

(S2-C)

미생물 균주의 장기보존

-효모 및 곰팡이의 효율적 보존 방법에 관하여-

한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

유전자은행

배 경 숙

I. 개 론

일반적으로 미생물 균주의 보존은 다양한 방법에 의해서 이루어지고 있다. 특정 미생물 균주의 보존을 위해서는 다음의 여러가지 사항을 고려하여 적절한 보존방법을 선택하여야 한다.

1. 보존방법 선택시의 고려사항

- ① 보존과정, 보존기간 중 viability를 유지할 것.
- ② 보존 중 population의 변화가 적을 것.
- ③ 특정 성질의 상실, 획득이 없이 유전적으로 안정할 것.
- ④ 오염의 가능성이 없을 것.
- ⑤ 인력, 장비, 재료, 유지시설 및 설비 등 경제적으로 유리할 것.
- ⑥ 보존하고자 하는 균주의 수.
- ⑦ 보존하고자 하는 균주의 중요도.
- ⑧ 균주분양의 빈도.
- ⑨ 균주의 사용빈도.

2. 보존방법

① 계대배양 (Subculturing)

일정기간에 한번씩 적정배지에 옮겨 배양하는 방법.

② 건조 (Drying)

가장 널리 사용되어 왔던 미생물 보존의 방법으로 주로 곰팡이류의 보존에 널리 적용 됨.

- 모래, 토양, Silica gel 등 - 포자형성 곰팡이류의 보존
- Paper strip 또는 discs - 효모류, Staphylococci 등의 보존
- Predried plug - Neisseria, Vibrio 등 동결건조 불능 균주
- Gelatin discs

③ 동결건조 (Freeze-drying)

동결된 시료로부터 수분을 기화시켜 제거하는 방법으로 많은 종류의 미생물의 장기보존방법으로 사용되고 있음. 조류, 원생동물의 보존에는 부적합.

- L-건조 - 시료를 동결시키지 않도록 조절하며 건조하는 방법
- 시료의 성장상태, 성장온도, 동결건조속도, 최종동결온도, 건조속도 및 시간, 최종습도 등의 조절이 장기보존의 관건

④ 동결보존 (Freezing)

5% DMSO 또는 10% glycerol 등을 첨가하여 -20° C 이하의 온도에서 보존하는 방법으로 -70° C에서의 보존이 널리 사용되며, -140° C 이하의 액체질소탱크에서의 보존은 반영구적이다.

II. 곰팡이의 효율적 보존방법

1. 계대배양

- ① 한천사면 배지상의 보존 - 상온보존시는 2-6달, 냉장보존시는 1년 정도의 보존이 가능. 일부 물곰팡이류는 부적합하며 작은 곤충류의 오염을 방지하기 위하여는 냉장보존이 유리하다. (표 1)

표 1. 곰팡이류의 한천배지상에서의 보존기간

곰팡이의 종류	보존조건	보존기간	곰팡이의 종류	보존조건	보존기간
Ascomycotina	4-7° C	1 year	Oomycetes	4° C	1 year
	RT	2-6 mon		16° C	2-3 mon
Basidiomycotina	4-7° C	1 year	Rhizopus and other low-temp-sensitive fungi	16° C	6 mon
	RT	2-6 mon		60% rel humidity	
Chytridiomycetes	16° C	2-3 mon	Zygomycotina	4-7° C	1 year
Deuteromycotina	5° C	1 year	Dermatophytes	RT	1-2 mon
Dermatophytes	18-25° C on hair	2-3 mon			

- ② 한천사면배지를 oil로 덮어 보존 - 약 1 cm 두께로 mineral oil을 덮어 줌으로써 산소의 공급을 중단하여 대사작용을 한정시키며 탈수를 방지함으로써 보존기간을 연장할 수 있다. 일반적으로 10년 이상 보존가능하다. (표 2)

