

저온보존기간이 담자균류의 균사생장과 목질분해효소의 활성에 미치는 영향

정연석 · 가강현*

국립산림과학원 화학미생물과

Effects of Preservation Period at Low Temperature on the Mycelial Growth and the Lignocellulolytic Enzyme Activities of Basidiomycetes

Yeun Sug Jeong¹ and Kang-Hyeon Ka*

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

ABSTRACT : Subculture is the most common method for preservation fungi, but has a disadvantage of accumulation of spontaneous mutations during the repeated subculture. To reduce the subculture frequency, the effect of preservation period at 4°C in a slant culture was examined on the mycelia growth and lignocellulolytic enzyme activities of various basidiomycetes. Mushrooms, including *Stereum ostrea*, *Coprinellus micaeus*, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Wolfiporia extensa*, *Pleurotus pulmonarius*, *Piptoporus betulinus* and *Ganoderma applanatum* were not affected by the preservation period more than two years, indicating that they can be maintained by subculture every two years. Some other tested fungal strains showed a significant decrease in both viability and enzyme activity when they were maintained for two years, suggesting that they should be subcultured at least once in a year. A little correlation was found between the recovery of mycelial growth and extracellular enzyme activity. In conclusion, mycelial activity and enzyme activity according to storage period is expected to be a way of deciding on subculture times for fungal preservation.

KEYWORDS : Basidiomycetes, Lignocellulolytic enzymes, Mycelial growth, Preservation, Subculture

서론

생태계내에서 영양소의 순환 및 유기화합물을 분해하는 역할을 하는 생물들 중 하나인 담자균류는 산업공정이나 기초 및 응용연구, 교육, 생물다양성 연구 등에 이용되는 중요한 자원이다. 담자균류를 효과적으로 이용하기 위해

서는 정확한 계통학적 분류도 중요하지만 장기간 동안 안전하게 보존하는 것이 중요하다[1]. 균주 보존의 목적은 오염이나 유전적 변이 없이 균주를 생존시키는 것이며, 형태적 특징, 성장력, 대사물질 생산력이 변하지 않는 것이 중요하다[2]. 가장 일반적으로 사용하는 균류의 보존방법은 계대배양 보존법이다[3]. 이 방법은 가장 쉽게 사용하는 방법으로서 주로 사면배지에 균주를 배양하여 4-8°C에서 보존하며, 여기에다 멸균 증류수나 광유 등을 첨가하기도 한다. 반복적인 계대배양에 시간이 많이 걸리고, 잦은 계대배양에 따른 오염문제와 유전적 변이를 막기 어려운 단점도 갖고 있지만, 특별한 첨가물이나 시설 및 설비가 필요하지 않기 때문에 비용이 적게 들어간다는 장점이 있다. 또한 실험실에서 자주 사용되는 보존 방법은 -80°C 이하의 냉동보존과 액체질소에 의한 장기간 보존방법이다. 따라서 균류의 보존은 실험실이나 기관의 여건과 보존기간에 따라 다른 방법을 이용하며, 각각의 장단점을 보완하는 방법들을 적용하고 있다[1].

국립산림과학원은 균주보존을 사면배지, 광유보존, 액체

Kor. J. Mycol. 2014 December, 42(4): 322-327
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.322>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received November 28, 2014
 Revised December 10, 2014
 Accepted December 12, 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.

질소 보존 등을 병행하고 있다[4]. 국립산림과학원 PDA 사면배지에 보존하는 균주는 매년 1회 계대배양을 수행하고 있다. 균주 숫자가 늘어나면서 균주의 계대배양도 큰 일거리 중의 하나가 되고 있다. 따라서 균주의 계대배양의 횟수를 줄일 수 있는 방안을 찾고자 균주의 보존기간에 따른 균주활력을 목질부후균을 중심으로 조사하였다. 이때 사용한 방법은 군사생장과 대표적인 목질분해효소인 cellulase와 laccase의 활성을 조사하여 그 근거를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

버섯균은 국립산림과학원(Korea Forest Research Institute, KFRI)에서 Potato Dextrose Agar (PDA) 사면배지에서 배양하여 4°C에 보관중인 것 중 동일 균주에서 보존기간이 1년과 2년이 경과한 것을 각각 사용하였다(Table 1).

