

농업미생물은행(KACC)의 곰팡이 보존

신명숙 · 홍승범*

국립농업과학원 농업미생물과

Maintenance of Filamentous Fungi in Korean Agricultural Culture Collection (KACC)

Myeong-Suk Shin and Seung-Beom Hong*

Korean Agricultural Culture Collection, Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT: A total of 7039 strains of filamentous fungi are preserved in Korean Agricultural Culture Collection (KACC). The 4065 strains (58%) of them, which produce many spores in cultivation on proper media, are preserved with freeze-drying method. They are also preserved with liquid nitrogen and deep-freezer storage in order to minimize loss by death. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizopus*, etc. which are common in surrounding environments, are included in this category. The others which do not produce spores, or produce few spores in vitro, are preserved with liquid nitrogen, deep-freezer and mineral oil storage. *Phytophthora*, *Pythium*, *Cercospora*, *Septoria*, *Rhizoctonia*, etc. are included in this category. The authors also introduced various fungal preservation methods and provided detailed preservation procedures that are used in KACC.

KEYWORDS : Freezer drying, Fungus, Korean Agriculture Culture Collection (KACC), Mineral oil storage, Preservation

곰팡이는 생물의 5계 중의 하나로서 인간의 삶에 큰 영향을 미친다. 따라서 곰팡이를 이용한 다양한 실험을 수행하는데 이는 필연적으로 곰팡이 자원의 보존을 수반한다. 하지만 곰팡이를 보존하고자 하면 막상 어떻게 이들을 보존해야 하는지에 대한 정보를 구하기가 쉽지 않다. 일반적으로 곰팡이 보존은 세균과 달리 까다롭고 또한 분류군별로 보존 방법이 다르며 같은 종 내에서도 균주 간에 보존 방법이 서로 다를 수 있다고 알려져 있다[1].

1991년 Kirsop과 Doyle[2]은 곰팡이를 포함한 세균, 조류, 동식물 세포 등의 생물자원의 보존에 대하여 종합 정리

하였다. 이후 1994년에 Smith와 Onion[3]은 CABI culture collection (IMI)에서 사용하고 있는 곰팡이의 보존법에 대하여 자세히 기술하였다. 1999년에는 유럽의 선진 미생물 자원센터인 독일의 DSMZ, 네덜란드의 CBS, 벨기에의 BCCM이 CABRI (Common Access to Biological Resources and Information) guideline [4]을 통하여 각 자원센터에서 수행하고 있는 미생물 보존에 관한 프로토콜을 인터넷에 공개하였다. 이 후 Jong과 Birmingham[1]은 균학 관련 비정간 저서인 Mycota에 곰팡이 보존법에 대하여 정리하여 발표하였다.

국내의 곰팡이 보존에 관한 자료는 많지 않다. Bae[5]는 1991년에 미생물학회 춘계학술발표대회에서 미생물의 장기보존에 대하여 발표하고 해당 논문집에 발표내용을 정리하였다. Lee 등[6]은 주요 식물병원균 종을 종류수에 보존한 후에 이들의 생존률을 보고한 바가 있다. 이 후 1995년에 한국식물병리학회는 '식물병원 Germplasm의 장기보존 워크숍'을 갖고 식물병원균 보존에 관한 소책자[7]를 발간하였다. 이상의 국내의 자료들은 국외의 경우를 소개하거나 또는 일부 속과 종에 제한적인 보존방법을 제공하였다.

국내외의 농업 미생물자원의 수집과 보존, 학계·연구계·산업계에 미생물 서비스 제공, 미생물의 분류와 보존 연구를 수행하기 위하여 1995년에 농업미생물은행 (Korean Ag-

Kor. J. Mycol. 2014 June, 42(2): 97-103
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.2.97
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: funguy@korea.kr

Received June 27, 2014
Revised June 28, 2014
Accepted June 30, 2014

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ricultural Culture Collection, 이하 KACC)이 설립되었다. KACC는 체계적인 미생물자원관리를 위하여 '미생물자원관리를 위한 CABRI guideline[4]'을 번역하여 '미생물자원센터 관리지침서[8]'로 발간하고 이를 우리나라 실정에 맞게 수정하여 '한국농업미생물자원센터(KACC) 미생물자원관리 업무편람[9]'을 발간하였다. 특히 네덜란드 CBS를 포함한 일부 유럽국가에서만 사용하고 있는 액체질소 스트로보존법을 아시아에서는 처음으로 우리나라 현실에 맞게 적용시켜 사용하고 그 결과를 Jeon 등[10]의 논문에서 소개하였다. 또한 KACC는 곰팡이 자원 보존의 실무 경험을 바탕으로 업무편람[9]의 내용을 우리나라 현실에 맞게 수정 보완하는 작업을 거쳐 2010년에 '농업유전자원센터 미생물은행(KACC) 미생물자원관리 업무지침서[11]'를 발간하였다.

