유용한 재

활용을 가능하게 한다. Lignocellulose의 세가지 주 구성성분 중에서 lignin은 분해가 가장 어려우며, 생물폐자원의 조직구조상 lignin성분이 hemicellulose와 cellulose 층을 싸고 있으므로 일단 lignin의 분해가 이루어져야 효과적으로 hemicellulose나 cellulose층의 분해가 가능하다. 따라서, lignin 분해능이 뛰어난 버섯을 유도하거나 선별해 내야 할 필요성이 대두된다. 생물폐자원의 보다 활발한 재활용을 위해 우량한 식용버섯을 개발하고자 균사체간의 교배 또는 원형질체(protoplast)의 융합, 외부유전자의 도입(Yoo and Cha, 1992) 등의 방법과 이온화방사선(Lee et al., 1998) 혹은 화학물질(Imbernon and Labarere, 1989) 등의 돌연변이 유기물질을 사용한 유전육종 방법이 시도되고 있다. 본 연구실에서는 본 보고서의 제2절 생물자원 분해균주 확보 연구결과에 보였 듯이 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 담자포자에 이온화방사선(gamma-ray)을 조사하여 섬유소분해능이 증가된 변이주를 분리해낸 바 있다. 또한, 방사선에 의해 유도된 버섯균주의 유전적 구분을 위하여 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)법을 사용하였는데 유사한 결과가 *Trichoderma harzianum*(Schlick et al., 1994)의 방사선 유도 변이주에서도 확인된 바 있다. 더불어 종의 분류 및 계통유전학적 연구를 위해 유전적 특징을 분석하는 방법 중 비교적 실행이 간단하고 변별력이 뛰어난 rDNA내 ITS(internal transcribed spacer)부위의 염기서열 비교 방법이(Graham, 1994; Hseu et al., 1996) 한 종에서 유도된 변이주의 구분에도 매우 유용할 것으로 여겨진다(Hseu et al., 1996). ITS의 염기서열은 종간 진화의 척도로 유용하게 이용되고 있으나 한 종에서 유래된 변이주들의 구분을 위한 척도로서 ITS 변화를 조사한 연구는 미진하며, 방사선에 의한 ITS의 염기서열 변화에 관한 보고는 전무한 상태이다(Schlick et al., 1994).

본 연구는 이온화 방사선으로 느타리버섯 균사체로부터 lignin 분

해능이 뛰어난 변이주를 선발하고, 유전적 특징을 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 리그닌분해능 및 균사체 성장특성 조사

이온화 방사선을 조사하여 획득한 변이주에 대한 리그닌분해능을 조사하였다. 또한 균사체의 성장 특성과 자실체 형성능 등을 조사하였다.

나. 변이주의 RAPD 양상 조사

PCR 반응용액은 AccuPower™ PreMix-Top Kit(Bioneer, Korea)에 5 pmol의 random primer(Operon Tech., Inc., USA; 표 6-1), 10 ng의 genomic DNA 그리고 50 μ l의 증류수를 첨가하여 만들었다. PCR 반응은 Gene Amp PCR System 2400(Perkin Elmer)를 사용하여 94℃에서 5분간 DNA를 변성(denaturation)한 후, 증폭반응은 94℃에서 1분간 변성, 38℃에서 30초간 부착(annealing), 72℃에서 2분간 중합(polymerization)을 55회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 5분간 중합반응을 하였다. 증폭된 DNA band는 1% agarose gel에서 10 V/cm로 전기영동하여 확인하였다. RAPD 양상을 분석하기 위해 증폭된 모든 DNA band에 일련번호를 붙이고 band가 있으면 'T'로, 없으면 'A'로 표기하여 CLUSTAL-W software(Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 균주간 유전 유사도를 구하였다.

Table 6-1. Primers used in RAPD reaction

Primer	Source	G-C contents (%)	Sequences
#1	OPF-1	60	5-ACGGATCCTG-3
#2	OPF-6	60	5-GGGAATTCGG-3
#3	OPF-9	60	5-CCAAGCTTCC-3
#4	OPF-13	60	5-GGCTGCAGAA-3
#5	OPG-2	70	5-GGCACTGAGG-3
#6	OPG-3	70	5-GAGCCCTCCA-3
#7	OPG-5	60	5-CTGAGACGGA-3
#8	OPH-2	60	5-TCGGACGTGA-3
#9	OPH-3	60	5-AGACGTCCAC-3
#10	OPH-4	70	5-GGAAGTCGCC-3

다. 변이주의 ITS2 염기서열 결정

변이주들을 100 ml의 PDB(potato-dextrose broth, Difco) 배양액에 25℃에서 7일간 배양하였다. 배양된 균사체로부터 Graham의 방법(1994)에 따라 DNA를 추출하였다. ITS 부위는 담자균류의 ITS 부위의 보존된 염기서열로부터 합성한 primer ITS1-A(5'-GGTTCGGTAGGTGAACCTG-3')와 ITS2-B(5'-GTTCAGCGGGATGTCCTACC-3')를 사용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물은 DNA PrepMate™(Bioneer, Korea)을 사용하여 순수분리하였다. ITS2의 염기서열은 AccuPower™ DNA Sequencing Kit(Bioneer, Korea)와 Silverstar™ Staining Kit(Bioneer, Korea)을 사용하였으며 ITS2-A(5'-CCTTGC GCCC TTGGTATTC-3') primer와 ITS2-B primer를 이용하여 결정하였다. 결정된 ITS2의 염기서열들은 BLAST program(Altschul *et al.*, 1990)을 이용하여 NCBI GenBank로부터 알려진 느타리버섯의 ITS 염기서열과의 상동성을 확인하였고 CLUSTAL-W software(Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 염기서열을 배열하여 차이가 있는 지 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 리그닌분해능 및 균사체 성장특성 조사

고체배지에서 균사생장은 LIG 배지에서 P0-5와 P0-6의 경우 각각 3.5배와 2.8배로 빠르게 성장하였으며 PDA 배지에서도 대조군에 비해 생장이 빨랐다. Lignin 분해는 느타리버섯의 경우 최소한 3가지 효소(manganese peroxidase, laccase, and glyoxal oxidase)가 관여되는 것으로 알려졌다(Sarikaya and Ladisch 1997). 본 연구에서 사용한 lignin 분해능 조사법은 어느 특정한 효소에 의한 지는 알 수 없으나 P0-5와 P0-6은 아마도 이들 효소의 활성이 증가되게하는 변화가 있을 것으로 여겨진다. 균사체로부터 방사선으로 유도한 5종의 변이주는 모두 자실체를 형성하였으며 균사체 성장양상도 대조군과 유사하였다.

Table 6-2. Characteristics of five strains (*Pleurotus ostreatus*) induced by gamma-ray radiation

Strain*	Mycelium density	Fruiting body formation	PDA (5-day)** (mm)	LIG (7-day)*** (mm)
Control	++++	Yes	15.1	2.5
PO-5	++++	Yes	19.5	8.7
PO-6	++++	Yes	16.0	7.0
PO-14	++++	Yes	13.0	2.5
PO-15	++++	Yes	23.0	3.5
PO-16	++++	Yes	17.5	3.5

* PO-5 and PO-6 were isolated from 1 kGy irradiation group, PO-14 from 2 kGy irradiation group, and PO-15 and PO-16 from 1 kGy re-irradiation group of PO-14.