군사 성장 조사

보존기간이 1년과 2년 경과한 사면배지는 시험관으로부터 배지 전체를 빼 내어 균 접종원으로 사용할 수 있도록 cork borer를 이용하여 직경 6 mm의 디스크 형태로 만들어 접종하였다. 이 때 군사 성장용 배지는 PDA (Difco 사)였고, 배지 사용 권장량을 따랐다. 배지는 고압증기멸균(121°C, 20 min)한 후 petri dish (85×15 mm)에 각 25 mL씩 분주하여 평판배지를 만들었다. 그리고 접종원 배지의 중앙에 1개씩 접종하고 25°C에서 21일간 배양한 후, 군사의 크기를 측정하였다.

목질분해 효소 활성 조사

효소 활성 조사용 접종원은 보존기간이 1년과 2년이 경과한 것을 1차 PDA 평판배지에 배양한 것을 이용하였다. 효소 활성 조사는 버섯 균사체가 균체 외로 방출하는 세포 외 효소들 중 cellulase와 laccase를 측정하였다. Cellulase의 활성조사는 Kasana[5]가 제시한 배지의 구성에 따라 NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, KCl 0.5 g, carboxymethylcellulose sodium salt 2 g, peptone 0.2 g, agar 15 g, 증류수 1 L를 혼합하였다(pH 6.0). 고압증기멸균(121°C, 20 min)한 배지를 petri dish (55×15 mm)에 10 mm씩 분주하였다. 직경 6 mm의 접종원을 배지의 중앙에 1개씩 접종한 후, 25°C에서 8일간 암배양하였다. 배지의 중앙에 Gram's iodine solution (KI 6 g, I₂ 3 g, 증류수 900 mL)을 1 mL 떨어뜨린 뒤 차광상태에서 약 2시간 동안 상온에서 방치한 후, 배지 내 cellulase 활성영역인 투명대의 직경을 측정하였다[6].

Laccase 활성 조사는 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)를 기질로 선택하여 측정하였다[6]. ABTS 배지는 무기물 혼합 농축액(K₂HPO₄ 2 g, KCl 2 g,

MgSO₄·7H₂O 2 g, 증류수 1 L, pH 5.0) 50 mL와 ABTS 0.5487 g에 증류수를 첨가해 1 L의 혼합액을 만든 뒤, agar 15 g을 첨가하여 고압증기멸균 하였다. 이를 petri dish(85×15 mm)에 20 mL씩 분주하여 배지를 제조하였다. 접종원(직경 6 mm)를 1개씩 접종한 후, 25°C에서 5일간 암배양하였다[4]. 접종원의 중심으로 청록색의 원형발색대의 유무와 발색대의 크기를 측정하여 기록하였다.

액체 배양액 내에 존재하는 세포 외 laccase 활성 조사는 Cehn[7]의 방법에 따라 측정하였다. 액체배지는 Potato Dextrose Broth (PDB, Difco)를 삼각플라스크(100 mL)에 20 mL씩 분주한 뒤, 고압증기멸균을 하였다. 균접종은 액체배지에 각각 한 개의 직경 6 mm의 접종원을 접종하여 25°C에서 6일간 배양하였다. 배양액은 건조시킨 filter paper를 통하여 회수하였다. Sodium citrate buffer (pH 5.0) 300 μL와 0.03% ABTS 용액 1 mL, 배양액 300 μL을 혼합하여 30°C에서 10분간 배양하였다. 녹색으로 색이 변하는 정도를 분광광도계를 이용해 420 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Laccase의 활성은 1분동안 1 μmol의 ABTS와 반응하는 laccase의 양을 1 Unit/mL로 규정하여 계산하였다.