KACC는 설립 이래 19,546 균주의 미생물을 수집 또는 도입하여 국가의 미생물로 등록, 보존하고 있는데(2014년 6월 현재) 그 중에서 효모, 사상균, 버섯을 포함한 균류는 10,821 균주이고, 이 중의 효모와 버섯을 제외한 사상균은 7,039 균주이다. 국내의 미생물자원센터들이 대부분 세균을 많이 보유하고 있는 것에 비하면 상대적으로 높은 비율의 곰팡이를 보유하고 있고 이는 농업이라는 특수환경에서 세균에 비하여 상대적으로 곰팡이가 큰 영향을 끼치는 것에 기인한다고 할 수 있다.

이에 실제적으로 곰팡이자원을 보존 관리할 수 있도록 다양한 곰팡이의 보존법을 소개하고, 사용자와 보존 기간에 따라 어떤 보존방법을 선택하여 보존할 것인지를 설명한다. 이어서 KACC는 각 곰팡이에 대하여 실제 어떤 보존방법으로 보존하고 있는지를 소개하고 또한 각 보존방법에 대한 상세 과정을 기술한다. 다만 버섯의 경우에는 이미 보고된 바[12]가 있고, 효모의 경우에는 세균과 보존법이 유사하기 때문에 사상균에 한정하여 소개한다.

곰팡이의 다양한 보존법

곰팡이의 기본적인 보존법은 계대배양보존법(Periodic transfer)이다. 이는 곰팡이를 배양한 후에 아무런 처리 없이 적절한 온도에 보관하는 방법이다. 이 경우에 곰팡이는 생장이 계속되고 또한 배지는 공기와 접하게 되어 마르게

됨으로 곰팡이는 오래 보존되지를 못한다. 곰팡이를 오래 보존한다는 것은 결국 곰팡이의 생장을 정지시키는 것인데 이를 위해서는 산소를 공급하지 않거나 물을 제공하지 않거나 온도를 떨어 뜨려 대사를 정지시킨다. 이 중에서 곰팡이를 공기와 격리시키기 위하여 계대배양한 곰팡이 위에 물과 기름을 채우는 것을 중층법(Overlay method)이라고 하고 물을 채우는 것을 물보존법(Water storage), 기름을 채우는 것을 광유보존법(Mineral oil storage)이라 한다(Table 1) 곰팡이로부터 물을 제공하지 않는 보존법을 건조법(Drying method)이라고 하는데 예전에는 실리카겔보존법, 토양보존법 등을 사용하였으나 지금은 동결건조법이 가장 널리 쓰이고 일본, 독일 등의 일부 선진 미생물자원센터에서 한정적으로 액상건조법을 사용한다. 곰팡이를 낮은 온도로 떨어뜨려 대사를 정지시켜 보관하는 보존법을 동결법(Freezing method)이라고 하는데 저온냉동고(Deep-freezer)를 이용하여 -80°C로 보관하는 저온냉동고보존법(Deep-freezer storage)이 있고 액체질소탱크 내의 기체상에서(일반적으로 -180~-196°C) 곰팡이를 보존하는 액체질소보존법(Liquid nitrogen storage)이 있다[2,3].

