

폴리프로필렌 스트로를 이용한 곰팡이의 액체질소 보존

전영아 · 신명숙 · 김효진 · 김대호 · 고승주 · 홍승범*

농업생명공학연구원 한국농업미생물자원센터(KACC)

Preservation of Fungi in Liquid Nitrogen Using Polypropylene Straws

Young-Ah Jeon, Myung-Sook Shin, Hyo-Jin Kim, Dae-Ho Kim, Seung-Joo Go and Seung-Beom Hong*

Korean Agricultural Culture Collection (KACC), National Institute of Agricultural Biotechnology

(Received February 1, 2006)

ABSTRACT: Liquid nitrogen storage is the most effective way to preserve many fungi including what cannot be lyophilized. The use of polypropylene straws instead of cryotubes has many advantages in economy, safety, convenience, and space-saving. We, Korean Agricultural Culture Collection (KACC), established the fungal preservation methods in liquid nitrogen using polypropylene drinking straws and introduced the methods in detail.

KEYWORDS: Fungi, Liquid nitrogen storage, Long-term preservation, Polypropylene straw

곰팡이 자원의 계통분류학(systematics)과 생물 다양성(biological diversity) 연구를 위해서는 적절한 배양과 보존 방법의 선택이 필수적인데, 이는 자원 자체의 생존과 함께 형태학적, 생리적 그리고 유전적 특성을 장기간 유지할 수 있어야 하기 때문이다(Nakasone *et al.*, 2004).

곰팡이 자원의 기본적인 보존 방법에는 계대배양(serial transfer), 건조(drying), 동결(freezing)이 있다. 계대배양 보존법은 주기적으로 신선한 한천배지에 계대 배양하여 5~20°C의 저온에서 보존하는 것으로 단기 보존에 적합하다. 동결 건조 보존법은 포자를 형성하는 곰팡이의 보존에 가장 적합한 방법으로서 대부분의 곰팡이가 이 방법으로 보존 가능하다.

액체질소(liquid nitrogen)를 이용하여 초저온에서 냉동 보존(이하 액체질소 보존법)할 경우, 세균(bacteria), 박테리오파지(bacteriophage), 바이러스(virus), 조류(algae), 원생생물(protozoa), 효모(yeast), 동물세포(animal cell), 식물세포(plant cell), 조직 배양체(tissue culture) 등 다양한 종류의 유기체들을 효과적으로 보존할 수 있다(Smith, 1991). 액체질소 보존법은 다양한 곰팡이 자원의 보존에도 효과적인데(Hwang, 1966, 1968; Hwang *et al.*, 1976; Butterfield *et al.*, 1974), 특히 포자형성이 잘 되지 않는 자낭균류(Ascomycota)와 균사로만 성장하는 담자균류(higher Basidiomycota) 등 동결건조 보존법의 적용이 불가능한 곰팡이의 보존에 적합하다(Nakasone *et al.*, 2004). 또한 영국의 International Mycological Institute(IMI)에서

는 다양한 곰팡이를 액체질소를 이용하여 보존할 경우 평균 93% 이상이 22년 동안 생존함을 확인한 바 있다(Smith, 1991).

다양한 보존 용기가 액체질소를 이용한 보존에 이용되고 있다. 초기에는 유리 앰플이 많이 사용되었으나 폭발의 위험으로 인해 스크루 캡(screw cap)이 있는 폴리프로필렌 재질의 크리오투브(cryotube)로 대체 되었으며(Simione *et al.*, 1977), 현재 미생물 자원의 액체질소 보존에 가장 많이 사용되고 있다. 이 외에 폴리에스테르 필름(polyester film)이 사용되기도 하였으나(Tuite, 1968), 이는 동결 시 부서지기 쉬운 단점이 있다.

폴리프로필렌 재질의 음료용 스트로를 이용한 곰팡이의 액체질소 보존법이 보고되어 있다(Challen and Elliott, 1986; Hoffmann, 1989; Staplers *et al.*, 1987; Henry and Kirsop, 1989). 음료용 스트로는 가격이 저렴하고 주위에서 쉽게 구할 수 있는 점 이외에도 여러 가지 이점을 가진다. 색깔이 다양하기 때문에 많은 균주를 개별적으로 관리하는 데 편리하며, 폴리프로필렌 크리오투브와 비교할 때 최소 6배 이상의 공간 절약 효과를 얻을 수 있다. 또한 비닐 접착기를 이용한 간단한 열처리로 완전 봉합이 가능하기 때문에 균주 간의 오염을 방지할 수 있다. 미생물 세포는 반복적인 동결과 해동 처리가 될 경우 세포 내부의 얼음 결정의 생성에 의해 생존율과 활력이 감소하게 되는데(Harrison, 1995), 스트로를 이용하면 새로운 배양을 위해 한 개의 스트로만을 꺼내어 사용하고 그 후 다시 보존하지 않고 폐기하므로 이러한 현상을 미연에 방지할 수 있다.