** Growth on potato dextrose agar for 5 days.

*** Growth on lignin media for 7 days.

나. 변이주의 RAPD 양상 조사

느타리버섯과 이의 방사선 유기 변이주들(P0-5, P0-6, P0-14, P0-15와 P0-16)에서 10종의 primer(Table 1)를 사용하여 RAPD 양상을 조사하였다(그림 6-1). 증폭된 DNA band들의 크기는 0.3-4.5 kb였으며 대조군에 대해 변이주 모두에서 다형성을 보였다. 유전유사도 상수는 표 6-3에 제시하였다. 세 변이주(P0-5, P0-6, 그리고 P0-14)는 대조군에 대해 각각 93%, 91%와 73%의 유전유사도를 보였다. 두 변이주(P0-15와 P0-16 : 1 kGy의 gamma-ray를 조사한 P0-14로부터 얻은 변이주)에서는 유전유사도가 P0-14에 대해선 각각 91%와 82%를 보였으며 대조군에 대해서는 77%와 64%에 불과하였다. 이상의 결과는 유전유사도의 경우 방사선 조사선량과 조사빈도에 의존적으로 변화될 수 있음을 보인 것으로 사료된다. 이러한 경향은 *Trichoderma harizianum*의 방사선 유기 변이주에서도 보고된 바 있다(Schlick et al. 1994).

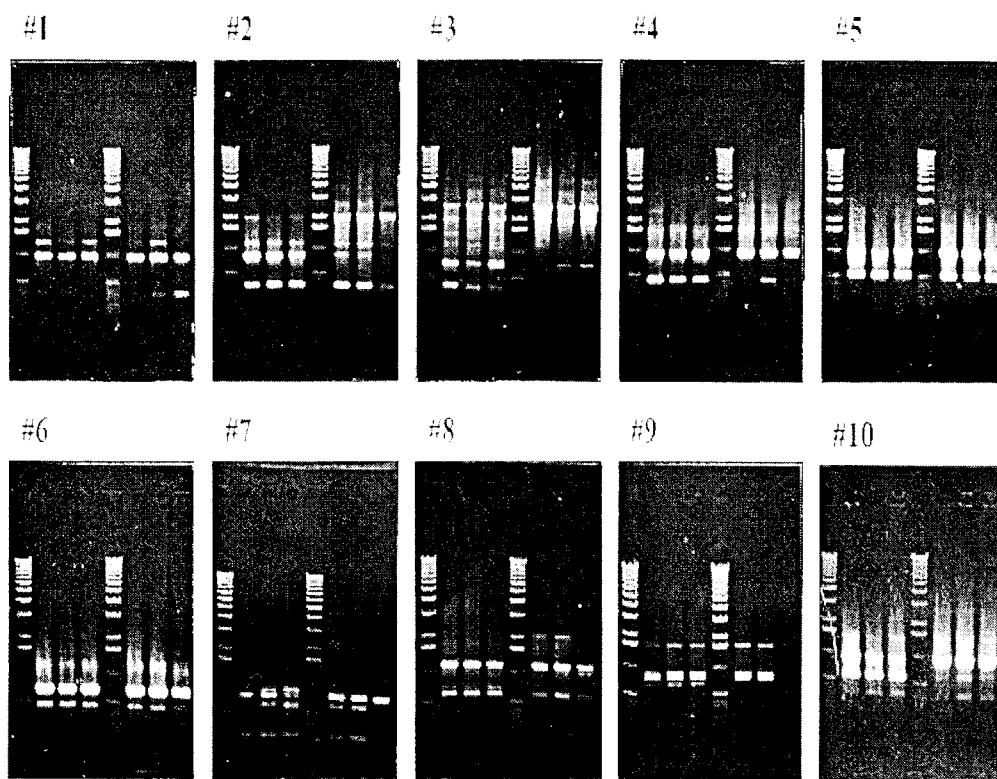


Figure 6-1. RAPD fingerprints of five strains (*Pleurotus ostreatus*) using ten different primers. Lane 1 : 1kb marker, lane 2 : control, lane 3 : PO-5, lane 4 : PO-6, lane 5 : 1 kb marker, lane 6 : PO-14, lane 7 : PO-15, lane 8 : PO-16. #1-#10 : primers (see Table 6-1).

Table 6-3. Genetic similarity coefficient matrix among five strains of *Pleurotus ostreatus* irradiated by gamma-ray radiation based on RAPD markers

Strain	Control	PO-5	PO-6	PO-14	PO-15	PO-16
Control	1.00					
PO-5	0.93	1.00				
PO-6	0.91	0.89	1.00			
PO-14	0.73	0.71	0.73	1.00		
PO-15	0.77	0.73	0.78	0.91	1.00	
PO-16	0.64	0.64	0.64	0.82	0.84	1.00

다. 변이주의 ITS2 염기서열 결정

조사된 5종의 변이주에서 각각 201 bp의 ITS2 염기서열을 결정하였다(그림 6-2). 모든 염기서열은 같았으나 대조군과 PO-5 및 PO-6의 33번째 염기서열인 C가 PO-14와 이로부터 유도된 PO-15와 PO-16에서는 T로 변화되었음을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 2 kGy의 gamma-ray를 조사받은 경우에 ITS2 부위에서 점돌연변이(point mutation)가 일어났으며, 1 kGy의 선량에서는 염기서열의 변화가 일어나지 않았음을 보인 것이다. *Trichoderma harzianum*에서 640 Gy의 gamma-ray로 유도한 돌연변이주에서 ITS의 염기서열을 조사하였으나 전혀 변화되지 않았다 (Schlick *et al.*, 1994). 본 결과와 RAPD의 분석결과로 보아서 고선량 gamma-ray 조사에 의해 느타리버섯의 genome에 중대한 변화가 야기될 수 있으며 다양한 돌연변이가 genome 상에 유발될 수 있다고 판단된다. 고등균류의 경우, genome내 ITS의 수는 100에서 200개 정도로 알려져 (Pukkila and Skrzynia, 1993) 돌연변이 유기물질에 의해 ITS의 염기서열이 변화될 가능성이 매우 희박할 것으로 생각된다. 본 연구에서 2 kGy의 gamma-ray에 의해 유도된 PO-14의 ITS2 염기서열은 PO-14로부터 1 kGy 조사후 유도된 PO-15와 PO-16에서도 변화되지 않아 염기서열 결정과정 중 PCR 증폭반응시에 나타날 수 있는 polymerase의 오작용은 배제될 수 있다. ITS 부위의 점돌연변이 유발 가능성은 이온화 방사선의 특성상-DNA 절단과 점돌연변이 유발성(Fukuoka *et al.*, 1994; Rajoka *et al.*, 1998)과 재조합기작에 의한 DNA 손상회복(Minton and Daly, 1995; Zolan *et al.*, 1988)- 여타의 돌연변이 유발원에 비해 높을 것으로 생각된다. 본 실험결과, gamma-ray에 의해 유발된 느타리버섯의 5개 변이주는 특징적인 ITS2 염기서열을 지니고 있음을 알 수 있었다.

