

## 우리나라 산림에서 분리한 외생균근균의 균사생장에 있어 배지, 온도, pH의 영향과 셀룰라아제 활성

전성민 · 김민수 · 가강현\*

국립산림과학원 화학미생물과

## Effects of Medium, Temperature and pH on Mycelial Growth and Cellulase Activity of Ectomycorrhizal Fungi from Korean Forests

Sung-Min Jeon, Min-Soo Kim and Kang-Hyeon Ka\*

Division of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

(Received 17, November 2012., Revised 4, December 2012., Accepted 6, December 2012)

**ABSTRACT:** Mycelial growth of ectomycorrhizal fungi (27 strains of 8 species) collected from Korean forests was observed on various culture conditions (media, temperature, pHs). After 60 days of incubation, all strains grown on potato dextrose agar (PDA) and modified Melin-Norkran's agar (MMNA), whereas no mycelial growth was observed on malt extract agar (MEA) or sabouraud dextrose agar (SDA) in some strains including *Tricholoma matsutake*. Mycelial growth on PDA was poor at high temperature (30°C) than the low temperature (10°C). The optimal temperature on PDA and pH in potato dextrose broth (PDB) for mycelial growth in most strains were 20-25°C and pH 4-5, respectively. All strains tested showed the carboxymethyl cellulase (CM-cellulase) activity and the maximal cellulase activity was expressed by the mycelium of *T. matsutake* (KFRI 1266) on the CMC agar plate with pH 5.0.

**KEYWORDS:** Cardinal temperature, Cellulase, Ectomycorrhizal fungi, Mycelial growth, pH

### 서 론

외생균근균에 속하는 많은 종들은 수목의 생장을 촉진시킬 뿐만 아니라 식용 가능한 자실체를 형성하여(Giomaro *et al.*, 2005) 인류에게 중요한 먹거리로 제공되고 있다. 기록된 2,500 종류의 식용버섯 중 400종 이상이 외생균근균이다(Murat *et al.*, 2008). 세계적으로 상업적인 가치가 높은 것으로 알려진 외생균근균으로는 *Tuber magnatum*, *Tuber melanosporum*, 송이(*Tricholoma matsutake*), 그물버섯(*Boletus edulis*), 찌꼬리버섯(*Cantharellus cibarius*) 등이 있다(Murat *et al.*, 2008). 이 중 *Tuber* spp.을 제외한 나머지 3종의 버섯들과 키다리곰보버섯(*Morchella conica*), *Phlebopus portentosus*, *Thelephora ganbajun*, *Tuber indicum* 등은 이미 아시아권에서 상업적으로 가치 있는 외생균근균으로 취급되고 있다(Mortimer *et al.*, 2012). 또한 외생균근균은 식용 이외에도 다양하게 이용할 수 있다. 최근에는 그들의 자실체 또는 균사체로부터 사람에게 유용하거나 환경 개선에 도움이 될만한 여러 가지 활성 물질들이 분리되고 그 기능이 밝혀지면서 의학

및 환경 분야에서도 중요한 가치를 지닌 새로운 생물자원으로 인식되고 있다. 다색벚꽃버섯(*Hygrophorus russula*), 비단그물버섯(*Suillus luteus*), 찌리버섯(*Ramaria botrytis*), 송이 등은 한국과 캐나다에서 상업적으로 중요한 야생버섯으로 취급되고 있다(Berch *et al.*, 2007). 이 중 비단그물버섯은 스페인, 프랑스, 이태리와 같은 국제적인 시장에서 상업적으로 거래되어 경제적인 가치를 인정받고 있는 중요한 버섯 중의 하나이다(Barros *et al.*, 2006). 찌리버섯 또한 식용버섯으로 널리 알려져 있지만, 최근에는 그 자실체로부터 새로운 세라마이드(ceramide) 성분이 분리되어(Yaoita *et al.*, 2007) 피부 보습제나 화장품 개발에 이용 가치가 크며, 찌리버섯의 추출물 또한 돌연변이 억제 효과와 함께 결장암 또는 간암 세포의 성장을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되어(Kim *et al.*, 1999) 항암제 원료로서의 활용도 기대된다. 큰비단그물버섯(*Suillus grevillei*), 일본연지그물버섯(*Heimioporus japonicus*), 붉은젓버섯(*Lactarius laeticolor*), 접시결겉이그물버섯(*Leccinum extremiorientale*) 등도 식용 가능한 외생균근균으로 알려져 있다(Kim and Han, 2009). 이 중 큰비단그물버섯은 식용 가능할 뿐만 아니라, 자실체가 수은(Hg)을 축적하는 특성이 있기 때문에(Chudzyn'ski *et al.*, 2009) 중금속

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

으로 오염된 토양을 복원하는 데에 유용하게 활용될 수 있다. 꺾겉이그물버섯속(*Leccinum*)에 속하는 버섯들은 중국에서 생버섯이나 건조 버섯 또는 염장이나 피클 형태로 만들어 시장에서 식용으로 판매되고 있는데, 특히 접시겉이그물버섯은 윈난성 쿤밍시(Kunming)의 야생버섯 시장에서 흔히 만나 볼 수 있는 버섯이기도 하다(Fu *et al.*, 2001). 국내에서 채취한 접시겉이그물버섯의 메탄을 추출물 또한 높은 피브린용해 활성(fibrinolytic activity)을 나타내는 것으로 보고되어(Kim *et al.*, 2007) 항혈전제로서의 개발 가능성이 있다. 또한 최근에는 이 버섯으로부터 분리해 낸 Leccine A가 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸(endoplasmic reticulum stress-dependent cell death)을 방어하는 활성을 나타내는 것으로 밝혀져(Choi *et al.*, 2011) 이 역시 의약품 원료로서의 활용이 기대된다.

그러나 이와 같은 외생균근균들은 살아있는 식물과 공생하며 버섯을 발생시키기에 인공재배가 매우 어렵다. 현재까지 상업적으로 활용 가능할 만큼 인공재배가 성공한 버섯류로는 *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, *Tuber borchii*, *Terfezia clavaryi*, *Lactarius delisiosus*, *Lyophyllum shimeji* 등 6종 밖에 되지 않는다(Murat *et al.*, 2008). 따라서 이 이외의 많은 종류의 외생균근균들은 자연 채취에 의존하지 않으면 쉽게 얻을 수 없는 자원이 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 균과 식물 간 균근 합성을 시도하는 등 자실체 발생에 보다 근접할 수 있는 버섯 인공재배 기술을 개발해야 한다. 이를 위해서는 균주의 생리학적 특성 조사를 통해 산림 내 유용 버섯 균주를 발굴하

고, 그 균사체의 효과적인 증식과 보존 과정이 순차적으로 이루어질 수 있도록 해야 한다. 이에 본 연구에서는 우리나라에서 수집한 외생균근균 중 식용버섯으로서 상업적으로 유용한 가치가 있을 것으로 기대되는 균주를 대상으로 다양한 배양 조건(배지의 종류, 배양 온도, 배지의 pH)에서 이들 각 균주의 기초적인 균사 성장 특성을 조사하였다. 또한 외생균근균의 부후적 특성이 인공재배를 가능케 하는데 유리한 요소가 될 수 있으므로 외생균근균의 셀룰라아제(cellulase) 활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 외생균근균의 수집 및 순수배양

2006~2011년까지 국내 4 지역(강원, 경기, 경남, 경북)에서 수집하여 국립산림과학원(Korea Forest Research Institute, KFRI)에 보존 중인 외생균근균 중 8종 27개 균주를 대상으로 이들의 생리학적 특성을 조사하였다(Table 1). 한천평판배지 또는 사면배지에 냉장보존(4°C) 했던 균의 생존 여부를 확인한 후, 영양세포의 대사가 활발한 접종원을 얻기 위해 본 실험 전 해당 균주를 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA) 또는 MMNA 배지(Modified Melin-Norkran's agar)와 같은 고체배지에 접종하여 25°C에서 암배양하였다. 육안 또는 실체현미경(Leica DFC290, German)을 이용하여 평판배지 상에서 균총(mycelial colony)을 형성한 순수 배양체만을 선별하여 접종원으로 사용하였다.

**Table 1.** Strains of ectomycorrhizal fungi used in this study

Scientific name	Korean name	KFRI strain No. <sup>1)</sup>	Origin of strains		
			Forest vegetation	Location	Year isolated
<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff.) Kauffman	다색벚꽃버섯	818	<i>Quercus mongolica</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2006
<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff.) Kauffman	다색벚꽃버섯	1022	<i>Quercus mongolica</i>	Mungyeong, Gyeongbuk, Korea	2007
<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff.) Kauffman	다색벚꽃버섯	1487	<i>Quercus mongolica</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2010
<i>Lactarius laeticolor</i> (S. Imai) Imazeki ex Hongo	붉은젓버섯	928	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2007
<i>Lactarius laeticolor</i> (S. Imai) Imazeki ex Hongo	붉은젓버섯	929	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2007
<i>Suillus luteus</i> (L.) Roussel	비단그물버섯	1232	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2009
<i>Suillus luteus</i> (L.) Roussel	비단그물버섯	1244	<i>Pinus rigida</i>	Sancheong, Gyeongnam, Korea	2009
<i>Suillus luteus</i> (L.) Roussel	비단그물버섯	1246	<i>Larix leptolepis</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2009
<i>Suillus luteus</i> (L.) Roussel	비단그물버섯	1458	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2010
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & S. Imai) Singer	송이	1013	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2007