결과 및 고찰

군사 성장 조사

보존기간이 1년과 2년이 경과한 부후성 버섯 23개 균주들은 PDA 평판배지에서 21일간 배양하여 각 보존기간에 따른 군사의 성장력을 측정하였다(Table 1). 갈색꽃구름버섯(*Stereum ostrea*), 갈색먹물버섯(*Coprinellus micaceus*), 구름버섯(*Trametes versicolor*), 복령(*Wolfiporia extensa*), 산느타리(*Pleurotus pulmonarius*), 자작나무버섯(*Piptoporus betulinus*), 잔나비불로초(*Ganoderma applanatum*)는 보존기간에 따른 군사의 성장력 차이가 나타나지 않았다. 반면에 저령(*Polyporus umbellatus*)은 60.1%, 뿔나무버섯(*Armillaria mellea*)은 25.0%, 꽃송이버섯(*Sparassis latifolia*)은 13.4%가 감소했다. 개암버섯(*Hypholoma lateritium*), 노루궁뎅이(*Hericium erinaceus*), 벚꽃버섯(*Agrocybe praecox*)은 균주 간에 군사활력의 차이가 나타났다.

보존 균주들의 군사 성장력은 보존 방법에 따라 달라지는 경우가 많지만, 균주의 종에 따라 변화하지는 않으며, 각 개체에 따라 다르게 나타난다. 균주들이 보존기간동안 균사체 내의 액포에서 공포화 현상이 나타나게 되며 불규칙한 군사 성장을 일어나게 하며, 하이드로포빈과 같은 군사 성장에 관여하는 물질들의 변화에 따라 각 개체의 군사 성장력이 달라지게 된다[8]. 보존기간동안 저장중인 배지의 양분결핍, 분비된 대사산물에 의한 일부 균체의 사멸에 의해 군사의 생장이 감소하지만[9], 보존기간에 비해해서 균주의 성장력이 감소하는 것은 아니며, 보존균주를 제작하기 전의 활력과 안정도, 균주의 나이에 의해 보존 균주

Table 1. Mycelial growth of preserved fungal strains on PDA plate for 21 days at 25°C

Family name	Scientific name	Strain No.	Mycelial growth (mm)		
			One year	Two years	Reduction rate (%)
Fomitopsidaceae	<i>Piptoporus betulinus</i>	KFRI 1040	85.0±0.0	85.0±0.0	0
Ganodermataceae	<i>Ganoderma applanatum</i>	KFRI 1523	85.0±0.0	85.0±0.0	0
	<i>G. applanatum</i>	KFRI 1815	85.0±0.0	85.0±0.0	0
Hericiaceae	<i>Hericium erinaceus</i>	KFRI 1622	82.1±3.0	78.7±4.4	4.1
	<i>H. erinaceus</i>	KFRI 1950	71.9±1.8	65.5±1.4	8.9*
Hymenochaetaceae	<i>Phellinus linteus</i>	KFRI 320	36.5±1.0	33.2±1.1	9*
Physalacriaceae	<i>Armillaria mellea</i>	KFRI 1617	46.4±3.2	34.8±4.1	25
Pleurotaceae	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	KFRI 1914	85.0±0.0	85.0±0.0	0
Polyporaceae	<i>Polyporus umbellatus</i>	KFRI 1820	33.9±1.5	13.5±0.9	60.1*
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	KFRI 1160	85.0±0.0	77.6±3.4	8.7
	<i>Trametes versicolor</i>	KFRI 1528	85.0±0.0	85.0±0.0	0
	<i>T. versicolor</i>	KFRI 1913	85.0±0.0	85.0±0.0	0
	<i>Wolfiporia extensa</i>	KFRI 1107	85.0±0.0	85.0±0.0	0
Psathyrellaceae	<i>Coprinellus micaceus</i>	KFRI 1291	85.0±0.0	85.0±0.0	0
	<i>C. micaceus</i>	KFRI 1768	85.0±0.0	85.0±0.0	0
Sparassidaceae	<i>Sparassis latifolia</i>	KFRI 1713	45.2±0.8	39.1±0.9	13.4*
Stereaceae	<i>Stereum ostrea</i>	KFRI 1300	85.0±0.0	85.0±0.0	0
	<i>S. ostrea</i>	KFRI 1527	85.0±0.0	85.0±0.0	0
Strophariaceae	<i>Agrocybe praecox</i>	KFRI 1282	34.5±1.2	35.2±1.0	0
	<i>A. praecox</i>	KFRI 1789	51.5±2.7	48.0±1.6	6.7*
	<i>Hypholoma fasciculare</i> -	KFRI 1587	45.4±1.8	47.4±2.0	0
	<i>Hypholoma lateritium</i>	KFRI 1098	51.5±1.4	49.5±1.8	3.8*
	<i>H. lateritium</i>	KFRI 1613	58.8±1.6	58.5±0.7	0

Data are shown as means±S.E. of 7 replicates of the mycelial growth on PDA. Significant different in means from two years compared to the one year are indicates as * $p<0.05$.