보존법의 선택

전술한 바와 같이 가장 간단한 곰팡이의 보존법은 계대배양보존법이다. 장기보존이 어렵다는 문제가 있기는 하지만 쉽고, 비용이 저렴하고, 재생이 쉽기 때문에 일반 균학 실험실에서 가장 많이 이용하는 보존법이다. 사면배지에 배양한 균주를 저온(4°C)에 보관할 경우에 일반적으로 안정되게 보존할 수 있는 기간을 일년 정도로 본다. 물론 일부의 난균류 및 담자균류는 6개월 또는 3개월마다 계대 배양해야 한다. 계대 배양된 균주 위에 광유를 채워서 곰팡이를 공기와 격리하는 광유보존법은 저렴한 광유를 사용하고 또한 특별한 보존장비가 필요 없음에도 곰팡이를 경우에 따라 10년 이상 보존할 수 있는 매우 유용한 곰팡이 보존법이다[3]. 세계 최대 곰팡이자원센터인 네덜란드의 CBS 그리고 영국의 CABI culture collection (IMI)에서 자주 이용할 정도로 유용한 곰팡이 보존법이나 의외로 국내에서는 많이 사용되고 있지 않다. 물보존은 광유보존에 비하여 물

Table 1. Preservation methods for fungi

Classification	Method	Selection
Overlay	Periodic transfer	Lab., short term
	Water storage	Lab., short or mid term
	Mineral oil storage	Lab., or MRC*, mid term
Drying	Freeze drying	MRC*, long term
	Liquid drying	MRC*, long term
Freezing	Deep-freezer storage	Lab., or MRC*, mid term
	Liquid nitrogen storage	MRC*, long term

*MRC: Microbial Resources Center.

의 증발 가능성이 높고 보존기간이 짧기 때문에 *Phytophthora*속과 *Pythium*속과 같은 난균문(Oomycota)의 일부 곰팡이에 한정하여 사용된다. 저온냉동고(Deep-freezer)의 일반적인 보급으로 곰팡이의 저온냉동고보존법이 우리나라의 학, 연, 산업계에 널리 이용되고 있다. 하지만 곰팡이는 저온으로 온도가 내려갈 때에 그리고 저온에서 상온으로 온도가 올라갈 때에 많은 스트레스를 받기 때문에 세균처럼 한번 사용 후에 다시 열려서 사용하기가 어렵고 또한 정전 등으로 저온냉동고에 문제가 발생 시에는 사멸의 위험성이 있다.

이상에서 언급한 계대배양보존법, 광유보존법, 물보존법, 저온냉동고보존법은 복잡한 시설이나 특수한 장비를 요하지 않기 때문에 대학과 연구소 등의 일반실험실에서 활용할 수 있는 보존법이다. 하지만 액체질소보존법, 동결건조보존법, 액상건조보존법은 많은 장비와 시설을 필요로 하고 유지에 많은 경비가 소요되기 때문에 일반 실험실에서는 사용하기가 어렵고 미생물자원을 전문적으로 관리하는 미생물자원센터에서 주로 사용하는 방법이다. 액체질소보존법은 지금까지 개발된 생물의 보존법 중에서 다양한 미생물을 오랫동안 안정되게 보존할 수 있는 가장 이상적인 보존법이다. 하지만 용기 내의 질소가 계속 증발하기 때문에 유지비가 가장 비싸다. 동결건조법과 액상건조법은 사상균의 포자를 건조보호제에 현탁하여 유리에 넣은 후에 각각 동결건조 또는 액상건조하는 방법인데, 건조하여 유리에 밀봉된 곰팡이가 실온에서도 안정되게 유통될 수 있기 때문에 많은 미생물자원을 공급하는 자원센터의 경우에는 유통의 편리성 때문에 이 보존 방법을 많이 사용한다. 하지만 포자를 형성하지 않는 곰팡이는 이 방법을 사용할 수 없고 또한 동결건조기, 앰플 밀봉장치 등의 특별한 장비가 필요하기 때문에 사용에 어려움이 있다.

결국 곰팡이 보존은 사용자에 따라, 보존 기간에 따라 다른 보존 방법을 사용하는데 대학, 연구소 등의 일반 실험실에서의 1년 미만의 짧은 기간의 보존은 계대배양보존법을 선택할 수 있다. 하지만 일반 실험실의 수년, 길게는 10여 년의 단, 중기간의 보존은 계대배양으로는 유지가 어렵고 상대적으로 부담 없이 접근할 수 있는 광유보존법과 저온냉동고보존법을 선택할 수 있다. 곰팡이를 안전하게 보관하기 위해서는 각 균주에 대하여 두가지 방법 모두를 사용하는 것이 좋다. 다만 난균문의 경우에는 물보존법이 중단기 보존법으로 추천되기도 하나 일반적으로 광유보존법에 비하여 덜 효율적인 것으로 알려져 있다. 다수의 미생물을 장기간 보존하는 전문 미생물자원센터의 경우에는 액체질소보존법, 동결건조보존법, 액상건조법을 포함한 모든 미생물 보존법을 사용한다.