*Corresponding author <E-mail: sbhong@rda.go.kr>

네덜란드의 CBS(Centraalbureau voor Schimmelcultures), 캐나다의 UAMH(University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium) 등의 미생물 자원센터에서 음료용 스트로를 이용한 액체질소 보존법을 사용하고 있다. 많은 이점에도 불구하고 국내에는 현재까지 이 보존 방법을 사용하는 자원센터가 없었던 바, 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 곰팡이 자원의 장기보존에 이 방법을 적용하여 안정하고 안전한 보존 방법을 정립하였으므로 이를 소개하고자 한다.

스트로를 이용한 액체질소 보존

스트로의 준비

스트로는 고압 증기 멸균과 열 봉합이 가능하고, 액체 질소에 견디는 것으로 직경 4 mm, 길이 15 cm의 일반 음료용 폴리프로필렌 재질의 스트로(홍익케미칼주식회사, 한국)를 사용하였다(Fig. 1a). 소요 시간을 단축시키기 위해 14개의 스트로를 특수 제작한 틀에 일렬로 끼운 후 종이 재단기를 이용하여 5 cm 길이로 3등분 하였다(Fig. 1b). 스트로의 한쪽 끝을 5 mm 접착폭의 열선을 가지는 탁상형 순간 비닐 접착기(SK-310/5.0, (주)탐스텍, 한국)로 약 280°C에서 1.5~2초 동안 가열하여 봉합하였다(Fig. 1c). 유리 병에 12개의 스트로를 넣어 121°C에서 20분간 고압 증기 멸균한 후 건조기에서 완전 건조하였다(Fig. 1d).

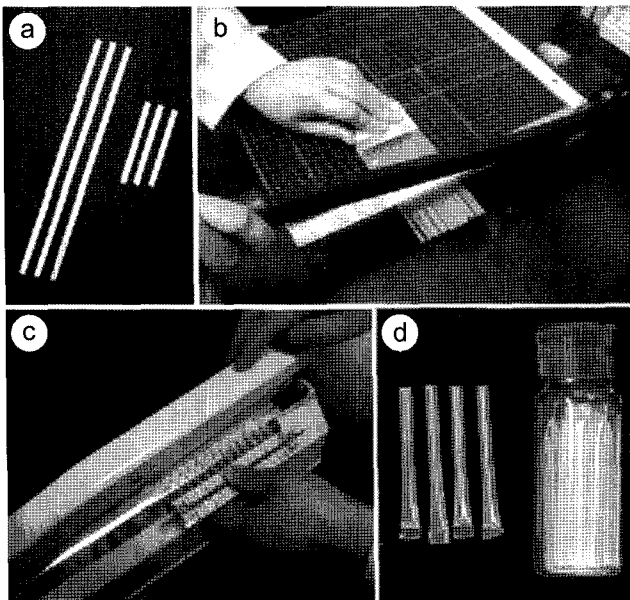


Fig. 1. Preparation of polypropylene straw vials. (a) Straws with 15 cm length and cut into 5 cm length, (b) Cutting of 14 straws at once with a paper cutter, (c) Heat-sealing of one side of straws, (d) one-side sealed straw vials and those in a glass bottle for single fungal strain.

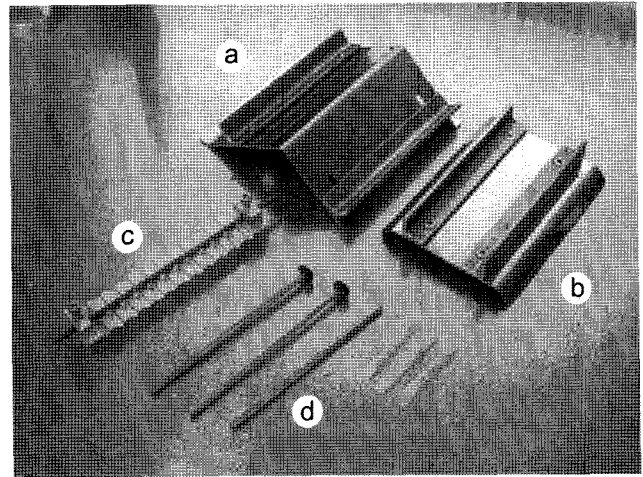


Fig. 2. Equipments for handling of straw vials. (a) Support with angles of 30 and 45 degrees, (b) Adjusting frame for lining up of straw vials on a straw holder, (c) Straw holder with a pin for holding 10 straws, (d) Cork borer with 2.8 mm diameter and straw vials.