의 생장력이 미리 결정되는 경우가 많다[10].

PDA 사면배지에서 균류의 보존기간이 1년과 2년 경과한 것에서 같은 균사활력을 나타낸 균주들은 매우 상당기간 균주의 활력을 유지할 수 있음을 알 수 있었다. 이들 균주들은 2년에 한번 균주의 계대배양 해도 큰 문제는 없을 것으로 판단되었다. 반면, 보존기간이 1과 2년에서 차이를 보이는 균주와 균주 활력이 급격히 떨어지는 균주들은 1년에 한번 균주의 계대배양이 적합한 것으로 보인다.

목질분해 효소 활성 조사

수용성 cellulose 유도체의 일종인 CMC는 cellulase에 의해 가수분해될 수 있는 β -1,4-glucosidic bond가 존재하는 기질이며, cellulase를 생산하는 균주들을 검색하는 데에 유용한 기질이 된다[4]. Table 2에 나타난 것과 같이 PDA 배지에서의 균사 생장력의 감소가 없었던 갈색먹물버섯(*C. micaceus*), 구름버섯(*T. versicolor*), 개암버섯(KFRI 1613), 자작나무버섯(*P. betulinus*)은 CM-cellulase의 활성 감소가

나타나지 않았다. 반면, 균사의 생장력 감소가 나타나지 않았던 갈색꽃구름버섯(*S. ostrea*), 잔나비볼로초(*G. applanatum*), 복령(*W. extensa*)은 CM-cellulase의 활성이 보존기간이 길어질수록 감소한 것을 볼 수 있었다. 균사의 생장력이 많이 감소한 저령(*P. umbellate*)은 CM-cellulase의 활성도 16.7%로 다른 균주들에 비해 많이 감소하였다. 갈색꽃구름버섯(KFRI 1300), 벗짚버섯(KFRI 1789), 복령(*W. extensa*), 저령(*P. umbellate*), 뽕나무버섯(*A. mellea*), 산느타리(*P. pulmonarius*), 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 활성 감소가 다른 버섯 균사체들에 비해서 큰 것으로 나타났다.

균주들의 laccase 활성을 조사하기 위해 ABTS를 기질로 하는 평판배지에 균주를 접종하여 25°C에서 5일간 암배양하였다. 이 방법은 laccase의 활력을 간편하게 측정할 수 있다는 장점이 있으며, ABTS가 균주의 laccase에 반응하여 생기는 청록색 발색대의 크기를 측정하였다(Table 2). 구름버섯(*T. versicolor*), 개암버섯(KFRI 1098), 자작나무버섯(*P.*

Table 2. CM-cellulase and laccase activities on agar plate of fungal strains according to preservation periods (one year and two years)

