

차가버섯(*Inonotus obliquus*)의 배양조건과 균핵 형성

이원호 · 박영진 · 김호경^{1,3} · 차주영² · 김태웅³ · 성재모*

강원대학교 생물자원공학부, ³생명과학부 ¹주) 머쉬텍, ²일본 북해도대학 북방생물권 필드과학센터

Favorable Condition of Culture and Sclerotial Formation by *Inonotus obliquus*

Won-Ho Lee, Young-Jin Park, Ho-Kyung Kim^{1,3}, Joo-Young Cha², Tae Woong Kim³ and Jae-Mo Sung*

Division of Bio-Resources Engineering,

³Division of Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Mushtech Co. Ltd. Chuncheon 200-161, Korea

²Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

(Received July 13, 2005)

ABSTRACT: Altogether twenty isolates were collected from Wakayama, Japan. The optimum mycelial growth of *I. obliquus* was observed in BMYA and MCM. The optimum temperature and pH for the mycelial growth were 25°C and 6.0~7.0, respectively. The optimum carbon and nitrogen sources were dextrose and yeast extract, respectively. Similarly, the optimum mineral salt was K₂HPO₄. The optimum number of mycelial discs for the mycelial growth was 6~7 per 100 ml. Similarly, the optimum culture period was 21~22 days in liquid broth. The optimum brown rice : water ratio was 1 : 1. No difference in mycelial growth was observed in all the four types of tree stumps used.

KEYWORDS: Carbon sources, *Inonotus obliquus*, Nitrogen sources, Optimum culture period

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 담자균문의 소나무비늘 버섯과(Hymenochaetaceae)에 속하는 약용버섯으로 주로 러시아를 비롯한 한랭지역에서 자생하는 검은 자작나무에 덩이 모양으로 기생하는 균핵으로 이루어져 표면은 검고 내부는 황갈색을 띠고 있다(Kier, 1961; Shivrina, 1967). 차가버섯은 다른 약용버섯과 마찬가지로 항종양 활성을 나타내는 다당체를 많이 함유하고 있고 자실체로부터 추출된 수용성 및 불용성 다당체는 각각 17.7% 및 13.3%를 차지하고 있는데 균사체 배양으로부터 얻어진 다당체보다 항종양 활성이 2~3배 높은 것으로 보고되었다(Kahlos *et al.*, 2002).

차가버섯은 자연산을 채집하여 이용되어 왔는데 채집에 많은 노력이 필요하므로 인공재배의 필요성이 요구된다(Wasser, 2002). 따라서 본 연구에서는 차가버섯의 배양적 특성을 알아내어 대량생산을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 균주는 강원대학교 동충하초은행에서 채집(일본) 보관중인 I-8, I-10, I-12, I-14를 공시균주로

사용하였다. 공시균주는 MYA(Malt extract yeast extract agar) 배지에 접종하여 15일 마다 계대배양하면서 공시균주로 사용하였다.

배양특성조사

차가버섯균의 적정기본배지를 선발하기 위하여 PDA(Potato dextrose agar)를 비롯한 7종의 배지를 이용하였으며 각각의 배지는 121°C, 15 psi(1.2 kg/cm²)에서 20분간 살균 후 살균된 petri-dish(직경 8.5 cm)에 15~20 ml씩 분주하여 조제하였으며, MYA 배지에서 15일간 배양된 공시균주의 균사 선단부분을 직경 6 mm cork borer로 잘라내어 얻은 균사체를 조제한 배지의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 25°C incubator에 14일간 배양하여 균사의 생장을 조사하였다.

공시균주의 균사생육 최적 온도를 규명하기 위하여 기본배지로 선발된 배지를 이용하여 균사체를 접종 후 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C 등 온도를 달리하여 10일간 배양 후 균사 생장 길이를 측정하였다. 또한 초기 pH가 차가버섯의 균사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH로 pH를 4.0~9.0까지 1.0 간격으로 조절하여 배지를 만든 후 MYA 배지에서 배양한 접종원을 접종한 후 25°C의 incubator에서 14일간 배양하여 pH 별로 균사 생장을 측정하였다.

