

액체배양 시 탄소원의 종류에 따른 외생균근균의 균사생장 특성

전성민 · 전하샘 · 기강현*

국립산림과학원 화학미생물과

Mycelial Growth of Ectomycorrhizal Fungi by Different Carbon Sources in Liquid Culture

Sung-Min Jeon, Ha-Saem Jeon and Kang-Hyeon Ka*

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

ABSTRACT : Four ectomycorrhizal fungi were tested for their ability to utilize seven carbon sources in modified Melin-Norkrans medium. After 60 days of mycelial culture, the highest mycelial growth in *Hygrophorus russula* (KFRI 1987), *Sarcodon aspratus*, *Leccinum extremiorientale* (KFRI 1194), and *Tricholoma matsutake* (KFRI 1256) was observed with use of dextrin used as a carbon source. *H. russula*, *S. aspratus* (KFRI 1676), and *L. extremiorientale* showed the lowest mycelial growth on nutrient medium with pectin. The utilization of homoglycans (starch, dextrin) in seven strains (except for *T. matsutake* KFRI 1256) was higher than that of heteroglycan (pectin). The final pH values of all culture media were decreased by pH 1.1~3.0 compared with the initial pH values of culture media. The dominant color of mycelia was white and varied according to the carbon sources (yellow, brown, and purple) in some strains. A single colony was observed in *L. extremiorientale* cultured in liquid media containing four or five different types of carbon sources, whereas multiple colonies were formed in liquid media containing six different types of carbon sources by six strains.

KEYWORDS : Carbon source, Ectomycorrhizal fungi, Mycelial growth

서론

지구상에 존재하는 외생균근균의 수는 명확히 알려져 있지 않으나, 1990년대 초부터 외생균근에 존재하는 균류를 직접 동정하기 위해 분자마커를 이용하면서 상당수의 분류군이 알려지게 되었고 부생성 균류로 여겨지던 균류들의

일부가 외생균근성 균류(ectomycorrhizal fungi, ECM fungi)임이 밝혀지면서 전세계적으로 약 7,000~10,000종이 분포하는 것으로 추정된다[1]. 외생균근균은 식물 뿌리 내부에서 식물과 함께 살아가는 공생자인 동시에 때로는 토양에서 부생형으로 살아가는 이중적인 생활사를 갖는다[2]. 식물 뿌리와 상리공생관계를 유지하면서 식물이 제공하는 당류에 전적으로 의존하며 살아가는 외생균근균의 이러한 특성 때문에 과거 많은 연구자들은 기주식물 없이 실험실 내에서 자실체를 얻기란 매우 어려운 일로 여겨왔다. 그러나 줄각버섯류(*Laccaria* spp.)와 같은 몇몇 외생균근균들은 기주식물 없이도 실험실 내 탄소원이 풍부한 배지에서 자실체 생산이 가능성이 확인되어[1], 외생균근균의 인공재배 기술 개발에 있어 균사 생장이 가장 우수한 탄소원을 찾는 일은 매우 중요하다고 볼 수 있다. 또한 유기물 분해력이 매우 높은 외생균근성 균류와 전적으로 유기물의 동화에만 의존하여 탄소원을 획득하는 진정한 의미의 부생성 균류를 구별하는 것도 중요하게 여겨지고 있다[1]. 이 두 종류의 균류와 함께 외생균근균과 부생균의 탄소원 섭취 방식을

Kor. J. Mycol. 2014 June, 42(2): 150-158
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.2.150>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: kasybio@forest.go.kr

Received June 21, 2014
 Revised June 23, 2014
 Accepted June 24, 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.

오기는 facultative ECM fungi를 구별하기란 쉽지 않을 것으로 생각되나, 특정 탄소원이 함유된 배지에서 균을 배양하여 그 균이 세포 외로 방출하는 효소에 대한 활성을 검정하고 효소 발현을 주도하는 genome sequence를 밝힌다면 균류의 진화적 측면에서 이들을 일차적으로 구별할 수도 있을 것이다.

대부분의 외생균근성 버섯들은 일반적인 버섯 배양용 인공배지에서 배양 시 균사체가 매우 느리게 자라는 특성이 있다. 따라서 산림으로부터 수집한 외생균근균의 순수분리나 균사 생장을 촉진하기 위해서는 특정 배지를 사용해야 하며, 반합성 배지인 MMN (modified Melin-Norkran) 배지[3]가 가장 널리 사용되고 있다. 이 배지에는 외생균근균이 단일 탄소원 또는 기본 탄소원으로 이용할 수 있는 포도당뿐만 아니라 무기질소원과 기타 미량원소들이 함유되어 있어 균사체 대량생산 목적의 액체배양에 주로 사용된다[4]. 균사 생장과 영양원과의 생리학적 관계를 구명하기 위해서는 고체배양보다는 액체배양을 실시하며[5], MMN 배지를 기본으로 질소원이나 일부 성분들을 변경하여 균사 생장에 적합한 영양원을 선발하는 예도 있다[6,7].

일반적으로 외생균근균의 배양을 위해 가장 널리 사용되는 탄소원은 포도당이나, 이와 분자 구조가 서로 다른 탄소원들도 균사가 성장하기에 적합한 영양원이 될 수 있다. 포도당과 전분은 액체배양뿐만 아니라 고체배양 시에서도 항버섯(능이)이나 송이의 균사 생장을 위한 최적 탄소원임이 보고되었다[8]. 이 중 전분은 포도당이 α 결합을 하고 있는 homopolycan 계열의 탄소원으로, 송이 균사체의 경우 이 결합을 분해할 수 있는 α-amylase의 활성이 높아 그들의 균사 생장에 전분이 우수한 탄소원으로 제공된 것으로 보고 있으며, 전분이 함유된 액체배지에서 능이의 균사 생장이 높게 나타난 이유 또한 송이와 유사한 기전에 의한 것으로 추정하였다[9]. 송이는 homoglycan 계열의 또 다른 다당류인 텍스트린이 함유된 액체배지에서도 균사 생장이 우수한 것으로 보고되었다[10]. 민달걀버섯(*Amanita caesarea*)의 일부 균주는 단당류의 유도체인 sugar alcohol 계열

의 만니톨이 함유된 고체 배지에서 균사 생장이 가장 우수하였고[11], 이당류인 trehalose와 heteroglycan계열의 펙틴 또한 바보송이(*Tricholoma bakamatsutake*)의 액체배양 시 균사 생장력이 우수한 탄소원으로 보고되었다[12]. 이와 같은 기존 연구를 참조하여 본 연구에서는 탄소원 7종(glucose, mannitol, trehalose, raffinose, starch, pectin, dextrin)을 선택하였다.