Table 1. Continued

Scientific name	Korean name	KFRI strain No. <sup>1)</sup>	Origin of strains		
			Forest vegetation	Location	Year isolated
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & S. Imai) Singer	송이	1014	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2007
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & S. Imai) Singer	송이	1015	<i>Pinus densiflora</i>	Mungyeong, Gyeongbuk, Korea	2007
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & S. Imai) Singer	송이	1017	<i>Pinus densiflora</i>	Bongwha, Gyeongbuk, Korea	2007
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & S. Imai) Singer	송이	1265	<i>Pinus densiflora</i>	Sancheong, Gyeongnam, Korea	2009
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & S. Imai) Singer	송이	1266	<i>Pinus rigida</i>	Sancheong, Gyeongnam, Korea	2009
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & S. Imai) Singer	송이	1681	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2011
<i>Ramaria botrytis</i> (Pers.) Ricken	싸리버섯	1018	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2007
<i>Ramaria botrytis</i> (Pers.) Ricken	싸리버섯	1680	<i>Pinus densiflora</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2011
<i>Heimioporus japonicus</i> (Hongo) E. Horak	일본연지그물버섯	1225	<i>Oak stand</i>	Goseong, Gangwon, Korea	2009
<i>Heimioporus japonicus</i> (Hongo) E. Horak	일본연지그물버섯	1482	<i>Quercus mongolica</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2010
<i>Leccinum extremiorientale</i> (Lar.N. Vassiljeva) Singer	접시결겉이그물버섯	1194	<i>Oak stand</i>	Goseong, Gangwon, Korea	2009
<i>Leccinum extremiorientale</i> (Lar.N. Vassiljeva) Singer	접시결겉이그물버섯	1195	<i>Oak stand</i>	Goseong, Gangwon, Korea	2009
<i>Suillus grevillei</i> (Klotzsch) Singer	큰비단그물버섯	1123	<i>Larix leptolepis</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2008
<i>Suillus grevillei</i> (Klotzsch) Singer	큰비단그물버섯	1124	<i>Larix leptolepis</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2008
<i>Suillus grevillei</i> (Klotzsch) Singer	큰비단그물버섯	1125	<i>Larix leptolepis</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2008
<i>Suillus grevillei</i> (Klotzsch) Singer	큰비단그물버섯	1233	<i>Larix leptolepis</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2009
<i>Suillus grevillei</i> (Klotzsch) Singer	큰비단그물버섯	1284	<i>Larix leptolepis</i>	Pocheon, Gyeonggi, Korea	2010

<sup>1)</sup>KFRI: Korea Forest Research Institute, Korea.

#### 고체배지의 종류에 따른 외생균근균의 균사 생장

외생균근균의 균사 생장에 적합한 고체배지를 선발하기 위해 다음과 같은 조성을 갖는 4 종의 배지를 준비하였다; Potato dextrose agar(PDA; glucose 20 g, potato starch 4 g, agar 15 g/L), Malt extract agar(MEA; maltose 12.75 g, dextrin 2.75 g, glycerol 2.35 g, peptone 0.78 g, agar 15 g/L), Sabouraud dextrose agar(SDA; dextrose 40 g, pancreatic digest of casein 10g, peptic digest of animal tissue 5 g/L), Modified Melin-Norkran's agar (MMN; glucose 10g, malt extract 3 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g, CaCl<sub>2</sub> 0.05 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15 g, NaCl 0.025 g, 1% FeCl<sub>3</sub> 1.2 mL, thiamine·HCl 100 µg,

Agar 15 g per L).

상용 가능한 3종의 배지(PDA, MEA, SDA; pH6.0)는 상용배지 제조사(Difco, USA)의 지시에 따라 제조하였다 (Zimbardo and Power, 2003). 또한 비상용 배지 1종(MMNA; pH5.5)은 sucrose 대신 glucose를 동량 첨가하여 제조하였다(Marx, 1969). 각각의 배지는 고압증기멸균(121°C, 20 min) 후 petri dish(bottom 85 × height 15 mm)에 25 mL씩 분주하였으며, 고체배지에서 배양한 각 균주의 균총 선단부를 접종원(직경 6 mm)으로 취하여 각 배지의 중앙에 1개씩 접종하고, 25°C 항온 배양기에서 60 일간 암배양하였다. 디지털 버어니어캘리퍼스를 이용하여 균총의 크기(접종원의 직경 제외)를 측정된 후, 배지의 중

류에 따른 60일 배양체의 균 성장력을 비교하였다.

### 외생균근균의 기본 성장온도

고체배지 상에서 외생균근균의 영양세포가 성장할 수 있는 온도 범위를 조사하기 위해 PDA 배지(pH 6.0)의 중앙에 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종하고, 서로 다른 온도(10, 15, 20, 25, 30°C)로 설정된 항온 배양기 내에서 60일간 암배양하였다. 디지털 버니어캘리퍼스를 이용하여 균층의 크기(접종원의 직경 제외)를 측정된 후, 각 시험 균주의 기본 성장온도(최저 성장온도, 최적 성장온도, 최고 성장온도)를 설정하였다.

### 액체배지의 pH 변화에 따른 외생균근균의 균체량 측정

상용배지 제조사(Difco, USA)의 지시에 따라 PDB (potato dextrose broth)를 제조한 후, 1M HCl 또는 1M NaOH 등을 가하여 액체배지(PDB)의 최종 pH가 4, 5, 6, 7, 8이 되도록 하였다. pH가 서로 다른 각각의 PDB를 유리 삼각플라스크에 20 mL씩 분주하여 고압증기멸균(121°C, 20분)한 후, 상온에서 냉각하였다. 각 액체배지당 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종하고, 정치 상태로 25±2°C에서 60일간 암배양하였다. 배양액 내 균체량을 측정하기 위해 액체배양 종료 2일 전에는 미리 직경 110 mm의 정성 원형 여과지(Advantec No.5A, Japan)를 준비하여 70°C 건조기에서 건조한 후, 여과지의 건조량을 측정하였다. 또한 배양 종료 시에는 이미 건조량을 알고 있는 여과지에 각 균주의 60일 배양체를 부어 여과한 다음, 균체가 함유된 여과지를 70°C 건조기에서 넣어 2일간 건조하였다. 외생균근균의 균주별로 건조량을 측정하고, 배양 후 액체배지 내의 final pH를 측정하여 PDB의 pH 변화가 그들의 생장에 미치는 영향력을 조사하였다.

### 외생균근균의 섬유소 분해 활성

외생균근균의 섬유소 분해 활성은 Kasana 등(2008)이 cellulase 생산 균주를 스크리닝하기 위해 사용한 방법에 따라 수행하였다. Cellulase 활성 기질로는 carboxymethylcellulose(CMC)를 사용하였으며, 염색 시약은 Gram's iodine solution을 사용하였다. 또한 각 균주의 섬유소 분해 활성이 최대로 발현되는 스크리닝 조건을 찾기 위해 Kasana 등(2008)의 방법과는 달리 pH가 서로 다른 carboxymethylcellulose(CMC) 한천평판배지를 다음과 같이 제조하였다. 증류수 1 L에 CMC 한천평판배지의 각 성분(NaNO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, KCl 0.5 g, Carboxymethylcellulose sodium salt 2 g, Peptone 0.2 g)을 혼합한 후, 1M NaOH 또는 1M HCl을 가하여 혼합액의 최종 pH를 5, 6, 7, 8로 각각 제조하였다. 여기에 agar 15 g씩을 첨가하고, 잘 혼합하여 고압증기멸균 하였다. 일회용 소형 멸균 플라스틱 petri dish(55 × 15 mm)에 멸균된 각각의 배지를 10 mL씩 고르게 분주한 다음, 상온에서

응고시켜 CMC 한천평판배지를 제조하였다. 섬유소 분해가 일어난 영역과 분해가 일어나지 않은 영역을 구별하기 위해 염색시약인 Gram's iodine solution(KI 2 g, I<sub>2</sub> 1 g, distilled water 300 mL)을 제조하여 사용 전까지 차광 보관하였다. 각 균주의 접종원(직경 6 mm)을 CMC 한천평판배지의 중앙에 1개씩 접종한 후 25°C에서 8일간 암배양하였다. CMC 한천평판배지의 중앙에 염색시약을 1~2 mL씩 떨어뜨린 후, 즉시 배지를 상하좌우로 흔들어 염색액이 배지 전면에서 고르게 분포하도록 하였다. 각 배지를 알루미늄 호일로 차광한 상태에서 약 2시간 동안 상온(25±2°C)에 방치하였다. 섬유소 분해가 일어나지 않은 영역(암적색으로 염색)과 섬유소 분해가 일어난 영역(투명대) 중 투명대의 직경(접종원의 직경 제외)을 mm 단위로 측정하여 기록하였다. 각 균주별로 CMC 한천평판배지의 pH 변화에 따른 투명대의 크기를 비교하여 외생균근균으로부터 분비되는 CM-cellulase 활성을 탐지하는 데에 가장 적합한 배지의 pH와 균주별 효소 활성을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 외생균근균의 식생

상업적으로 유용한 가치가 있을 것으로 기대되는 국내의 외생균근균을 발굴하고, 이들의 증식과 보존을 위한 순수 배양체의 생리학적 특성을 밝히기 위해 2006년부터 2011까지 강원(홍천, 고성), 경기(포천), 경남(산청), 경북(문경, 봉화) 등지에서 수집한 균주 중 27 균주에 대한 균사생장 특성과 섬유소분해효소 활성을 조사하였다.

