

팽나무버섯 액체 종균의 접종 전 오염 검사

심규광^{1*}, 유영진², 구창덕³, 김명곤⁴

¹(주)팔오테크, ²전북농업기술원, ³충북대학교 산림학과, ⁴전북대학교 바이오식품공학과

The contamination check before inoculation at the liquid Spawn on *Flammulina velutipes*

Kyu-Kwang Shim^{1*}, Young-Jin Yoo², Chang-Duck Koo³ and Myung-Koon Kim⁴

¹ParoTech, Deokjeol-ri Jeongnam-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-960, Korea

²Jeollabuk-do Agricultural Research and Crop-Management, Iksan, 570-704, Korea

³Chungbuk National Univ., Gaesin-dong, Heungdeok-gu, Cheongju, Chungbuk 631-763, Korea

⁴Jeonbuk National Univ. Iksan Campus, Bio Food Technology, Iksan, 570-704, Korea

(Received March 4, 2012, Revised March 19, 2012, Accepted March 21, 2012)

ABSTRACT: In this study, whether Giemsa staining solution can accurately determine bacterial contamination of liquid spawn for *Flammulina velutipes* in a short period of time was investigated. Giemsa solution staining cells of blood, bone marrow, lymph node, malaria parasites, rickettsia et al. was prepared by dissolving basic methylene azul and methylene blue, and acidic eosine in methyl alcohol-glycerine. Supernatant samples of *Flammulina velutipes* liquid spawn cultured under explosive aeration were placed on a slide, mixed with Gimesa solution and examined with optical microscope after staining. In 40 to 60 seconds bacterial cells were distinguishable from soybean meal residual and hyphal cell fragments. Thus we conclude that microscopy using Gimesa staining solution is a quick, simple and accurate method for the mushroom growers to effectively use to detect bacterial contamination of the liquid spawn.

KEYWORDS : Contamination check, *Flammulina velutipes*, Liquid Spawn, Giemsa stain, Optical microscopic test.

팽나무버섯(*Flammulina velutipes*(Curt. ex Fr.) Singer)은 담자균류 주름버섯목(Agaricales)송이과(Tricholomataceae)에 속하는 백색목재부후균(Donk, 1971)의 일종으로 자실체는 자연 상태에서 늦가을부터 초겨울까지 활엽수의 그루터기에 발생되어 winter mushroom 이라고도 하며(김, 1995; 성 등, 2000), 야생에서의 자실체형태는 대가 짧고 갓이 큰 특징을 가지고 있으나(古川, 1992) 온도가 낮은 곳에서 인공재배를 할 경우 생육에서 이산화탄소 농도를 높이고 광량을 줄여주면 야생종과는 달리 대가 길어지고 갓이 매우 작아지는 분화특성을 갖고 있다(Stamets, 1993).

식용버섯 균사의 액체배양은 Lambert(1933)에 의해 시작되었고, Hunfeid(1948)는 새로운 형태의 종균으로 균사 현탁액인 액체종균(liquid spawn)을 이용하여 버섯을 재배할 수 있음을 제안하였다. 우리나라 버섯재배에서 액체종균의 산업적 이용은 1990년대 초에 밀가루 액체배지를 이용한 영지버섯 재배가 시도된 바 있으나 정착하지 못하였다. 그 후

1995년부터 액체종균의 제조와 이용에 관한 연구가 시작되어, 농업과학기술원에서는 팽나무버섯 병재배 농가에서의 자가 종균 생산에 액체종균의 이용에 관하여 검토하였다. 액체종균의 제조에서 접종 전 오염 여부는 균사의 활착문제와 함께 버섯재배의 가장 중요한 것 중의 하나이다. 지금까지의 오염검사는 육안에 의한 액의 혼탁상태나 거품의 발생여부, 후각을 이용한 냄새의 유무, 그리고 BPB(bromophenol blue) 첨가 배지에서의 재 배양 등을 이용하고는 있으나 이러한 방법은 오류가 있을 수 있고, 시간이 많이 걸리는 등 현재에도 액체종균의 접종 전 오염검사 방법이 정립되어 있지 않다. 물론 실험상으로는 2개 이상의 primers를 갖는 염기쌍 등의 PCR(polymerase chain reaction) 기법에 의한 일정한 크기의 염기(base pair) 쌍으로 확인하는 방법, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 면역기법 등의 비교적 유용한 방법이 있기는 하지만 시간과 비용이 들며 농가에서 통상적인 재배에서의 적용은 그리 쉽지가 않다. 또한 염색방법인 gram stain 염색 등을 이용하여 검사가 가능하지만 균사의 크기는 상대적으로 너무 커서 2~3종류의 염