보조 기구의 제작 및 준비

스트로의 취급 및 보존 과정을 간편화하기 위해 몇 가지 보조 기구들을 네덜란드의 CBS에서 사용하고 있는 기구들의 설계도(Staplers *et al.*, 1987)를 참고하여, 스트로를 일정 간격으로 나란히 배열하기 위해 쇠봉이 장착되어 있는 스트로 홀더(Fig. 2c)와 조절 프레임(Fig. 2b), 곰팡이 블록을 삽입하기 편리하도록 스트로에 45° 또는 30°의 각도를 부여할 수 있는 지지대(Fig. 2a)를 국내에서 주문 제작하였다. 한천 평판 배지에서 배양한 곰팡이 균사체로부터 곰팡이 블록을 취할 수 있도록 내경 2.8 mm의 코르크 보러와 취한 블록을 스트로에 밀어 넣어 삽입할 수 있도록 코르크 보러 안에서 자유롭게 움직일 수 있는 편을 제작하였다(Fig. 2d). 스트로 홀더와 편이 삽입된 코르크 보러는 121°C에서 20분간 고압 증기 멸균한 후 건조기에서 완전히 건조하고, 나머지 보조 기구들은 사용 전 70%(v/v) 에탄올로 살균한 후 사용하였다.

동결보호제의 준비

증류수로 희석한 10% (v/v) 글리세롤(Merck 1.04093.2500, Germany) 용액을 뚜껑이 있는 유리병에 10 ml씩 분주하여 121°C에서 15분간 고압 증기 멸균한 후 4°C에 보관하였다. 곰팡이에 가장 효과적인 동결보호제로 알려져 있는 글리세롤(glycerol)과 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 세포 내부로 침투하여 세포 내외에서 보호 작용을 한다. 가장 광범위하게 사용되는 것은 10% 글리세롤 용액이지만, 생존율이 낮을 경우 20%나 5%로 농도를 변경할 수 있다. 또한 10% DMSO 용액(Hwang *et al.*, 1976) 또는 8% glucose와 10% DMSO를 함께 사용해야 하는 종류도 있다(Smith, 1983). 그리고 세포 외부에서 보호 작용을 나타

내는 것으로서 sucrose, lactose, glucose, mannitol, sorbitol, dextran, polyvinyl-pyrrolidone, hydroxyethyl starch 등이 사용되기도 한다(Ohmasa *et al.*, 1992; Henry and Kirsop, 1989).

균사체 한천 블록의 제조 및 삽입

곰팡이 균사체 한천 블록을 제조하기 전 보조 기구들을 이용하여 스트로를 장치하였으며, 다음의 모든 준비 과정은 무균상에서 수행되었다. 조절 프레임 위에 스트로 홀더를 얹고 그 위에 멸균된 스트로 10개를 화염 멸균된 핀셋을 이용하여 봉합되지 않은 부위의 끝이 나란히 배열되도록 한 후, 멸균된 쇠봉으로 스트로를 단단히 고정시켰다. 이것을 지지대에 장착한 후 일회용 10 ml 주사기를 이용하여 약 100 μ l의 10% 글리세롤 용액을 스트로의 1/2 이 채워지도록 주입하였다(Fig. 3a). 이 때 스트로 바닥에 공기 방울이 생기지 않도록 바닥부터 천천히 채워야 한다. 10개의 스트로를 채운 후에, 균사가 활발히 성장하고 있는 콜로니의 가장자리 부위에서 코르크 보러로 균사체를 포함하는 한천 블록 4~6개를 취한 후(Fig. 3b), 핀으로 밀면서 스트로에 삽입하였다. 이 때, 들어 있던 글리세롤 용액이 넘쳐 나오지 않도록 코르크 보러를 조금씩 빼면서 삽입하고 블록이 글리세롤 용액에 잘 잠기도록 해야 한다(Fig. 3c).