③ 멸균증류수에서의 보존 - colony의 가장자리 균사 혹은 한천배지 덩어리를 떼어 멸균증류수에서 보존하는 방법으로 수서곰팡이의 보존에 적합하다. 때로 viability나 infectivity가 상실되는 수가 있으므로 2년 미만의 계대가 적당하다. (표 3)

표 2. Oil 보존시의 여러 곰팡이의 보존기간 (상온, 영국 CMI의 결과)

곰팡이의 종류	보존기간(년)	곰팡이의 종류	보존기간(년)
<i>Alternaria*</i>	0.5	<i>Aspergillus</i> spp.	20-32
Basidiomycetes	10	<i>Chlamydomyces palmarum</i>	32
<i>Corticium</i> spp.	20-32	<i>Drechslera portulacae</i>	32
<i>Fusarium</i> spp.*	0.5	<i>Mortierella alpina</i>	12
<i>Nectria</i> spp.	32	<i>Mucor</i> spp.	20
<i>Penicillium</i> spp.	20-32	<i>Pythium</i> spp.	3
<i>Trichoderma harzianum</i>	27	<i>Trichophyton</i> spp.	12
<i>Verticillium</i> spp.	32	<i>Volutella ciliata</i>	32

* Pathogenicity의 유지

표 3. 곰팡이의 멸균 증류수 보존

Fungus	Inoculum	Storage temperature (°C)	Period before transfer (years)
<i>Cladosporium mansonii</i>	spores and hyphae	room	1
<i>Colletotrichum</i>	agar	1	0.5
<i>Conidiobolus</i> spp.	agar blocks	25	1.75
Ectomycorrhizal fungi	agar blocks	5	1-3
<i>Entomophthora coronata</i>	agar blocks	25	1.75
<i>Epidermophyton floccosum</i>	spores and hyphae	room	1
<i>Geotrichum</i> spp.	spores and hyphae	room	1
Hymenomycetes	agar blocks	25	0.4-1.75
<i>Monilia</i> spp.	spores and hyphae	room	1
Mucorales	agar blocks	25	0.4-1.75
<i>Nectria radicola</i>	agar blocks	25	1.75
<i>Phytophthora</i> spp.	agar blocks	15	2-3
<i>Pythium</i> spp.	agar blocks	15	2-3
<i>Saprolegnia furcata</i>	mycelium on tellurite agar blocks	4	8
<i>Trichophyton rubrum</i>	spores and hyphae	room	1

2. 건조보존

곰팡이류의 포자는 균사에 비해 함수량이 적어 건조보존에 적합하다. 멸균된 토양, 사토, 또는 무수 규사 등이 탈수의 기질로 사용된다.

- ① 멸균토양을 이용한 보존 - 자연상태를 모사한 방법으로 곰팡이의 포자 또는 균사의 현탁액을 멸균토양에 접종하여 상온에서 10일 정도 배양한 후 상온 또는 냉장 보존한다.

표 4. 멸균토양에서의 여러 곰팡이의 보존기간 (영국 CMI의 결과)

곰팡이의 종류	보존온도	기간	곰팡이의 종류	보존온도	기간
<i>Alternaria</i> spp.	RT	5	<i>Aspergillus</i> spp.	RT	5
<i>Calonectria</i> spp.	4-7° C	10-20	<i>Chaetomium</i> spp.	RT	5
<i>Circinella</i> spp.	RT	5	<i>Cylindrocarpon</i> spp.	4-7° C	10-20
<i>Cylindrocladium</i> spp.	4-7° C	10-20	<i>Fusarium oxysporum</i>	RT	5
<i>Fusarium</i> spp.	4-7° C	10-20	<i>Giberella</i> spp.	4-7° C	10-20
<i>Melanospora</i> spp.	4-7° C	10-20	<i>Nectria</i> spp.	4-7° C	10-20
<i>Penicillium</i> spp.	RT	5	<i>Pseudocercospora</i>	4° C	1
<i>Rhizopus nigricans</i>	RT	5	spp. *		
<i>Septoria</i> spp. *	4° C	1.75	<i>Thielavia</i> spp.	4-7° C	15