본 연구에서는 식용 및 약용 가치가 있는 것으로 알려진 외생균근균을 탄소원이 서로 다른 MMN 액체배지에 각각 배양하여 균사 생장에 적합한 탄소원을 조사하고, 동일종내 균주 간 탄소원 이용력을 비교하였으며, 균사체의 형태학적 성장 특성을 기술하였다.

재료 및 방법

균주의 수집과 접종원 준비

국내 및 스웨덴에서 수집하여 순수분리를 통해 국립산림과학원에 보존 중인 외생균근균을 대상으로 액체배지 내 탄소원 변화에 따른 균사생장 특성을 조사하였다(Table 1). 식용 가능하며 상업적 가치가 있다고 판단되는 균종의 종별 또는 동일 종내 균주 간 균사생장 특성을 비교하기 위해 다색벚꽃버섯, 항버섯, 접시겉겉이그물버섯, 송이 등을 각 균종별로 2균주씩 선택하여 총 8개 균주를 시험에 사용하였다. 접종원으로 사용할 순수배양체를 얻기 위해 potato dextrose agar (PDA) 사면배지에 냉장보존(4°C) 중이던 시험 균주들을 각 균종별로 PDA 또는 MMNA 배지(modified Melin-Norkran agar)에 접종하여 25°C에서 1~2개월 간 암배양 하였다.

탄소원 시험배지의 제조

공시한 외생균근성 버섯 균주의 균사 생장에 탄소원이 미치는 영향을 조사하기 위하여 Modified Melin-Norkran (MMN; sucrose 대신 glucose 10 g, malt extract 3 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.25 g, CaCl₂ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.15

Table 1. Ectomycorrhizal fungal strains used in this study

Scientific name	KFRI strain No. ¹⁾	Origin of strains		
		Forest vegetation	Location	Year isolated
<i>Hygrophorus russula</i>	818	<i>Quercus mongolica</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2006
<i>H. russula</i>	1987	<i>Q. mongolica</i>	Pyeongchang, Gangwon, Korea	2012
<i>Sarcodon aspratus</i>	1676	<i>Q. mongolica</i>	Hongcheon, Gangwon, Korea	2010
<i>S. aspratus</i>	1677	<i>Quercus</i> sp.	Unknown, Korea	2011
<i>Leccinum extremiorientale</i>	1194	<i>Quercus</i> sp.	Goseong, Gangwon, Korea	2009
<i>L. extremiorientale</i>	1195	<i>Quercus</i> sp.	Goseong, Gangwon, Korea	2009
<i>Tricholoma matsutake</i>	1256	<i>Pinus sylvestris</i>	Skelleftea, Sweden	2009
<i>T. matsutake</i>	1266	<i>P. rigida</i>	Sancheon, Gyeongnam, Korea	2009

¹⁾KFRI: Korea Forest Research Institute, Korea.

g, NaCl 0.025 g, 1% FeCl₃ 1.2 mL, thiamine-HCl 100 µg per 1 L) 배지를 기본배지로 사용하였다[3]. MMN 배지 내 유기 질소원(malt extract)과 무기질소원((NH₄)₂HPO₄, thiamin-HCl) 및 기타 미량 성분들은 그대로 유지한 채 포도당을 탄소원으로 하는 배지와 이를 대체하여 분자구조가 서로 다른 6종의 탄소원을 선택하여 10 g/L씩 배지에 동일하게 첨가하여 총 7종류의 시험배지를 제조하였다. 단당류로는 D-(+)-mannitol (FW 182.17)과 D-(+)-glucose (FW 180.16), 이당류는 D-(+)-trehalose dehydrate (FW 378.33), 삼당류는 D-(+)-raffinose pentahydrate (FW 594.51) 그리고 다당류로는 homoglycan계열 2종(soluble starch, dextrin from corn)과 heteroglycan 계열 1종(pectin from citrus peel)을 각각 첨가하여 제조하였다. 각 배지에 1 M HCl 또는 1 M NaOH를 가하여 pH 5.5가 되도록 조정후, 유리 삼각플라스크에 20 mL씩 분주하여 고압증기멸균(121°C, 20분)하였다.

탄소원 시험배지에 외생균근균 배양 및 균사생장 특성 조사

탄소원이 서로 다른 7종의 시험배지를 준비한 후, 각 배지 20 mL 당 시험균(직경 6 mm 크기의 접종원)을 1개씩 접종하였다. 모든 시험균을 25±2°C에서 60일간 암배양한 후, 배양체의 형태적 특성(균사체의 색, 집락 수를 기준으로 한 성장 형태, 배지 착색)을 관찰하여 기록하였다. 또한 정성원형 여과지(직경 110 mm, Advantec No.5A, Japan)에 배양체를 여과하여 70°C에서 2일간 건조한 후, 균사체 건중량(mg/flask)을 측정하였다. 이와 함께 배양체 여과액을 회수하여 final pH를 측정하고 시험배지의 pH 변화를 조사하여 균사 성장과의 상관성을 조사하였다.

