

저온 보존 기간에 따른 담자균류의 생존율 비교

유성열¹ · 가강현^{2*} · 이봉훈² · 박현² · 박원철²

¹국립산림품종관리센터, ²국립산림과학원 녹색자원이용부

Comparison of Viability in Basidiomycetes After Low Temperature Storage According to Storage Period

Sung-Ryul Ryu¹, Kang-Hyeon Ka^{2*}, Bong-Hun Lee², Hyun Park² and Won-Chull Bak²

¹Korea Forest Seed & Variety Center, Suhoer-ri, Suanbo-myeon, Chungju-si 380-941, Korea

²Department of Forest Resources Utilization, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

(Received 13, June 2011., Accepted 27, July 2011)

ABSTRACT : Short-preservation of basidiomycetes is generally being conducted in slant tubes containing solid medium based on agar. In this study, we investigated the vitality of 28 species and 76 strains preserved on potato dextrose agar (PDA) at 4°C for 2~7 years. The survival rates of the fungi were 82%, 86%, 94%, 96%, 94%, and 94% for seven, six, five, four, three, and two years old preservation, respectively. The volume of medium in *Lentinula edodes* showed decrease after 2 years preserved. The pH of preserved medium was 5.42 in 2007 (two years old), but it became nearly neutral as increasing preservation term.

KEYWORDS : Basidiomycetes, Low temperature storage, Preservation

균주 보존의 일차적 목적은 보존체의 오염 없이, 유전적 변이 없이, 노화 없이 생존을 시키는 것이다(Jong and Birmingham, 2001). 일반적으로 균주보존은 적어도 두 가지 이상의 방법을 통해 이루어지고 있다(Borman *et al.*, 2006). 실험실 또는 기관의 여건에 따라 균류 보존은 단기 및 장기보존을 병행하는 경우가 많다. 버섯 균사체는 계대배양을 통해 새로운 균사체를 지속적으로 얻어 생명력을 유지시키며, 보존 방법에 따라 계대배양의 횟수가 좌우된다. 균사체의 보존하는 방법은 4°C 한천배지, 멸균수, -85°C 냉동, 액체질소 등에서 보존하면서 지속적으로 계대를 하는 것이다(Borman *et al.*, 2006; Jong and Birmingham, 2001; Kitamoto *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2009). 4°C 한천배지와 멸균수 방법은 전처리 없이 균사체를 보존하는 방법이지만, -85°C 냉동과 액체질소 보존은 결빙보호제를 첨가하여 보존하고 있다.

일반적인 실험실에서 가장 자주 사용되는 균류 보존의 방법은 지속적인 계대배양에 의한 단기보존을 이용하며, 그 대표적인 것이 시험관에 사면배지를 만들어 사용하는 것이다. 이 방법은 단순하며, 비용이 적게 들고, 특별한 장비를 요구하지 않는 장점이 있지만, 균류의 생존을 유지하기 위해서는 계대배양을 자주 해야 하며, 유전적 속성을 보존하는데 비효과적인 단점을 갖고 있다(Jong and Birmingham, 2001).

이와 같은 단점을 보완하고자 국립산림과학원은 균류 보존을 사면배지와 액체질소 보존을 병행하고 있다. 균류는 PDA 사면배지에 보존하면서 1년에 한 번씩 계대배양을 수행하고 있다. 본 연구는 저온에서 담자균류의 생존이 가능한 보존 기간을 알아보기 위해 4°C PDA 사면배지에 7년간 보관중인 균주의 균사생장량 및 보존배지의 감소량, pH변화를 분석한 결과를 소개하고자 한다.

시험균주

사용한 균주는 국립산림과학원의 4°C 균주 보존실에 보관중인 것 중 2002년부터 2007년까지 연도별로 갖추어진 28종 76균주를 대상으로 하였다(Table 1). 이들 균주들은 시험관 (22 mm × 200 mm 또는 18 mm × 180 mm)에 Potato dextrose agar (PDA, Difco 사) 배지를 22 mm는 12 ml과 18 mm는 10 ml씩 넣고 균을 접종하고 배양 후 보관된 것이다. 연도별 균주는 시험관 1개씩 사용하였다.