Control	1	GTGTCATTA AATTCTCAA AACTCACTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTG
P0-5	1	GTGTCATTA AATTCTCAA AACTCACTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTG
P0-6	1	GTGTCATTA AATTCTCAA AACTCACTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTG
P0-14	1	GTGTCATTA AATTCTCAA AACTCACTTTGGTTTTTTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTG
P0-15	1	GTGTCATTA AATTCTCAA AACTCACTTTGGTTTTTTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTG
P0-16	1	GTGTCATTA AATTCTCAA AACTCACTTTGGTTTTTTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTG

Control	61	GGGGCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGC
P0-5	61	GGGGCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGC
P0-6	61	GGGGCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGC
P0-14	61	GGGGCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGC
P0-15	61	GGGGCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGC
P0-16	61	GGGGCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGC

Control	121	CAGTCATGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAG
P0-5	121	CAGTCATGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAG
P0-6	121	CAGTCATGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAG
P0-14	121	CAGTCATGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAG
P0-15	121	CAGTCATGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAG
P0-16	121	CAGTCATGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAG

Control	181	CTCTCTAATCGTCCGCAAGGA
P0-5	181	CTCTCTAATCGTCCGCAAGGA
P0-6	181	CTCTCTAATCGTCCGCAAGGA
P0-14	181	CTCTCTAATCGTCCGCAAGGA
P0-15	181	CTCTCTAATCGTCCGCAAGGA
P0-16	181	CTCTCTAATCGTCCGCAAGGA

Figure 6-2. Alignment of ITS2 sequences of five strains (*Pleurotus ostreatus*) induced by gamma-ray radiation. With the exception of a single conservative change of nt 33 (C to T) in P0-14, P0-15 and P0-16 strains, all sites are identical. Asterisks indicate the conserved nucleotides.

제 7 절 헤미셀룰로오스 분해균주 발굴 및 이용기술

1. 연구 배경

섬유소성 생물폐자원은 주로 셀룰로오스 및 리그닌으로 구성되어 있는 데 아울러 5탄당과 함께 헤미셀룰로오스를 구성하고 있다. 이에 미생물에 의한 섬유소성 생물폐자원 분해의 일환으로 5탄당 분해에 대한 관심을 가질 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 방사선을 이용하여 5탄당 분해가 탁월한 우량균주의 선발을 도모하였고 이에 따른 변이주의 5탄당 분해능을 평가하고 기타 관련된 세포외 효소활성도를 분석함으로써 생물폐자원의 분해에 이용될 가능성의 크기를 타진하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 5탄당 분해 우량균주 선발

총 16 종의 변이주를 검색하여 5탄당을 기질로 하는 배지에서의 균사생장속도를 조사하였다.

나. xylanase 활성 측정

각 sample의 냉동 건조 균사체 1 g으로부터 얻은 protein 상등액 1ml을 99 ml의 sodium acetate extraction/dilution buffer(25 mM, pH 4.7)에 희석한 후 이 희석액 0.5 ml을 4.5 ml sodium acetate buffer에 희석하여 40℃에서 5분간 전처리하였다. 여기에 substrate 인 Xylazyme AX(azurine-crosslinked wheat arabinoxylan) tablet (Amegazyme)을 넣어 녹인 후 10분간 반응이 이루어지도록 하였다. 0.5

ml의 Trizma base(1% w/v) 용액을 넣어 반응을 증시시켰다. 상온에서 5 분간 더 방치한 후 반응액을 Whatman No. 1 filter로 걸러내고 나온 용액을 590 nm에서 absorbance를 측정하였다. Xylanase activity는 다음의 공식에 의거하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Units/ml of original preparation} \\ & = \text{milli-Units (per assay i.e. per 0.5 ml)} \times 1/1000 \times 100 \times \\ & \quad 2 \times \text{Dilution} \end{aligned}$$

1/1000 = conversion from milli-Units to Units

100 = initial extraction volume (i.e. 100 ml per g of solid)

2 = conversion from volume assayed (0.5 ml) to 1 ml of extract

Diltution = further dilution of the initial extraction solution

$$\text{milli-Unit/assay} = 46.8 \times \text{Abs.} + 0.9; R = 0.99$$

$$\text{Specific activity} = \text{Unit/protein quantity} = \text{Unit/mg of protein}$$

다. 세포의 효소활성도 측정

변이주를 100ml의 potato dextrose broth(PDB) 배양액에 30℃에서 10일간 배양하였다. 원심분리(1000 x g)한 후 상등액내 분비효소의 활성은 MUF 반응기(표 7-1)와의 반응성을 이용하여 조사하였다(Haran *et al.*, 1995). 단백질량은 spectrophotometer를 사용해서 280nm에서 흡광도로부터 정량하였다. 반응기질은 각각 5mM되게 methylcellosolve에 녹

여 -20°C 에 보관하여 이용하였다. 효소활성도를 보기 위하여, 1ml 의 각 시료에 $25\mu\text{M}$ 의 반응기질을 첨가하여 20°C 의 암소에서 3시간 동안 반응시킨 후 나타나는 형광을 spectrofluorometer(Edinburgh FS-900CD)를 이용하여 측정하였다(excitation : 365nm , photomultiplier tube voltage : low, sensitivity : $\times 100$).

Table 7-1. Substrates with 4-methylumbelliferyl for extracellular enzyme assay

Enzymes	Substrates
Exo- β -glucosidase	4-methylumbelliferyl--D-glucoside
Exo-amylase	4-methylumbelliferyl--D-glucoside
Exo-phosphatase	4-methylumbelliferyl-phosphate
Exo-chitinase	4-methylumbelliferyl-N-acetyl--D-glucosaminide
Endo-chitinase	4-methylumbelliferyl-N,N'-diacetyl chitobioside
Exo-cellulase	4-methylumbelliferyl--D-cellobioside
Endo-cellulase	4-methylumbelliferyl--D-celotrioside
Exo-lipase	4-methylumbelliferyl-butyrate

3. 결과 및 고찰

가. 5탄당 분해 우량균주 선발

총 16 종의 검색한 변이주 중 5탄당 고체배지(XYL)에서 군사생장속도가 대조군에 비해 15% 이상 증가한 변이주는 7종이었으며(표 7-2) 이들은 PDA 배지에서도 5-10% 빠른 군사생장을 하는 균주였다. 이 중 PO-1-5 균주는 5탄당배지 뿐 만 아니라 lignin 배지(LIG)에서도 대조군에 비해 11% 빠르게 성장하는 특성을 보였다. 검색한 16 종의 변이주에 대한 5탄당기질 분해효소 활성도(endo-1,4- β -xylanase assay kit, Megazyme)를 조사한 결과 6 종의 변이주가 대조군보다 증가한 양상을 보였으며 그 중에서 대조군에 비해 1.6-2.0배의 활성도를 지닌 4 종의 변이주(PO-1-6, PO-1.5-7, PO-2-14와 PO-2-14-1-1)를 확보 할 수 있었다(표 7-3).