결과 및 고찰

외생균근균의 기원

시험에 사용한 외생균근균의 대부분은 강원도(홍천, 평창, 고성)와 경남 지역의 에서 수집한 것이다(Table 1). 다색벚꽃버섯 KFRI 818과 1987, 향버섯 KFRI 1676, 접시겉껍이그물버섯 KFRI 1194와 1195는 신갈나무(*Quercus mongolica*)나 *Quercus* sp.이 분포하는 참나무림에서, 송이 KFRI 1266은 리기다소나무(*Pinus rigida*)가 분포하는 산림에서 수집하였다. 향버섯 KFRI 1677은 참나무림에서 수집한 균주이다. 송이 KFRI 1256은 스웨덴 Skelleftea 지역의 100년 생 구주적송(*Pinus sylvestris*)에서 발생한 균주로, 우리나라 산청 지역의 리기다소나무림에서 발생한 송이 KFRI 1266과의 균사생장 특성을 비교하기 위해 시험 균주로 선택하였다.

탄소원의 종류에 따른 외생균근균의 균사생장 특성

MMN 배지 내 탄소원 종류를 달리하여 외생균근균을 60일 간 배양한 결과, 송이 2균주(KFRI 1256, 1266)와 능이

1균주(KFRI 1677)를 제외한 대부분의 균주들은 pectin을 탄소원으로 한 배지에서 균체량이 가장 낮게 나타났다(Fig. 1~4). 이와 달리 총 8개의 시험균주 중 5균주(다색벚꽃버섯 KFRI 1987, 향버섯 KFRI 1676과 1677, 접시겉껍이그물버섯 KFRI 1194, 송이 KFRI 1256)는 dextrin이 함유된 배지에서 최대 균체량을 나타냈다. 다당류 3종에 대한 이용도를 비교한 결과, 송이 KFRI 1256을 제외한 7개의 균주들은 heteroglycan보다는 homoglycan 계열의 탄소원에서 균사생장이 더 우수하였다.

다색벚꽃버섯의 경우, KFRI 818과 KFRI 1987 균주는 pectin이 함유된 배지에서 최소 균체량을 나타냈으며, 두 균주 간 균체량이 약 2배 정도 차이를 보여 동일 균종이라도 pectin을 탄소원으로 이용하는 능력이 균주 간에 서로 다를 수 있었다(Fig. 1). KFRI 818은 7종류의 탄소원 중 이당류인 trehalose가 함유된 배지에서, KFRI 1987은 삼당류인 raffinose (63.4±4.5 mg/flask)와 다당류인 dextrin (63.0±3.0 mg/flask)에서 균사가 최대로 성장하였다($p<0.05$).

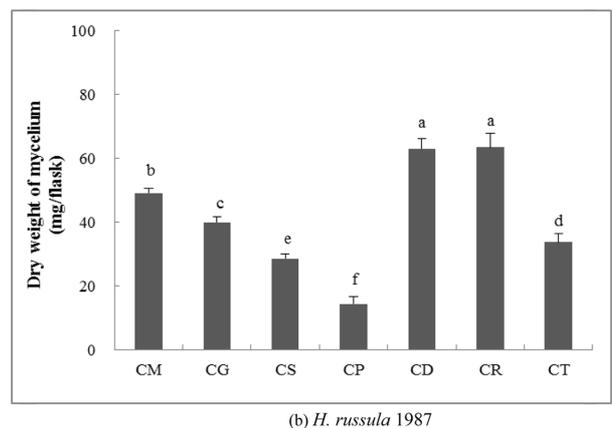
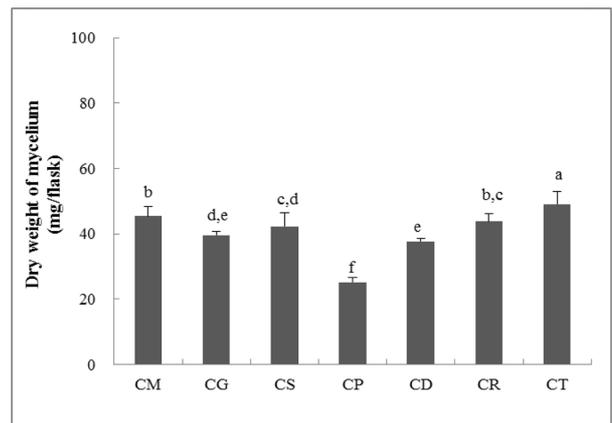
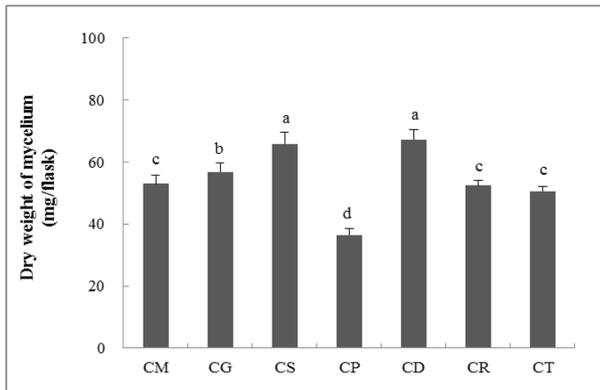


Fig. 1. Effect of carbon sources on mycelial growth of two different *Hygrophorus russula* strains. ¹Cx indicates the culture medium containing carbon source (10 g/L). CM, mannitol; CG, glucose; CS, soluble starch; CP, pectin; CD, dextrin; CR, raffinose; CT, trehalose. ²Values with the same uppercase letters on each bar are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p<0.05$). Values are mean±SD of seven replicates.