Scientific name	Strain No.	Cellulase activity (mm) ^a			Laccase activity (mm) ^b			Laccase activity (Unit/mL) ^c		
		One year	Two years	Reduction rate (%)	One year	Two years	Reduction rate (%)	One year	Two years	Reduction rate (%)
<i>A. praecox</i>	KFRI 1282	34.3±0.6	31.7±2.5	7.5*	47.7±1.4	47.1±1.4	1.2*	16.33	11.18	31.5*
<i>A. praecox</i>	KFRI 1789	46.0±0.4	38.7±0.6	15.8*	55.8±0.9	55.2±.9	1	1.42	1.06	25.3*
<i>P. betulinus</i>	KFRI 1040	43.7±0.9	44.0±0.6	0	0.0±0.0	0.0±0.0	0	0.19	0.19	0
<i>G. applanatum</i>	KFRI 1523	29.6±1.3	27.4±2.0	7.4*	48.9±0.9	42.7±2.1	12.6*	0.84	0.33	60.7*
<i>G. applanatum</i>	KFRI 1815	35.4±1.3	33.6±0.9	5*	46.2±1.2	47.7±1.7	0	5.63	3.13	44.4*
<i>H. erinaceus</i>	KFRI 1622	20.3±0.7	19.3±0.3	4.9*	30.6±0.7	24.8±1.1	18.9*	3.18	1.09	65.7
<i>H. erinaceus</i>	KFRI 1950	19.7±1.8	19.7±0.3	0	19.4±1.1	17.6±0.7	9.2*	1.24	0.77	37.9*
<i>P. linteus</i>	KFRI 320	15.4±1.5	13.0±0.7	15.5*	59.4±1.5	56.4±0.5	5*	49.4	33.77	31.7*
<i>A. mellea</i>	KFRI 1617	34.1±1.2	28.4±2.1	16.7*	33.9±4.0	26.5±1.7	10.3*	1.55	0.91	41.2*
<i>P. pulmonarius</i>	KFRI 1914	41.2±0.4	35.2±2.1	14.5*	36.7±1.7	32.9±0.9	10.3*	-	-	-
<i>P. umbellatus</i>	KFRI 1820	31.6±0.8	26.3±1.4	16.7*	18.2±1.1	15.2±1.3	16.4*	-	-	-
<i>P. coccineus</i>	KFRI 1160	50.0±0.0	50.0±0.0	0	40.6±1.5	37.3±0.9	8.1*	2.91	1.77	39.1*
<i>T. versicolor</i>	KFRI 1528	50.0±0.0	50.0±0.0	0	38.8±0.5	38.5±0.6	0	11.34	9.05	20.1*
<i>T. versicolor</i>	KFRI 1913	50.0±0.0	50.0±0.0	0	37.7±0.7	37.9±1.2	0	25.43	19.02	25.2*
<i>W. extensa</i>	KFRI 1107	41.9±1.5	37.3±1.3	10.9*	27.6±3.4	16.9±5.9	38.7*	0.41	0.34	17*
<i>C. micaceus</i>	KFRI 1291	50.0±0.0	50.0±0.0	0	43.8±0.5	38.8±1.0	11.4*	-	-	-
<i>C. micaceus</i>	KFRI 1768	50.0±0.0	50.0±0.0	0	40.8±0.7	39.5±1.0	3.1*	-	-	-
<i>S. latifolia</i>	KFRI 1713	24.0±0.4	24.8±0.3	0	0.0±0.0	0.0±0.0	0	0.29	0.28	3.4*
<i>S. ostrea</i>	KFRI 1300	34.0±1.9	29.9±1.7	12*	23.9±1.2	16.4±1.1	31.3*	-	-	-
<i>S. ostrea</i>	KFRI 1527	31.4±0.8	30.2±1.0	3.8*	20.5±0.9	20.1±1.1	1.9*	0.99	0.75	24.2*
<i>H. fasciculare</i>	KFRI 1587	45.6±1.0	42.5±1.3	6.7*	36.8±1.8	35.0±1.4	4.8*	0.84	0.67	20.2*
<i>H. lateritium</i>	KFRI 1098	45.5±2.3	43.6±2.2	4.1*	34.6±1.3	35.7±1.3	0	1.39	1.2	13.6*
<i>H. lateritium</i>	KFRI 1613	44.6±0.7	44.6±0.7	0	36.4±1.1	34.1±1.4	6.3*	1.7	1.17	31.1*

Hydrolysis circle on carboxymethylcellulose(CMC) agar plate after eight days of inoculation.

Chromogenic zone on 2,2'-2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) agar plate five days of inoculation.

One unit of enzyme activity is defined as the amount require to oxidese 1imol ABTS for a minute.