*Corresponding author <E-mail: jmsung@kangwon.ac.kr>

영양원 선발

차가버섯균의 균사생장에 적합한 탄소원을 선발하기 위하여 MYA를 기본배지로 하여 7종의 탄소원 농도를 2%로 탄소량이 되도록 배지를 조제하였다. 121°C, 15 psi (1.2 kg/cm²)에서 20분간 고압살균 후 살균된 Petri-dish (직경 8.5 cm)에 15~20 ml씩 분주하여 조제하였으며, MYA 배지에서 15일간 배양된 차가버섯균의 균사 선단부분을 직경 6 mm cork borer로 잘라 낸 다음 조제한 배지의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 25°C incubator에서 14일간 배양하여 균사의 생장을 조사하였다.

질소원을 선발하기 위하여 MYA를 기본배지로 하여 7종의 질소원 농도를 0.2%로 질소량이 되도록 배지를 조제한 다음 차가버섯균을 접종하여 균사의 생장을 조사하였다.

무기염류의 선발을 위하여 MYA를 기본배지로 하여 6종의 무기염류 농도를 0.1%로 배지를 조제한 다음 차가버섯균을 접종하여 균사의 생장을 조사하였다.

액체접종원 배양환경 조사

삼각플라스크 배양에서 차가버섯균이 균사체 생산에 미치는 접종량의 영향을 조사하기 위하여 300 ml의 Shake flask에 100 ml 배양액을 분주하여 silicon plug를 채운 후 121°C, 15 psi (1.2 kg/cm²)에서 20분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, petri-dish에서 배양된 균총의 선단을 내경 6 mm의 cork borer로 취하여 접종량을 3~8개씩 1개 간격으로 달리하여 접종 후 shaking incubator에서 25°C, 125 rpm으로 21일간 진탕배양하였다. 삼각플라스크에서의 생육측정은 filter paper(Whatman No. 2)에 여과시킨 후 80°C의 dry oven에서 항량·건조하여 균사체의 건조중량을 측정하였다. 또한 균사체 생산에 미치는 배양기간을 조사하기 위하여 균총을 5개 접종 후 shaking incubator에서 25°C, 125 rpm으로 배양하면서 하루간격으로 회수하여 filter paper(Whatman No. 2)에 여과시킨 후 80°C의 dry oven에서 항량·건조하여 균사체의 건조중량을 측정하였다.

현미와 원목을 이용한 균핵 배양

현미배지에서의 균사생장에 적정 수분함량을 조사하기

위하여 1000 ml pp(polypropylene)병에 현미 200 g와 수분을 140 ml, 160 ml, 180 ml, 200 ml, 220 ml을 넣은 후 121°C, 15 psi (1.2 kg/cm²)에서 60분간 가압 살균하여 공시균주를 접종 후 현미 균사체를 형성하여 비교하였다. 또한 원목배지의 종류에 따른 균사생장 및 자실체 형성을 알아보기 위하여 참나무, 자작나무, 은사시나무, 오리나무로 원목배지를 만든 후 121°C, 15 psi (1.2 kg/cm²)에서 120분 살균 후 액체종균을 100 ml 접종하였다. 접종 후 균사배양실에서 60일간 배양하여 균사생장을 비교하였다.

결과 및 고찰

배양특성

차가버섯균의 기본적인 배지를 선발하기 위하여 PDA를 비롯한 7가지의 배지를 이용한 실험 결과, BMYA(Birch malt extract agar)와 MCM(Mushroom complete medium) 배지에서 균사의 생장 및 밀도가 우수하게 나타났다 (Table 1, Fig. 1). BMAY 배지는 MYA 배지에 자작나무 추출물을 첨가한 배지로 높은 균사생장을 보였으며 이는 차가버섯의 기주식물이 자작나무이므로 자작나무 추출물이 균사생장에 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 온도는 25°C에서 균사생장이 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 차가버섯은 추운지방에서 자생하는 균이지만 균사생장에서는 일반 버섯균과 비슷하게 자라는 것을 확인할 수 있었다. 35°C 이상에서는 균의 대사작용에 영향을 미쳐 생장이 정지된다고 한다(Kumada *et al.*, 1976, 1977). pH 6.0~7.0의 배지에서 균사 생장이 양호한 것으로 나타났다(Fig. 3). 일반 버섯과 비슷한 배양특성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

영양원 선발

차가버섯의 영양원 선발 결과 탄소원으로는 4가지 균주에서 약간의 차이는 있지만 Dextrose를 첨가한 배지에서 다른 탄소원을 첨가한 배지보다 더 높은 균사의 생장 및 밀도가 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 질소원 선발에서는 Yeast extract를 첨가한 배지에서 다른