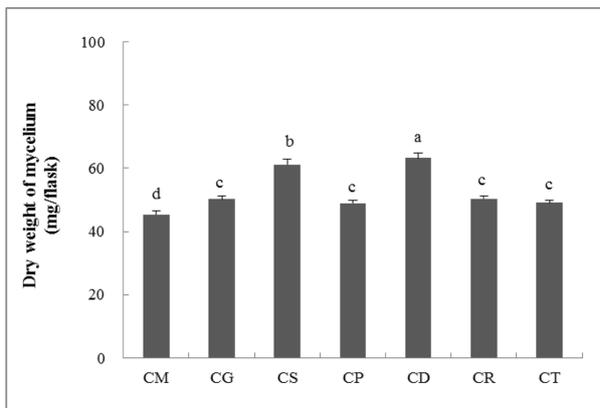
분자량은 비슷하나 분자구조가 서로 다른 당당류 2종에 대한 다색벚꽃버섯 2균주의 균사 성장력을 비교한 결과, KFRI 818은 glucose (FW 180.16)와 mannitol (FW 182.17)에서 현격한 균체량 차이를 보이지 않았다. KFRI 1987의 경우에는 glucose (53.2±2.0 mg/flask)보다 sugar alcohol 계열의 mannitol (63.8±1.5 mg/flask)이 함유된 탄소원 배지에서 더 유의하게 균이 성장하였다($p < 0.05$). 향버섯 2균주는 Fig. 2에서와 같이 다당류인 homoglycan 계열의 dextrin을 탄소원으로 하는 시험배지에서 균체량이 최대에 달했으며, 두 균주 간 균체량에도 큰 차이를 보이지 않았다(KFRI 1676: 67.3±3.0 mg/flask, KFRI 1677: 63.3±1.5 mg/flask). KFRI 1676은 starch가 함유된 배지에서도 높은 균체량을 나타냈는데, dextrin배지에서의 균체량과 통계적으로 유의한 차이가 없어 이 두 성분이 KFRI 1676의 균사생장에 적합한 탄소원임을 알 수 있었다. KFRI 1677은 다당류인 starch에서도 높은 균사 성장력을 나타냈는데, 이 균주의 경우 당당류, 이당류, 삼당류보다는 homopolygan 계열의 두 다당류에서 균 성장력이 높아 다당류의 이용 능력이 우수함을 알 수 있었다. 접시결결이그물버섯 역시 7종류의 탄소원 중 pectin

이 함유된 배지에서 균 성장력은 최저로 나타났으며, KFRI 1194와 KFRI 1195 간 균체량은 유사하였다(Fig. 3). KFRI 1194의 탄소원별 균사 성장력을 비교한 결과, dextrin, starch, trehalose, monosaccharides (mannitol, glucose), raffinose, pectin 순으로 균체량이 높게 나타났다. KFRI 1195는 당당류나 다당류보다는 raffinose와 trehalose와 같은 탄소원에서 최대 균체량을 나타냈으며, pectin과 dextrin이 함유된 배지는 다른 탄소원 6종에 비해 균체량이 현격히 낮았다(Fig. 3).

신갈나무와 같은 참나무림에서 수집한 다색벚꽃버섯, 향버섯, 접시결결이그물버섯 균주들의 대부분은 탄소원으로 pectin이 함유된 배지에서 균사가 잘 성장하는 특성을 보인다(Fig. 1~3), 침엽수림에서 수집한 송이의 두 균주는 pectin이 함유된 배지에서 최소 균체량을 나타내지 않았다(Fig. 4). 스웨덴의 구주적송림에서 수집한 KFRI 1256은 glucose와 raffinose가 함유된 배지에서, 우리나라 경남 지역 리기다소나무림에서 수집한 KFRI 1266은 dextrin이 함유된 탄소원 배지에서 최소 균체량을 나타냈다(Fig. 4). 또한 KFRI 1256과 KFRI 1266은 동일한 균종임에도 불구하고, 7종류의 탄소원을 그들의 균사 성장을 위해 이용하는

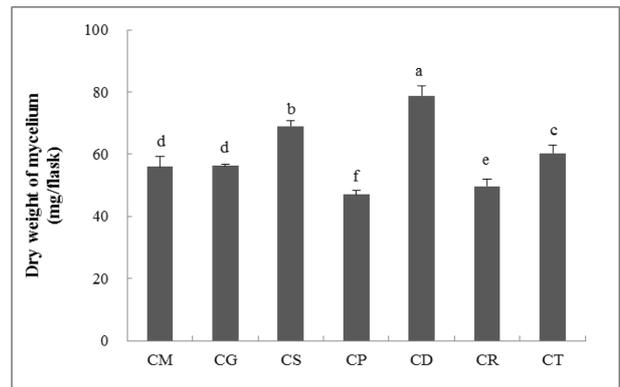


(a) *S. aspratus* 1676

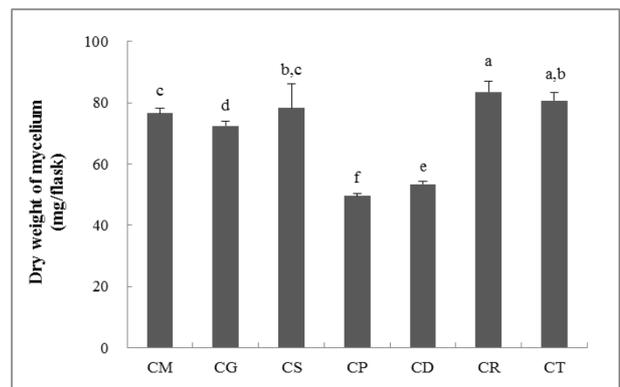


(b) *S. aspratus* 1677

Fig. 2. Effect of carbon sources on mycelial growth of two different *Sarcodon aspratus* strains. ¹⁾Values with the same uppercase letters on each bar are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$). Values are mean±SD of seven replicates.



(a) *L. extremiorientale* 1194



(b) *L. extremiorientale* 1195

Fig. 3. Effect of carbon sources on mycelial growth of two different *Leccinum extremiorientale* strains. ¹⁾Values with the same uppercase letters on each bar are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$). Values are mean±SD of seven replicates.