송이와 같은 외생균근균은 산림에 서식하는 수목류와 상리공생 관계를 유지하면서 살아가는 식물공생 미생물로 (Ka *et al.*, 2011), 버섯이 발생한 지역의 식생 파악은 균의 생리적 특성, 특히 균근 합성이 가능한 기주식물을 찾는 데에 중요한 정보가 될 수 있다. Table 1은 국립산림과학원 산림미생물연구실에 등록된 버섯 균주 정보를 참고하여 본 시험 균주의 발생지와 식생을 조사한 것으로, 이들은 주로 소나무, 리기다소나무, 일본이깔나무, 신갈나무 등과 균근을 형성하며 살아가는 것으로 추정된다. 소나무림에서는 송이, 짜리버섯, 붉은젓버섯, 비단그물버섯 등의 일부 균주가 수집되었으며, 송이(1266)의 경우에는 특이하게 소나무림이 아닌 리기다소나무림에서 발견되었다. 큰비단그물버섯은 주로 일본이깔나무림에서, 비단그물버섯은 소나무, 리기다소나무, 일본이깔나무와 같은 침엽수림에 다양하게 분포하는 것으로 조사되었다. 이와 달리, 다색벚꽃버섯이나 일본연지그물버섯의 일부 균주들은 신갈나무림에서, 점시겉겉이그물버섯은 참나무림과 같은 활엽수에 주로 분포하는 것으로 조사되었다.

**고체배지의 종류에 따른 외생균근균의 균사 성장 특성**  
국내에서 수집한 외생균근균의 60일 후 균사 성장 특성

을 조사한 결과, PDA와 반합성배지인 MMNA에서는 모든 균주들이 생장한 반면, MEA와 SDA에서는 일부 균주들이 생장하지 못했다(Table 2와 Fig. 1). 7개 균주(KFRI 929, 1013, 1014, 1017, 1265, 1266, 1681)는 반합성 배지인 MMNA에서보다 상용배지인 PDA에서 1.9배 이상 균사 생장이 더 높은 것으로 나타났다. 특히, 이 중 붉은 젿버섯(KFRI 929)은 MMNA에서보다 PDA에서 3.2배 이상 더 크게 균이 성장하였다. 이와 달리 PDA에서보다 MMNA에서 짜리버섯(1680)과 접시결겉이그물버섯(KFRI 1194, 1195)은 1.8배 이상, 일본연지그물버섯(KFRI 1225)은 3.5배 이상 더 크게 균이 성장하였다. 반면, 비단그물버섯과 큰비단그물버섯을 제외한 나머지 즉, 총 시험 균주의 67%(18/27균주)는 MEA에서 전혀 균사가 생장하지 않았으며, 송이 4개 균주(KFRI 1017, 1265, 1266, 1681)는 MEA와 SDA 모두에서 전혀 생장하지 않았다. 이와 같은 현상은 시험 균주의 대부분이 이당류인 maltose를

분해하여 그들의 영양원으로 이용할 수 있는 능력이 낮다는 것을 말해준다. 또한 외생균근균들의 대다수가 단당류를 선호한다 하더라도 배지 내 단당류의 함량에 비례하여 균사 생장이 높게 나타난 것은 아니므로 균주마다 적정 가용 함량이 있는 것으로 보인다. 이러한 예는 송이를 포함한 18개 균주에서 볼 수 있는데, PDA보다 단당류 함량이 2배나 더 높은 SDA에서 균사 생장은 비슷하거나 오히려 낮게 나타났다. 이는 PDA보다 SDA 내에 단당류가 고농도로 존재하기 때문에 시험균의 삼투압이 증가되고 탄소원 이용률이 상대적으로 PDA에서보다 낮아져 균사 생장이 저해된 것으로 보인다. 대부분의 외생균근균들은 순수배양 시 주로 glucose나 mannose와 같은 단당류가 포함된 배지에서 잘 자라기는 하지만(Jackson and Mason, 1984), 이와 같은 저분자 물질을 배지에 고농도로 첨가하게 되면 삼투압 증가로 인해 균의 생장이 저해되는 것으로 보고하였다(Ohta, 1997). 고체배지와 액체배지는 각

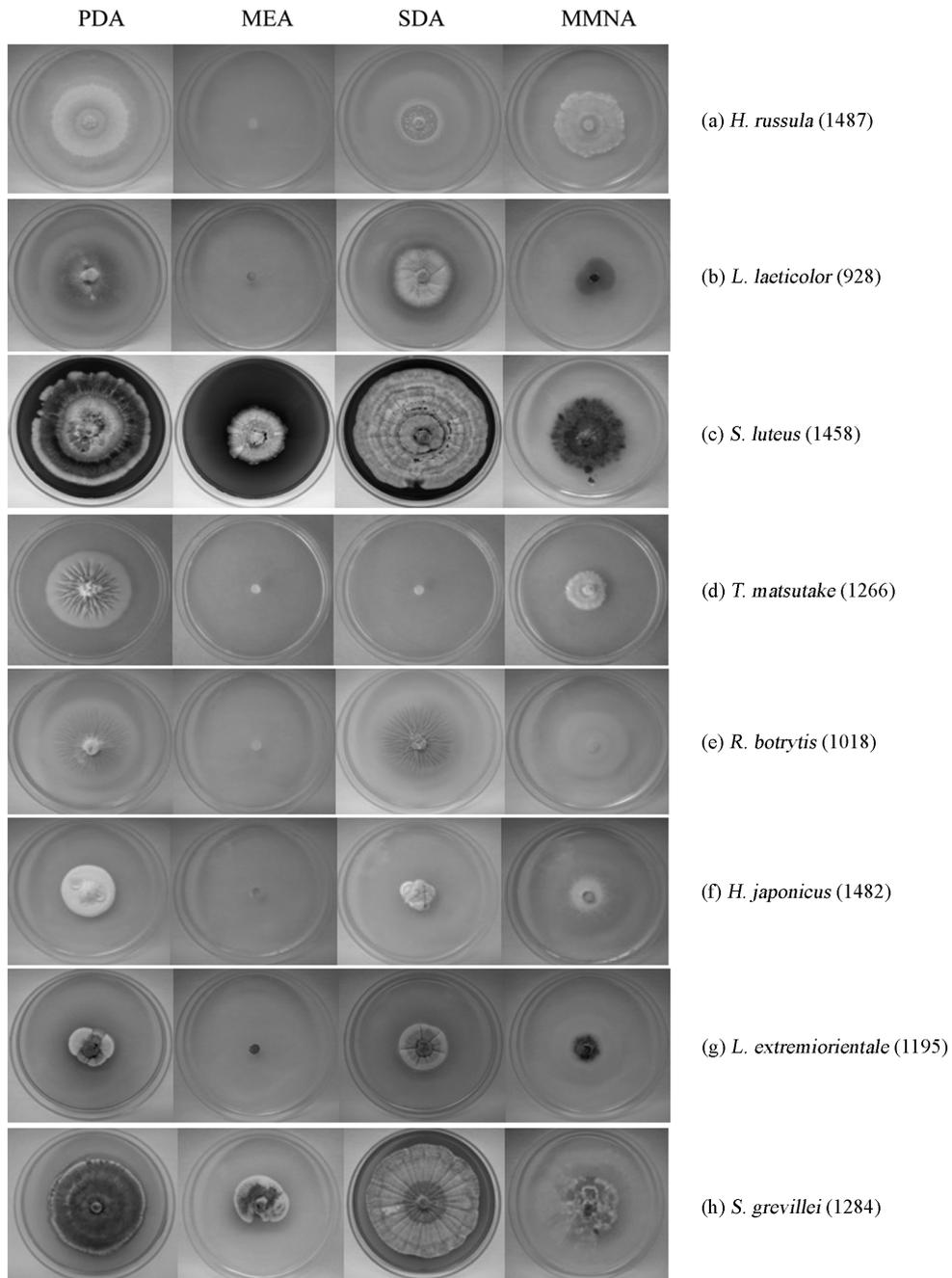
**Table 2.** Mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on four different media

Fungi (KFRI strain No.)	Mycelial growth (mm/60 days)			
	PDA	MEA	SDA	MMNA
<i>H. russula</i> (818)	44.3±1.7	0.0±0.0	41.7±1.0	43.5±1.1
<i>H. russula</i> (1022)	55.4±1.7	0.0±0.0	13.3±3.3	34.0±2.3
<i>H. russula</i> (1487)	56.9±4.8	0.0±0.0	43.0±6.7	34.3±1.4
<i>L. laeticolor</i> (928)	55.7±2.7	0.0±0.0	41.3±1.1	36.7±2.7
<i>L. laeticolor</i> (929)	70.8±7.1	0.0±0.0	8.4±0.4	22.2±0.9
<i>S. luteus</i> (1232)	58.5±1.5	16.7±0.9	60.9±1.4	54.4±1.0
<i>S. luteus</i> (1244)	61.5±1.4	13.0±0.2	62.7±4.1	59.4±1.6
<i>S. luteus</i> (1246)	67.4±2.0	51.4±2.0	51.1±2.9	68.3±1.8
<i>S. luteus</i> (1458)	66.6±2.8	31.4±2.3	73.7±1.2	56.6±1.2
<i>T. matsutake</i> (1013)	43.2±1.0	0.0±0.0	23.6±0.5	21.9±0.7
<i>T. matsutake</i> (1014)	39.9±0.5	0.0±0.0	14.2±2.3	16.5±0.4
<i>T. matsutake</i> (1015)	41.0±2.1	0.0±0.0	25.5±2.4	24.1±1.1
<i>T. matsutake</i> (1017)	49.2±4.0	0.0±0.0	0.0±0.0	24.8±1.0
<i>T. matsutake</i> (1265)	46.9±1.2	0.0±0.0	0.0±0.0	16.9±0.7
<i>T. matsutake</i> (1266)	43.7±5.4	0.0±0.0	0.0±0.0	17.9±0.5
<i>T. matsutake</i> (1681)	43.9±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	22.8±0.7
<i>R. botrytis</i> (1018)	59.0±2.2	0.0±0.0	57.3±1.1	40.6±1.7
<i>R. botrytis</i> (1680)	13.5±3.6	0.0±0.0	15.4±0.6	24.7±1.4
<i>H. japonicus</i> (1225)	10.9±0.4	0.0±0.0	6.9±2.5	38.0±0.9
<i>H. japonicus</i> (1482)	29.1±1.3	0.0±0.0	14.0±1.2	28.5±5.9
<i>L. extremiorientale</i> (1194)	20.3±4.5	0.0±0.0	20.8±2.2	46.6±0.0
<i>L. extremiorientale</i> (1195)	17.0±1.7	0.0±0.0	23.9±1.3	34.7±2.6
<i>S. grevillei</i> (1123)	58.5±0.7	8.9±0.2	57.2±1.8	50.1±3.1
<i>S. grevillei</i> (1124)	46.5±1.7	17.5±3.7	48.9±5.2	31.7±1.7
<i>S. grevillei</i> (1125)	52.8±2.9	61.0±1.2	55.3±2.6	41.8±1.5
<i>S. grevillei</i> (1233)	29.8±3.8	7.4±1.1	28.8±3.3	25.6±2.1
<i>S. grevillei</i> (1284)	60.8±3.8	14.1±3.2	65.8±0.7	66.5±3.22