스트로를 모두 채운 후, 스트로 홀더를 바다에 수차례 쳐서 입구에 묻어 있는 글리세롤 용액을 제거하고, 탁상형 순간 비닐 접착기를 이용하여 약 280°C에서 1.5~2초 동안 가열하여 봉합하였다(Fig. 3d). 이 때 스트로 홀더에 장착된 상태로 봉합하면 10개의 스트로를 한번에 효율적으로 처리할 수 있다. 열 봉합이 마무리되면 손으로 수차례 눌러 스트로의 봉합 상태를 점검하고 완전하지 않은 경우 동일한 방법으로 재봉합 하였다. 초저온용 펜으로 스트로 표면에 균주 번호를 기입하거나 액체질소에서 안정한 초저온용 라벨 용지(15.0 mm×26.5 mm, 주문 제작, Brady, USA)와 라벨 인쇄기(300X-Plus, Brady, USA)를 이용하여 제작한 균주 번호 라벨을 스트로 몸체에 돌려 부착하였다.

1차 동결

글리세롤이 세포 내로 침투할 수 있도록 30분 이상 실온에 둔 후, 온도 제어 동결기(IceCube 1800D, SY-LAB, Austria)를 이용하여 약 -1°C/분의 속도로 -45°C까지 동결하고 -50°C/분의 속도로 -75°C까지 동결하였다. 곰팡이의 액체질소 보존 시 생존율은 동결 속도에 의해 크게 영향을 받는데, 일반적으로 분당 1°C의 동결 속도가 적당하다. 그러나 동결 처리에 대한 반응이나 적정 동결 속도가 다른 곰팡이가 많으므로(Smith, 1991), 장기간 균주의

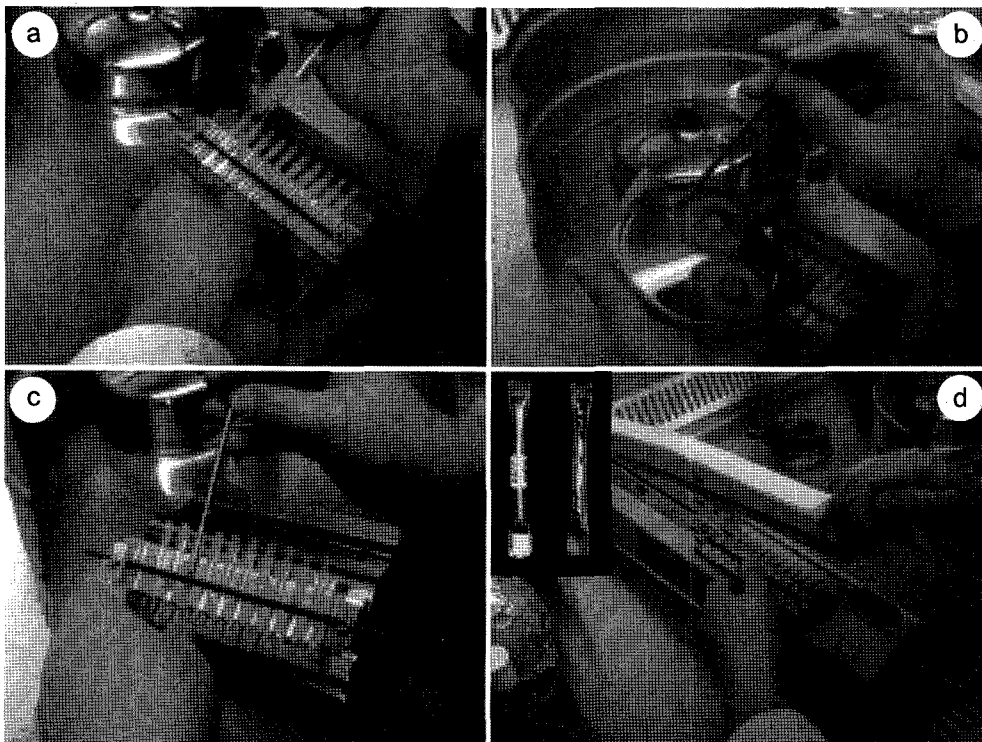


Fig. 3. Preparation and transfer into straw vials of mycelial agar blocks. For each strain 10 straws are prepared. (a) Half-filling of straw vials with 10% glycerol solution using a 10 ml syringe, (b) Punching out of blocks from actively growing mycelial parts of fungal culture on agar plate with a cork borer, (c) Transfer of mycelial agar blocks into 10% glycerol-filled straw vials, (d) Heat-sealing and labeling of mycelial agar block-filled straws. Inlet shows two ways for labeling of straws.