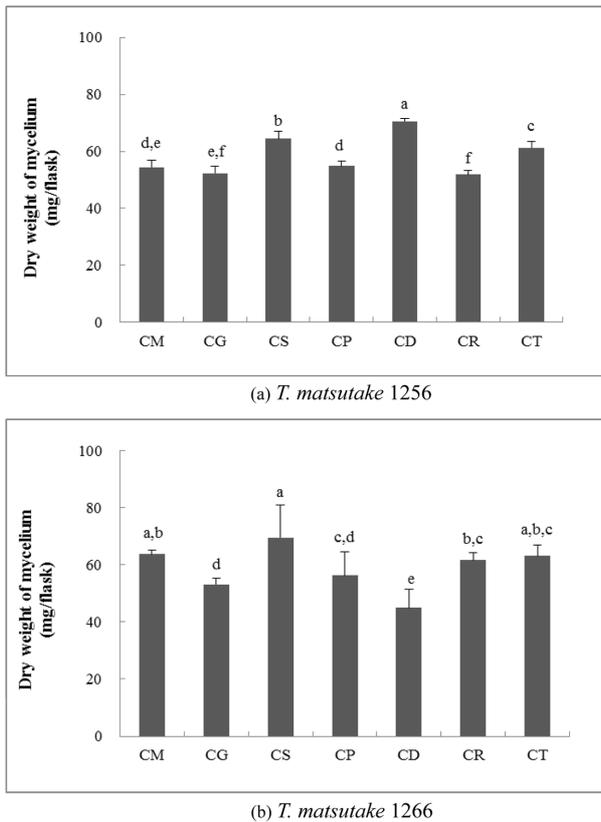


Fig. 4. Effect of carbon sources on mycelial growth of two different *Tricholoma matsutake* strains. ¹⁾Values with the same uppercase letters on each bar are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$). Values are mean \pm SD of seven replicates.

능력이 서로 다른 특성을 보였다. KFRI 1256은 dextrin이 함유된 배지에서 최대 균사 성장력을 나타냈으며 (70.6 \pm 0.8 mg/flask), starch (64.4 \pm 2.7 mg/flask)를 탄소원으로 이용하는 능력도 다른 당당류나 삼당류보다 높았다. KFRI 1266

은 KFRI 1265와는 달리 dextrin에서 균체량이 최소였으며, starch와 mannitol 및 trehalose에서의 균체량은 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p < 0.05$). 동일한 송이균종임에도 불구하고 이와 같이 두 균주 간 탄소원 이용 능력이 서로 다른 이유는 명확히 알 수 없으나 두 균주가 발생한 지역의 식생이 서로 다른 데에 기인한 결과로 추정된다. 또한 시험 규모가 적어 시험균주들의 식생과 탄소원 이용과의 상관관계를 통계적으로 제시하기는 어려우나, 활엽수와 침엽수에서 발생한 균종 간의 탄소원 이용도에 차이가 있는 것으로 보아 기주식물의 종류와 외생균근균이 주로 이용하는 특정 탄소원과의 상관관계를 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

외생균근균 배양 후 탄소원 시험배지의 pH 변화

탄소원 시험배지에 외생균근균을 접종하여 회분식 배양 (batch culture)을 할 경우, 시간이 경과함에 따라 배지 내에는 균의 각종 대사산물들이 존재하게 되며, 이들이 수소이동 농도의 변화를 가져와 균사 성장에 영향을 끼칠 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 60일간 균을 배양하고 회수한 7종류의 탄소원 배지를 대상으로 final pH를 측정하여 initial pH (pH 5.5)와의 차이가 있는지를 조사하였다.

Table 2는 탄소원 시험배지에서 외생균근균을 60일간 배양한 후 배지의 final pH 값을 측정한 것으로 모든 시험균의 pH는 최소 1.1~최대 3.0까지 감소하였다. 다색벚꽃버섯을 접종한 탄소원 시험배지에서의 initial pH와 final pH 값의 평균치를 기준으로 격차 범위를 조사한 결과, pH는 최소 1.1~최대 2.7까지 감소하였다. KFRI 818의 경우 pectin이 함유된 배지에서 final pH 값이 4.0으로 나타나 다른 탄소원 시험배지에 비해 initial pH 5.5와 최소 격차를 나타냈다. KFRI 1987을 배양한 배지의 final pH 값도 4.4로 측정되어 탄소원 시험배지 중 initial pH와의 격차가 가장 낮게 나타났다. Pectin은 다색벚꽃버섯 두 균주 모두 가장 낮은

Table 2. The final pH of culture media containing different carbon sources after 60 days of culture