<sup>1)</sup>Refer to Materials and Methods for the abbreviations of the media.

<sup>2)</sup>The bottom size of agar plate containing the solid agar medium is 85 mm in diameter.

<sup>3)</sup>Values (except for the size of inoculants, 6 mm in diameter) are mean±SD of three replicates



**Fig. 1.** Mycelial growth of ectomycorrhizal fungi grown on four different media (PDA, MEA, SDA and MMNA) at 25°C for 60 days.

배지 내 당당류 함량에 따라 삼투압이 다소 차이가 있을 것으로 예상되나, 배지의 성상을 배제하고 당당류 함량만을 기준으로 삼투압을 계산하면 일부 균주의 생장이 PDA에서보다 SDA에서 낮게 나타난 이유에 대한 설명이 가능하다. Kusuda(2008) 등은 2% glucose 용액 내 삼투압은 274 osm/L 정도가 되며, 약 300-500 osm/L의 농도에서는 송이의 균사 생장이 억제된다고 보고하였다. 이와 관련하여 비록 당당류가 함유된 배지의 성상은 다르지만 본 연구의 시험배지로 선택한 SDA 고체배지의 dextrose 함량

(40 g/L)을 기준으로 배지 내 삼투압 이론치를 산출하면 548 osm/L 정도가 된다. 따라서 이렇게 높은 배지 내 삼투압은 일부 송이 시험 균주의 균사 생장을 억제하기에 충분한 요인이 될 수 있다.

Laiho(1970)는 1925년 Melin과 1948년 Mikola가 각각 발표한 연구 내용을 제시하면서, 배지 내 탄소원으로 포도당이나 기타 당당류 또는 전분만을 단독으로 제공했을 때보다 포도당과 전분이 동량으로 구성된 배지에서 외생 균근균인 주름우단버섯(*Paxillus involutus*)의 균사 생장이

현저히 증가함을 보여주었다. Laiho(1970)의 보고에 따르면, Melin은 단당류 특히, 포도당이 외생균근균의 탄소원으로 가장 좋으며 고분자화된 전분 또는 셀룰로오스는 거의 이용할 수 없다고 한 반면, Mikola는 일부 외생균근균들이 탄소원으로 전분을 이용할 수 있다고 하였다. 후자와 같이 최근 연구에서도 향버섯(*Sarcodon aspratus*)이나 송이와 같이 상업적으로 중요한 외생균근균들이 포도당뿐만 아니라 전분을 이용하여 균사 생장을 하는 것으로 보고 되었다(Kusuda *et al.*, 2007; Ohta, 1997). 다당류 중 전분과 동일한 homopolycan 계열의 dextrin 또한 송이의 균사 생장에 적합한 탄소원인 것으로 보고되었는데(Kim *et al.*, 2005), 본 연구에 사용한 송이 7개 균주(KFRI 1013, 1014, 1015, 1017, 1265, 1266, 1681) 모두 dextrin이 함유된 MEA 배지에서는 균사가 생장하지 않았다. 복합 탄수화물 또한 균류의 탄소원으로 배지에 첨가할 수 있는데, Harvey(1991)는 감자나 전분과 같은 복합 탄수화물에 소량(0.1 g/L)의 D-glucose를 starter로 첨가하게 되면, cellulase나 amylase와 같은 균의

적응효소(adaptive enzymes) 생산이 자극되어 더 복잡한 탄수화물을 가수분해시킴으로써 결국 탄소원 이용률을 크게 강화할 수 있다고 하였다(Jackson and Mason, 1984). 한 예로, 송이속의 몇몇 균류들은 그들의 생장 배지에 소량의 포도당만 starter로 첨가해주면 전분이나 인눌린(inulin)과 같은 다당류가 함유된 배지에서도 자라는 것으로 보고 하였다(Norkrans, 1950). 시험 균주의 78%(21/27 균주)가 4종류의 배지 중 PDA에서 우수한 균사 생장을 나타낸 것은 배양 초기와 후기에 균이 각각 이용할 수 있는 단당류(glucose)와 다당류(starch)가 한 배지 내에 공존하고, SDA에서와 같이 배지 내에 삼투압을 증가시킬 만큼 과도한 양의 다당류가 포함되어 있지 않았기 때문인 것으로 생각된다.

**외생균근균의 기본 생장온도**

온도는 생물체의 생장과 생존에 영향을 미치는 중요한 요인 중의 하나이다. 특히 상업적으로 활용가치가 있을 것으로 기대되는 외생균근균들의 실내 보존과 증식을 위

**Table 3.** Influence of temperature on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi

Fungi (KFRI strain No.)	Mycelial growth (mm/60 days)					Cardinal temperature (°C)		
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	Minimum	Optimum	Maximum
<i>H. russula</i> (818)	14.6±1.0	27.9±3.0	42.0±2.6	42.2±0.9	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>H. russula</i> (1022)	19.3±0.9	36.6±1.2	52.6±3.4	66.3±3.2	0.0±0.0	10	25	25
<i>H. russula</i> (1487)	24.5±0.7	36.1±1.0	53.2±4.7	57.4±4.7	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>L. laeticolor</i> (928)	10.3±0.8	24.9±1.8	45.6±2.0	59.2±1.4	0.0±0.0	10	25	25
<i>L. laeticolor</i> (929)	8.0±0.6	33.4±1.8	74.6±3.8	55.5±2.6	0.0±0.0	10	20	25
<i>S. luteus</i> (1232)	4.9±2.4	44.6±2.0	60.0±1.6	64.1±1.6	8.2±0.5	10	25	30
<i>S. luteus</i> (1244)	10.2±1.9	35.5±3.5	57.4±2.0	65.1±2.4	0.0±0.0	10	25	25
<i>S. luteus</i> (1246)	24.6±1.3	40.6±0.2	63.8±3.7	64.2±1.1	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>S. luteus</i> (1458)	18.7±1.4	57.1±2.4	72.3±1.2	62.9±2.4	30.5±1.9	10	20	30
<i>T. matsutake</i> (1013)	13.7±0.3	19.8±1.8	37.5±0.8	38.0±2.0	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>T. matsutake</i> (1014)	6.0±0.9	9.8±0.8	10.9±0.9	39.8±1.8	0.0±0.0	10	25	25
<i>T. matsutake</i> (1015)	6.2±2.2	8.0±1.7	21.8±2.6	39.7±13.4	0.0±0.0	10	25	25
<i>T. matsutake</i> (1017)	8.0±0.6	19.7±1.7	35.1±5.8	42.8±3.7	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>T. matsutake</i> (1265)	7.4±2.0	19.2±3.8	31.1±5.3	45.1±1.6	0.0±0.0	10	25	25
<i>T. matsutake</i> (1266)	7.9±3.4	22.0±0.7	39.9±3.0	42.6±3.6	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>T. matsutake</i> (1681)	10.8±1.6	25.0±1.3	36.4±1.8	44.2±2.3	0.0±0.0	10	25	25
<i>R. botrytis</i> (1018)	14.2±1.0	31.1±1.4	38.3±3.0	49.0±2.2	0.0±0.0	10	25	25
<i>R. botrytis</i> (1680)	4.4±0.4	11.7±1.4	19.2±2.8	18.5±1.0	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>H. japonicus</i> (1225)	0.0±0.0	2.6±0.8	11.3±1.2	13.5±1.6	0.0±0.0	15	20-25	25
<i>H. japonicus</i> (1482)	0.0±0.0	2.5±0.4	21.9± 2.5	32.6±3.3	0.0±0.0	15	25	25
<i>L. extremiorientale</i> (1194)	0.0±0.0	4.0±1.0	15.4±1.4	23.3±2.6	0.0±0.0	15	25	25
<i>L. extremiorientale</i> (1195)	0.0±0.0	5.1±0.8	13.1±1.7	24.6±1.1	4.3±0.3	15	25	30
<i>S. grevillei</i> (1123)	11.8±1.1	28.5±1.1	48.8±3.2	58.7±0.2	0.0±0.0	10	25	25
<i>S. grevillei</i> (1124)	9.9±0.4	31.2±1.2	45.3±5.6	49.2±0.6	19.1±0.4	10	20-25	30
<i>S. grevillei</i> (1125)	7.7±0.4	26.1±2.9	53.5±2.4	57.3±1.3	0.0±0.0	10	20-25	25
<i>S. grevillei</i> (1233)	11.8±2.1	26.7±1.1	39.3±6.3	35.3±0.5	0.0± 0.0	10	20-25	25
<i>S. grevillei</i> (1284)	35.9±1.2	66.5±4.4	71.5±1.1	66.1±2.5	0.0±0.0	10	15-25	25