* Host infectivity의 유지

- ② Silica gel을 사용한 보존 - 냉장된 탈지우유에 만든 포자 현탁액을 -20° C의 멸균된 silica gel과 섞어 상온에서 1-2주 방치하여 완전 건조시킨 후 밀폐하여 냉장 보존한다. 반드시 포자를 형성하는 곰팡이에서만 적용되며 하등곰팡이류에서는 포자를 형성하여도 silica gel 보존에 실패하였다. (표 5)

3. 동결건조

감압상태에서 시료를 냉동시켜 기화에 의해 건조시키는 방법과 미리 동결된 시료를 감압건조시키는 두가지 방법이 사용된다. 동결건조시는 시료의 냉해를 방지하기 위하여 탈지우유(10%), 혈청, peptone 및 당류 혹은 그 혼합물을 냉해방지제로 사용하여야 하며 대부분의 포자형성 곰팡이류가 안정하게 보존된다. 적절한 냉해방지제의 선택과 적절한 냉동속도, 건조중의 동결상태 유지, 건조후의 함수도, 보존중 산소와의 접촉여부에 따라 장기보존이 가능하다. (표 6)

표 5. Silica gel 보존 8-11년 후의 여러 곰팡이의 생존도 (화란 CBS의 결과)

Tested % Survival			Tested % Survival		
<i>Mastigomycotina</i>			<i>Ascomycotina</i>		
Chytridiomycetes	5	0	Clavicipitales	1	100
Oomycetes	5	0	Diaporthales	5	60
<i>Zygomycotina</i>			Dothideales	10	40
Zygomycetes	34	59	Endomycetales	2	100
<i>Basidiomycotina</i>			Eurotiales	4	100
Hymenomycetes	19	52	Helotiales	1	0
Gasteromycetes	1	0	Hypocreales	4	75
<i>Deuteromycotina</i>			Ophiostomatales	4	25
Coelomycetes	28	75	Pezizales	4	75
Hyphomycetes	250	81	Sordariales	38	79
			Sphaeriales	6	50

표 6. 동결보존 7-20년후의 여러 곰팡이의 생존도 (영국 CMI의 결과)

Tested % Survival			Tested % Survival		
<i>Mastigomycotina</i>			<i>Ascomycotina</i>		
Chytridiomycetes	6	0	Ascosphaerales	7	100
Oomycetes	29	0	Clavicipitales	13	62
<i>Zygomycotina</i>			Diaporthales	36	89
Zygomycetes	34	59	Diatrypales	2	50
<i>Basidiomycotina</i>			Dothideales	236	95
Hymenomycetes	19	52	Elaphomycetales	1	100
Gasteromycetes	1	0	Endomycetales	36	100
Urediniomycetes	3	0	Eurotiales	85	100
Ustilaginomycetes	24	79	Gymnoascales	88	98
<i>Deuteromycotina</i>			Helotiales	44	95
Coelomycetes	28	75	Hypocreales	132	93
Hyphomycetes	250	81	Microascales	49	100
			Ophiostomatales	45	98
			Pezizales	56	91
			Polystigmatales	13	100
			Rhizomatales	6	100
			Sordariales	351	97
			Sphaeriales	66	67
			Taphrinales	6	100

4. 냉동보존

시료의 온도를 낮추면 그 대사활동이 늦추어지고, 세포내부의 수분이 얼게되면 어떠한 반응도 일어나지않고 모든 대사활동이 멈추게 된다. 따라서 현재 통용되고 있는 방법 중 가장 확실한 보존방법은 액체질소의 액체부분 (-196° C) 보존이라 할 수 있다.