KACC의 곰팡이 보존법 선택

KACC는 국가의 미생물자원센터로서 등록된 자원이 관리의 소홀로 소실되는 것을 최소화하기 위하여 등록 균주

당 3가지 이상의 방법으로 보존한다. 곰팡이의 경우에 다수의 포자를 형성하여 동결건조 보존이 가능한 균주는 동결건조보존, 액체질소보존, 저온냉동고보존의 3가지 방법으로 보존하고, 포자를 형성하지 않거나 적게 형성하거나 너무 큰 포자를 형성하여 동결건조가 어려운 곰팡이는 액체질소보존, 저온냉동고보존, 광유보존법을 사용하는 것을 원칙으로 한다. 하지만 곰팡이는 같은 종의 균주 사이에도 포자형성 능력과 보존 방법이 서로 다르기 때문에 특정그룹에 맞는 보존법이 따로 있다고 하기 보다는 보존하고자 하는 균주를 관찰하고 상황에 맞게 보존 방법을 선택하는 것이 바람직하다.

Table 2는 KACC에서 보존 중인 곰팡이 7,039 균주의 보존 결과를 정리한 것이다. 전체의 85%에 해당하는 5,998 균주는 액체질소보존이 되어 있고, 4,065 (58%) 균주는 동결건조보존 되어 있으며, 2,398 (34%) 균주는 광유보존이 되어 있다. 또한 모든 균주는 저온냉동고보존법으로 보존이 되어 있다. 공기 중에서 흔히 존재하며 포자를 많이 만들고 산업적으로 이용성이 높은 속(Genus)인 *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Lichtheimia* 속 균주들은 *Cladosporium* 속을 제외하고는 95% 이상이 동결건조보존이 되어 있는 반면 광유보존 비율은 10% 미만이다. 물론 이들은 혹시나 발생할 수 있는 동결건조보존 균주의 사멸에 대비하여 모든 균주가 저온냉동고보존법으로, 또한 대부분이 액체질소보존법으로 중복 보존 되어 있다. 반면 식물병원균으로 분류되는 속들인 *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria* 속 등의 균주들은 포자를 대량생산하는 *Colletotrichum* 속과 *Fusarium* 속을 제외하고는 20% 미만이 동결건조보존 되어 있고, 대부분 균주들은 액체질소보존법, 저온냉동고보존법, 광유보존법으로 보존되어 있다.

분류군별로 볼 때에는 *Phytophthora* 속과 *Pythium* 속의 난균문은 액체질소보존, 광유보존법, 물보존법으로 주로 보존되어 있고, *Mucor*, *Rhizous*, *Lichtheimia* 속 등의 접합균은 포자를 많이 생성함으로 동결건조보존법과 액체질소보존법으로 주로 보존되어 있으며, 불완전균을 포함한 자낭균은 액체질소보존을 기본으로 하고 속에 따라 동결건조보존법, 광유보존법을 채택하였다. 또한 KACC에 등록된 모든 균주는 저온냉동고보존법으로 보존하여 사멸로 인한 국가 자원의 소실을 방지하고 있다.

KACC의 곰팡이 상세 보존 과정

곰팡이의 보존법은 이론적으로 특별히 복잡하거나 어려운 것은 아니다. 하지만 막상 곰팡이를 보존하려고 하면 여러 가지 문제에 봉착하게 되는데 KACC에서 사용하고 있는 곰팡이 보존의 상세 과정을 기술하여 곰팡이 보존에 도움을 주고자 한다. 아래의 프로토콜은 '미생물자원관리 업무지침서[11]'에 기록되어 있으나 절판되어 자료를 구하기 어렵기 때문에 독자의 편리성을 위하여 일부 수정하여 게

Table 2. Strain numbers in the genera that are preserved with various methods in KACC