Table 1. Effect of medium on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*

	BMYA	MYA	PDA	SMS	BM	MCM	YM
I-8	58.9 ^a +++ ^b	43.8 ++	56.8 +++	57.3 ++	57.8 +	58.5 +++	38.5 +
I-10	63.2 +++	42.1 +++	68.1 ++	66.2 ++	74.9 +	76.3 +++	44 ++
I-12	55.9 +++	33.9 ++	48.2 +	37.5 ++	49.4 +	52.9 ++	25.2 ++
I-14	67.9 +++	46.6 +++	66.3 ++	74.6 ++	65.4 +	69.7 +++	47.7 ++

^aColony diameter (mm/14 days).

^bDensity : +, thin; ++, moderate; +++, compact.

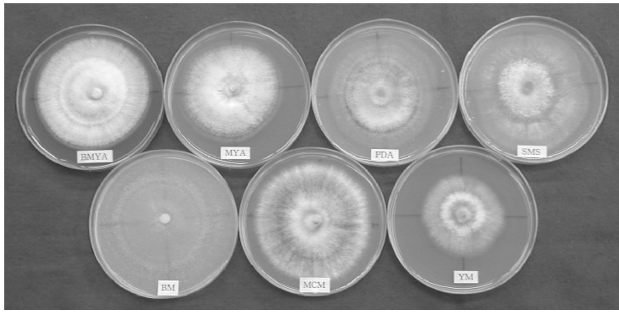


Fig. 1. Effect of cultural media on the mycelial growth of *Inonotus obliquus* (I-10).

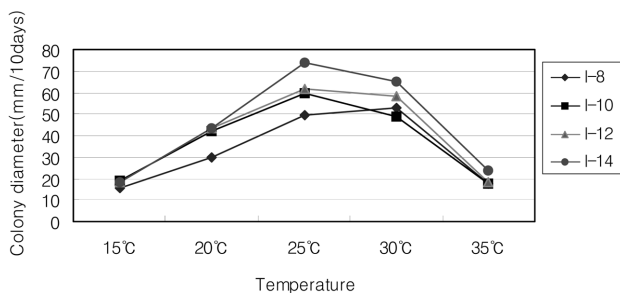


Fig. 2. Effect of temperature on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

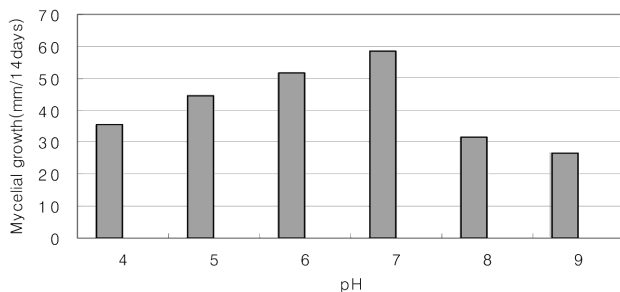


Fig. 3. Effect of initial pH on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

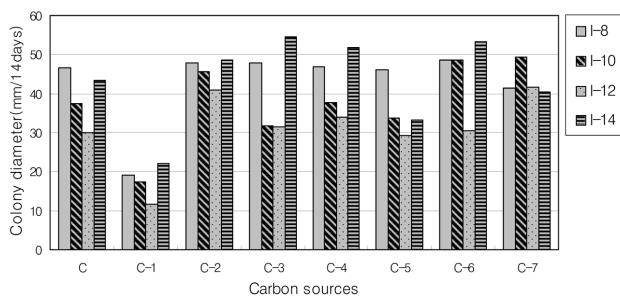


Fig. 4. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*. C : Control (no carbon source), C-1 : Xylose, C-2 : Dextrose, C-3 : Sucrose, C-4 : Maltose, C-5 : Soluble starch, C-6 : Dextrin, C-7 : Malt extract.