Culture media	<i>Hygrophorus russula</i>		<i>Sarcodon aspratus</i>		<i>Leccinum extremiorientale</i>		<i>Tricholoma matsutake</i>	
	818	1987	1676	1677	1194	1195	1256	1266
CM	2.8 \pm 0.0 ^c	3.2 \pm 0.0 ^c	2.9 \pm 0.0 ^c	2.8 \pm 0.0 ^c	2.6 \pm 0.0 ^e	2.8 \pm 0.0 ^d	2.7 \pm 0.0 ^e	2.8 \pm 0.0 ^c
CG	2.8 \pm 0.0 ^c	3.0 \pm 0.1 ^d	2.6 \pm 0.4 ^d	2.8 \pm 0.0 ^c	2.6 \pm 0.0 ^{ef}	2.8 \pm 0.0 ^d	2.8 \pm 0.0 ^d	2.8 \pm 0.0 ^c
CS	3.3 \pm 0.1 ^b	3.3 \pm 0.2 ^c	3.1 \pm 0.0 ^b	3.2 \pm 0.0 ^b	3.0 \pm 0.0 ^b	3.1 \pm 0.0 ^c	3.1 \pm 0.0 ^b	3.1 \pm 0.1 ^c
CP	4.0 \pm 0.0 ^a	4.4 \pm 0.0 ^a	4.2 \pm 0.0 ^a	4.4 \pm 0.0 ^a	4.0 \pm 0.1 ^a	4.5 \pm 0.0 ^b	4.3 \pm 0.0 ^a	4.2 \pm 0.1 ^a
CD	2.8 \pm 0.0 ^c	3.0 \pm 0.0 ^d	2.8 \pm 0.0 ^{cd}	2.8 \pm 0.0 ^d	2.6 \pm 0.0 ^{de}	5.0 \pm 0.1 ^a	2.8 \pm 0.0 ^e	3.6 \pm 0.8 ^b
CR	2.8 \pm 0.0 ^c	3.5 \pm 0.2 ^b	2.8 \pm 0.0 ^{cd}	2.8 \pm 0.0 ^c	2.6 \pm 0.0 ^{cd}	2.8 \pm 0.0 ^d	3.0 \pm 0.0 ^e	2.8 \pm 0.0 ^c
CT	2.8 \pm 0.0 ^c	3.3 \pm 0.2 ^c	2.8 \pm 0.0 ^{cd}	2.8 \pm 0.0 ^c	2.5 \pm 0.0 ^f	2.7 \pm 0.0 ^e	2.8 \pm 0.0 ^e	2.8 \pm 0.0 ^c

¹⁾The initial pH of media was adjusted to 5.5 with 1 M HCl or 1 M NaOH.

²⁾Values with the same uppercase letters in each column are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$). Values are mean \pm SD (n=7).

Cx indicates the culture medium containing carbon source (10 g/L). CM, mannitol; CG, glucose; CS, soluble starch; CP, pectin; CD, dextrin; CR, raffinose; CT, trehalose.

균사 생장력을 나타낸 탄소원 시험배지로 이러한 균주들의 경우에는 pectin을 이용할 수 있는 능력이 부족하여 균사 생장이 저조하게 되고, 결국 유기산이나 이온 등의 대사산물이 배지 내로 활발하게 분비되지 않아 initial pH 값이 크게 감소하지 않은 것으로 추정된다. Pectin을 제외한 다른 탄소원 시험 배지에서의 final pH는 pectin보다 낮은 수치로 KFRI 818은 pH 2.8, KFRI 1987은 pH 3.0~3.5 범위의 값을 갖는 것으로 조사되었다. 다색벚꽃버섯에서와 같이 향버섯 2균주 또한 pectin이 함유된 시험배지에서 final pH 값이 가장 높게 나타나(pH 4.2~4.4) initial pH와의 격차가 가장 적었다. KFRI 1676은 pectin이 함유된 배지에서 최소 균체량을 나타냈으며, 동일 배지에서의 final pH값은 4.2로 탄소원 시험배지 중 가장 높았다. 반면, KFRI 1677은 man-

nitol이 함유된 배지에서 최소 균체량을 나타냈으나, 동일 배지에서의 final pH값은 2.8로 initial pH보다 유의하게 감소되었다. 또한 균체량이 가장 높았던 dextrin 시험배지의 final pH값도 2.8로 측정되어 균체량과 배지의 final pH 간 상관관계가 있다고 단정하기는 어려웠다. 접시결결이그물버섯의 경우, KFRI 1194는 pectin이 함유된 배지에서 final pH값이 4.0 ± 0.1 로 가장 높았으며, 이 때 균체량은 7종류의 탄소원 시험배지 중 가장 낮았다. KFRI 1195는 pectin이나 dextrin이 함유된 시험배지에서 배양 시 배지의 final pH값이 4.5 또는 5.0 ± 0.1 로 측정되어 다른 탄소원 시험배지에 비해 높았다. 또한 KFRI 1195의 균체량은 다른 종류의 탄소원 시험배지보다 pectin이나 dextrin이 함유된 시험배지에서 유의하게 낮아 균체량과 시험배지의 final pH값이 역

Table 3. Morphological characteristics of *H. russula* and *S. aspratus* strains grown in different culture media for 60 days

Strains	Culture media ¹⁾	Mycelium color	Growth type ²⁾	Medium coloration
<i>Hygrophorus russula</i> 818	CM	White	Multiple colony	No
	CG	White	Multiple colony	No
	CS	White	Multiple colony	No
	CP	Light brown	Single colony	No
	CD	White	Multiple colony	No
	CR	White	Multiple colony	No
	CT	White	Multiple colony	No
<i>H. russula</i> 1987	CM	White	Multiple colony	No
	CG	White	Multiple colony	No
	CS	White	Multiple colony	No
	CP	Light brown	Single colony	No
	CD	White and pale yellow	Multiple colony	No
	CR	White and pale yellow	Multiple colony	No
	CT	White and pale yellow	Multiple colony	No
<i>Sarcodon aspratus</i> 1676	CM	White	Multiple colony	No
	CG	White	Multiple colony	No
	CS	White	Multiple colony	No
	CP	White and pale yellow	Multiple colony	No
	CD	White	Multiple colony	No
	CR	White	Multiple colony	No
	CT	White	Multiple colony	No
<i>S. aspratus</i> 1677	CM	White and pale purple	Multiple colony	No
	CG	White and pale purple	Multiple colony	No
	CS	Pale brown	Multiple colony	No
	CP	White and pale brown	Multiple colony	No
	CD	Pale purple brown	Multiple colony	No
	CR	White and purple brown	Multiple colony	No
	CT	White and pale purple	Multiple colony	No

¹⁾The abbreviations are same that Table 2.

²⁾The growth types of mycelial cultures were categorized into the two patterns according to the number of fungal colony per culture flask. The presence of two and more fungal colonies per culture flask was determined as 'multiple colony'.