* Corresponding author (microgaba@naver.com)

색액을 반복처리하는 가운데 slideglass에서 피검체의 대부분이 떨어져 나가거나 일부가 탈착된 후 균사 선단이 다시 부착되는 균사 겹침 현상(folding) 등의 문제점 등이 있다. 본 방법의 conc. Giemsa sol.의 단일염색으로 피검체의 탈락 등이 발생되지 않고 세균류의 감염 여부에 대하여 짧은 시간 내에 정확한 오염원의 동정이 가능한 기법이다. 본 연구에서는 액체종균의 제조에 있어서 배양 병(봉지)에 접종하기 전 간단한 검사방법인 Giemsa's Sol.의 단일 염색기법을 통한 광학 현미경 검경 결과를 보고하고자 한다.

시험에 사용된 품종은 팽나무버섯(일명 고사 품종) 균주를 사용하였다. 종균계대에서 petri dish에 PDA(potato dextrose agar) 42g/1l의 비율로 조제하여 고압 살균 후에 사면이나 평면 배지를 만들었다. 삼각플라스틱 배양은 1l에 설탕 30g, 탈지대두박 3g, 펩톤 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8g, $KH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 0.8g, peptone 0.8g, 목초액(상품명; 유기칼) 농도 1/1,500배액, antiform 204(Sigma, A-6426)을 2~3방울 첨가하여 멸균하고 autoclave로 고압살균을 실시하고 살균 시간 60~80분간 유지한 후 방랭하였고 접종원은 petri dish에서 8~9개 조각을 접종하였다. 초기에는 정치 배양하고 후반기에는 진탕(90rpm)하면서 8~12일간 균사를 배양하였다. 대용량 배양은 140l에 설탕 3.45kg, 대두박 0.98kg, $MgSO_4$ 70g, K_2HPO_4 70g, 목초액 100ml(1/1500X), antiform 5ml를 넣었고 pH는 조정하지 않았다. 밀폐한 다음 고압살균 처리하였고 방랭은 밤새도록 냉각수를 흘려보내면서 실시하였다. 접종원량은 액용량 350ml를 고속 균질기로 12,000rpm에서 40~60초 동안 파쇄하여 접종하였다. 배양실 온도는 20~22°C, 폭기 압력 2.0kg.f/cm²의 공기압, 직경 50mm×0.2µm의 필터(Pall Co.) 3개를 직렬로 배열하여 공기를 여과하면서 폭기 배양을 하였다.

Giemsa stain 용액은 poasmodia 등의 세포 염색과 혈액·골수 세포·림프절 세포·말라리아 원충·리케차 등의 염색에 많이 사용되고 있다. Giemsa stain은 독일의 세균학자인 Gustav Giemsa가 고안하였다(Bernhard, 2004). 염색용액은 염기성 색소로서 methylene azul과 methylene blue, 산성색소로는 eosine을 methyl alcohol-glycerine에 녹인 것을 사용하였다.

버섯 균사체의 액체배양은 다른 미생물에 비하여 생육속도가 느리며 배양 중 오염의 가능성이 높아서 산업화하기가 어렵기 때문에 접종 전의 오염검사방법의 확립은 중요하다. 본 실험은 위의 방법에서 염색액의 농도를 진하게 한 단일염색으로 짧은 시간에 진행하여 slideglass에 고정시킨 검체가 떨어져 나가지 않도록 하였고 검체 중의 오염원에 대하여 최종적으로 광학현미경의 대물렌즈 100X로 검경하였다.

액체종균의 접종 전 오염검사 적용에 있어 본 방법은 균사를 형성하는 곰팡이류의 감별에는 상당히 난해하지만 다

행히도 곰팡이류의 오염은 극히 적은 상황이다. 액체종균의 제조에서 배양용기의 결합 불량, 살균 불량, 접종 과정 등의 잘못으로 구균류나 간균류 등이 감염되면 버섯균사에 비하여 증식속도가 훨씬 빨라서 비교적 자주 발생하는 상황이므로 이러한 오염원의 판정이 가능할 것이다.

시약조제는 Giemsa stain(Merck & Co., Inc.)용액의 원액 그대로를 크린벤치 내에서 syringe용 소형 filter인 0.45µm와 0.2µm로 천천히 여과한 용액을 무균 vial병에 담아 10~20ml씩 분획하여 parapilm으로 밀봉하고, 이를 냉장보관하면서 무균적으로 분취하여 사용한다.