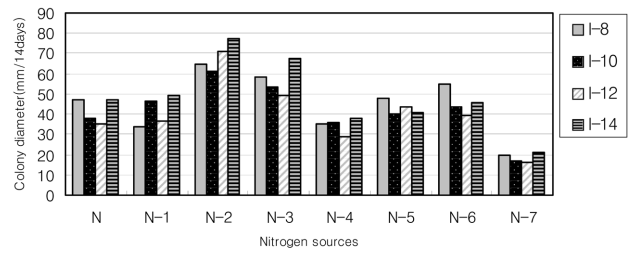


Fig. 5. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*. N : Control (no nitrogen source), N-1 : Peptone, N-2 : Yeast extract, N-3 : Asparagine, N-4 : Urea, N-5 : NaNO₃, N-6 : KNO₃, N-7 : NH₄NO₃.

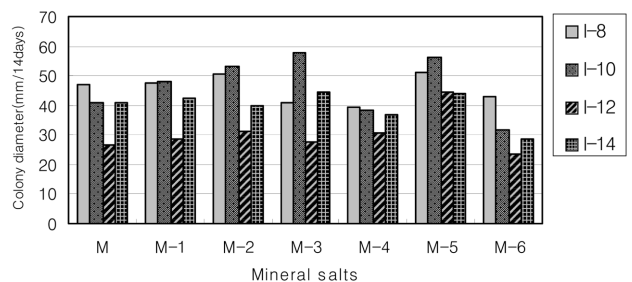


Fig. 6. Effect of various mineral salts on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*. M : Control (no mineral salt), M-1 : MgSO₄·7H₂O, M-2 : KCl, M-3 : CaCl₂, M-4 : KH₂PO₄, M-5 : K₂HPO₄, M-6 : NaCl.

질소원을 첨가한 배지보다 높은 균사생장 및 밀도를 보이는 것을 확인했다(Fig. 5). 무기염류 선별에서는 각각의 무기염류간의 큰 차이를 보이지는 않았지만 K₂HPO₄를 첨가한 배지에서 약간의 높은 균사생장을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 영양원이 느타리와 약간의 차이를 보이는 것으로 나타나 무기염류 종류에 따라 균사생장이 다른 것을 알 수 있었다.

액체접종원 배양환경 조사

삼각플라스크 접종원의 조건을 조사해본 결과, 접종량에 따른 균체 건중량 조사에서는 균사절편은 6개 접종하였을 때 가장 높은 균체 건중량을 보이는 것을 확인할 수 있었고 7~8개를 접종을 하였을 때는 6개 접종하였을 때와 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 7). 목질진흙버섯의 균사절편 5~6개를 넣었을 때 균체가 가장 많았다는 결과와 비슷한 결과를 보였고(이 등, 2004) 느타리버섯의 균사절편 3개를 넣었을 때 균체가 가장 많았다는 홍 등(2002)의 보고와는 차이가 있는 것은 차가버섯은 균사 자람이 느타리보다는 느리기 때문으로 사료된다. 또한 배양기간에 따른 균체 건중량을 조사한 결과, 접종 후 22일까지는 균체 건중량이 증가하였다(Fig. 8). 이는 버섯의 종류에 따라 액체접종원의 배양환경이 달라지는 것을 보여주었다.

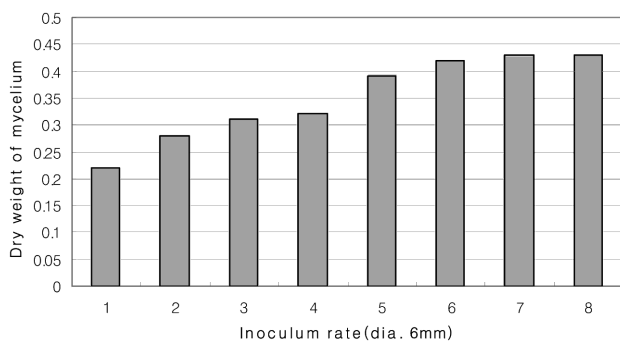


Fig. 7. Effect of inoculum amount on the mycelial growth of *Inonotus obliquus* (I-10) in shake flask cultures, incubated at 25°C, 125 rpm for 21 days.

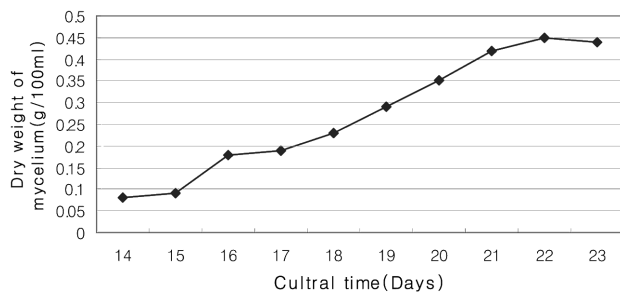


Fig. 8. Time course of the mycelial growth of *Inonotus obliquus* (I-10) in a Erlenmeyer flask, incubated at 25°C, 125 rpm.