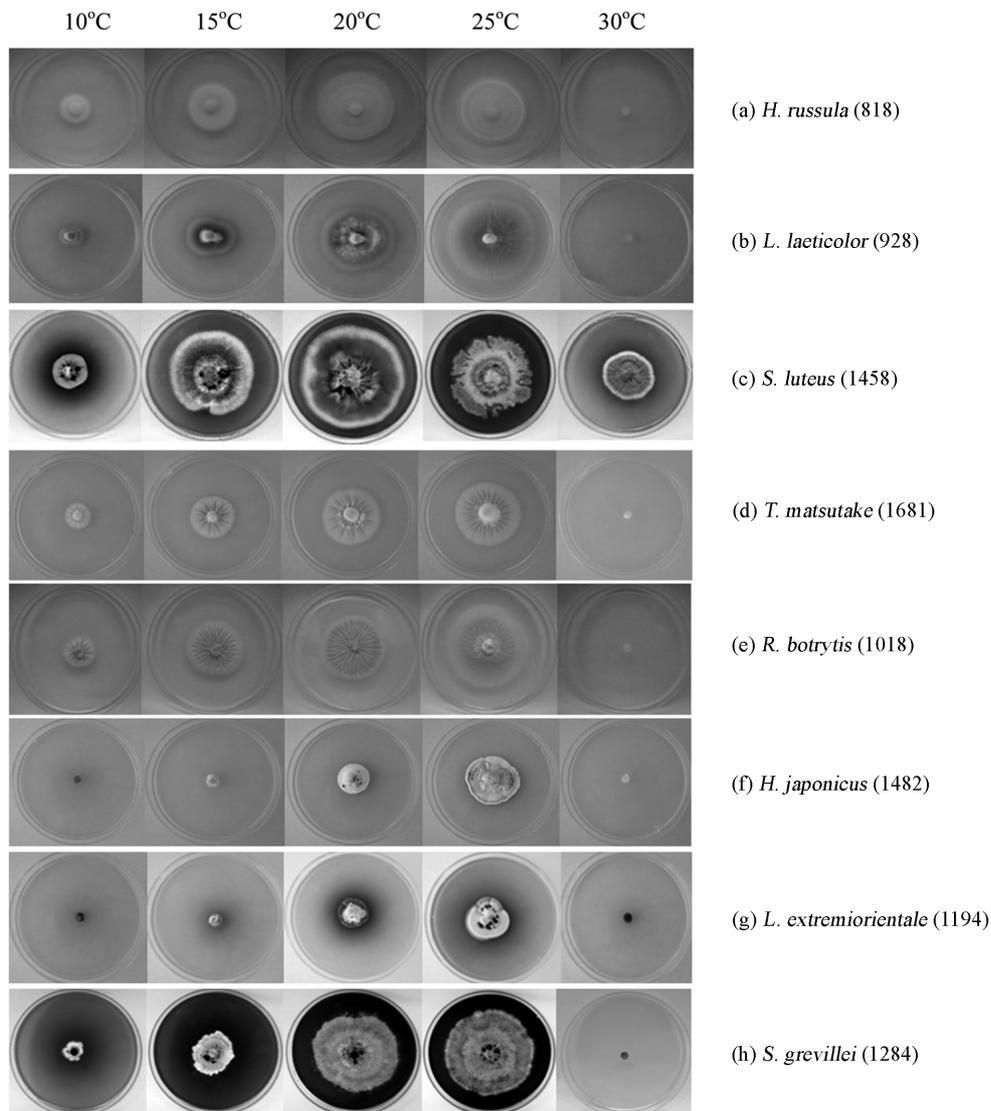
<sup>1)</sup>All strains were cultured on PDA plates (pH 6.0, 85 mm in diameter) at 25°C.

<sup>2)</sup>Values (except for the size of inoculants, 6 mm in diameter) are mean±SD of three replicates.

해서는 온도와 같은 물리적인 환경인자에 반응하는 각 균주의 생리적 특성을 조사할 필요가 있어 일반적으로 균류 배양에 널리 사용되고 있는 PDA 배지를 이용하여 60일 배양 후 배양 온도(10, 15, 20, 25, 30°C) 변화에 따른 균사 성장력을 측정하고, 순수배양 시 그들이 성장할 수 기본 성장온도를 정하였다. 여기서 '기본 성장온도(cardinal temperature)'란 생물체가 성장할 수 있는 최저온도(minimum temperature), 최적온도(optimum temperature) 및 최고온도(maximum temperature)를 의미하며, 이는 미생물의 종류에 따라 각각 다를 수 있으며, 일반적으로 미생물이 서식했던 곳의 평균 온도 범위를 반영하는 경우가 많다 (Madigan *et al.*, 2009). Harvey(1991)는 균근균(mycorrhizal fungi)이 토양 미생물이기 때문에 이들의 최대 성장온도가 30°C 근방이거나 그 이하일 거라 예측하였다. 실제, 본 시험 균주들을 대상으로 최대 성장온도를 조사한 결과,

Harvey의 예측과 일치하는 균사 성장 특성을 나타냈다.

다색벚꽃버섯을 포함한 대부분의 시험 균주들은 20~25°C에서 균총의 크기가 가장 크게 나타난 반면, 10과 30°C에서는 균총의 크기가 작아 균사 생장이 활발하지 못했다(Table 3과 Fig. 2). 또한 대부분의 균주들은 낮은 (10°C)보다 고온(30°C)에서 균사 생장이 저조하였다. 10°C에서 전혀 성장하지 못한 균주는 총시험 균주의 15%(4/27균주)였으나, 30°C에서 전혀 성장하지 못하는 균주는 총시험 균주의 85%(23/27균주)였다. 기본성장 온도 범위가 가장 좁은 균주는 일본연지그물버섯(KFRI 1194)과 접시겉겉이그물버섯(KFRI 1458)으로, 이들은 극한 배양 온도 조건(10과 30°C 모두)에서 전혀 성장하지 못했다. 비단그물버섯(KFRI 1458)을 포함한 3개 균주는 30°C 고온에서도 균사가 성장하기는 하였으나, 균사 성장력은 타 온도 조건에서보다 약했다. 이와 같이 대부분의 시험 균



**Fig. 2.** Mycelial growth of ectomycorrhizal fungi grown on PDA plates at different temperature (10, 15, 20, 25 and 30°C) for 60 days.

주들은 저온보다 고온에 특히 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 배양 중 30°C 고온에서는 때때로 배지가 건조해져 갈라지는 현상을 관찰할 수 있었는데, 이는 세포가 물질대사에 이용할 수 있는 배지 내 가용수분이 고열로 인해 고갈될 뿐만 아니라 세포 내 효소 활성의 장애로 균사 생장에 필요한 구성성분들이 제대로 합성되지 않았기 때문인 것으로 보인다.

일반적으로 부후성이 강한 균류들은 최적 온도가 25°C 전후이며, 인공배지에서 대부분 생장이 매우 느린 외생균근균 또한 18~27°C에서 최적 생장을 나타내며, 5°C 이하와 35°C 이상에서는 생장이 지연되거나 생장이 멈추는 경향이 있는 것으로 보고되었다(Jackson and Mason, 1984). Table 4에서와 같이 27개 모든 균주는 25°C에서 최적 균사 생장을 나타내 부후성 균류와 생장온도가 크게 다르지 않았다. 최적 생장온도는 또한 같은 종 내에서도 균주 간 차이가 있을 수 있는데, 한 예로 *Tricholoma pessundatum* 의 서로 다른 두 균주의 최적 생장온도는 각각 20°C와

25~30°C인 것으로 나타났다(Dennis, 1985). 이와 동일 속인 송이의 경우에도 KFRI 1013, 1017, 1266는 20~25°C에서, 나머지 4개 균주는 25°C에서 최적 생장온도를 나타내 균주 간에도 기본 생장온도가 차이가 남을 알 수 있었다. 시험균 중 3균주(KFRI 1022, 929, 1018)는 동일한 배양 조건(PDA, 25°C, 60일)임에도 불구하고 균사 생장에 있어 10 mm 이상의 큰 차이를 보였는데, 두 실험을 동시에 수행한 것이 아니기 때문에 각 실험에 사용한 접종원의 계대배양 횟수나 균 보존 시 균주 활력이 동일하지 않았기 때문인 것으로 보인다. 이에 대해서는 차후 이러한 관점에서 실험을 설계하여 그 원인을 명확히 규명할 필요가 있다.