냉동보존은 냉동의 방법 (1° C/min, 200° C/min)과 최종보존온도 (-20, -70, -135, -196° C) 등이 생존율에 영향을 미치는데, 천천히 냉동시켜 -130° C 이하에서 보존하는 것이 가장 안정한 방법이다. 곰팡이류의 냉동보존시의 냉해방지제로는 주로 10% glycerol, 5% DMSO가 사용되며, 특히 식물병원균의 병원성 유지를 위해서는 냉동보존이 필수적이다.

표 7. 액체질소에서 냉동보존 중인 곰팡이류의 생존도 (영국 CMI의 결과)

Tested % Survival			Tested % Survival		
<i>Mastigomycotina</i>			<i>Ascomycotina</i>		
<i>Chytridiomycetes</i>	56	16	<i>Ascosphaerales</i>	7	86
<i>Hyphochytriomycetes</i>	5	60	<i>Clavicipitales</i>	15	87
<i>Oomycetes</i>	348	50	<i>Diaporthales</i>	17	100
<i>Zygomycotina</i>			<i>Dothideales</i>	109	89
<i>Zygomycetes</i>	267	95	<i>Elaphomycetales</i>	1	0
<i>Basidiomycotina</i>			<i>Endomycetales</i>	10	100
<i>Hymenomycetes</i>	149	96	<i>Eurotiales</i>	56	98
<i>Gasteromycetes</i>	8	100	<i>Gymnoascales</i>	41	98
<i>Urediniomycetes</i>	18	56	<i>Helotiales</i>	33	100
<i>Ustilaginomycetes</i>	6	100	<i>Hypocreales</i>	39	97
<i>Deuteromycotina</i>			<i>Microascales</i>	13	100
<i>Coelomycetes</i>	238	94	<i>Ophiostomatales</i>	22	100
<i>Hyphomycetes</i>	1543	95	<i>Pezizales</i>	41	95
			<i>Polystigmatales</i>	8	75
			<i>Rhizismatales</i>	7	100
			<i>Sordariales</i>	178	96
			<i>Sphaeriales</i>	59	86
			<i>Taphrinales</i>	5	100

5. 곰팡이 종류에 따른 최적의 보존방법

① *Mastigomycotina*

액체질소보존이 최적의 방법이나 불가능할 경우 멸균증류수 보존방법을

사용 2년에 한번씩 계대한다.

② *Zygomycotina*

Mucor, *Rhizopus* 속의 보존은 액체질소보존이 최적이며, 이들을 제외한 대부분의 균주는 동결건조 할 수 있다.

③ *Ascomycotina*

대부분의 *Ascomycetes*는 동결건조, 액체질소보존이 최적이며, silica gel 을 이용한 건조보존도 효율적이며, 포자형성이 잘 안되는 경우는 냉동보존한다.

④ *Basidiomycotina*

고등균류는 배양시 일반적으로 균사만을 형성하므로 보존에 어려움을 겪는다. 이런 종류의 곰팡이는 주로 계대배양, 혹은 액체질소보존이 최적이다. 균사의 벽이 두꺼운 경우는 동결건조방법을 사용하기도 하나 생존율이 매우 낮다. 한편, 자연계에서 담자포자를 채취하여 이를 동결보존하기도 한다.

⑤ *Deuteromycotina*

포자형성 곰팡이의 경우, 동결건조방법이 널리 사용되고 있으며, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* 등은 한천사면배지를 -18°C 에서 6개월-2년에 한번씩 계대배양하며, *Fusarium*의 경우 토양보존이 효율적이다. 최적의 방법은 역시 액체질소보존법이다.

III. 효모의 효율적 보존방법

미생물이 산업계에서 유용물질의 생산에 사용되는 경우, 생산균주의 안전한 보존은 필수적이다. Biotechnology에서 중요한 생산균주의 높은 생존도 및 균일한 배양상태의 유지야말로 사업의 흥망을 좌우할 정도로 중요한 변수이다. 일반적으로 발효공정의 관리는 standard inoculum을 사용한 시험운전 기록에 따른다. 따라서 standard inoculum의 적절치 못한 보존으로 말미암은 생산의 차질은 매우 심각하다. 특히 유전적으로 조작된 균주의 경우 더욱 심각하다. 그러므로 발효산업에서 널리 사용되고 있는 효모류의 적절한 보존방법의 선택은 제 1의 조건이라 할 수 있다.