특성과 생존율을 유지하기 위해서는 적정 동결 속도를 먼저 결정해야 할 필요성이 있다.

2차 동결 및 보존

2차 동결 및 장기 보존을 위해 자동수위조절기가 장착된 액체질소용 저장기(MVE 1520 HE-190, USA)로 1차 동결된 스트로를 옮겼다. 64개의 칸으로 구성된 알루미늄 재질의 스트로 전용 박스(13 cm×13 cm×5 cm)를 주문 제작하였다. 박스의 한 칸에 한 곰팡이 균주에 해당하는 10개의 스트로를 넣어 장기 보존한 후, 액체질소 저장기 번호, 랙 번호 및 박스 번호가 포함된 균주의 위치에 대한 정보를 기록하였다.

재생 및 생존검사

액체질소에 보존된 곰팡이 균주는 보존 개시 후 1주일 이내, 그리고 5년 후에 재생 및 생존검사를 실시한다. 재생을 위하여 액체질소에서 꺼낸 스트로를 30~35°C의 수조에서 최대 5분 동안 해동하였다. 난균류(Oomycota)를 포함한 일부 균주는 20°C에서 5분간 해동하기도 한다(Staplers *et al.*, 1987). 1차 동결 시 적정 동결 속도 또는 그 보다 느린 속도로 동결하였다면 해동 속도 자체는 생존율에 그다지 영향을 미치지 않는다. 그러나 적정 동결 속도보다 빠른 속도로 동결하였다면 해동 속도 또한 빨라야 하며 그렇지 못할 경우 생존율이 감소된다(Smith, 1991).

해동이 완료되면 스트로 표면을 70%(v/v) 에탄올로 소독하고 화염 멸균된 가위로 스트로 한 쪽 끝을 절단한다.

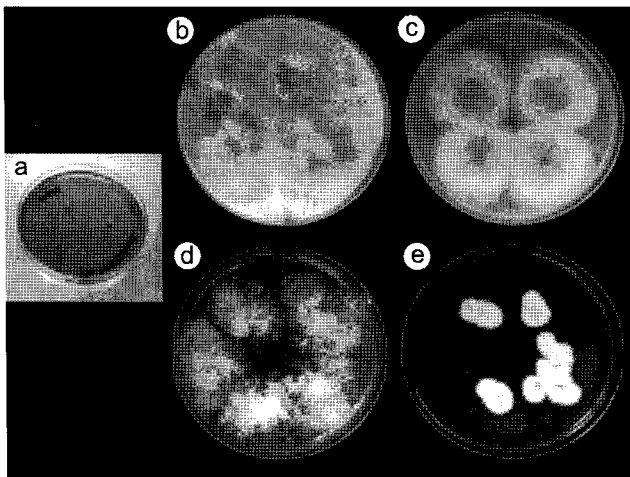


Fig. 4. Viability check of several fungal strains within a week after liquid nitrogen storage. (a) After thawing at 30°C, several mycelial agar blocks were pumped out onto appropriate agar plate with mycelial part faced to medium surface, and then cultured at 25°C in the dark for 4 days, (b) *Trichoderma* sp. (KACC 42189), (c) *Fusarium* sp. (KACC 42165), (d) *Hericium erinaceus* (KACC 42140), (e) *Penicillium* sp. (KACC 41396).

화염 멸균된 백금침으로 균사체 한천 블록을 꺼내거나 스트로 한쪽을 손가락으로 눌러, 적정 한천 평판 배지에 균사체가 있는 부위가 배지 표면에 닿도록 3~5개의 블록을 접종하고, 적정 조건에서 5~10일간 배양한 후 생존 여부와 형태적인 변이 등을 검사하였다. Fig. 4는 *Trichoderma* sp.(KACC 42189), *Fusarium* sp.(KACC 42165), *Hericium erinaceus*(KACC 42140), *Penicillium* sp.(KACC 41396) 균주를 스트로를 이용한 액체질소 보존 7일 후에 적정 배지에서 4일 동안 25°C 암소에서 배양하여 재생한 균주의 콜로니 사진으로서, 각각의 콜로니는 원균주의 특성을 나타내었다.