#### 액체배지의 pH 변화에 따른 외생균근균의 균사생장량

미생물의 생장에 영향을 끼치는 또 다른 중요한 인자 중의 하나는 생장 배지의 pH로, 특히 액체 배양 시 외생균근균의 최적 pH는 균종에 따라 매우 다르긴 하지만, 대

**Table 4.** Mycelial growth of ectomycorrhizal fungi in liquid media with different initial pH values

Fungi (KFRI strain No.)	Dry weight of mycelium (mg/60 days)				
	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>H. russula</i> (818)	59.6±16.1	31.1±13.4	34.4±6.8	60.4±10.7	42.5±7.0
<i>H. russula</i> (1022)	81.7±0.6	115.9±2.1	118.1±9.6	90.2±2.1	75.4±1.8
<i>H. russula</i> (1487)	84.5±5.7	102.7±11.6	92.9±7.4	92.4±10.6	76.3±1.8
<i>L. laeticolor</i> (928)	53.2±2.7	57.7±1.9	54.8±1.7	48.5±0.2	50.4±3.7
<i>L. laeticolor</i> (929)	59.9±0.1	77.5±3.3	71.6±2.2	76.2±9.0	70.9±12.2
<i>S. luteus</i> (1232)	93.8±0.9	103.5±5.5	87.2±4.2	80.6±4.4	93.2±2.6
<i>S. luteus</i> (1244)	103.4±5.3	92.5±2.1	83.1±9.7	91.6±3.5	94.4±1.6
<i>S. luteus</i> (1246)	165.1±1.6	143.1±5.0	137.9±5.6	134.4±2.6	138.2±5.9
<i>S. luteus</i> (1458)	146.3±5.2	110.4±2.6	99.8±2.4	98.5±6.4	113.0±5.7
<i>T. matsutake</i> (1013)	149.3±0.7	135.4±0.4	132.2±5.4	134.5±2.3	109.5±1.6
<i>T. matsutake</i> (1014)	127.4±8.1	120.0±2.2	107.1±2.6	106.3±5.7	102.0±1.9
<i>T. matsutake</i> (1015)	136.4±10.6	152.7±5.1	121.8±3.0	110.4±4.2	89.7±7.1
<i>T. matsutake</i> (1017)	110.1±13.4	53.3±10.4	62.2±12.5	69.1±11.4	94.8±7.4
<i>T. matsutake</i> (1265)	99.6±8.1	142.9±18.9	102.6±3.5	107.4±5.6	97.5±0.5
<i>T. matsutake</i> (1266)	87.0±5.9	87.2±4.7	97.5±0.7	90.3±5.0	64.7±1.0
<i>T. matsutake</i> (1681)	124.4±4.3	191.7±7.6	144.2±21.8	128.7±6.7	112.8±9.3
<i>R. botrytis</i> (1018)	115.9±0.3	95.6±1.3	99.7±7.0	87.6±0.5	85.9±0.8
<i>R. botrytis</i> (1680)	105.4±6.4	119.7±28.2	100.6±13.8	83.8±11.8	77.6±3.7
<i>H. japonicus</i> (1225)	60.1±16.6	61.5±9.3	104.4±6.9	60.1±1.3	58.3±2.4
<i>H. japonicus</i> (1482)	56.9±1.8	50.8±1.1	63.2±4.2	54.0±0.3	51.8±2.3
<i>L. extremiorientale</i> (1194)	203.2±4.0	108.3±6.2	93.4±1.4	110.6±5.1	79.8±0.5
<i>L. extremiorientale</i> (1195)	61.1±6.8	97.5±3.4	72.8±3.7	75.0±1.0	62.3±0.2
<i>S. grevillei</i> (1123)	112.2±2.8	118.2±1.3	113.7±3.4	102.6±6.9	108.4±2.1
<i>S. grevillei</i> (1124)	108.3±6.5	103.4±6.7	112.4±3.1	76.2±3.3	64.7±10.4
<i>S. grevillei</i> (1125)	115.4±7.7	124.6±7.2	93.7±2.9	96.9±2.5	121.5±1.4
<i>S. grevillei</i> (1233)	134.9±5.7	99.1±3.6	80.0±3.2	76.5±1.7	84.0±12.4
<i>S. grevillei</i> (1284)	119.8±4.4	114.4±5.3	116.5±2.0	106.6±7.8	113.6±1.3

<sup>1)</sup>Strains were grown in liquid media (PDB, potato dextrose broth) adjusted to various pH values for 60 days at 25°C.

<sup>2)</sup>Values are mean±SD of three replicates.

부분 산성 pH에서 잘 자라는 경향이 있다(Harvey, 1991). 또한 액체배지는 아니나 MMNA 상에서 비단그물버섯을 포함한 일부 외생균근균들의 최적 성장 pH가 4-6 범위이며(Dennis, 1985), 많은 부후균들이 pH 7-8에서 잘 자라는 반면, 외생균근균들은 pH 5-6에서 잘 자라는 것으로 보고 되었다(Yamanaka, 2003). Madigan 등(2009)은 자연 환경의 pH가 4-9 범위이며, 그 범위를 벗어난 환경에서 성장하는 미생물의 종류가 많지 않고, 특히 균류는 세균보다 내산성(acid tolerance)이 큰 경향이 있어 많은 균류들은 pH 5 이하에서 최적 성장을 하는 것으로 알려져 있다. Jackson과 Mason(1984)도 외생균근균을 배양할 때에 가능한 한 많은 균류들의 성장에 적합한 초기 pH 5.0 근처의 인공 배지를 사용하는 것이 현명하다고 제안하였다. 중성이나 알칼리성 환경에서 자라는 일부 균종이 있기는 하지만, 대부분의 외생균근균이 산성 환경에 근접하여 자라기 때문에 많은 이들은 외생균근균을 호산성(acidophilic)으로 보고 있다(Sánchez *et al.*, 2001). 이와 같은 점들을 고려하여 배지 내 초기 pH의 변화에 따른 외생균근균의 균사 성장량을 산성 환경에 비중을 둔 pH 4.0-8.0 범위로 설정하여 조사하였다.

5종류의 PDB pH(4,5,6,7,8)에 대한 균사 성장 특성을 조사한 결과, 대부분의 균주들은 pH 4, 5에서 최대 균체량을 나타내어 중성(pH 7.0)이나 알칼리성(pH 8.0) 환경에서 보다 산성 pH에서 더 잘 성장하는 것으로 나타나 일반적인 진균류의 성장과 유사한 경향을 나타냈다(Table 4

와 Fig. 2). 그러나 6개 균주(KFRI 1487, 928, 929, 1266, 1680, 1284)는 다른 균주들에 비해 PDB 내 pH 변화에 따른 균체량의 차이가 크게 나타나지 않았다. 60일 배양 후 접시결핵이그물버섯(KFRI 1194)는 pH4.0에서 최대 균체량이 203.2±4.0 mg/flask에 달해 다른 pH 단위보다 2배 더 많이 균이 성장하여 이들 균사 성장에 최적 pH임을 알 수 있었다. 이와 유사하게 일본연지그물버섯(KFRI 1225) 역시 다른 pH에서와는 달리 pH 6.0에서 균체량이 현저하게 증가하는 특성을 나타냈다. 송이 7개 균주에 대한 균체량을 비교한 결과, 소나무림에서 채집한 송이 균주들(KFRI 1013, 1014, 1015, 1017, 1265, 1681)의 최적 성장 pH는 4, 5였으나, 리기다소나무림에서 채집한 KFRI 1266의 경우에는 pH 4-7 범위로 균체량에 유의한 차이가 없어 앞선 소나무림에서 채집한 균주들과는 균사 성장 특성이 다르게 나타났다.

여기서 언급하는 최적 성장 pH는 외생균근균의 성장에 필요한 멸균 전PDB 배지의 pH를 의미하며, 세포질이 아닌 세포 외부의 배양 환경을 의미한다. 또한 이와 같이 회분식 배양(batch culture)을 하는 경우에는 균의 물질대사로 인해 배지 내 pH가 변할 수 있으며(Madigan *et al.*, 2009), 특히 수소이온농도가 다른 세포외 제한된 환경과 폐쇄된 공간에서는 균이 성장하거나 생존하는 데에 많은 영향을 받을 것으로 생각된다. 따라서 60일 배양 후 외생균근균의 균체량 변화의 원인은 액체배지 내 final pH의 변화를 통해 설명이 가능할 것으로 보여 송이를 포함한

**Table 5.** The final pH of the liquid medium (PDB) after 60 days of culture in some strains of ectomycorrhizal fungi

Fungi (KFRI strain No.)	Initial pH				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
<i>H. russula</i> (1022)	4.1±0.0	4.9±0.2*	5.1±0.1*	5.3±0.0	5.6±0.0
<i>S. luteus</i> (1232)	6.2±0.4	7.1±0.2*	6.8±0.1	6.4±0.0	6.3±0.2
<i>S. luteus</i> (1244)	5.7±0.7*	7.1±0.2	6.7±0.3	6.4±0.1	6.2±0.2
<i>S. luteus</i> (1246)	6.3±0.1*	7.3±0.3	7.2±0.1	7.4±0.1	6.5±0.3
<i>T. matsutake</i> (1015)	5.9±0.2	6.8±0.1*	6.3±0.3	6.2±0.3	6.3±0.0
<i>T. matsutake</i> (1017)	5.4±0.4*	5.8±0.4	6.0±0.2	5.9±0.4	6.0±0.2
<i>T. matsutake</i> (1266)	4.4±0.2	5.4±0.3	5.9±0.1*	6.2±0.0	5.7±0.0
<i>R. botrytis</i> (1680)	4.1±0.0*	5.1±0.1*	5.8±0.0*	6.1±0.0	6.2±0.0
<i>H. japonicus</i> (1225)	4.3±0.1	5.4±0.2	5.8±0.0*	6.0±0.0	6.2±0.1
<i>H. japonicus</i> (1482)	4.2±0.2	5.0±0.0	5.9±0.2*	6.0±0.1	6.3±0.1
<i>L. extremiorientale</i> (1194)	4.0±0.1*	4.9±0.4	5.9±0.4	6.2±0.1	6.0±0.2
<i>L. extremiorientale</i> (1195)	4.2±0.1	4.5±0.3*	6.0±0.1	6.5±0.1	6.6±0.0
<i>S. grevillei</i> (1123)	5.9±0.1	6.4±0.1*	6.3±0.1	6.3±0.0	6.4±0.0
<i>S. grevillei</i> (1233)	4.7±0.4*	5.2±0.0	5.8±0.1	5.8±0.1	6.6±0.1

<sup>1)</sup>Asterisk (\*) indicates the optimum pH of PDB for the mycelial growth of test strain.