액체종균의 분취 과정은 액체배양 용기 내에 양압을 유지하기 위하여 Fig. 1에서와 같이 폭기 진행 중인 배양용기의 배출구의 솜통 부위를 폐쇄(Order 1), 폭기 입구측(필터부착된 공기 주입쪽)을 폐쇄(Order 2), 연결호스를 분리(Order 3)한다. 액체배양용기의 양압 상태에서 배양 용기를 크린브스 걸이로 이동하고, 접종용 실리콘 호스 중의 배출구 끝에 알코올을 분무하여 화염살균하고, 호스의 처음 부위에 고여 있는 침전된 대두박 고형분을 버리고(Order 4) 이후의 여액을 무균 용기에 채취한다(Order 5). 배양용기의 호스 부위를 다시 원 위치하고 배양 용기를 폭기 상태로 되돌려 놓는다.

슬라이드 제작 및 현미경 검경은 질산과 물을 1:3으로 혼합한 용액에 slideglass를 2~3일 동안 담가서 먼지나 기름기 등을 녹여 내고 이를 흐르는 물에 씻어낸 후 건조하여 둔 slideglass에 채취한 위 시료를 분산 도말하여 건조하고(Order 6), 냉장보관된 무균상태인 진한 염색액(conc. Giemsa solution)으로 slideglass의 검체에 흘려보내어 40~60초 동안 염색을 실시(Order 7), slideglass 뒷면에 물을 흘려서 여액의 염색액을 제거하고 건조시켜서 광학 현미경 검경방법(Order 8)에 따라 최종적으로 대물렌즈 100×와 유침(immersion oil)하여 슬라이드 상의 검체를 slideglass 상의 전 면적을 지그재그(ㄷ)로 관찰한다. 주로 감염되는 구균과 간균류의 오염 유무를 검사하였고 버섯 균사 이외의 오염원이 없는 액체배양 종균을 배양병의 접종원으로 사용하였다.(Fig. 1)

본 방법은 주로 산전 진단, 유전학적인 질환, 임신초기의 선천적 태아 기형을 확인하기 위하여 용모막 배양 검사(CVS culture)나 혈액 배양 검사 등에서 많이 사용하는 기법으로 양 등(1985)에 의하여 사용되어져 왔으며 이 방법을 변형한 진한 염색액(conc. Giemsa solution)으로 본 실험의 목적에 따라 염색하였다. 지금까지 액체종균의 검사방법에서 거의 투명할 정도의 미세한 오염에 대한 동정은 거의 할 수 없었지만 본 방법에 의한 진한 염색액 처리와 광학 현미경의 대물렌즈 100× 배율의 유침(immersion oil)에 의한 검경에서는 폭기 배양 4~5일째부터 오염원의 판정이 가능