Data are shown as means±S.E. of 5 replicates of extracellular enzyme activity. Significant different in means from two years compared to the one year are indicates as * $p < 0.05$.

betulinus), 잔나비불로초(KFRI 1815)는 laccase의 활력 감소가 나타나지 않았다. 꽃송이버섯(*S. latifolia*)과 자작나무버섯(*P. betulinus*)은 전혀 laccase를 분해하는 능력이 없는 것으로 나타나 전형적인 갈색부후균의 특성을 나타냈다. 갈색꽃구름버섯(KFRI 1300), 복령(*W. extensa*), 저령(*P. umbellate*), 노루궁뎅이(KFRI 1622)의 경우 보존기간이 2년 이 지난 균주의 활력이 1년이 지난 균주에 비해 큰 폭으로 감소한 것을 볼 수 있었다. 또한 동일 종이지만, 균주가 다름에 따라 laccase의 효소활성의 차이가 나타나고 있었다(갈색꽃구름버섯(*S. ostrea*), 개암버섯(*H. lateritium*), 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceus*), 잔나비불로초(*G. applanatum*)). 한편 간버섯(*Pycnoporus coccineus*), 갈색먹물버섯(*C. micaceus*), 개암버섯(*H. lateritium*), 구름버섯(*T. versicolor*), 벗

짚버섯(*L. leucothites*), 잔나비불로초(*G. applanatum*), 목질 진흙버섯(*P. linteus*)은 다른 균주들에 비해 높은 laccase 활성을 나타내었으며, 갈색꽃구름버섯(*S. ostrea*)과 복령(*W. extensa*)은 앞의 버섯 균주들보다는 낮은 활성을 나타내었다.

최소한의 적은 영양물질만 첨가되어 있는 ABTS 평판배지가 아닌 종균 및 보존균주 제작에 이용하는 PDB 배양액에 각각의 균주들을 접종하여 1주일간 배양 후 laccase의 활성을 측정하였다(Table 2). Homolka[11]에 의하면 laccase의 활성이 배양기간이 길어질수록 증가하다가 감소하게 되는 것을 확인할 수 있는데, 이를 참고하여 6일간 배양 후, 배양액 속의 laccase의 활성을 측정하였다. 복령과 자작나무버섯을 제외한 다른 균주들은 보존기간이 길어짐

에 따라 laccase의 활성이 감소하는 것을 볼 수 있다. 노루궁뎅이(KFRI 1622), 잔나비불로초(KFRI 1523)는 ABTS 평판배지에서와 같이 다른 균주들에 비해 높은 감소율을 나타냈다(감소율 60% 이상). 개암버섯(KFRI 1098)은 다른 균주들에 비해 감소율이 낮은 것으로 나타났으며, 다른 균주들은 20%내외에서 40%이상의 활성 감소율을 나타냈다. 개암버섯(*H. lateritium*), 노루궁뎅이(*H. erinaceus*), 벗짚버섯(*A. praecox*), 잔나비불로초(*G. applanatum*)는 평판배지에서처럼 같은 종끼리 비교하였을 경우 감소하는 정도가 같은 경향을 나타내었다. 반면에 구름버섯(*T. versicolor*)은 반대의 경향을 나타내었다. 그러나 구름버섯(*T. versicolor*)의 경우 다른 균주들에 비해 laccase의 활성 자체가 높기 때문에 감소율은 낮지만 활성 자체의 수치는 다른 균주에 비해 높으며, 이는 벗짚버섯(KFRI 1282)와 목질진흠버섯(*P. linteus*)도 마찬가지이다. 벗짚버섯(*A. praecox*)의 경우 KFRI 1282 균주의 활성 감소가 KFRI 1789 균주에 비해서 더 크지만, laccase의 활성은 KFRI 1282 균주가 더 높게 나타났다.

Laccase의 활성도를 측정한 두 가지 방법에서의 보존기간에 따른 활성의 감소폭이 다르게 나타났다. PDB 배양액에서 배양한 균주들에서의 활성 감소폭이 더 크게 나타났다. 녹색으로 발색되는 정도를 확인한 방법의 경우 평판배지의 영양분들이 매우 적으며, laccase에 반응하는 기질인 ABTS를 제외하면 적은 양의 성장요소들만이 첨가되어 있다. 이와는 반대로 PDB 배양액은 증균을 위한 배양액으로서, ABTS 평판배지에 비해 영양분이 다량 들어있기 때문에 균주들이 빠른 성장을 보이게 된다. 보존기간이 2년이 지난 균주와 1년이 지난 균주의 경우 PDB 배양액에서의 균주의 성장 및 효소의 활성이 증진되는 속도가 보존기간이 1년 더 적은 균주들이 더 빠르기 때문에 상대적으로 2년간 보존되어 있던 균주들에 비해 높은 효소 활성을 나타내며, 그로 인하여 활성의 감소율이 평판배지에 비해 더 큰 폭으로 감소한 것으로 보인다.