<sup>2)</sup>Values are mean ± SD of three replicates.

일부 시험균주의 final pH를 조사하였다. Table 5에서의 결과와 같이 PDB 배지 내 initial pH값이 낮은 경우(pH 4-5)에는 접시결결이그물버섯(KFRI 1195)를 제외하고 대부분의 균주에서 final pH값이 상승하였다. 또한 initial pH값이 6.0인 경우에는 다색벚꽃버섯(KFRI 1022)를 제외하곤 대부분 final pH값이 그대로 유지되거나 약간 상승하였다. 배지 내 initial pH값이 7.0 또는 8.0인 경우에는 배양 후 final pH값이 감소하였다. 또한 균의 최적 생장은 initial pH 7-8보다 pH 4-6 범위에서 나타나 final pH가 상승된 배지에서 균의 생장이 높은 것을 알 수 있었다.

Sánchez 등(2001)은 이론적으로 균의 생장이 더 클수록 배지 내로 많은 양의 유기산이 방출되어 배지의 final pH값이 감소되는 것으로 알려져 있으나, 토양 pH 7.5 근처의 지중해 산림에 발생하는 *Suillus*, *Tricholoma*, *Lactarius* 속의 일부 균주들을 대상으로 한 그들의 연구에서는 pH 감소와 균체량 생산과의 상관 관계를 발견할 수 없었고, 균

이 유기산을 생산하거나 이온을 선택적으로 흡수함으로써 initial pH와 final pH의 차이가 생길 수도 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 PDB 배지의 final pH값이 감소된 것과 균체량 생산과의 비례적인 상관 관계는 찾을 수 없었다. 그러나, initial pH가 산성인 경우에 final pH값이 상승하거나 initial pH가 중성이나 약알칼리성인 경우에 final pH값이 감소하는 일부 외생균근균의 성장 특성에 대해서는 명확한 해석이 어려우나, 아마도 자신의 대사 활성에 필요한 각종 효소나 고분자가 세포의 환경에 의해 영향을 받지 않도록 세포 밖, 즉 PDB 배지 쪽으로 수소이온 농도에 변화를 줄 수 있는 물질을 분비함으로써 세포질 내 항산성을 유지하려는 것으로 생각된다.

### 외생균근균의 섬유소 분해 활성

셀룰라아제(cellulase)는 섬유소(cellulose)를 당(sugar)으로 가수분해하는 반응을 촉매하는 효소(EC 3.2.1.4)로 (Kasana *et al.*, 2008), 최근에는 생명공학 연구나 펄프 및

**Table 6.** CM-cellulase activity of ectomycorrhizal fungi on carboxymethylcellulose (CMC) agar plate with different pH

Fungi (KFRI strain No.)	CM-cellulase activity (mm) <sup>3)</sup>			
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>H. russula</i> (818)	31.6±0.6	29.7±0.4	25.1±0.2	22.6±0.2
<i>H. russula</i> (1022)	19.8±0.4	20.5±0.7	18.4±0.1	14.8±0.1
<i>H. russula</i> (1487)	27.9±0.5	24.4±0.3	19.7±0.1	18.9±0.3
<i>L. laeticolor</i> (928)	19.3±0.0	17.8±0.1	16.8±0.0	12.4±0.0
<i>L. laeticolor</i> (929)	24.1±0.9	21.5±0.4	17.4±0.4	9.4±0.5
<i>S. luteus</i> (1232)	10.3±0.5	9.1±0.8	8.0±0.6	5.3±0.7
<i>S. luteus</i> (1244)	11.4±0.2	10.0±0.3	6.0±0.3	5.2±0.1
<i>S. luteus</i> (1246)	21.8±0.4	22.1±0.4	17.7±0.0	14.4±0.8
<i>S. luteus</i> (1458)	15.4±0.8	14.3±0.1	13.6±0.2	10.5±0.2
<i>T. matsutake</i> (1013)	32.5±1.0	25.7±0.5	18.4±0.4	12.4±0.4
<i>T. matsutake</i> (1014)	28.6±1.0	25.5±0.7	15.6±0.4	11.4±0.3
<i>T. matsutake</i> (1015)	29.6±0.4	24.1±0.5	17.3±0.1	11.6±0.1
<i>T. matsutake</i> (1017)	11.3±0.1	10.6±0.4	4.5±0.3	0.0±0.0
<i>T. matsutake</i> (1265)	37.9±0.5	32.3±1.0	15.9±1.1	12.6±0.7
<i>T. matsutake</i> (1266)	40.0±1.0	37.4±0.6	22.7±0.6	16.7±0.3
<i>T. matsutake</i> (1681)	32.0±0.6	27.4±0.3	19.1±0.1	14.9±0.0
<i>R. botrytis</i> (1018)	17.8±0.1	14.5±0.4	10.0±0.1	4.3±0.2
<i>R. botrytis</i> (1680)	9.2±0.2	6.5±0.1	2.7±0.5	0.0±0.0
<i>H. japonicus</i> (1225)	12.3±0.1	12.0±0.1	8.8±0.1	4.3±0.5
<i>H. japonicus</i> (1482)	10.6±1.1	11.4±0.2	7.9±0.0	1.4±0.3
<i>L. extremiorientale</i> (1194)	9.0±0.4	9.1±0.9	7.2±0.1	0.0±0.0
<i>L. extremiorientale</i> (1195)	2.9±0.0	1.0±0.1	1.3±0.1	1.0±0.1
<i>S. grevillei</i> (1123)	23.0±0.2	22.5±0.2	19.8±0.1	16.4±0.0
<i>S. grevillei</i> (1124)	13.4±0.1	12.8±1.3	9.8±0.2	7.4±0.0
<i>S. grevillei</i> (1125)	19.5±0.1	19.1±0.1	17.6±0.2	14.0±0.4
<i>S. grevillei</i> (1233)	19.5±0.4	20.8±0.4	18.0±0.1	12.4±0.1
<i>S. grevillei</i> (1284)	23.3±0.3	23.1±0.6	17.1±0.8	16.2±0.5

<sup>1)</sup>Strains were incubated on solid agar media containing 0.2% (w/v) CMC with different pH (pH 5-8) for 8 days at 25°C.

<sup>2)</sup>The bottom size of CMC agar plate is 55 mm in diameter.

<sup>3)</sup>The CM-cellulase activity was determined by the size (mm in diameter) of cellulolytic zone only.

<sup>4)</sup>Values are mean±SD of three replicates.

제지산업, 동물사료 생산, 맥주와 포도주 제조 등과 같이 다양한 산업 분야에서 그 이용 가치가 증대되고 있으며 (Bhat, 2000), 비교적 높은 가격으로 거래되는 효소로, 산림 내 cellulase 생산 균주의 발굴은 상업적인 측면에서 활용 가치가 있을 것으로 생각된다. 이 효소는 특히 갈색 부후균(brown-rot fungi)이나 백색부후균(white-rot fungi)을 포함한 많은 균류들에 의해 생산되는데, 최근에는 *Trichoderma*나 *Aspergillus* 속과 같은 진균류에 의해 대부분의 상업적인 cellulase가 생산되며, 각종 섬유나 식품 산업, 에너지 생산 공정 개선 등 그 용도가 폭넓게 확대되고 있다(Zhang *et al.*, 2006). Cellulase를 생산하는 균주 범위 또한 확대되고 있는데, 부후균 뿐만 아니라 산림에서 서식하는 외생균근균의 일부도 이와 같은 활성을 가져, Terashita 등(1995)은 특히 송이 7개 균주가 비교적 높은 carboxymethyl cellulase(CM-cellulase) 활성을 나타냄을 보고하였다. 이와 같은 결과는 자연계에 서식하는 갈색부후균이나 백색부후균처럼 외생균근성 균류도 인공배지에서 배양 시 부후적 특성을 나타낼 수도 있음을 의미한다. 이에 본 연구에서는 국내 산림에서 수집한 외생균근균들도 인공배지 내에서 이와 같은 CM-cellulase 활성을 나타낼 가능성이 있으리라 생각되어 그들의 섬유소 분해력을 조사하였다.

국내에서 수집한 송이 균주 중 KFRI 1017을 제외한 6개 균주 또한 pH 5.0인 CMC 배지에서 비단그물버섯, 짜리버섯, 일본연지그물버섯, 큰비단그물버섯보다 높은 CM-cellulase 활성을 나타냈다(Table 6). 시험 균주의 CM-cellulase 활성이 최대로 발현되는 CMC 배지의 pH 범위는 5-6이었으며, Fig. 3과 같이 송이 1015와 같이 pH가 증가함에 따라 효소 활성은 감소하는 경향을 나타내어 외생균근균의 CM-cellulase 활성 탐지에 적합한 CMC 배지의 pH는 5-6임을 알 수 있었다. CMC 배지(pH 5.0)에서 최대 효소 활성을 나타낸 균주는 송이 KFRI 1266(투명대의 크기;  $40.0 \pm 1.0$  mm)이었으며, 접시결결이그물버섯(KFRI 1995)은 시험 균주 중 가장 낮은 효소 활성을 나타냈다. 산림에서 특정 기주와 균근을 형성하며 살아가고 있는 외생균근균들이 이와 같이 cellulase 활성을 나타낸 것은 생태적 및 상업적인 측면에서 의미가 있다고 해석되는데, 우선 이들이 단당류 형태의 탄소원이 고갈된 인공적인 배양 환경에 놓이게 되면, cellulase를 생산하여 섬유소를 분해함으로써 저분자 형태의 당으로 전환시킬 수도 있다는 점이다. 이는 외생균근균라 하더라도 그 균에게 주어진 영양원의 종류에 따라 때로는 부후성 균류와 유사한 영양 섭취 방식을 취할 수 있음을 의미한다. 또한 균근성 균류들의 cellulase 활성이 높아 갈색부후균이나 백색부후균처럼 산업적으로 이용한 예는 거의 없으나, 일반적인 미생물 효소의 생산 공정 연구와 같이 관련 효소의 생성 기전에 관한 분자유전학적 구명이나 인공배지에서의 균사체 배양 조건을 개선하는 등 체계적이고 지속적

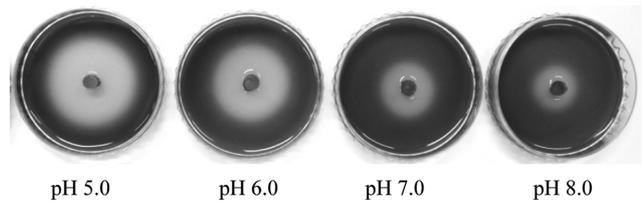


Fig. 3. CM-cellulase activity of *T. matsutake* (1015) on carboxymethylcellulose(CMC) agar plate with different pHs. The size of inoculant is 6 mm in diameter.