현미와 원목을 이용한 군사배양 연구

현미배지의 수분함량 조사에서는 현미 200 g에 수분을 200 ml 첨가 하였을 때 군사생장이 높게 나타났다(Fig. 9). 현미배지에 수분 함량이 많으면 균의 침투력이 떨어져 배

지 밑 부분에 오염 원인이 되었으며, 배양기간도 오래 걸리는 것을 확인했다.

4개의 수종을 이용한 군사배양 실험 결과, 참나무, 자작나무, 은사시나무, 오리나무 4종 모두에서 군사생장이 잘 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10). 차가버섯균은 거의 모든 원목에서 군사 배양에 좋은 결과를 보임으로써 앞으로 균핵이나 자실체 형성에 도움이 되리라 생각되어진다.

적 요

차가버섯의 군사생육에 적합한 배지로는 BMYA 배지, MCM 배지로 조사되었으며 이 결과 MYA를 공시균주의 기본배지로 사용하였다. 배양환경 조사로 군사생육에 적합한 온도는 25°C, 초기 적정 pH는 6.0~7.0으로 나타났다. 영양원 선발로 탄소원은 2%의 농도에서 Dextrose를 사용하였을 때 군사 생장 및 밀도가 높게 나타났다. 질소원은 0.2%의 농도에서 Yeast extract를 사용하였을 때 군사생장 및 밀도가 높게 나타났다. 무기염류 조사에서는 여러 가지 무기염류 사이에 큰 차이를 보이지는 않았지만 0.1%의 농도에서 K_2HPO_4 를 사용하였을 때 약간의 높은 군사생장을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

차가버섯의 액체 접종원 배양환경 조사에서 군사절편 6개 절편을 접종하는 것이 삼각플라스크 배양에 적당한 것으로 나타났다. 또한 군사의 형태가 pellet 형태로 생장이 되었다. 배양기간에 따른 군사 생육조사에서 삼각플라스크 액체배양 시 300 ml의 진탕배양용 Shake flask에 군사절편 6개를 접종하여 22일간 배양하였을 때 높은 균체 건중량을 보였다.



Fig. 9. Effect of brown rice : water ratio on sclerotial formation.



Fig. 10. Effect of medium (tree stump) on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*. Alder, Oak, Aspen, and Birch from left to right.

현미배지를 이용한 균사체 형성에 관한 조사에서는 현미배지의 수분함량에 따른 조사를 하여 본 결과 현미 200 g와 수분을 200 ml로 하였을 때 균핵형성이 가장 좋게 나타났다. 4개의 수종을 이용한 균사배양 실험 결과, 참나무, 자작나무, 은사시나무, 오리나무의 4종 모두 균사생장이 잘 되는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 강원대학교 산·학·연 공동기술개발지역컨서시엄센터와 강원대학교 동충하초연구소 연구비 지원으로 수행된 연구로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

이원호, 김수영, 박영진, 김태웅, 김호경, 성재모. 2004. 목질진흙

- 버섯(*Phellinus linteus*)의 적합한 균사생장. 한국균학회지 **32**(2): 95-100.
- 홍성준. 2002. 액체종균 자동접종시스템을 이용한 느타리·팽나무버섯의 자실체 형성 연구. 강원대학교 석사학위 논문.
- Kier, L. 1961. Triterpenes of *Poria obliquus*. *J. Pharm. Sci.* **50**: 471-474.
- Kumada, Y., Naganawa, H., Linuma, H., Matsuzaki, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. 1976. Dehydrocaffeic acid dilactone an inhibitor of catechol-o-methyl transferase. *J. Antibiot.* **29**: 862-889.
- _____, Takeuchi, T. and Umezawa, H. 1977. Purification and properties of a dehydrocaffeic acid dilactoneforming enzyme from a mushroom, *Inonotus* sp. K-1410. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 869-876.
- Shivrina, A. N. 1967. Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem. Abstr.* **66**: 17271-17279.
- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 258-274.