균주의 생존율 조사

생존율 조사는 각각의 보존균주로부터 하나의 시험관에서 10개 균사체 조각을 떼어내어 PDA 배지에 각각 치상한 후 25°C에서 암배양 하여 종별 균주의 생존유무, 오염여부를 관찰하였다. 생존율 계산은 10개 가운데 생존된 것을 퍼센트로서 나타냈다.

*Corresponding author <E-mail : kasymbio@forest.go.kr>

Table 1. Survival percentage of basidiomycete fungi for seven years on PDA

Scientific name	Strain No.	Preservation year					
		2002	2003	2004	2005	2006	2007
<i>Agaricus blazei</i>	362	20	100	100	con.	con.	100
<i>Agrocybe cylindracea</i>	119	10	10	100	100	100	100
<i>Armillariella mellea</i>	321	100	-	100	100	100	100
<i>Auricularia polytricha</i>	291	100	0	100	100	100	100
<i>Calocybe gambosa</i>	205	con.	100	100	100	20	100
<i>Calocybe gambosa</i>	323	100	100	20	100	100	100
<i>Calocybe gambosa</i>	204	100	10	70	100	100	100
<i>Coprinus comatus</i>	181	0	100	30	100	100	100
<i>Coprinus comatus</i>	346	100	10	100	100	0	0
<i>Coprinus comatus</i>	302	100	0	100	0	100	0
<i>Flammulima velutipes</i>	322	con.	0	100	100	100	100
<i>Flammulima velutipes</i>	410	100	0	10	100	100	100
<i>Flammulima velutipes</i>	109	100	10	100	100	100	100
<i>Ganoderma applanatum</i>	475	100	100	100	100	100	100
<i>Ganoderma lucidum</i>	72	100	-	0	100	100	100
<i>Ganoderma lucidum</i>	199	100	100	100	100	100	100
<i>Grifola frondosa</i>	75	100	100	100	100	100	100
<i>Grifola frondosa</i>	209	100	100	100	100	100	100
<i>Grifola frondosa</i>	327	con.	100	20	100	100	100
<i>Grifola frondosa</i>	328	10	100	100	100	100	100
<i>Grifola frondosa</i>	329	100	100	100	100	100	100
<i>Grifola umbellata</i>	311	-	100	100	70	100	100
<i>Hericium alpestre</i>	242	100	100	100	10	10	100
<i>Hericium erinacium</i>	124	100	100	100	100	100	100
<i>Hericium erinacium</i>	349	100	100	100	100	100	100
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	331	100	100	100	100	100	100
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	333	100	100	100	100	100	100
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	334	100	100	100	100	100	100
<i>Irpex lacteus</i>	200	-	100	100	100	100	con.
<i>Laetiporus sulphureus</i>	76	100	100	100	100	100	100
<i>Laetiporus sulphureus</i>	343	100	100	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	2	100	100	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	3	-	100	100	50	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	4	100	100	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	5	100	100	100	-	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	8	100	100	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	234	100	100	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	253	100	100	100	100	100	100

Table 1. Continued

Scientific name	Strain No.	Preservation year					
		2002	2003	2004	2005	2006	2007
<i>Lentinula edodes</i>	254	con	100	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	256	100	100	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	257	100	100	100	100	100	100
<i>Lentinus lepideus</i>	201	70	0	100	20	100	100
<i>Lentinus lepideus</i>	202	100	100	100	100	100	con.
<i>Lentinus lepideus</i>	206	100	0	0	100	100	100
<i>Lentinus lepideus</i>	207	0	100	100	100	100	100
<i>Lentinus lepideus</i>	217	100	100	100	100	100	100
<i>Macrolepota procera</i>	477	100	100	-	100	100	100
<i>Morchella esculenta</i>	348	con.	100	100	100	10	100
<i>Naematoloma sylvaticum</i>	112	70	10	100	100	100	100
<i>Phanerochate chrysosporium</i>	156	0	0	0	100	100	100
<i>Phellinus lintens</i>	360	30	con.	100	70	100	100
<i>Phellinus lintens</i>	361	100	con.	100	100	con.	100
<i>Phellinus lintens</i>	286	30	70	100	10	-	100
<i>Phellinus lintens</i>	288	100	10	-	40	100	100
<i>Phellinus lintens</i>	289	20	100	100	100	100	100
<i>Phellinus lintens</i>	290	20	100	100	100	100	100
<i>Phellinus lintens</i>	315	20	100	100	100	con.	100
<i>Phellinus lintens</i>	316	100	100	100	con.	70	100
<i>Phellinus lintens</i>	318	100	100	100	100	100	100
<i>Pholiota nameko</i>	210	con.	100	100	100	100	100
<i>Pholiota squarrosa</i>	240	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	324	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	326	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	77	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	80	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	111	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2111	0	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	239	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	294	100	100	con.	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	295	100	100	100	100	100	100
<i>Pleurotus ostreatus</i>	298	100	100	100	100	100	100
<i>Poria cocos</i>	85	80	50	100	100	100	100
<i>Poria cocos</i>	154	0	0	100	100	100	100
<i>Pycnoporus coccineus</i>	476	con.	100	100	100	100	100
<i>Sparassis crispa</i>	123	con.	100	100	100	100	100
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	120	100	100	100	100	100	100
Total vitality (%)		82	86	94	96	94	94