Table 7-2. Xylanase activity of the irradiated *Pleurotus ostreatus* on the xylan substrate.

strains	PDA			LIG			XYL		
	3-d	5-d	7-d	3-d	5-d	7-d	3-d	5-d	7-d
Control	22.25 ±2.22	37.75 ±4.72	55.50 ±6.45	21.25 ±1.50	45.25 ±0.50	64.75 ±1.26	13.50 ±0.58	25.50 ±1.73	38.50 ±0.58
PO-1-5	26.50 ±0.58	44.25 ±0.50	66.00 ±2.16	30.50 ±0.58	52.75 ±0.96	71.75 ±0.96	19.75 ±0.96	31.00 ±0.82	46.00 ±0.82
PO-1-6	25.25 ±0.50	42.75 ±1.26	63.25 ±2.06	25.00 ±1.15	47.00 ±0.82	62.75 ±1.26	16.75 ±1.50	28.25 ±2.75	38.00 ±3.56
PO-1.5-7	26.25 ±1.50	41.75 ±3.77	62.50 ±6.40	26.75 ±0.50	44.50 ±1.29	60.50 ±1.00	22.25 ±2.06	37.25 ±1.50	48.75 ±3.86
PO-2-14	26.25 ±1.26	40.25 ±1.71	54.00 ±0.82	28.00 ±1.63	51.00 ±2.16	68.25 ±1.71	18.75 ±1.26	27.75 ±0.96	38.00 ±1.83
PO-2-14-1-1	20.00 ±2.45	34.75 ±3.77	53.75 ±6.24	23.75 ±1.50	43.50 ±1.73	61.00 ±0.82	15.00 ±1.15	22.50 ±1.29	31.50 ±1.29
PO-2-14-1-2	27.25 ±1.71	44.50 ±2.38	65.00 ±2.31	24.75 ±1.50	42.75 ±1.71	62.00 ±1.41	18.75 ±1.26	26.75 ±0.50	36.50 ±0.58
PO-2-2	24.00 ±0.82	42.75 ±1.89	65.00 ±1.63	17.50 ±1.73	33.50 ±2.38	51.50 ±4.04	14.75 ±0.50	28.25 ±1.26	39.50 ±0.58
PO-2-3	21.50 ±1.29	35.25 ±4.65	49.75 ±5.56	15.25 ±2.99	34.75 ±4.57	56.75 ±2.63	14.25 ±1.50	26.75 ±1.50	42.00 ±1.83
PO-2-4	21.25 ±0.96	39.00 ±1.83	58.25 ±1.89	16.25 ±0.96	30.00 ±1.41	50.50 ±1.00	12.75 ±0.50	23.25 ±2.06	37.50 ±3.00
PO-1.5-2	22.75 ±2.22	38.00 ±2.94	61.00 ±4.08	18.00 ±1.41	38.25 ±2.22	59.25 ±0.96	16.00 ±2.45	30.25 ±5.74	46.75 ±2.22
PO-1-4	24.50 ±1.29	43.25 ±4.35	63.50 ±6.61	19.25 ±0.96	36.25 ±2.06	55.50 ±2.08	19.00 ±0.82	29.00 ±3.56	45.00 ±2.94
PO-1-7	21.00 ±1.41	36.75 ±3.20	54.25 ±5.50	17.00 ±1.41	36.00 ±3.16	56.25 ±2.87	15.50 ±1.29	26.00 ±3.83	40.75 ±2.63
PO-0.5-2	20.75 ±2.22	39.50 ±3.11	60.75 ±4.11	17.75 ±2.36	36.50 ±2.65	59.25 ±2.87	17.75 ±1.50	31.75 ±2.22	49.75 ±3.77
PO-0.5-4	21.50 ±1.29	37.50 ±2.65	56.25 ±4.57	19.00 ±2.45	40.50 ±1.29	60.75 ±2.22	17.75 ±3.30	30.25 ±5.56	45.25 ±5.74
PO-1G-3	22.25 ±2.75	40.00 ±4.97	58.25 ±4.50	18.25 ±1.50	38.50 ±1.29	59.50 ±2.08	12.25 ±1.50	27.75 ±0.96	42.50 ±1.29
PO-0-1	24.25 ±1.71	43.50 ±2.65	68.00 ±2.00	21.50 ±1.00	40.00 ±0.82	58.50 ±1.00	18.25 ±1.50	28.50 ±1.29	45.00 ±1.15

Table 7-3. Xylanase activity of the γ -ray radiation induced mutants from the mycelium of *Pleurotus ostreatus*

Strains	Abs. 590 nm			Specific activity (unit/mg)			Standard deviation
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	
Control	0.033	0.031	0.034	0.070	0.067	0.071	± 0.004
PO-1-5	0.032	0.033	0.033	0.073	0.075	0.075	± 0.002
PO-1-6	0.039	0.033	0.033	0.153	0.137	0.137	± 0.000
PO-1.5-7	0.037	0.031	0.032	0.162	0.145	0.148	± 0.003
PO-2-14	0.035	0.030	0.029	0.136	0.123	0.121	± 0.002
PO-2-14-1-1	0.034	0.033	0.031	0.129	0.126	0.121	± 0.005
PO-2-14-1-2	0.037	0.027	0.028	0.086	0.071	0.072	± 0.001

나. 세포의 효소활성도

MUF 기질을 이용하여 8종류의 세포외분비효소의 활성도를 측정하였다(표 7-4). 대조군에 비해 모든 변이주에서 모든 효소활성이 높았으나 PO-1-6은 *exo-amylase*, *exo-*와 *endo-cellulase*의 경우 낮았다. 변이주들의 *exo-cellulase*는 대조군에 비해 1.2-1.7배 였으며 *endo-cellulase*는 1.0-1.4배 정도였고 *exo-glucosidase* 활성도는 1.3-1.5배 정도였다. 그외의 효소들도 대조군에 비해 변이주에서 1.1-11배의 차이를 보이는 등 매우 높은 활성도를 보였다. 이로 보아 방사선에 의해 유도된 변이주들은 매우 높은 생물폐자원의 탄수화물분해능을 지니고 있음을 알 수 있었다. 또한, 변이주들이 높은 *lipase*와 *chitinase* 활성도를 보인 것으로 보아 이들이 강한 항진균성을 지니고 있으며 지방성분의 배지도 충분히 분해할 수 있을 것으로 여겨진다.

본 연구결과 이온화방사선에 의해 균사체로부터 5탄당 분해능이 뛰어난 변이주 및 특정 효소활성이 뛰어난 변이주를 선발할 수 있었다. 이러한 변이주는 섬유소성 생물폐자원의 재활용에 있어서 매우 유용하게 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 7-4. The extracellular enzyme activities of five strains (*Pleurotus ostreatus*) induced by gamma-ray radiation

Strain	Activiy of extracellular enzyme (counting per second)*								Protein (mg/ml)	Dry weight (g)
	Exo-- glucosid ase	Exo- cellulase	Endo- cellulase	Exo- amylase	Exo- phosphat ase	Exo- lipase	Exo- chitin ase	Endo- chitin ase		
Control	1387	1229	1250	1161	1245	4134	1369	1643	10.0	0.29
PO-1-5	7024	2109	1778	1727	1938	14693	16489	11314	8.7	0.31
PO-1-6	4081	929	681	727	4461	16078	15701	15701	10.6	0.24
PO-2-14	1842	1522	1289	1236	1409	6300	8310	6430	8.0	0.38
PO-2-14-1-1	4651	2054	1629	1560	2042	8308	10950	7848	8.6	0.44
PO-2-14-1-2	4768	1902	1709	1740	2484	22629	8785	12216	6.9	0.28

* The mycelia were harvested after 14 days cultivation on PDB.