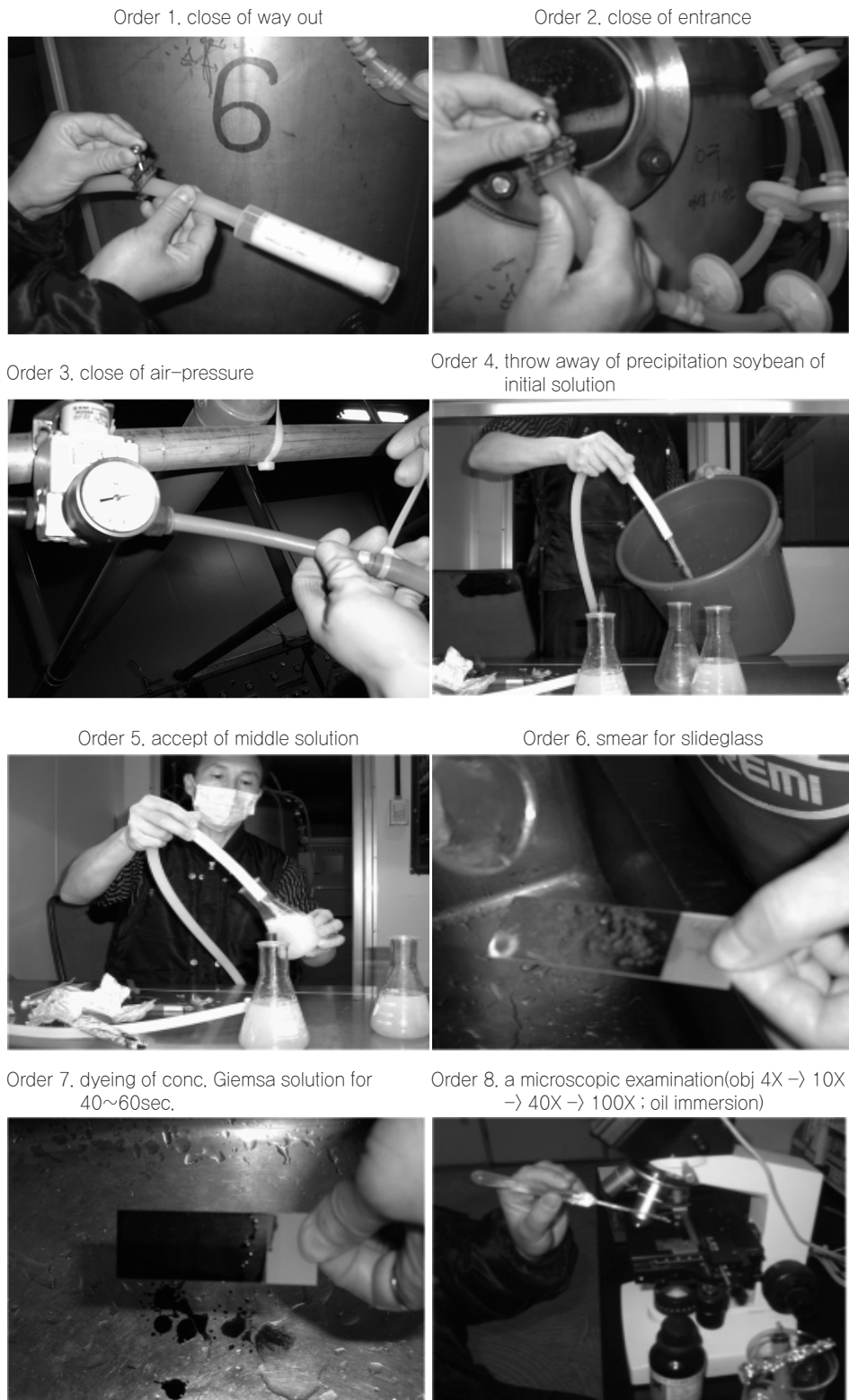


Fig. 1. Sequence of production on dyeing slideglass.

하였다. 하지만 주로 접종 전 날이나 접종 직전에 액의 일부를 뽑아서 검사하면 좋다.

Fig. 3-2에서와 같이 배양 중에 잔존 대두박의 입자도 확인할 수 있으며, 오염이 되었을 경우에는 간균(원형균)의 상

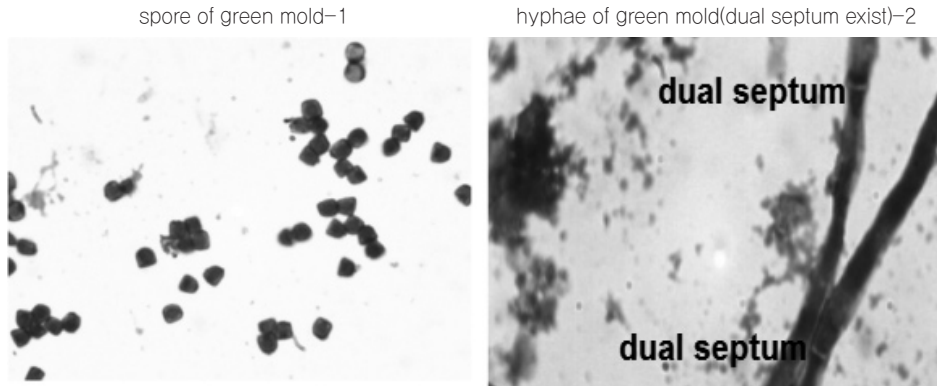


Fig. 2. The spore and the hypha(e) of a green mold.