Genera	Strain no.	Ly. no.*	LN2 no.*	DF no.*	MO no.*	The others
<i>Alternaria</i>	218	101	203	218	106	
<i>Aspergillus</i>	1113	1093	840	1113	10	
<i>Botrytis</i>	38	27	36	38	9	
<i>Cercospora</i>	86	3	84	86	84	
<i>Cladosporium</i>	76	50	67	76	24	
<i>Colletotrichum</i>	249	126	240	249	170	
<i>Cordyceps</i>	118	70	115	118	47	
<i>Fusarium</i>	478	264	465	478	200	
<i>Trichoderma</i>	309	297	156	309	11	
<i>Mucor</i>	124	124	103	124	3	
<i>Paecilomyces</i>	108	98	101	108	10	
<i>Penicillium</i>	749	742	462	749	6	
<i>Phytophthora</i>	152	0	140	152	29	Wa* (16)
<i>Pyricularia</i>	450	8	419	450	78	
<i>Pythium</i>	32	0	28	32	20	Wa* (4)
<i>Rhizoctonia</i>	73	0	73	73	10	So* (54)
<i>Rhizopus</i>	81	77	60	81	4	
<i>Sclerotinia</i>	33	0	32	33	24	
<i>Septoria</i>	223	46	220	223	185	
<i>Lichtheimia</i>	60	60	59	60	4	
The other genera	2269	879	2095	2269	1359	
Total	7039	4065	5998	7039	2393	

*Ly no., strain numbers that are preserved in lyophilization method; LN2 no., strain numbers that are preserved in liquid nitrogen method; DF no., strain numbers that are preserved in deep-freezer; Mo no., strain numbers that are preserved in mineral oil storage; Wa, strain numbers that are preserved with water storage; So, strain numbers that are preserved with soil storage.

제한다.

사상균의 계대배양보존 [11]

1) 계대배양 관련 재료의 준비

1.1. 시험관은 $\Phi 18 \times 150 \sim 180$ mm(국산 제작)을 사용하며 시험관 마개는 실리콘마개(경일산업사 P19호)를 사용한다.

1.2. 계대배양보존을 위한 사면배지는 일반사면배지와 유사하게 제조하나 사면의 각도를 일반 배양 시보다 완만하게 제조한다.

2) 균주의 배양

2.1. 생장이 왕성한 콜로니의 가장자리 부위의 균사를 취하여 사면의 중심부 약간 아래에 접종하고 적절한 온도에서 키운다.

2.2. 곰팡이가 사면의 전체에 충분히 자라면 품질을 검사하고 기록한다.

3) 균주의 보존과 재보존

3.1. 시험관은 일반적으로 4°C 저장고에 보관하나 일부는 15°C 저장고에 보관하기도 한다.

3.2. 계대배양보존된 곰팡이는 매 1년마다 재보존 한다.

그러나 일부 곰팡이는 매 3개월, 6개월마다 재보존 한다.

사상균의 물보존 [11]

1) 물보존 관련 재료의 준비

1.1. 스크류캡 시험관은 $\Phi 8 \times 150 \sim 180$ mm(국산제작)을 사용한다.

1.2. 물은 증류수를 사용하며 121°C에서 15분간 멸균한 후 4°C에 보관하며 사용한다.

1.3. 배양 배지는 가능한 얇게 부어 물보존 시험관에 가능한 적은 양의 배지가 들어가도록 한다.

2) 균주의 배양

2.1. 적정 평판배지에 접종하여 적절한 온도에서 키운다.

2.2. 곰팡이가 평판의 가장자리까지 자라면 품질을 검사하고 결과를 기록한다.

3) 물 보존

3.1. 배지의 가장자리까지 곰팡이가 자라면 가장자리 부위를 Cork borer (No. 2) 또는 수술용 칼로 적당한 크기의 블록(약 가로, 세로 5 mm)을 만들고 멸균증류수의 1/2 가량이 되도록 시험관을 채운다. 스크류캡을 단단하게 돌려

막고 파라필름으로 봉한다.

3.2. 15°C 저온실에 시험관을 보관한다.

4) 정기 재보존

4.1. 물보존된 곰팡이는 보존 후 매 1년마다 재보존 하나 *Phytophthora infestans* 등의 일부곰팡이는 매 6개월마다 재보존 한다.

사상균의 광유보존 [11]

1) 광유보존 관련 재료의 준비

1.1. 시험관은 $\Phi 18 \times 150 \sim 180$ mm(국산 제작)을 사용하며 시험관 마개는 실리콘마개(경일산업사 P19호)를 사용한다.

1.2. 광유는 순도가 높은 액체파라핀, 비중 0.83~0.89를 사용하며 121°C에서 15분간 2회 가압멸균하고 170°C에서 1~2시간 건조한 후에 사용한다.