1. 계대배양

계대보존시의 고려사항은 계대기간의 연장이다. 효모의 생존력의 연장은 대사활동을 감소시킴으로써 얻어지는데, 보존온도를 낮추거나 산소와의 접촉을 차단함으로써 가능하다.

대부분의 자낭균류 효모는 주로 한천배지에서 자낭포자를 형성하므로 균

주의 안정성이 중요한 경우 액체배지의 사용이 유리하다. 반면, 비발효성 효모의 경우는 한천배지에서 더 생존력이 좋으며, *Brettanomyces*, *Dekkera* 속은 과량의 유기산을 생성하므로 CaCO_3 등을 첨가함으로써 생존력을 높일 수 있다. *Kloeckera* 혹은 *Hanseniaspora* 등은 비타민의 첨가로 계대기간을 연장할 수 있으며, 특정 물질에 대한 내성, 내염성을 나타내는 효모류의 경우 이들 필요물질을 첨가하여 계대함으로써 안정하게 보존할 수 있다.

대부분의 효모류는 YM, PDA, wort agar, SDA 등에서 잘 자라며, 담자균류의 효모는 특히 PDA 배지가 적합하다.

보존은 대사활동이 감소될 정도의 낮은 온도이면 적합($2-4^\circ\text{C}$)하며, 일반적으로 6개월에 한번씩 계대한다. *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Brettanomyces* 등은 2개월에 한번씩 계대해야 한다. Oil을 덮어 보존하는 경우 계대기간을 2년 정도로 연장할 수 있으나 균주에 따라 변이가 심하므로 주의 필요로 한다.

2. 건조보존

① Silica gel을 이용한 건조보존 - 멸균된 silica gel을 차게 식힌 5% 탈지우유에 현탁한 효모시료와 섞어 얼음수조에서 건조시켜 밀폐후 냉장보존한다. 영국의 NCYC의 실험결과 탈지우유를 사용한 건조보존 효모류의 보존기간이 2년 미만으로 나타났으나, 일본의 IFO의 경우 실험한 200 여 균주의 90%가 10년이상 보존가능하다고 보고하였다.

② Filter paper를 이용한 건조보존 - 사방 1 cm 크기의 두꺼운 filter paper를 멸균하여 효모현탁액을 서너방울 떨어뜨린 후 건조기에서 건조시킨 후 밀폐용기에 냉장보존한다. 영국의 NCYC의 실험결과 유전적 지표를 갖는 *Saccharomyces*에서 특히 안정적인 보존방법이다.

3. L-건조보존

L-건조방법은 수분을 액체상태의 시료로부터 직접 제거하는 방법으로 보존용 앰플을 감압장치에 수직연결하고 20°C 의 수조에 담근 뒤, 감압장치를 조절하여 시료의 동결이 일어나지 않는 조건으로 건조하는 방법이다.

이 방법은 일본의 IFO에서 5% Na-glutamate, 5% lactose, 6% polyvinylpyrrolidone을 함유한 인산완충용액 (pH 7.0)에 효모를 현탁하여 성공적인 결과를 얻음으로써 일반화되었다. IFO의 경우 46속, 385종의 1,710균주를 실험하여 91%의 균주가 L-건조 후 5°C 보존으로 50년 이상 생존할 것으로 보고하였다. 이들 균주는 10년이 지난 현재 여전히 높은 생존력을 나타낸다.

L-건조보존은 균사를 생성하는 효모류와 저온성 효모류, osmotolerant 효모류의 보존에는 부적합하다.