균사의 성장에 주요하게 작용하는 두 효소인 cellulase와 laccase가 균주의 보존기간에 따라 받는 영향이 균주들마다 각각 다른 것을 확인할 수 있었다. 두 효소들 중 laccase가 보존기간에 따라 감소되는 빈도는 더 많았다. 복령(*W. extensa*), 저령(*P. umbellatus*), 갈색꽃구름버섯(*S. ostrea*)은 두 효소의 활성이 감소하는 경향이 유사하였다. 간버섯(*P. coccineus*), 갈색먹물버섯(*C. micaceus*), 개암버섯(KFRI 1613)은 laccase만이 보존기간에 영향을 받았으며, 개암버섯(KFRI 1098), 노루궁뎅이(KFRI 1950)는 cellulase만이 감소한 것을 볼 수 있다.

균주들의 균사 생장력이 세포 외 효소의 활성과 반드시 비례관계에 있다고는 볼 수 없다. Jeon[12]은 CMC agar plate상에서 CM-cellulase 활성이 높다고 해서 균주들이 cellulase를 이용해 CMC agar plate에 첨가되어 있는 CMC를 바로 탄소원으로 이용하여 생장을 하는 것이 아니기 때

문에 균사의 생장력이 CM-cellulase의 활성과 비례적인 관계에 있지 않을 수도 있다고 언급하였다. 또 다른 효소인 laccase의 경우에도 이와 같은 경향을 나타내는데, Voyron[8], Homolka[13]의 연구에서도 보존균주들의 균사 생장과 효소의 활성이 완전한 비례관계가 아닌 것으로 알려졌다. 본 연구에서도 개암버섯(*H. lateritium*), 잔나비불로초(*G. applanatum*), 갈색꽃구름버섯(*S. ostrea*)은 균사의 생장력에 비해 효소의 활성이 낮은 편이며, 복령(*W. extensa*)은 균사의 성장에 비해 효소 활성을 나타내는 직경의 크기가 크게 나타났다. 이를 통해서 보존균주들의 균사가 배지에서 생장하는 속도와 배지에서 나타나는 효소의 활성이 일치한다고 단정지을 수는 없지만, 보존중인 균주의 활력을 조사하는 데에는 필요한 요소라고 할 수 있다.

균주들은 보존기간이 오래될수록 오염이 되기 쉬우며 유전적 형질을 보존하기 어렵고 유전적 안정성이 변화하며, 생리적 특성의 변화가 나타나며, 균주의 영양 상태에 따라 활력의 변화 및 불규칙한 균사의 생장이 나타난다. 트랜스포존과 같은 세포외적인 유전적 요소들의 변이가 일어나면서 형태적인 모습에서 다형성을 나타내는 균주들도 나타나게 된다[1, 8]. 많은 담자균류의 경우 무성포자를 형성하지 않으며, 포자를 받는 것이 환경조건에 매우 민감하기에[14], 보존하는 동안 균주의 생리적 활성 및 균사의 형태가 변화할 수도 있다. 세포가 외부 환경 요인에 의한 스트레스 방어기작이 작동하여 세포자연사나 노화가 일어나게 된다면 보존중인 균사체에 유전적 변이가 일어날 수 있기에[8, 11], 주기적으로 활력을 측정해주어야 한다.

앰플에 보존을 하는 동결건조 방법은 특별한 장치가 필요하지 않으며, 가볍고 잘 이동하지 않으며, 오래 지속이 되는 방법으로, 분생자, 포자, 아포형성 균류의 보존에 이용이 된다. 그러나 사상형 균주와 몇몇 균근성 버섯, 일부 식용버섯의 경우 동결건조에 매우 민감하다고 보고되어 있다. *Amanita*, *Cenococcum*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lepista*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tomentella*들은 동결건조 방법에서 생존을 하지 못한 것으로 보고되어 있다[15]. 액체질소를 이용한 초저온보존 방법은 좋은 보존방법이긴 하나, 꾸준히 액체질소를 보급해줘야 하기 때문에, 다른 보존 방법들에 비해 매우 많은 비용이 들어가게 된다[16]. 이를 해결하기 위해 균사체를 필라이트에 부착시켜 균주를 보존하는 방법이 개발되어 담자균류의 보존방법에 이용이 되고 있다[11].