con : contamination, - : no strain, 0 : no vitality

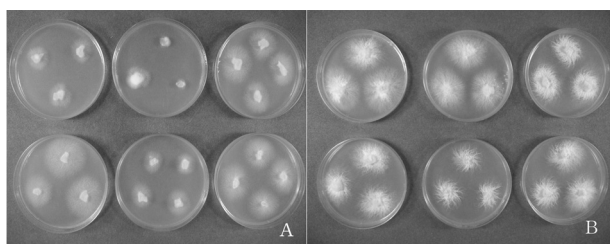


Fig. 1. Viability tests of *Lentinula edodes* (A) and *Hericium erinacius* (B) by preservation year (from 2002 to 2007, clockwise) on PDA at 25°C for 10 days.

본 연구에서 사용된 균주보존방법인 PDA 배지를 이용하여 장기간 보존한 것들에 대해서 균주가 언제까지 생존할 수 있는지를 조사해 보았다. 버섯류 28종 76균주에 대해 조사한 결과, *Phanerochate chrysosporium*을 제외하고 대부분의 균주는 계대배양 없이 7년째까지 생존하는 것으로 나타났다(Table 1; Fig. 1). 뽕나무버섯(*Armillariella mellea*), 잔나비불로초(*Ganoderma applanatum*), 불로초(*Ganoderma lucidum*), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinacium*), 느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus*), 기계충버섯(*Irpex lacteus*), 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus*), 큰갓버섯(*Macrolepiota procera*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 표고(*Lentinula edodes*), 독청버섯아재비(*Stropharia rugosoannulata*)는 2002년부터 2007년까지 100% 생존율을 보였다.

일부 버섯 균주들은 연도별 균의 생존율에 약간의 차이가 나타났다. 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)은 균주별로 생존율이 2002년에는 20~100%범위였으며, 2003년에는 10~100%, 2004년에는 100%, 2005년에는 10~100%, 2006년에는 70~100%, 2007년에는 100%로 나타났다. 복령(*Poria cocos*)은 2002년(80%, 0%)과 2003년(50%, 0%)로 생존율이 낮았다. 한편, 먹물버섯(*Coprinus comatus*)은 최근 것이 활력을 잃는 것으로 나타나 이에 대해서는 연구가 필요한 상태이다. 생존율 평가 과정에서 오염은 세균과 푸른곰팡이류에 의해 일어났고, 보존기간이 길어질수록 배지가 건조되어 지고 세균 오염이 높아졌다.

사면배지 보존은 매 3개월마다 계대배양 하는 것이 대부분의 균류의 생명력을 유지하며, 어떤 종에서는 수년간 생명력이 지속되는 것으로 알려져 있다(Jong and Birmingham, 2001). 본 실험에 사용한 것은 실험실 여건에서 매년 계대배양 하는 균주들이어서 생명력이 수년간 유지되는 것으로 보인다. 모래발버섯(*Pisolithus tinctorius*)과 알버섯류(*Rhizopogon* spp.) 같은 일부 균근성 버섯들은 매년 계대배양 하는 경우 생명력을 잃는 것이 나타나기도 하였다(자료 미제시).