1.3. 광유보존을 위한 사면배지는 일반사면배지와 유사하게 제조하나 다만 사면의 각도를 일반 배양 시보다 완만하게 한다.

2) 균주의 배양

2.1. 콜로니의 가장자리 부위의 균사를 취하여 사면의 중심부 약간 아래에 접종하고 적절한 온도에서 키운다.

2.2. 곰팡이가 사면의 전체에 충분히 자라면 품질을 검사하고 기록한다.

3) 광유 보존

3.1. 보존에 적절한 정도로 곰팡이가 충분히 자라면 멸균된 광유를 멸균된 피펫을 사용하여 채운다. 이때에 균사 위에 생기는 공기방울을 제거하기 위하여 시험관을 강하게 흔들어 주고 광유의 양은 배지 최상단 1 cm 위로 한다.

3.2. 광유를 채운 시험관을 15°C의 저장고에 보관하는데 보존 1주일 후에 광유의 높이를 점검하여 배지 상단 1 cm 이하로 줄어든 시험관은 다시 광유를 보충한다.

4) 정기 재보존

4.1. 광유 보존된 곰팡이는 균주마다 상이하지만 일반적으로 매 5년마다 재보존 한다.

사상균 동결건조보존 [11]

1) 동결건조보호제의 준비

1.1. 동결건조보호제 조성

12% Skim Milk

Skim Milk (Difco 232100)	12 g
Distilled water	100 mL

12% Skim Milk with 7% trehalose

Skim Milk (Difco 232100)	12 g
Trehalose (Sigma T0617)	7 g
Distilled water	100 mL

1.2. 8 mL의 동결건조보호제를 다수의 스크류캡 튜브에 담은 후에 110°C에서 15분간 1회 멸균하고 이중의 2개 튜브를 25, 55°C에서 3일간 배양하여 미생물이 자라면 동일

조건에서 1회 더 멸균한다. 이때에도 미생물이 자라면 폐기하고 새로운 보호제를 다시 멸균한다.

2) 동결건조애플

2.1. 가열하여 밀봉할 수 있는 애플(국산제작, Pyrex $\Phi 8 \times 110$ mm)을 세제로 씻고 수돗물로 행군 후에 다시 증류수로 행구고 드라이오븐에서 말린다.

2.2. 무독성 잉크로 균주번호와 제작년도를 적은 종이라벨(35×4 mm)을 애플에 넣고 면전으로 입구를 느슨하게 막는다.

2.3. 121°C에서 15분간 멸균하고 드라이오븐에서 면전과 종이가 완전히 마를 때까지 넣어 둔다.

3) 애플 채우기

3.1. 곰팡이를 평판배지(직경 9 cm)에 접종하고 일정 기간 배양 후에 포자가 충분히 형성되었는지를 관찰한다.

3.2. 포자를 충분히 형성하였을 때 저온멸균된 12% 탈지유 8 mL를 배지에 부어 포자현탁액을 만들고 주사바늘로 현탁액을 뽑아낸다. 멸균된 애플에 200~400 μ L의 현탁액을 채우고 면전으로 다시 입구를 막는다. 각 균주에 대하여 10개의 바이얼을 제작하여 그 중 9개를 보존한다. 하나는 생존검사를 위하여 사용한다.

3.3. 5 μ m 미만의 소형단세포 포자를 형성하는 균주의 경우에는 -80°C의 저온냉동기에 넣어 급속 냉각하고, 5 μ m 이상의 대형단세포포자, 다세포포자 또는 두터운 세포벽을 가진 포자의 경우는 애플을 스티로폼 박스 안에 넣은 후에 밀봉하여 -80°C의 저온냉동기에서 넣음으로써 서서히 냉각시킨다. 바로 동결건조를 하지 않을 경우에는 저장기간 동안 세포내 얼음결정생성을 최소화하기 위하여 애플을 -80°C에 보관한다.

4) 애플의 건조

4.1. 애플을 걸기 전에 동결건조기(Labconco FD 5505)의 온도를 -50°C로 냉각시키고 압력을 50 mm Torr. 이하로 떨어뜨린다. 애플을 걸고 압력이 다시 50 미크론 이하로 떨어지는지 확인한다.

4.2. 밤동안(15~20시간) 건조한다.