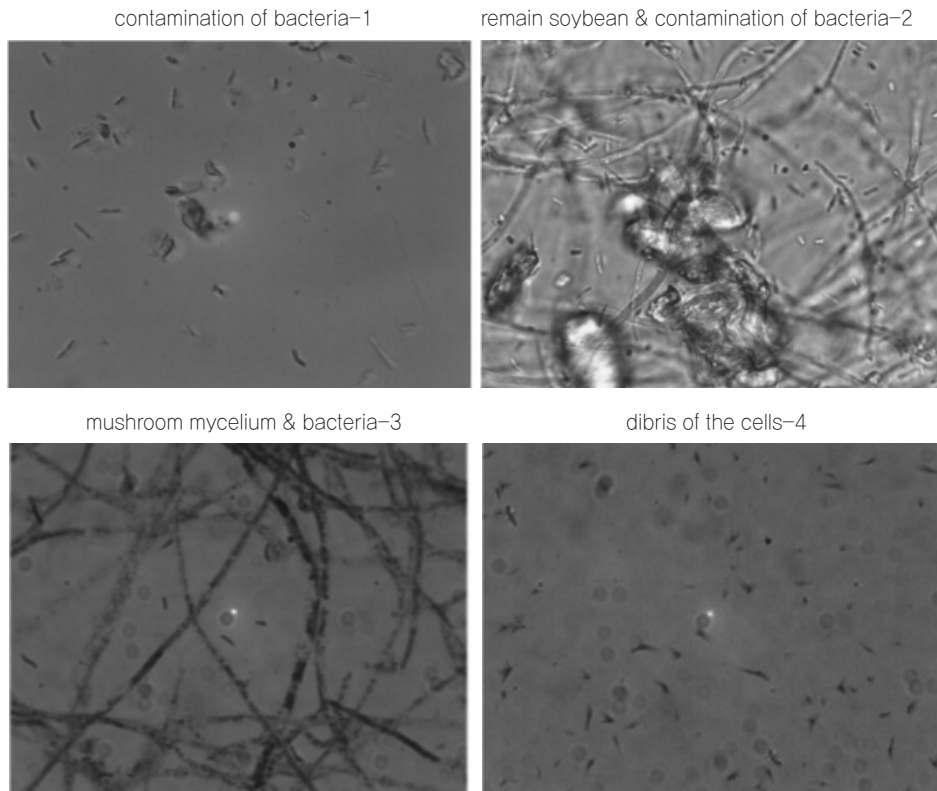


Fig. 3. The identification of the bacteria, remaining soybean meal and dibris of identification of sources of liquid spawn during the aeration culture.

태를 확인할 수 있다(Fig 3-1, 3-2, 3-3). 오염원 중에 자실체의 검은썩음병으로 주목 받고 있는 *Pseudimonas* spp. 등은 편모를 가지고 있는 것으로 알려져 있으나 액체종균의 오염원 동정에서는 이러한 편모 형태까지 확인할 필요는 없는 것이며 편모를 확인하기 위한 염색 방법 또한 간단하지 않다. 또한 본 방법으로 Fig. 2-2와 같이 곰팡이류 균사의 오염 판정은 버섯 균사처럼 비슷하나 연결된 격막 사이에 대나무의 마디처럼 된 이중 격막을 확인할 수 있지만 대량의 버섯균사와 미량의 곰팡이 균사가 혼재되어 있는 경

우에는 찾아내기가 대단히 어렵다. 하지만 액체종균 제조시에 흔하게 나오는 것은 아니며 액체종균 제조에서의 오염 문제는 주로 세균류(주로 간균 형태와 원형균 형태)가 동정되고 있다(Fig. 3).

고체종균에서는 오염여부의 판정이 간단하지 않을 뿐만 아니라 비용과 시간이 많이 소모된다. 액체종균의 폭기 배양 방식에서는 충분한 영양과 지속적인 공기(산소)가 공급되는 조건에서 액체배양 중에 액 전체에 쉽게 분산되어 희석되게 되며, 세균류는 증식 대수기가 $2n$ (증식속도의 예 ;

n= 1세대, 30분) 속도에 준하는 증식속도로 빨라서 1개의 포자나 세포는 이론적인 증식이 하루만에 2^{48} 배로 증식하므로 세균류의 검출은 그리 어렵지 않다. 또 미생물의 특성상 증식 대수기가 존재하고 액체종균의 제조에서 처음 투입한 영양원의 양은 한정되며, 이때에 과도한 호흡반응이 되는 조건이거나 폭기 일수가 많이 지난 뒤에는 영양원의 고갈이나 균사의 노화현상 등으로 세포파괴 등의 현상이 발생하여 debris(세포 파괴 물질 등)가 나타날 수도 있다는 것에 주의할 필요가 있다(Fig. 3). 본 연구에서 고안된 conc. Giemsa solution에 의한 염색 방법은 기존의 그램 염색법에 의한 여러 방법에서의 염색에서의 문제점을 해결할 수 있으며 덩어리가 큰 균사 입자가 슬라이드 표면에서 떨어져 나가지 않도록 하면서도 기존 방법보다는 비교할 수 없이 정확하고 짧은 시간 안에 액체종균에서의 오염원 동정이 가능하였다.