제 8 절 항진균성 및 질소고정성 균주 개발 (위탁연구)

1. 연구 배경

현재 선진국은 87년 물질특허 제도의 도입으로 타국의 기술개발 규제에 의한 독점적 지배체제의 유지를 시도하고 있어, 새로운 농약 및 신제품 개발 없이는 농업분야에 있어서 외국으로부터의 수입에 전적으로 의존하여야 한다. 또한 전세계의 농약시장은 약 280 억불(1994)로 전년도 대비 10.1%의 성장율을 보였다. 이중 살균제는 54 억불로 전년도 대비 14.5%의 성장율을 나타낸 품목으로 앞으로도 고성장을 계속할 것으로 예상된다. 이렇게 급변하는 국제환경의 변화에 대처하기 위해서는 농업 및 환경분야의 신기술의 소유가 필수적이므로 이의 연구 개발 또한 적극적으로 추진되어야 할 것이다. 또한 WTO 체제하에서 외국농산물과 경쟁하기 위해서 특수작물을 주로 시설재배하는 우리나라의 실정에서는 하우스 내의 연작장해 및 환경상 진균에 의한 문제가 야기, 새로운 선택성, 저공해 항진균제의 개발이 시급히 요구된다. 한편 농업생산의 안정성 향상, 환경 보전, 농업 생산물의 부가가치 증진 등 양적, 질적 생산성을 향상시키는데 있어 무엇보다 농업분야에 기여할 수 있는 생물공학적인 신기술의 개발이 선행되어야 할 것이다. 식량증진을 목적으로 무차별한 농약남용은 지하수 및 토양오염, 농산물중의 잔류독성, 그리고 생태계의 불균형을 초래하는데, 최근 환경보호와 생태계 보전에 관한 Green Round 협약이 국제적 관심의 대상이 되면서 이를 대체하여 식물병 방제에 이용될 수 있는 무공해 biocide의 개발은 국제적 경쟁이 치열한 하나의 핵심 분야로 등장하고 있다. 따라서 본 연구는 다기능적 유용후보 세균(농약분해 및 농약내성 그리고 생물폐자원 분해능이 있는 항진균 활성 미생물과 고효율적 질소고정성 균주)을 탐색

하여 그들의 특성을 조사하고 더 나아가 산업화의 기초자료로 삼고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 항진균활성세균 선별

식물병원성 진균류 6종(*Mucor* sp. *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Pyricularia oryzae* 등)과 동물병원성 균류 1종 (*Candida albicans*)을 대상으로 여러차례의 길항 실험을 실시하였다. 항진균제의 최적 생성조건을 확립하기 위해 물리화학적 요인(pH, Temp, 통기) 및 탄소원, 질소원, 인원 등의 조성이 다른 배지(GM63, GM63+0.05%YE, CZ-dox+0.05%YE, Glu-MOPS, NA, NB, TSA, TSB, SMA, SMB, PDA, PDB, TYEA, TYEB, LA, LB 등) 따라 항진균활성물질의 생성을 추적 조사하였다.

나. 질소고정균주 선별

토양과 콩과식물의 뿌리혹를 채취하여 YMA배지와 선택배지인 Ashby's 배지 등을 사용하여 단독 생활 질소고정균주와 공생 질소고정 세균을 선별하였다.

다. 항진균활성세균의 농약저항성 분석

항진균활성세균의 농약에 대한 저항성을 분석하기 위하여 NA medium 에 23종의 농약을 각각 첨가하여 30℃에서 2일간 배양한 후 성장여부를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 항진균활성세균 선별

식물병원성 진균류 6종(*Mucor* sp. *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Pyricularia oryzae* 등)과 동물병원성 균류 1종 (*Candida albicans*)을 대상으로 여러차례의 길항 실험을 실시하여 강한 항진균활성을 보이면서 독특한 항진균활성스펙트럼을 보이는 11개의 새로운 항진균활성세균을 최종적으로 추가 선별하였다(KL2314, 2321, 2322, 2326, 2330, 2332, 2367, 2143 및 KLP221, 222, 226). 탄소원에 있어서는 Glucose를 제외한 7가지 탄소원 중 KL2143는 lactose와 mannitol이 KL2326의 경우 fructose, galactose, glycerol이 성장을 위한 탄소원으로 매우 효과적이었으며, 또한 대체적으로 항진균세균의 성장을 위한 질소원으로 peptone과 yeast extract가 가장 좋았으며, urea를 사용할 경우 성장률이 가장 낮았다. KL2143의 경우에는 특이하게 peptone과 yeast extract가 가장 좋았다. 인산원 농도에 따른 성장량은 농도에 따라 성장률은 정확히 비례하였다. 0.5mM 이상의 농도에서는 세균성장량의 최대 yield에서 차이가 없었다. 한편, 탄소원, 질소원 종류 및 인산원 농도에 따른 항진균활성도는 KL2143의 경우 배지 구성에 영향을 받지 않고 높은 활성도를 보였으며 나머지 미생물들은 Glu-MOPS 배지보다는 질소원 배지에서, 질소원보다는 탄소원 배지에서 높은 활성도를 나타내었다. 아미노산, 비타민 첨가 및 pH 변화에 따른 항진균활성도 조사는 각 구간에서 배양된 배양액의 상등액을 동량의 butanol로 추출하여 감압농축 한 후, 농축액으로부터 항진균활성물질의 생성능을 측정하였다. 그 결과, 항진균활성세균의 성장률 및 배지내 pH변화는 균주간 거의 유사한 양상을 보였다. 그러나 항진균활성물질 생성능에 있어서는 균주간 차이를 보여 KL2326는 비타민 B1, KL2143는 비타민

B12가 첨가될 때 최대 항진균활성물질 생성능을 보였다. 아미노산은 aginine, lysine 처리구에서 항진균활성물질생성능이 높았다. 온도에 따른 항진균활성물질 생성률은 균주간 다소 차이는 있지만 전체적으로 30~37℃ 온도구간에서 항진균물질 생성능이 우수하였다(표 8-1, 표 8-2).

나. 질소고정균주 선별

토양과 콩과식물의 뿌리혹를 채취하여 YMA배지와 선택배지인 Ashby's 배지 등을 사용하여 단독 생활 질소고정균주와 공생 질소고정세균을 선별한 후, Bergey's manual 및 Vincent 그리고 Jordan의 방법으로 동정한 결과, *Rhizobium loti*와 *R. japonicum*으로 확인되었다. 항진균 활성도 측정 및 활성물질의 최적조건은 현재 항진균활성 세균의 방법과 동일하게 실행 중에 있다. *R. loti*와 *R. japonicum*은 공히 난분해성 유기인 화합물인 C-P화합물(phosphonate, Pn)의 일종인 AEPn, MPn, EPn를 잘 분해하였다.