참고

1. 열 봉합 후에 스트로의 길이가 약간 늘어나는 경향이 있으므로 사용할 액체질소용 박스의 높이를 감안하여 스트로의 길이를 결정해야 한다.
2. 스트로를 봉합하기 전 봉합할 부위를 납작하게 눌러 주어야 하며, 여러 개의 스트로를 일정 간격으로 고정할 수 있는 틀을 사용하면 한번에 봉합이 가능하므로 소요 시간을 단축할 수 있다.
3. 한 균주의 보존에 사용되는 10개와 여유분 2개를 합쳐 총 12개의 스트로를 뚜껑이 있는 유리병에 봉합부위가 위를 향하도록 넣은 상태로 고압 증기 멸균하면 필요한 양의 스트로만을 개봉할 수 있으므로 오염을 방지할 수 있다.
4. 1차 동결에 필요한 온도 제어 동결기가 없을 경우, 보존에 문제가 없는 균주에 한하여 스트로를 스티로폼 박스에 넣은 후 -80°C 냉동고에 4시간 이상 넣어 둔다.
5. 1차 동결과 2차 동결 장소 사이의 거리가 멀 경우, 1차 동결된 스트로가 녹지 않도록 동결 컨테이너(Freezing Container, Cat. No. 5100-0001, Nalgene, USA) 또는 다른 적정 용기에 담은 상태로 옮겨야 한다.

적 요

액체질소 보존법은 동결 건조 보존이 불가능한 것을 포함한 곰팡이를 가장 효과적으로 보존할 수 있는 방법 중의 하나로서, 유전적인 변화와 오염을 방지하고 장기보존이 가능한 이점을 가진다. 크료튜브 대신 액체질소 보존에 사용할 수 있는 폴리프로필렌 스트로는 경제성, 안전성, 편리성 그리고 공간 이용성 등의 이점을 가진다. 이에 한국농업미생물자원센터(KACC)에서는 폴리프로필렌 스트로를 이용한 곰팡이의 액체질소 보존법을 정립하였으며, 이를 상세하게 소개하였다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 지원에 의

하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Butterfield, W., Jong, S. C. and Alexander, M. J. 1974. Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. *Can. J. Microbiol.* **20**: 1665-1673.
- Challen, M. P. and Elliott, T. J. 1986. Polypropylene straw ampoules for the storage in microorganisms in liquid nitrogen. *J. Microbiol. Methods* **5**: 11-23.
- Dietz, A. 1975. Nitrogen preservation of stock cultures of unicellular and filamentous microorganisms. Pp 22-26. *In*: Rinfret, A. P. and La Salle, A. B. Eds. Round table conference on cryogenic preservation of cell cultures. National Academy of Science, Washington DC.
- Elliot, T. J. 1976. Alternative ampoule for storing fungal cultures in liquid nitrogen. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **67**: 545-546.
- Harrison, A. P. 1995. Survival of bacteria upon repeated freezing and thawing. *J. Bacteriol.* **70**: 711-715.
- Henry, J. and Kirsop, B. 1989. Cryopreservation of yeasts in polypropylene straws. *World Federation for Culture Collection - Technical Information Sheet No.3*.
- Hoffmann, P. 1989. Cryopreservation of fungi. *World Federation for Culture Collection - Technical Information Sheet No.5*.
- Hwang, S.-W. 1966. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Appl. Microbiol.* **14**: 784-788.
- _____. 1968. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. Evaluation of liquid-nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia* **60**: 613-621.
- _____, Kwolek, W. F. and Haynes, W. C. 1976. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. III. Viability and growth rate of mycelial cultures following cryogenic storage. *Mycologia* **68**: 377-387.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W. and Jong, S. C. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. Pp 37-47. *In*: Mueller G. M., Bills, G. F. and Foster, M. S. Eds. Biodiversity of fungi - Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Ohmasa, M., Abe, Y., Babasaki, K., Hiraide, M. and Okabe, K. 1992. Preservation of cultures of mushrooms by freezing. *Trans. Mycol. Soc. Jap.* **33**: 467-479.
- Simione, F. P., Daggett, P. M., McGrath, M. S. and Alexander, M. T. 1977. The use of plastic ampoules for freeze preservation of microorganisms. *Cryobiology* **14**: 500-502.
- Smith, D. 1983. Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **80**: 360-363.
- Smith, D. 1991. Maintenance of filamentous fungi. Pp 133-159. *In*: Kirsop, B. E. and Doyle, A. Eds. Maintenance of microorganisms and cultured cells - A manual of laboratory methods. Academic Press, San Diego.
- Staplers, J. A., de Hoog, A. and Vlug, I. J. 1987. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. *Mycologia* **79**: 82-89.
- Tuite, J. 1968. Liquid nitrogen storage of fungi sealed in a polyester film. *Mycologia* **60**: 591-594.