인 기반 연구가 수행된다면 이와 같은 균류의 상업적인 활용도 기대해 볼만한 가치가 있을 것으로 사료된다.

비록 현재 상업적인 용도로 널리 사용되는 cellulase 생산 균주가 아니고 효소 활성 조사 기간도 7일로 시험 조건에 다소 차이가 있어 절대적인 비교는 되지 않지만, 본 연구에서 제시한 것과 동일한 기질(CMC agar, pH 5.0), 온도( $25^{\circ}\text{C}$ ), 염색시약(Gram's iodine solution)을 적용하여 국내 산림에서 수집한 백색부후균과 갈색부후균 4균주를 대상으로 효소 활성을 조사한 결과(미 발표 자료), 몇몇 외생균근균 시험 균주들의 CM-cellulase 활성이 이들 부후균과 유사하게 나타남을 알 수 있었다. 상업적으로 유용하다고 판단되는 백색부후균 표고(KFRI 1311)와 치마버섯(KFRI 1423)의 CM-cellulase 활성을 조사한 결과, 접종원을 제외한 투명대의 크기가 각각  $32.7 \pm 1.5$  mm와  $42.1 \pm 3.3$  mm인 것으로 측정되어 외생균근균인 다색벚꽃버섯(KFRI 818)나 송이의 몇몇 균주와 효소 활성이 비슷하였다. 갈색부후균인 붉은덕다리버섯(KFRI 1437)과 잣버섯(KFRI 1302)의 활성도는 각각  $31.8 \pm 6.6$  mm와  $29.7 \pm 0.1$  mm인 것으로 조사되었다. 송이(KFRI 1266)의 경우, CMC 한천평판배지(pH 5.0) 상에서 다른 시험 균주들에 비해 높은 cellulase 활성을 보여 인공재배 균주로 활용해 볼 만한 가치가 있으며, 산림 내 미생물 자원의 상업적 가치를 높이는 데에도 기여할 것으로 기대된다.

## 적 요

우리나라 산림에서 수집한 외생균근균 8종 27개 균주에 대한 균사 성장 특성을 다양한 배양 조건(배지, 온도, pH)에서 조사하였다. 60일 배양 후, 모든 균주는 PDA와 MMN 배지에서 성장하였으나, 송이를 포함한 일부 균주들은 MEA나 SDA 배지에서 전혀 성장하지 않았다. 또한 대부분의 균주들을 PDA 배지에서 배양했을 때에 저온( $10^{\circ}\text{C}$ )보다 고온( $30^{\circ}\text{C}$ )에서 균사 생장이 저조하였다. 또한 PDA 배지 상에서의 최적 생장온도는  $20-25^{\circ}\text{C}$ , PDB 배지 내 균사 성장을 위한 최적 pH는 4-5로 나타났다. Carboxymethyl cellulose(CMC) 활성은 모든 시험 균주에서 나타났으며, CMC(pH 5.0) 한천배지 상에서 최대의 셀룰라아제 활성을 나타낸 균주는 송이(1266)였다.

## 감사의 글

본 연구는 국립산림과학원 ‘산림미생물 유전자원의 수집 및 증식 보존 기술 연구(FP 0801-2010-01)’의 지원을 받아 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Barros, L., Baptista, P. and Ferreira, I. C. F. R. 2006. Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. *Minerva Biotec.* 18:165-170.
- Berch, S. M., Ka, K. H., Park, H. and Winder, R. 2007. Development and potential of the cultivated and wild-harvested mushroom industries in the Republic of Korea and British Columbia. *JEM.* 8(3):53-75.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotech. Adv.* 18:355-383.
- Choi, J. H., Ozawa, N., Yamakawa, Y., Nagai, K., Hirai, H. and Kawagishi, H. 2011. Leccinin A, an endoplasmic reticulum stress-suppressive compound from the edible mushroom *Leccinum extremiorientale*. *Tetrahedron.* 67(35):6649-6653.
- Chudzyn'ski, K., Bielawski, L. and Falandysz, J. 2009. Mercury bio-concentration potential of larch bolete, *Suillus grevillei*, Mushroom. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 83:275-279.
- Dennis, J. 1985. Effect of pH and temperature on *in vitro* growth of ectomycorrhizal fungi. pp. 1-19. Canadian Forest Service Pacific Forestry Centre, Canada.
- Fu, S. Z., Wang, Q. B. and Yao, Y. J. 2006. An annotated checklist of *Leccinum* in China. *Mycotaxon.* 96:47-50.
- Giomaro, G., Sisti, D. and Zambonelli, A. 2005. Cultivation of edible ectomycorrhizal fungi by *in vitro* mycorrhizal synthesis. *Soil Biology.* 4:253-267.
- Harvey, L. M., 1991. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. *Biotech. Adv.* 9:13-29.
- Jackson, R. M. and Mason, P. A. 1984. Mycorrhiza: Culture and nutrition of sheathing mycorrhizal fungi. The institute of Biology's Studies in Biotechnology. 159:31-33. The Camelot Press Ltd., London, UK.
- Ka, K. H., Jeon, S. M., Ryoo, R., Ryu, S. H., Kim, M. G, Bak, W. C., Park, J. W., Koo, C. D. and Eom, A. H. 2011. Management of genetic resources of forest microorganisms. Korea Forest Research Institute, Research report. 434: p3. (in Korean).
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr. Microbiol.* 57(5):503-507.
- Kim, H. J. and Han, S. K. 2009. 200 Mushrooms of forest in Korea. Korea National Arboretum. (in Korean).
- Kim, H. J., Lee, I. S. and Lee, K. R. 1999. Antimutagenic and anticancer effects of *Ramaria botrytis*(Fr.) rick extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28(6):1321-1325.
- Kim, I. Y., Jung, G. R., Han, S. K., Cha J. Y. and Sung, J. M. 2005. Favorable condition for mycelial growth of *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Mycol.* 33(1): 22-29. (in Korean).
- Kim, J. H., Yoo, K. H. and Seok, S. J. 2007. Screening test of wild mushroom methanol extracts for fibrinolytic and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *J. Exp. Biomed. Sci.* 13(3):245-249.
- Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Yamanaka, K., Terashita, T. and Miyatake, K. 2007. Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*. *Mycoscience.* 48:358-364.
- Kusuda, M., Ueda, M., Miyatake, K. and Terachita, T. 2008. Characterization of the carbohydrase productions of an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience.* 49:291-297.
- Laiho, O. 1970. *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. *Acta For. Fenn.* 106:5-72.
- Madigan, M. T., Martinko J. M. and Parker, J. 2009. Brock Biology of Microorganisms. 12 edition, pp. 151-167. Pearson/Benjamin Cummings. (in Korean).
- Marx, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology.* 59:153-163.
- Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Li, Q., Gui, H., Yang, X., Yang, X., He, J., Ye, L., Guo, J., Li, H., Sysouphanthong, P., Zhou, D., Xu, J. and Hyde, K. D. 2012. Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability. *Fungal Divers.* 56:31-47.
- Murat, C., Mello, A., Abba, S., Vizzini, A. and Bonfante, P. 2008. Edible mycorrhizal fungi: identification, life cycle and morphogenesis. In: Mycorrhiza-state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics, 3<sup>rd</sup> edition, pp. 707-732. Eds. A. Varma. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Norkrans, B. 1950. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. *Symb. Bot. Ups.* 11:1-126.
- Ohta, A. 1997. Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize search and related substrates. *Mycoscience.* 38:404-408.
- Sánchez, F., Mario Honrubia, M. and Torres, P. 2001. Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie, Mycol.* 22 (4):243-258.
- Terashita, T., Kono, M., Yoshikawa, K. and Shishiyama, J. 1995. Productivity of hydrolytic enzymes by mycorrhizal mushrooms. *Mycoscience.* 36:221-225.
- Zhang, Y-H. P., Himmel, M. E. and Mielenz, J. R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection. *Biotechnol Adv.* 24:452-481.
- Zimbro, M. J. and Power, D. A. 2003. Difco & BBL manual; manual of Microbiological Culture Media. Becton Dickinson and Company, Sparks.
- Yamanaka, T. 2003. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycologia.* 95(4):584-589.
- Yaoita, Y., Satoh, Y. and Kikuchi, M. 2007. A new ceramide from *Ramaria botrytis* (Pers.) Ricken. *J. Nat. Med.* 61:205-207.