다. 항진균활성세균의 농약저항성 분석

농약 저항성에 있어서는 본 연구에 이용된 항진균활성세균 균주들 중 대부분이 여러 종류의 농약에 대하여 저항성을 갖는 반면 분해능에 있어서는 균주별, 농약별로 차이를 나타내었다. 고체배지상에서는 항진균활성이 우수한 KL2143 균주는 glucan, 전분, 단백질, 셀룰로오즈, 리그닌 분해능력이 다른 균주에 비하여 3배 이상 높아 매우 탁월하였으며, KL2326 균주는 키틴분해능과 지질분해능이 매우 강하였다. 농약 저항성에 있어서는 본 연구에 이용된 항진균활성세균 균주들 중 대부분이 여러 종류의 농약에 대하여 저항성을 갖는 반면 분해능에 있어서는 균주별, 농약별로 차이를 나타내었다(표 8-3). 독성이 강하고 환경오염물

질로 작용하는 대부분의 유기화학농약에 대하여 항진균활성세균이 저항성과 분해능을 가지고 있기 때문에 환경보전 및 정화에 매우 유용한 균주로 이용할 수 있다고 본다. KL2143는 대조구에 비하여 성장률이 우수하였고, 다른 균주에서는 대조구에 비해 성장률이 다소 둔화되면서 농약을 분해하는 것으로 나타났다. 농약의 농도에 대한 표준곡선을 구하기 위하여, 2가지 농약, DIA(diazinon), IPR(iprobenfos)를 chloroform에 DIA는 0.03%, 0.015%, 0.0075%, IPR는 0.05%, 0.025%, 0.0125%가 되도록 조정한 표준농도에 따라 190nm~500nm까지의 흡광도 변화를 측정 한 결과, 7일 경과후에는 균주에 따라 약간 차이는 있지만 전체적으로 70%이상 농약이 분해되는 양상을 나타내었다.

Table 8-1. Antifungal spectra of antifungal bacteria against several plant pathogenic fungi and one animal pathogenic fungi

Antifungal bacteria	Antifungal activity ^b						
	A ^a	B	C	D	E	F	G
KL2143	⊙	⊙	⊙	●	●	●	●
KL2314	○	○	⊙		○		⊙
KL2321	○	⊙	⊙	●	●	●	●
KL2326	○	⊙	⊙				
KL2330	○	⊙	⊙	●	●	●	●
KL2367	○	⊙	●	●	●	●	●
KL2322	⊙	⊙					⊙
KL2332							○

^a Abbreviations: A: *Candida albicans*, B: *Mucor* spp, C: *Rhizoctonia solani*, D: *Botrytis cinerea*, E: *Colletotrichum gloeosporioides*, F: *Pyricularia grisea*, G: *Fusarium oxysporum*

^b Antifungal activity against each fungus were measured 5 days after inoculation of antagonistic bacteria ; ● : very good
 ⊙ : good ○ : small efficacy

Table 8-2. Susceptibility test of antifungal agents in agar medium^a

Strains	Treatment ^b	Inhibition zone(mm) ^d								
		A ^c			B	C	D	E	F	G
KL2143	320 μ g	3	2	3	-	++	-	-	++	++
									+	+
KL2314	100 μ g	0	0	7	-	-	-	-	+	-
KL2321	400 μ g	4	0	0	+	++	++	-	++	-
									+	
KL2326	250 μ g	0	6	0	-	-	-	-	-	-
KL2330	100 μ g	3	0	0	++	++	++	+	++	++
						+	+		+	
KL2367	100 μ g	2.5	2	0	+	++	++	+	++	++
										+

^a Means of three replications

^b Butanol extracts of each antagonistic bacteria were applied to 6 mm well on agar plate

^c Abbreviations: A: *C. albicans*, B: *R. solani*, C: *Mucor. spp*, D: *B. cinerea*, E: *P. oryzae* F: *F. oxysporum*, G: *C. gloeosporioides*

^d Inhibition zones were measured 5days after inoculation of target fungi

^e Complete inhibition zone, ^f Delayed growth zone, ^g Partial inhibition zone, ^h +: 1~2 mm, ++: 3~4 mm, +++: >5 mm

Table 8-3. Resistant and degradable patterns of KL2143 strain for pesticides

Pesticides	Names	Resistant patterns	Degradable patterns
Fungicide	Benomyl	+ ^a	-
	Flusilazole	-	-
	Tebuconazole	-	-
	Oxadixyl	+	+
	Edifenphos	-	-
	Tricyclazole	+	-
	Mancozeb	-	-
	Chlorothalonil	-	-
	Dichlofluanide	-	-
	Pencycuron	+	-
	Azoxystrobin	+	-
	Copper hydroxide	-	-
	Isoprothiorane	+	-
	Iprobenphos	-	-
Insecticide	Chlorfenapyr	+	-
	Imidacloprid	+	-
	Carbofuran	+	+
	Fenpyroximate	+	+
	Chlorpyrifos	+	+
	BPMC	-	-
	Diazinon	+	+
Herbicide	Butachlor	+	-
	Glyphosate	+	-
Control	GM63	+	+
	GluMOPS	+	+

^a +: positive, -: negative

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

1. 연구개발 목표의 달성도

- 생물자원의 방사선 처리를 위한 형태학적, 물리적인 성상이 파악되었으며, 최적 방사선 조사환경이 확립됨.
- 방사선조사를 통한 적정 균이(lignin 분해 우량균주, 고생장균주, 헤미셀룰로오스 분해 우량균주)를 육종하는 데 성공적이었으며, 그의 특성에 대한 생리학적, 유전학적 분석에 많은 진전이 있었음.
- 생분해성 생물중합체에 대한 방사선이용 기술이 기본적으로 정립되었다고 봄.
- 발효부산물의 사료화 효용성제고/생물활성물질에 대한 기반기술 및 지식 확립.

2. 대외 기여도

- 생물자원에 대한 방사선의 이용을 최적화시킬 수 있는 기반기술이 확립되었고,
- 생물자원의 효율적 이용을 위한 돌연변이체를 확보할 수 있었으며,
- 다각도로의 생물자원 발효부산물의 이용가능성을 제고시켰음.
- 방사선 돌연변이 유기 기술의 정착화로 각종 유용균주의 기탁 및 특허출원이 가능하여 다수의 지적재산권을 보유하게 될 것임.

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 방사선이용 섬유소 분해성, 리그닌분해성, 5탄당 분해성, 항진균성, 질소고정성 균주 등 산업적 유용균주의 개발로 생물폐자원 재이용에 응용이 가능하고, 환경오염 저감화 효과와 아울러 축산폐자원, 해양 폐자원 등 여타의 생물자원 재활용에 관한 연구에의 활용이 기대됨.
- 방사선을 이용한 기본적 바이오폴리머 가공기술이 정립되었으나 각종 제초제, 살충제, 농약 등의 살포에 직접적으로 응용이 가능한 시점에 이르기 위해서는 경제성 검토와 아울러 바이오폴리머를 대량으로 생산해낼 수 있도록 방사선을 이용한 균주개발 연구가 계속해서 수행되어야 할 것임.
- 방사선 돌연변이 유기 기술의 정착화로 유기 미생물에 대한 생리적, 유전학적 분석에 대한 연구가 동반되면 각종 유용균주의 기탁 및 특허출원이 가능하여 다수의 지적재산권을 보유하게 될 것임.
- 발효부산물로부터의 항돌연변이성 및 식물성장촉진성 물질을 확인하였는 바, 방사선개질 기술개발과 아울러 이들을 분리, 정제, 제재화 하는 연구가 수행된다면 국민보건 향상 및 수입대체 효과가 기대되며, 또한 발효부산물의 사료화에 대해서는 가축사육 등을 통한 실질적인 연구를 수행하여 실용화에 박차를 가할 필요가 있음.
- 미생물에 대한 방사선 돌연변이 유기기술은 환경오염 제거용, 순화용, 식품, 의약용, 각종 화학 기반물질을 생산해 내는 산업용 등의 미생물 개발 및 미생물제재 개발 연구에 많이 이용될 수 있을 것으로 사료됨.