시 반비례 관계를 나타냈다. 송이 2균주 역시 7종류의 탄소 원 중 pectin이 함유된 배지에서의 final pH값이 높게 나타났다. 그러나 KFRI 1256과 KFRI 1266에서 최소 균체량을 나타낸 탄소원은 glucose와 raffinose, dextrin 등으로 균체량과 final pH 간 상관 관계가 성립되지 않았다.

이상과 같이 MMN 배지를 기본으로 탄소원을 달리하여 외생균근균을 액체배양할 경우, 대부분의 외생균근균들은 균체량이 증가함에 따라 배지의 final pH가 감소하는 특성을 나타냈다. 이는 MMN 배지 또는 암모늄 형태의 무기질 소원으로 치환된 MMN 변형배지에 외생균근균을 배양한 선행 연구 결과와도 일치하는 것으로, 송이를 포함한 몇몇 외생균근균들을 액체배양한 경우 두 배지 모두 final pH가 3.0 부근으로 나타나 배지의 initial pH 5.5보다 감소하는

특성을 나타냈다[7]. 탄소원 또는 질소원을 달리한 MMN 배지에 외생균근균을 접종하여 배양한 경우, 각 배지의 final pH가 initial pH보다 감소하는 이유는 균이 성장하면서 배지 내로 방출하는 유기산이 주요인이라 생각된다.

외생균근균 배양체의 형태학적 특성

외생균근균의 균사생장 특성이 액체배지 내 탄소원의 종류나 균주에 따라 다르게 나타나는 지 알기 위해 배양용기 내 균사체의 색과 성장 형태 및 배지 착색 여부 등을 관찰하여 Table 3과 4에 기록하였다. 특히 성장 형태는 fungal colony의 크기에 상관 없이 시험배지 내 탄소원을 이용하여 세포의 성장점을 증가시킬만한 형태로 균사체가 분산되어 성장하는 지에 기준을 두어 임의로 배양 용기 내에 존재하

Table 4. Morphological characteristics of *L. extremiorientale* and *T. matsutake* strains grown in different culture media for 60 days

Strains	Culture media ¹⁾	Mycelium color	Growth type	Medium coloration
<i>Leccinum extremiorientale</i> 1194	CM	White and pale yellow	Single colony	No
	CG	White and light brown	Multiple colony	No
	CS	White and pale yellow	Single colony	No
	CP	Light brown	Single colony	No
	CD	White	Single colony	No
	CR	White	Multiple colony	No
	CT	White and pale yellow	Multiple colony	No
<i>L. extremiorientale</i> 1195	CM	White and pale yellow	Multiple colony	No
	CG	White	Multiple colony	No
	CS	White	Single colony	No
	CP	Light brown	Single colony	No
	CD	White	Single colony	No
	CR	White and pale yellow	Single colony	No
	CT	White and dark brown	Single colony	No
<i>Tricholoma matsutake</i> 1256	CM	White	Multiple colony	No
	CG	White	Multiple colony	No
	CS	White	Multiple colony	No
	CP	Light brown	Multiple colony	No
	CD	White	Single colony	No
	CR	White	Multiple colony	No
	CT	White	Multiple colony	No
<i>T. matsutake</i> 1266	CM	White	Multiple colony	No
	CG	White	Multiple colony	No
	CS	White	Multiple colony	No
	CP	Light brown	Multiple colony	No
	CD	White	Single colony	No
	CR	White	Multiple colony	No
	CT	White	Multiple colony	No

¹⁾The abbreviations are same that Table 2.

는 fungal colony의 수에 따라 2종류로 구분하였다. Fungal colony가 1개만 존재할 경우 'single colony', 2개 이상의 colony가 존재할 경우 'multiple colony'로 기재하였다.

다색벚꽃버섯 KFRI 818의 균사생장 특성을 조사한 결과, pectin을 제외한 6종의 탄소원 시험배지 모두에서 백색의 균사체가 관찰되었으며, 균의 영양세포가 분열한 후 배지 내에 여러 개로 흩어져 fungal colony를 형성한 것으로 추정되는 multiple colony의 생장 형태를 나타냈다(Table 3). 또한 액체배지를 착색시킬만한 멜라닌 색소 등은 관찰되지 않았다. 다색벚꽃버섯 KFRI 1987 역시 다당류 2종과 starch를 탄소원으로 함유하고 있는 배지에서는 백색의 multiple colony가 관찰되었다. Dextrin, raffinose, trehalose가 함유된 배지에서 균사체는 백색~옅은 황색계열의 multiple colony를 형성하였으며, 배지 착색 현상은 역시 관찰되지 않았다. Pectin이 함유된 배지에서는 KFRI 818과 1987 모두 접종원을 중심으로 균 생장이 매우 저조한 single colony 형태로 생장하였다. 향버섯 2균주는 7종의 탄소원 시험배지에서 모두 multiple colony의 형태로 생장하였으며, 배지 착색은 관찰되지 않았으나, 균사체의 색은 KFRI 1676과 KFRI 1677 간 다르게 나타났다(Table 3). KFRI 1676은 pectin을 제외한 6종의 탄소원 시험배지에서 백색의 균사체를 형성한 반면, KFRI 1677은 탄소원 배지별로 백색과 옅은 자주색(또는 옅은 갈색)이 혼합되어 있거나 옅은 자주색과 갈색이 혼합되어 있는 등 다양한 색상의 균사체가 관찰되었다(Table 3). 접시결결이그물버섯 2균주 또한 백색을 기본 바탕으로 옅은 황색에서 갈색, 짙은 갈색까지 혼합되어 균주 및 탄소원의 종류별로 균사체의 색이 다양하였다(Table 4). 송이의 경우, pectin을 제외한 나머지 6종류의 탄소원 시험배지에서 KFRI 1256과 KFRI 1266 모두 백색의 균사체로 생장하였으며, 배지 착색 현상은 관찰되지 않았으나, 두 균주 모두 dextrin 배지에서만 single colony 형태로 생장하였다.