보존기간에 따른 PDA 배지의 부피변화

보존기간에 따라 배지의 부피변화는 배지를 만들 당시의

부피를 기준으로 해서 감소한 부피를 퍼센트로 계산하였다. 보존된 시험관은 기간별로 끓는 물 100°C에 녹여서 한 천이 굳기 전 65°C 전후에서 측정하였다. 부피변화는 2002년부터 2008년까지 7년 동안 4°C에서 보존된 연도별 표고 균주를 5반복하였다.

4°C PDA 배지에서 보존한 균주들은 보존기간이 길수록 배지의 색깔이 갈변되었고, 배지건조에 따른 부피변화를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 갈변이 일어나는 것은 균사체가 영양단계에서 생식단계로 전환되는 지표로도 사용하지만, 한천 배지상에서는 배지건조와 양분고갈을 알 수 있는 간접 지표로도 볼 수 있다.

건조된 배지를 확인하기 위하여 표고 균주의 부피 양을 조사한 결과, 배지의 부피는 2008년 3%, 2007년 20%, 2006년 30%, 2005년 47%, 2004년 33%, 2003년 45%, 2002년 42%로 4년 경과까지 배지 부피의 급격한 감소가 일어났고, 그 이



Fig. 2. Photograph of *Lentinula edodes* grown PDA slant tubes by preservation year. A : 2007, B : 2006, C : 2005, D : 2004, E : 2003, F : 2002.

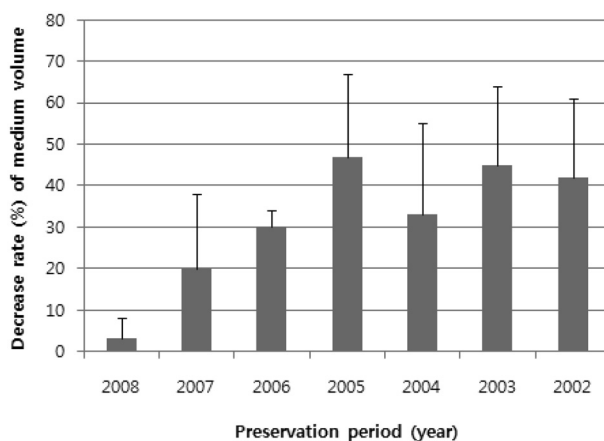


Fig. 3. Volume fluctuations of PDA slant tubes grown *Lentinula edodes* by preservation year. Data is mean $\pm$ SD, n = 5.

후부터는 감소경향이 거의 없었다(Fig. 3). 배지의 부피 감소 차이는 시험관에 실리스토퍼 마개를 어느 정도 밀착시키느냐에 따라 기공밀도 차이가 일어나 발생할 수 있을 것으로 판단되나, 4년 경과까지 배지수분의 급격한 감소는 보관균주의 활력에 영향을 줄 것으로 생각된다. 적합한 배지 수분함량은 65%인데(Stamets and Chilton 1983; Chang and Miles, 2004), 수분함량이 30% 이하가 되면 이용균주의 활성이 저하되고 다른 해균의 오염을 불러일으킬 수 있어, 저온 시험관 보존은 3년 미만 간격으로 계대배양 하는 것이 적합한 것으로 판단된다.

또한 단기간 균주보존을 할 때 사용하는 증류수 보존은 균체량 증가를 억제시키며 형태적, 유전적인 특성을 억제시켜 유용한 방법으로 알려져 왔다. 그리고 항상 수분이 유지되기에 생명력을 유지하는데도 장점이 있어 2-7년도 유지된다(Jong and Birmingham, 2001). 반면, 냉장 사면배지 보존은 시간이 경과할수록 배지건조가 진행되기 때문에 증류수 보존과는 달리 균주별 계대배양을 해야만 한다. 따라서 배지의 부피감소와 갈변 같은 배지의 색깔변화는 배지건조와 배지의 양분고갈로 균주보존에 부적합한 조건이 되기 때문에 4°C에서 시험관을 이용하여 균주를 보존하기 위해서는 배지 부피감소가 일어나기 전에 계대배양 하는 것이 바람직할 것이다.