여 백

제 6 장 참고문헌

- Adamovi, M, G Grubi, I Milenkovi, R Jovanovi, R Proti, L Sretenovi, Lj Stoievi, 1998 ; The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Sci. Technol.* 71:357-362,
- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman, 1990 ; Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Ames, BN, J Mccann and E Yamasaki, 1975 ; Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31:347-363.
- Awafo, VA, DS Chahal and R Charbonneau, 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.
- Bisaria, R, M Madan and VS Bisaria, 1987 ; Biological efficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor-caju* cultivated on different agro-wastes. *Biol. Wastes* 19:239-255,
- Boominathan K, S Balachandra Dass, TA Randall and CA Reddy, 1990 ; Nitrogen-deregulated mutants of *Phanerochaete chrysosporium* - a lignin-degrading basidiomycete. *Arch Microbiol.* 153:260-265.
- Branca, C, G De Lorenzo and F Cervone, 1988 ; Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α

- D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiol. Plant.* 72:499-504.
- Byun, MO, JC Chung, CH You, DY Cha and DH Lee, 1997 ; Transformation of *Pleurotus sajor-caju* by complementation of PABA requiring mutant. *Kor. J. Mycol.* 25:233-237.
- Canale-parola E, CE Dowell and SB Leschine, 1988 ; Conversion of cellulose to ethanol by mesophilic bacteria, DOE/ER/10878-T1,T2.
- Chernoglazov, VM, AN Jafarova and AA Klyosov, 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.
- Demain, A. L., 1976. Enzymatic conversion of cellulosic materials. *In: Technology and Application. Symp. No. 6, pp.79-81.* John, Wiley and Sons, New York.
- Fukuoka H, Y Kageyama, K Yamamoto and G Takeda, 1994 ; Rapid conversion of rDNA intergenic spacer of diploid mutants of rice derived from gamma-ray irradiated tetraploids. *Mol. Gen. Genet.* 243:166-172.
- Gerber, PJ, JA Heitmann and TW Joyce, 1997 ; Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*. *Bioresource Technol.* 61:127-140.
- Gharpuray MM, YH Lee and LT Fan, 1983 ; Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* 25:157-172.

- Graham GC, 1994 : A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques* 16:49-50.
- Grous W, A Converse, H Grethlein and L Lynd, 1985 : Kinetics of cellobiose hydrolysis using cellobiase composites from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Bioeng.* 27:463-470.
- Gusakov, AV, OV Protas, VM Chernglazov, AP Sinitzyn, GV Kovalysheva, OV Shpanchenko and OV Ermolova, 1991 : Transglycosylation activity of cellobiohydrolase I from *Trichoderma longibrachiatum* on synthetic and natural substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1073:481-485.
- Haran, S, H Schickler, A Oppenheim and I Chet, 1995 : New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99:441-446.
- Hobbs, CH and RO Mc Clellan, 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., pp.669-705, Macmillan Pub., New York.
- Holms, NW and RJ Bery, 1970 : *Manual on Radiation Dosimetry.* Marcel Dekker Inc., New York.
- Hseu RS, HH Wang, HF Wang and JM Moncalvo, 1996 : Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1354-1363.

- Imbernon M and J Labarere, 1989 : Selection of sporeledd or poorly spored induced mutants from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and selective breeding. Mushroom Sci. 1:109-123.
- Jwanny, EW, MM Rashad and HM Ab^o, 1995 : Solid-state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus* cultivation. Appl. Biochem. Biotechnol. 50:71-78.
- Kaetsu I, M Kumakura, T Fujimura, F Yoshii, T Kojima and M Tamada, 1981 : Utilization of radiation technique on the saccharification and fermentation of biomass, Radiat. Phys. Chem. 18:827-835.
- Kirk, TK and RL Farrell, 1987 : Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41:465-505.
- Kojima K, S Miyake and I Uda, 1983 : Effects of irradiation as a pretreatment in enzymatic hydrolysis of cellulose materials, Radiat. Phys. Chem. 22:901-906.
- Kuhad, RC and A Singh, 1993 : Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 13:151-172.
- Kumakura M, 1993 : Dose-dependency of radiation on enzyme production in *Trichoderma reesei*. Radiat. Environ. Biophys. 32:41-46.
- Kume T, 1991 : Radiation chemistry of food and food component, UNDP/IAEA/RCA Reginal training course on radiation chemistry, TRCRE, JAERI, 13-24 May.
- Lagrinini LM, 1990 : The molecular characterization of the lignin-

- forming peroxidase, DOE/ER/14004-1,2,3.
- Lee YK, HH Chang, WR Kim, CJ Lee and JK Kim, 1998 : Cellulolytic variants of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) irradiated with gamma-ray. Korean J. Environ. Biol. 16:93-99.
- Macdonald DG, NN Bakhshi, JF Mathews, A Roychowdhury and P Bajpai, 1983 : Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis, Biotechnol. Bioeng. 25:2067-2076.
- Malek, MA, NA Chowdhury, S Matsushashi, S Hashimoto and T Kume, 1994 : Radiation and fermentation treatment of cellulosic wastes. Mycoscience, 35:95-98
- Mandels, M and D Sternberg, 1976 : Recent advances in cellulase technology. J. Ferment. 54:259-267.
- Mateos, PF, JI Jimenez-Zurdo, J Chen, AS Squartini, SK Haack, E Martinez-Molina, DH Hubbell and FB Dazzo, 1992 : Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar Trifolii. Appl. Environ. Microbiol. 58:1816-1822.
- Matsushashi, S, M Shimazu and T Kume, 1997 : Pectic fragments prepared by irradiation and their phytoalexin elicitor activity. T. Ando *et al.*(Eds.), Plant Nutrition - for Sustainable Food Production and Environment. 217-218, Kluwer Academic Publishers. Printed in Japan.
- Minton KW and MJ Daly, 1995 : A model for repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*. BioEssays 17:457-464.