4. 동결건조

효모류의 동결건조방법은 시료의 동결과정과 건조과정의 연결정도에 따라 약간의 차이가 있는데 선동결 후건조방법보다는 원심력을 이용함 동시건조방법이 장기보존에 유리하다. 효모류의 동결건조시의 냉해방지제로는 glucose-horse serum, inositol-serum, inositol broth, sucrose, 탈지우유 등이 사용되며 7.5% glucose-horse serum이 널리 사용되고 있다.

표 8과 그림 1은 영국의 NCYC에서 실험한 결과이다. 균종에 따라 생존력에 차이가 있으며, 생존력을 높이기 위해서는 대수기 직후의 세포를 사용하고, 정체배양으로 산소접촉도를 낮출수록 유리하다. 또한, 빈영양하의 배양이 생존력을 높이기도 한다.

동결건조방법은 장기보존에 효율적이며, 계대배양에 비하여 형태적 변이, 생리적 이상, 산업적 안정성 등의 변이율이 매우 낮으며 일반적인 발효특성의 변화도 나타나지 않아 상당히 안정한 보존방법이다. 또한, 이 방법은 Standard inocula를 한꺼번에 다량 만들어 별다른 변화없이 장기보존할 수 있다는 면에서 산업적으로 특히 유용한 방법이다.

5. 액체질소보존법

효모류의 냉동보존시의 냉해방지제로는 5, 10, 20% glycerol, glycerol + DMSO, 10% DMSO, ethanol, methanol, YM broth, 5-10% hydroxyethyl starch 등이 사용되며, 5% glycerol이 다수의 효모류에서 효율적으로 작용한다. 이상적인 보존을 위해서는 냉동속도의 조절이 중요한데 대부분의 효모류에서 -30° C 까지의 감온을 2시간정도에 행한 후 냉동된 시료를 액체질소로 이동함으로써 성공적인 생존율을 얻었다. 장기보존을 위해서는 보존온도가 중요한 요인인데 -196° C의 액체부위에서의 보존이 가장 바람직하다.

액체질소보존법으로 보존된 효모류는 그 형태적 특성이 매우 안정적이며 장기간 동안 높은 생존도를 보이며, 유전적 변이에 대해서도 매우 안정하므로, 최적의 보존법이라 할 수 있다. (표 9)

6. 냉동보존법 (기계적인 냉동)

-20, -70, -90, -135° C 등의 냉동고를 이용한 보존의 경우는 10% glycerol을 냉해방지제로 사용하며 액체질소탱크를 갖추지 못한 일반 실험실

표 8. 동결건조 후의 효모류의 생존도 (영국 NCYC의 결과)

Genus	Mean % survival	Standard deviation	S.E.M.	No. of strains
<i>Brettanomyces</i>	2.21	2.53	.89	8
<i>Bullera</i>	3.7	3.05	1.76	3
<i>Candida</i>	12.95	19.1	2.45	61
<i>Citeromyces</i>	11.28	12.76	9.03	2
<i>Cryptococcus</i>	21.48	27.49	8.69	10
<i>Debaryomyces</i>	15.04	18.2	5.5	12
<i>Dekkera</i>	.35	.13	.10	2
<i>Hanseniaspora</i>	7.5	7.64	5.4	2
<i>Hansenula</i>	5.1	6.99	1.2	34
<i>Kloeckera</i>	25.44	24.74	8.75	8
<i>Kluyveromyces</i>	9.12	19.29	3.78	26
<i>Lipomyces</i>	5.29	5.46	3.15	3
<i>Metschnikowia</i>	11.19	8.64	2.88	9
<i>Nadsonia</i>	4.08	4.84	3.42	2
<i>Pichia</i>	9.10	15.54	2.63	35
<i>Rhodosporidium</i>	4.40	2.47	1.75	2
<i>Rhodotorula</i>	11.75	22.05	4.50	24
<i>Saccharomyces</i>	5.16	10.80	.45	580
<i>Saccharomycodes</i>	.01	.006	.003	5
<i>Saccharomycopsis</i>	11.36	10.4	3.83	7
<i>Schizosaccharomyces</i>	7.04	10.55	3.99	7
<i>Sporobolomyces</i>	1.4	1.37	.54	6
<i>Trichosporon</i>	8.27	11.56	4.72	6
<i>Trigonopsis</i>	.76	.91	.65	2