보존균주의 배지 pH 변화

보존 균주는 끓는 물에 녹인 후 1 ml에 증류수 10 ml를 섞어 6시간 동안 상온에서 흔들어 준 다음 상층액을 이용하여 측정하였다. 이미 한천이 들어가 굳어져 버린 배지의 산도 측정이 그 자체로 불가능하기 때문에 톱밥이나 토양과 같이 고체매질을 측정할 때 이용되는 방법을 적용하여 측정하였다(Gray *et al.*, 1971; Obodai, 1992). 2002년부터 2008년까지 7년 동안 4에서 보존된 연도별 표고 4개의 pH를 측정하였다. 대조구는 2009년 새롭게 계대배양한 배지의 균사체를 이용하였다.

Table 2는 한천배지에서 보존된 균주들에 대하여 보존 기간별로 pH를 측정하고 변화를 살펴본 것이다. 보존기간이 짧을수록 배지내 pH는 낮아지는 경향이 나타났고, 보존기간이 길어질수록 높아지는 경향을 보였다. 일반적으로 시간이 경과하면서 호기성균은 단백질과 아미노산으로부터 암모

니아를 방출해 배지가 알칼리화가 진행되는 것으로 알려져 있다(Schmidt, 2006). 본 실험에서도 배양 초기에는 pH가 4.15이었으나, 6년 보존된 균주에서는 pH 6.71까지 나타났다. 대사작용이 활발하게 이루어지는 균사가 성장하는 기간 동안 pH가 떨어지는 이유는 배지 내 잘 용해되어지며 쉽게 분해 가능한 탄소원의 고갈로 인하여 수소이온 농도에 영향을 미치는 유기산이 형성되어 배지를 산성화시켰지만(Gray *et al.*, 1971), 보존기간이 길어지면서 양분결핍, 배지건조와 같은 불리한 조건을 견디어 내기 위해 균사체로부터 알칼리성 물질을 분비함으로 pH의 변화를 가져온 것으로 판단된다.

적요

균류의 단기 보존은 일반적으로 한천이 포함된 고체 사면배지에서 이루어진다. 본 연구에서는 2~7년간 PDA 배지를 이용하여 4°C에서 보관된 담자균류 28종 76개 균주들에 대한 활력을 조사하였다. 균의 생존율은 보존기간이 7년 82%, 6년 86%, 5년 94%, 4년 96%, 3년 94%, 2년 94%로 나타났다. 표고 균주의 배지 부피는 2년 이후부터 감소하였다. 보존된 배지의 pH는 2007년에 5.42였지만 보존기간이 길어질수록 거의 중성 pH에 도달하였다.

참고문헌

- Borman, A. M., Szekely, A., Campbell, C. K. and Johnson, E. M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 161:361-368.
- Chang, S. T. and Miles, P. G. 2004. Mushroom: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. CRC press.
- Gray, K. R., Sherman, K. and Biddlestone, A. J. 1971. A review of composting part 1. *Process Biochemistry* 6: 32-26.
- Jong, S.C. and Birmingham, J.M. 2001. Cultivation and preservation of fungi in culture. In: The Mycota VII Part B. p.193-202.
- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S. and Yamanaka, K. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience* 43: 143-149.
- Obodai, M. 1992. Comparative studies on the utilization of agricultural waste by some mushrooms (*Pleurotus* and *Volvarella* species). Ghana: University of Ghana, MPhil thesis.
- Ryu, S. R., Bak, W. C., Koo, C. D. and Ka, K. H. 2009. Studies on cry-preservation of registered strains of *Lentinula edodes*. *Jour. Kor. For. Soc.* 98: 115-124.
- Schmidt, O. 2006. Wood and Tree Fungi: biology, damage, protection, and use. Springer.
- Stamets, P. and Chilton, J. S. 1983. The mushroom cultivator. A practical guide for growing mushrooms at home. Washington, Agarikon Press.

Table 2. pH changes of PDA slant tubes grown *Lentinula edodes* by preservation year

Strain No.	Preservation year						
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2009
554	6.49	6.52	6.28	5.90	6.01	5.88	4.71
555	6.31	6.95	6.48	6.04	5.94	4.82	4.17
610	5.80	7.14	6.17	5.24	6.35	6.09	3.82
611	5.93	6.23	6.11	6.10	5.98	4.89	3.91
Average	6.13	6.71	6.26	5.82	6.07	5.42	4.15