- Nakamura, S, K Wakabayashi, R Nakai, R Aono and K Horikoshi, 1993 : Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2311-2316.
- Paterson, RRM and PD Bridge, 1994 : *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi.* IMI Technical Handbooks No. 1. pp. 19-31. CAB International, Wallingford.
- Patrabansii, S and M Madan, 1997 : Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* on different bio-wastes. *Acta Biotechnol.* 17:107-122.
- Pukkila PJ and C Skrzynia, 1993 : Frequent changes in the number of reiterated ribosomal RNA genes throughout the life cycle of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Genetics* 133:203-211.
- Rajoka MI, A Bashir, SR Hussain and KA Malik, 1998 : Gamma-ray induced mutagenesis of *Cellulomonas biazotea* for improved production of cellulases. *Folia Microbiol. (Praha)* 43:15-22.
- Ramirez-Carrillo, R, H Leal-Lara and G Eger-Hummel, 1991 : Genetic control of cellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. *In: Science and Cultivation of Edible Fungi.* H. Maher, ed., pp.11-15. Balkema, Rotterdam.
- Sarikaya A and MR Ladisch, 1997 : Mechanism and potential applications of bio-ligninolytic systems in a CELSS. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62:131-149.
- Schlick A, K Kuhls, W Meyer, E Lieckfeldt, T Borner and K Messner, 1994 : Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in

- fungal DNA: implications for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 26:74-78.
- Sharp, JK, B Valent and P Albersheim, 1984 ; Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259:11312-11320.
- Tanaka M, M Taniguchi, T Morita, R Matsuno and T Kamikubo, 1979 ; Effect of chemical treatment on solubilization of crystalline cellulose and cellulosic wastes with *Pellicularia filamentosa* cellulase, *J. Ferment, Technol.* 57:186-190.
- Teather, RM and PJ Wood, 1982 ; Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:777-780.
- Thompson JD, DG Higgins and TJ Gibson, 1994 ; CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- West, PA and RR Colwell, 1994 ; Identification and classification of *Vibrionaceae*: an overview. In: *Vibriosis in the Environment*, R.R.Colwell, ed., pp.285-363. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York.
- Williams, JGK, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalaski and SV Tingey, 1990 ; DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acid Res.* 8:6531-6535.
- Yoo, YB and DY Cha, 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., pp. 157-192, Gordon and Breach Science Publisher, New York.
- Yoo, YB, 1992 ; Interspecific hybridization between *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus florida* following protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* 20:118-126.
- Yoo, YB, YH Park and KY Chang, 1988 ; Induction of Auxotrophic Mutants and Back Mutation in *Pleurotus*. *Res. Rep. Rural Development Administration, FPUM-30, Korea*, pp.133-140.
- Zhuang, C, T Mizuno, A Shimada, H Ito C Suzuki, Y Mayuzumi, H Okamoto, Y Ma and J Li, 1993 ; Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom Fengweigu or Houbitake. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:901-906.
- Zolan ME, CJ Tremel and PJ Pukkila, 1988 ; Production and chracterization of radiation-sensitive meiotic mutants of *Coprinus cinereus*. *Genetics* 120:379-387.
- 공원식, 김동현, 김영호, 김경수, 유창현, 변명옥, 김광호, 1997 ; 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*) 단포자 분리주의 유전적 변이성. *한국균학회지*, 25:111-120.
- 배 무, 이 용현, 성 낙계, 서 정훈, 김 진상, 1989 ; Biomass 자원의 bioenergy화 공정의 개량된 방법 개발에 관한 연구, KOSEF 86-06-04.
- 손 현수, 김 종욱, 이 상선, 최 연배, 배 영용, 1991 ; 폐비지를 이용한 메탄의 생산 (II), 90IC302-603AP.
- 송영재, 정미정, 김범기, 노영덕, 류진창, 유영복, 1996 ; DNA 다형성 분석에 의한 느타리버섯 단포자 분리주의 유전적 변이성. *한국균*

학회지, 24:186-205.

하 영철, 김 상중, 1991 ; Lignin 분해 미생물의 균주탐색과 개발연구
901C201-305FP.

서 지 정 보 양 식					
수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제코드		
KAERI/RR-1909/98					
제목 / 부제	방사선이용 생물자원유통화				
연구책임자 및 부서명	이 영 근, 동위원소·방사선응용연구팀				
연구자 및 부서명	이영일, 송희섭, 김재성, 김진규, 천기정, 장화형, 한갑진(동위원소·방사선응용연구팀), 이기성, 김수기, 이성호, 이정숙(배재대학교, 생물학과)				
출판지	한국	발행기관	한국원자력연구소	발행년	1999
페이지	145 p.	도표	있음(○), 없음()	크기	A ₄
참고사항					
비밀여부	공개(○), 대외비(), _ 급비밀		보고서종류	최종보고서	
연구위탁기관			계약번호		
초록 (15-20줄내외)	<p>세계적으로 부존량이 많은 섬유소성 생물폐자원이 미이용되고 있어서 이를 유익하게 재활용하고자 하였다. 물리적·화학적전처리의 경우 비용이 많이 들고 2차 오염원을 초래하는 단점이 있기 때문에, 방사선과 미생물을 이용한 생물폐자원 분해를 시도하였다. 생물폐자원의 물리적·형태적 특성 및 방사선분해 반응을 조사하였다. 방사선을 이용하여 생물폐자원의 주성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌을 효율적으로 분해하는 돌연변이 균주를 확보하였으며 이에 대한 생리적·유전학적 특성을 파악하였다. 4종의 섬유소성 생물폐자원을 기질로하여 위의 돌연변이주로 발효한 후 생겨나는 발효부산물의 생물활성을 알아 본 결과 항돌연변이원성, 식물의 glyceollin 유도성 및 IAA와의 상호효과가 있는 것으로 나타났다. 또한, 발효부산물내 3대 영양소, 무기물 및 비타민 함량을 조사한 결과 가축사료로서의 높은 효용성이 있는 것으로 나타났다.</p>				
주제명키워드 (10단어내외)	생물폐자원, 방사선, 버섯, 돌연변이주, 사료, 생활성물질				

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET					
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.	
KAERI/RR-1909/98					
Title / Subtitle		Radiation Application for Upgrading of Bioresources			
Project Manager and Department		Young-Keun Lee, Radioisotope and Radiation Application Team			
Researcher and Department		Young il Lee, Hi sup Song, Jae sung Kim, Jin kyu Kim, Ki jung Chun, Hwa-Hyoung Chang, Gab jin Han(Radioisotope and Radiation Application Team)			
		Ki sung Lee, Soo ki Kim, Sung ho Lee, Jung sook Lee (Paichai University)			
Publication Place	Korea	Publisher	KAERI	Publication Date	1999. 04
Page	145 p.	Ill. & Tab.	Yes(o), No ()	Size	A ₄
Note					
Classified	Open(o), Restricted(), __ Class Document		Report Type	Final report	
Sponsoring Org.			Contract No.		
Abstract (15-20 Lines)					
<p>The productivity of lignocellulosic biowastes is greatly expanded along the technical improvement of agricultural industry all over the world. Among the components of biowastes, the lignin is the most difficult fraction to be degraded by mushroom. Thus, the improved strains of edible mushroom with more highly lignocellulolytic activity were induced by γ-ray radiation and analysed their physiological and genetical characteristics. After cultivation of radiation induced edible mushrooms. Antimutagenicity, glyceollin elicitation activity and synergistic effects with indole acetic acid were found promisingly from the extracts of their cultural byproduct. And also were the byproducts expected to be useful for the candidate of subsidiary animal feed suggested from the analysis of protein, lipid, carbohydrate, mineral, and vitamin concentration of them.</p>					
Subject Keywords (About 10 words)		Bioactive material, Bioresource, Feed, Mushroom, Mutant, Radiation			