이 방법은 기존의 육안 검사, 악취 냄새 유무, 혼탁 여부, 또는 오염 검사를 위한 재 배양 방법 및 또 다른 염색 과정의 방법, BPB(bromophenol blue) 염색 등의 방법에 비하여 짧은 시간 안에 오염원의 동정이 가능하였다. 또 기존의 그램 염색 방법 등은 1액, 2액, 3액 등의 처리를 하면서 시간도 많이 걸릴 뿐 만 아니라 슬라이드에 붙여 놓은 거대한 균사 덩어리들이 떨어져 나가는 단점이 있으나 본 방법(Fig. 1)은 단일 염색액으로 짧은 시간 안에 단일 염색을 실시하여 슬라이드에서 검체가 벗겨져나가는 것을 방지 할 수 있다. 본 방법 적용상의 경험에 의하면 배양초기에 오염이 잘 발생하는 것은 액체 배양용기의 살균과정과 접종원의 투입전의 미생물의 오염 가능성이 높으며, 폭기 후기에 미세하게 오염되는 경우에는 접종 시점 이후의 필터 파손이나 음압 형성에 의한 미생물 유입의 문제이다. 오래된 염색액 제품에는 미생물이 존재할 수도 있으므로 실험의 오류를 줄이기 위하여 사용 전에 반드시 $0.45\mu\text{m}$ 와 $0.2\mu\text{m}$ 의 필터를 통과시켜 여과한 염색액을 살균 처리된 vial 병에 넣고 밀봉한 후 냉장고에 보관하며 사용하는 것이 좋다. 슬라이드 상에 간균이나 원형균의 모습이 균락(colony) 현상이면 틀림 없는 오염 증세이고 다수의 독립성이거나 연속된 쌍을 이루는 등의 형태로 일관되게 나타나면 정밀검사 등의 검경으로 재확인해야 하며 미세한 오염원이 발견되면 절대 사용하지 말아야 한다.

적 요

본 연구에서는 배양된 액체종균의 세균 오염 여부를 Giemsa 용액의 단일 염색으로 짧은 시간 안에 정확하게

판정이 가능한지를 조사하였다. Giemsa 용액은 혈액·골수·립프질·말라리아 원충·리케차 세포 등을 염색하는 것으로, 염기성 색소인 methylene azul과 methylene blue, 그리고 산성색소인 eosine을 methyl alcohol-glycerine에 녹여서 제조하였다. 그리고 팽이 액체종균의 폭기 배양액 분취하여 슬라이드에 올리고 Gimesa 용액으로 염색한 후 광학 현미경으로 검사하였다. 이 결과 40~60초 동안의 세균 세포를 (팽나무)버섯(류) 균사세포의 부스러기나 잔존 대두박 등과 구별할 수 있었다. 이 Gimesa 용액을 이용한 염색 및 검경방법은 빠르고 간편하며 정확하므로 액체종균을 사용하는 버섯재배 농가에서도 세균 오염을 효과적으로 동정(감지)하는데 이용할 수 있다고 생각한다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품 기술기획평가원(IPET)의 2009년 4월~2012년 4월까지 수행된 결과로서 이를 수행할 수 있도록 지원하여 주신 모든 분께 감사드립니다.

참고문헌

- 김병각. 버섯 건강요법. 가람출판사. 1995.
 성재모, 유영복, 차동열. 2000. 버섯학. 교학사.
 양영호, 박용원, 이면선, 박찬규. 1985. 임신초기에 있어서 용모막 용모 생검에 의한 산전 염색체 검사. 대한산부회지 28 : 460-467.
 古川久彦. 1992.きのこ學. pp450, 公立出版株式會社.
 Bernhard, F. 2004. Tropical Medicine and International Health, volume 9 no 7 pp 755- 756 Bernhard Nocht Institut fur Tropenmedizin, Bernhard-Nocht-Str. Hamburg, Germany. 74 : 20359.
 Donk, M. A. 1971. Progress in the study of classification of the higher Basidiomycetes. An international Symposium. 3-25.
 Edmund B. L. 1933. Effect of excess carbon dioxide on growing mushrooms. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C. 47 : 599-608.
 Hunfeid, H. 1948. The production of mushroom mycelium(Agaricus campestris) in submerged culture. Mushroom Sci. 107 : 373.
 Paul, S. 1993. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten speed press. pp146-150.