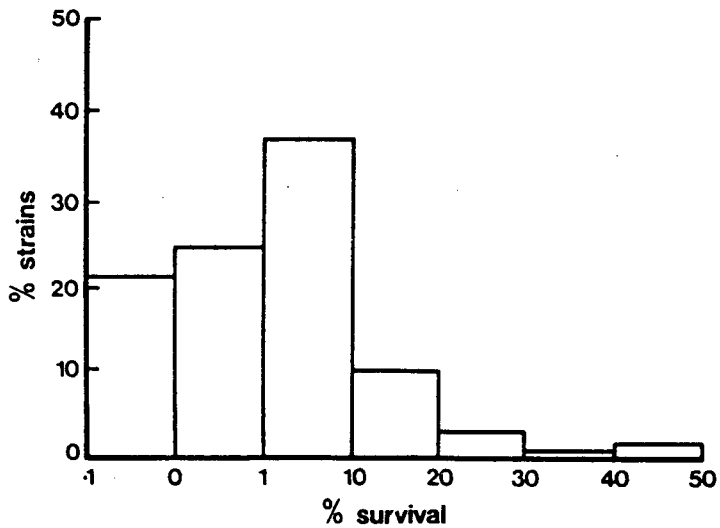


그림. *Saccharomyces cerevisiae* 117종의 동결건조 후의 % survival

에서 유용하게 이용될 수 있는 방법이다. -20°C 의 경우 2년이상 보존가능하며 보존온도가 낮아질수록 보존기간이 길어진다.

표 9. 액체질소보존법에 의한 효모류의 생존도 (영국 NCYC의 결과)

Genus	% Survival	No. of strains
<i>Brettanomyces</i>	29.2	4
<i>Candida</i>	70.4	25
<i>Cryptococcus</i>	85.4	3
<i>Debaryomyces</i>	54.8	3
<i>Hanseniaspora</i>	65	1
<i>Hansenula</i>	51.4	7
<i>Kloeckera</i>	34.2	2
<i>Kluyveromyces</i>	62.4	6
<i>Lipomyces</i>	68.7	7
<i>Pichia</i>	50.6	10
<i>Rhodotorula</i>	90.3	1
<i>Saccharomyces</i>	66.1	75
<i>Schizosaccharomyces</i>	103	2
<i>Sporobolomyces</i>	62	5
<i>Trichosporon</i>	85.6	2

7. 유전적 조작으로 만들어진 효모류의 보존

생명공학의 발달로 유전자 조작에 의해 제조된 균주의 안정적인 보존방법의 개발이 매우 중요하게 여겨지고 있다. 일반적으로 이러한 재조합 균주를 개발하고 있는 연구실에서는 이들 재조합균주를 glycerol을 첨가하여 -20 - -90°C 의 냉동고에서 보관하고 있다. 아직까지는 이들 방법에 대한 뚜렷한 연구결과가 없으나 중요한 균주의 경우 액체질소보존법이 가장 안전하다.

한편, plasmid DNA의 경우 확정된 보존방법이 보고되지 않았으나 DNA를 순수분리하여 ethanol 침전상태로 -20°C 이하에서 보존하는 것이 안전하다.

최근 일본의 IFO에서 *Saccharomyces cerevisiae*의 유전자재조합 균주를 L-건조방법으로 생존력의 상실을 최소화하는 범위에서 보존에 성공하였으나, L-건조 후 plasmid를 상실한 균주가 있어 이 방법이 안정적인 보존방법이라 하기에는 부적합하다.