대부분의 외생균근균들은 7종류의 탄소원 중 특히 pectin이 함유된 액체배지에서 배양 시 형태학적 특성이 다르게 나타났다(Table 3과 4). 또한 대부분의 균주들은 pectin을 탄소원으로 한 경우 균사 생장이 저조하였다. 특정 탄소원이 함유된 배지에서 배양 시 외생균근균 균사체의 형태학적 특성과 균사 생장과의 상관관계를 도출하기는 어려웠다. 그러나, pectin의 경우 그의 구조적 특성과 물과의 접촉 시 수화되는 특성 그리고 식품이나 의약품 제조 시 고형화제(gelling agent)나 농후제(thickner)로 이용된다는 측면에서 외생균근균 균사체의 형태학적 특성이 그들의 균사 생장에 영향을 줄 가능성도 있으리라 생각한다. Pectin을 탄소원으로 한 경우, 대부분의 균주들의 균사체는 light brown의 색을 띠는 데, 이는 상용으로 판매되고 있는 pectin powder의 색을 반영한 것으로 보인다. Pectin은 크게 감귤류나 사과에서 추출하는데, 감귤류에서 추출한 분말의 경우에는 white, light brown, light cream, light tan 등의 색을 띠는

반면, 사과에서 추출한 pectin은 이보다 더 진한 색을 띠는 것으로 알려져 있다[13]. 또한 pectin은 물과 접촉 시 점성이 증가하고, 매우 빠르게 수화되어 clump를 형성하는 경향이 있어 가정용 잼 등을 제조하는 데에도 이용된다[13]. 본 실험에서는 사용한 pectin은 감귤류 껍질에서 추출한 heteropolysaccharide로, 외생균근균의 균사체 주변에 수화된 pectin 고분자가 흡착하거나 포위하여 세포의 생장점 증가 기회를 감소시킴으로써 light brown 계열의 single colony로 남게 된 것으로 보인다. 접시결결이그물버섯의 두 균주는 pectin을 포함한 3종류의 다당류 모두에서 single colony의 형태로 균사체가 생장하는 데, pectin보다 soluble starch나 dextrin에서의 균체량이 유의하게 많아 heteroglycan보다 homoglycan 구조의 다당류에 대한 이용도가 높았던 것으로 생각된다. 특히 송이의 경우에는 pectin과 starch 모두 다당류에 속하는 탄소원이긴 하지만, pectin보다 starch에서의 균체량이 많은 것으로 나타나 송이 2균주 모두 그들의 균사 생장을 위해 starch를 분해할 수 있는 α -amylase를 세포 밖으로 분비하면서 single colony의 형태를 신장시킨 것으로 보인다.

적 요

4종의 외생균근균이 MMN 배지상에서 7종 탄소원에 대한 이용능력을 조사하였다. 60일간 순수배양한 결과, 다색벚꽃버섯(KFRI 1987), 향버섯, 접시결결이그물버섯(KFRI 1194), 송이(KFRI 1256)는 dextrin에서 균사 생장이 우수하였다. 다색벚꽃버섯, 향버섯(KFRI 1676), 접시결결이그물버섯은 pectin에서 균사 생장이 가장 낮았다. 송이(KFRI 1256)를 제외한 7개의 균주들은 heteroglycan(pectin)보다 homoglycan계 탄소원(starch, dextrin)의 이용률이 더 높은 것으로 조사되었다. 균 배양 후 배지의 pH 값은 배양 전보다 최소 1.1~최대 3.0 범위까지 감소하였다. 외생균근균 배양체의 형태적 특징을 조사한 결과, 모든 탄소원 시험배지에서 백색 균사체가 우세하였으나 탄소원의 종류에 따라 황색, 갈색, 자주색 계열의 다양한 균사체가 관찰되었다. 접시결결이그물버섯은 4~5종류의 탄소원에서 single colony의 형태로 생장한 반면, 이외 대부분의 균주들은 6종의 탄소원에서 multiple colony의 형태로 생장하였다.

감사의 글

본 연구는 국립산림과학원 '산림미생물 유전자원의 수집 및 증식 보존 기술 연구(FP 0801-2010-01)'의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Taylor AFS, Alexander I. The ectomycorrhizal symbiosis: life

- in the real world. *Mycologist* 2005;19:102-12.
2. Nehls U, Göhringer F, Wittulsky S, Dietz S. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol* 2010;12:291-302.
 3. Marx DH. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 1969;59:153-63.
 4. Harvey LM. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. *Biotech Adv* 1991;9:13-29.
 5. 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 434: Korea Forest Research Institute; 2011.
 6. Barr J, Comini B, Elferink MO, Kuyper TW. Performance of four ectomycorrhizal fungi on organic and inorganic nitrogen sources. *Mycol Res* 1997;101:523-9.
 7. Jeon SM, Ka KH. Nitrogen source-requirement and preference of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Kor J Mycol* 2013;41:149-50.
 8. Ohta A. Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience* 2001;38:403-8.
 9. Lee WY, Ahn JK, Ka KH, Park EJ. Liquid culture of mushroom mycelia and production of valuable compounds. Research report 08-07: Korea Forest Research Institute; 2008.
 10. Kim IY, Jung GR, Han SK, Cha JY, Sung JM. Favorable condition for mycelial growth of *Tricholoma matsutake*. *Kor J Mycol* 2005;33:22-9.
 11. Daza A, Manjon JL, Camacho M, Osa LR, Aguilar A, Santamaria C. Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on *in vitro* culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. *Mycorrhiza* 2006;16:133-6.
 12. Terashima Y. Carbon and nitrogen utilization and acid production by media of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake* *in vitro*. *Mycoscience* 1999;40:51-6.
 13. Srivastava P, Malviya R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry-An overview. *Ind J Nat Pro Res* 2011;2:10-8.