4.3. 산소와 프로판가스를 연결한 토치를 이용하여 애플을 진공 밀봉한다. 밀봉 후에는 진공시험기(spark tester, Electro-Tecnic products Inc., BD-20)를 이용하여 애플의 진공 여부를 검사하는데 불꽃이 애플 내부를 통하여 흐를 때 제대로 진공이 된 것이다. 진공이 되지 않은 애플은 폐기한다.

5) 재생 및 생존검사

5.1. 생존검사는 동결건조 1주일 이내에 실시한다. 동결건조 애플을 줄칼을 이용하여 개봉한 후에 건조균체를 0.5% malt-peptone medium 2 mL이 들어 있는 시험관에 넣고 25°C에서 1일간 교반배양 한다. 배양액의 세균 오염여부를 검사하고 다시 적정 고체배지에 부어 도말하고 적정 조건에서 배양한다. 생존검사에서 문제가 없으면 애플을 4°C의 암실에 보관한다.

사상균 액체질소보존 [11]

1) 동결보호제의 준비

1.1. KACC 사용 동결보호제의 조성

10% glycerol

Glycerol (Merck 1.04093)	10 mL
Distilled water	90 mL

15% glycerol

Glycerol (Merck 1.04093)	15 mL
Distilled water	85 mL

20% glycerol

Glycerol (Merck 1.04093)	20 mL
Distilled water	80 mL

1.2. 121°C에서 15분간 멸균한다.

1.3. 각각 2개의 크로튜브를 25, 55°C에서 배양하여 멸균 여부를 검사한다.

2) 스트로의 준비

2.1. 폴리프로필렌 스트로(Φ4 mm, 국산)를 47 mm 길이로 잘라서 자동 밀봉기로 한 쪽을 열 봉합하고 50 mL conical tube에 50개씩을 넣어 121°C에서 15분간 멸균한다.

3) 스트로 채우기

3.1. 적절한 한천평판 배지(지름 9 cm, 페트리접시당 20 mL 미만의 배지를 부어 배지가 두텁지 않게 유의한다)에 균주를 접종한 후에 균주가 배양기의 가장자리에 닿을 때까지 배양하고 균주의 품질을 검사한다.

3.2. 스트로홀더와 고정틀(DIB 0223, 주문제작)을 사용하여 10개의 스트로를 고정한 후에 멸균주사기로 10% glycerol 0.5 mL을 채운다. 이 후에 코르크보러(내경 2.8 mm, DIB0223 주문제작)를 사용하여 균주가 활발히 자라는 가장자리 부위에서 4개의 플러그를 내구성기관이 형성될 수 있는 중앙 부위에서 2개의 플러그를 만들어 스트로에 채워 넣는다. 플러그가 동결보호제에 잘 섞이도록 흔들어 준 후에 자동밀봉기(좋은포장기계 GS 300-5)를 이용하여 열 봉합한다. 스트로의 밀봉상태를 점검하고 불량하면 다시 봉합한다. 초저온에 안정한 접착제가 붙어 있는 라벨지(PE 합성지, Brady co. USA)에 등록번호를 인쇄한 후에 스트로의 상단에 붙이고 크로박스에 넣는다.

3.3. 글리세롤이 세포내로 침투할 수 있도록 30분 이상 실온에 둔 후 온도제어동결기(Sylab iceCube 1800D)에서 -1°C/분의 속도로 -45°C까지 냉각하고 -50°C/분의 속도로 -75°C까지 냉각한다. 그러나 작업의 편의를 위하여 보존에 문제가 없는 균주에 한하여 스트로를 ice box에 넣은 후에 봉하고 -80°C 냉동고에 4시간 이상 넣어둔다.

3.4. 스트로를 자동수위조절기가 장착된 액체질소 보존 탱크(MVE Cryo-Preservation Freezers XLC 1520HE) 안의 64개 칸이 있는 알루미늄 크로박스에 넣고 보존위치를 기록한다. 각 균주에 대하여 10개의 스트로를 준비하고 1개는 생존검사에 사용하고 9개는 알루미늄 크로박스에 보관한다.