적 요

계대배양은 균류의 보존을 위해 가장 일반적 방법이지만, 반복된 계대배양을 하는 동안 저질로 변이들이 축적된다는 단점이 있다. 계대배양의 횟수를 줄이기 위해, 사면배지에서 4°C로 보존하는 것의 효과를 다양한 균주들의 균사 생장과 목질 분해효소의 활성을 통해 조사해보았다. 갈색

꽃구름버섯, 갈색먹물버섯, 구름버섯, 노란개암버섯, 복령, 산느타리, 자작나무버섯, 잔나비불로초를 포함한 버섯들은 2년 이상의 보존기간에도 영향을 받지 않아서, 이는 2년에 한번 계대배양을 하여도 유지가 가능하다는 것을 의미한다. 그 이외의 실험 균주들은 2년이 지났을 경우 활력과 효소의 활성이 크게 감소한 것으로 나타났으며 1년에 한 번 계대배양 하는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 군사 성장력의 회복과 세포외 효소의 활성은 약간의 상관관계가 나타났다. 결론적으로, 보존기간에 따른 군사활력 및 효소의 활성은 균류 보존의 횡수를 정하는 하나의 방법으로 사용될 수 있을 것으로 여겨진다.

감사의 글

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

REFERENCES

1. Homolka L. Preservation of live culture of basidiomycetes - Recent methods. *Fungal Biol* 2014;118:107-25.
2. Ryu SR, Ka KH, Lee BH, Park H, Bak WC. Comparison of viability in basidiomycetes after low temperature storage according to storage period. *Kor J Mycol* 2011;39:141-4.
3. Shin MS, Hong SB. Maintenance of filamentous fungi in Korean Agricultural Culture Collection (KACC). *Kor J Mycol* 2014;42:97-103.
4. Ka KH, Jeon SM, Ryoo R, Ryu SH, Kim MG, Bak WC, Park JW, Koo CD, Eom AH. Management of genetic resources of forest microorganisms. Research report: Korea Forest Research Institute; 2011.
5. Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr Microbiol* 2008;57:503-7.
6. Jeon SM, Ka KH. Mycelial growth and extracellular enzyme activities of wood-decaying mushroom strains on solid media. *Kor J Mycol* 2014;42:40-9.
7. Chen S, Ma D, Ge W, Buswell JA. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;218:143-8.
8. Voyron S, Roussel S, Munaut F, Varese GC, Ginepro M, Declerck S, Marchisio VF. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycol Res* 2009;1024-38.
9. Lee HJ, Ro HS, Kim JG, Lee CY. Mycelial viability and cultivation characteristics of *Hypsizygus marmoreus* after long-term storage in different conditions. *J Mushrooms* 2014;12:29-34.
10. Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 2006;161:361-68.
11. Homolka L, Lis L, Nerud F. Basidiomycete cultures on perlite survive successfully repeated freezing and thawing in cryovials without subculturing. *J Microbiol Methods* 2007;69:529-32.
12. Jeon SM, Kim MS, Ka KH. Effects of medium, temperature and pH on mycelial growth and cellulose activity of ectomycorrhizal fungi from Korean forests. *Kor J Mycol* 2012;40:191-203.
13. Homolka L, Lis L, Eichlerov I, Nerud F. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. *J Microbiol Methods* 2001;47:307-13.
14. Homolka L, Lisa L, Eichlerov, Valskova V, Baldriam P. Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. *Fungal Biol* 2010;114:929-35.
15. Obase K, Lee SY, Chun W, Lee JK. Regeneration of ectomycorrhizal fungal isolates following deep freezer storage. *Mycobiology* 2011;39:133-6.
16. Kitamoto Y, Suzuki A, Shimada S, Yamanaka K. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep freezing. *Mycoscience* 2003;43:143-9.