4) 재생과 생존검사

4.1. 액체질소에 보존된 균주는 저장 1주일 내에 생존검사를 실시한다. 재생을 위하여 스트로를 30°C에서 5분간(난균류를 포함한 일부 균주는 25°C에서 5분간) 수조에서 녹인다. 스트로를 96% 에탄올로 세척하고 멸균된 가위로 절단한 후 배지에 올려놓는다. 평판배지마다 6개 플러그를 접종하여 배양하고 생장하면 생존여부와 동일성을 검사하고 그 결과를 기록한다. 이때에 형태적인 변이도 기록한다.

곰팡이를 이용한 실험을 수행함에 있어 곰팡이의 보존은 필수불가결하다. 하지만 이들의 보존 및 관리에 관한 명쾌한 자료를 구하기가 쉽지가 않다. 따라서 본고에서는 곰팡이의 다양한 보존법을 소개하고 이들이 어떻게 적용될 수 있는지를 정리하였다. 아울러 곰팡이 자원을 많이 관리하고 있는 농업미생물은행(KACC)에서 어떤 보존방법으로 곰팡이 자원을 보존하고 있는지 주요 속 별로 보존방법을 제시하였다. 또한 누구나 손쉽게 실제 곰팡이를 보존할 수 있도록 KACC에서 적용하고 있는 상세한 보존 과정을 제공하였다.

적 요

농업미생물은행(KACC)에는 7,039균주의 곰팡이가 장기 보존되어 있다. 이 중에서 다수의 포자를 형성하는 4,065균주는 동결건조법으로 보존되어 있는데 사멸로 인한 균주의 소실을 막기 위하여 대부분은 액체질소보존법 그리고 모든 균주가 저온냉동고보존법으로 함께 보존되어 있다. 4,065균주의 곰팡이에는 주로 공기 중에 흔하며 산업적으로 이용성이 많은 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizopus* 속 등이 포함된다. 포자를 형성하지 않거나 소수 형성하거나 또한 보존이 어려운 너무 큰 포자를 형성하는 나머지 곰팡이는 동결건조보존법으로 보존이 불가하기 때문에 액체질소보존법, 저온냉동고보존법 그리고 광유보존법으로 균주를 보존한다. 여기에는 *Phytophthora*, *Pythium*, *Cercospora*, *Septoria*, *Rhizoctonia* 속 등의 식물병원균이 포함된다. 이 외에도 KACC에서 이용하는 다양한 곰팡이 보존법을 소개하고 이들의 상세보존 과정을 기술한다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구과제(과제번호:PJ008676)의 연구비로 수행된 결과이며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Jong SC, Birmingham JM. Cultivation and preservation of fungi in culture. In: The Mycota VII, Systematics and evolution, eds. McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA. pp.

- 193-202. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2001.
2. Kirsop BE, Doyle A. Maintenance of microorganisms and cultured cells - a manual of laboratory methods, 2nd ed. Academic Press; 1991.
3. Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. CAB International Wallingford. UK; 1994.
4. Web site of CABRI Guideline [Internet], [Cited 25 June 2014]. Available from <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/MCover1.html>.
5. Bae KS. Long term storage of microorganisms - Focusing on yeast and mold. Special issue for 2011 Spring Congress of Microbial Society of Korea 1991;4:38-48.
6. Lee JK, Choi KJ, Kim BS, Cho KY. Storage of phytopathogenic fungal cultures in sterile distilled water. *Kor J Plant Pathol* 1994;10:144-7.
7. Korean Society of Plant Pathology. Long term storage of plant pathogenic germplasm. Korean Society of Plant Pathology. Suwon; 1995.
8. Korean Agricultural Culture Collection. Korean translation of 'CABRI guideline-microorganisms.' National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon; 1993.
9. Korean Agricultural Culture Collection. Laboratory procedures for maintenance of microorganism in KACC. National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon; 1995.
10. Jeon YA, Shin MS, Kim HJ, Kim DH, Go SJ, Hong SB. Preservation of fungi in liquid nitrogen using polypropylene straws. *Kor J Mycol* 2006;34:54-8.
11. Korean Agricultural Culture Collection. Laboratory procedures for maintenance of microorganism in KACC. 2nd ed. National Academy of Agricultural Science, Suwon; 2010.
12. Hong SB. Preservation of mushroom strains. In: *Mushroom science*, pp. 266-85. Eds. Yoo YB, Koo CD, Kim SH, Seo GS, Shin HD, Lee JW, Lee CS, Chang HY. Nature & Human, Seoul; 2010.