

*Phellinus pini*의 배양적 특성과 자실체형성

류영현* · 조우식 · 정기채 · 윤재탁 · 최부술

*경북농업기술원 농업환경연구과

Cultural Characteristics and Fruitbody Formation of *Phellinus pini*

Young-Hyun Rew*, Woo-Sik Jo, Ki-Chae Jeong, Jae-Tak Yoon and Boo-Sool Choi

*Department of Agricultural Environment, Kyungbuk Agricultural Technology Administration, Taegu 702-320, Korea

ABSTRACT: For artificial cultivation of *Phellinus pini* (Thore. Fr.) Ames, we conducted some study on mycelium growth and optimum condition for fruitbody formation. The optimum condition for mycelial growth was 25~30°C at pH 5.0~6.0. Optimum sawdust media were oak sawdust + willow sawdust + rice bran (4.5 : 4.5 : 1, V/V) and oak sawdust + pine sawdust + rice bran (4.5 : 4.5 : 1, V/V) and the optimum spawn incubation period was about 33~34 days. Mycelial growth in the inner portion of oak log was 40 mm after 60 days and duration for first fruitbody primordia formation was about 110 days after inoculation.

KEYWORDS: *Phellinus pini*, artificial cultivation, basidiocarp formation

버섯류의 항암효과는 Ikekawa 등(1968)에 의하여 *polyporaceae*를 위시하여 식용균류의 자실체를 열수추출하여 얻은 extract가 sarcoma 180 등의 동물 이식암에 대하여 숙주 증개성이 현저한 항종양 활성이 있는 것이 발견되었으며, 이후 *Lentinus edodes*(표고버섯) (Chihara 등 1969), *Coriolus versicolor*(운지버섯), *Piptoporus betulinus*(자작나무버섯), *Ganoderma lucidum*(영지버섯) 등에서도 항종양효과가 있는 물질이 발견되었다(Hartwell, 1971, Ikekawa 등 1968). 특히 *Volvariella volvacea*(플버섯), *Flammulina velutipes*(팽나무버섯)가 생산하는 cardiotoxic protein인 volvatxin (Maeda and Chihara, 1971)과 flammutoxin(Komatsu 등 1963)이 Ehrlich ascites tumor cell의 호흡을 저해함이 입증되었다(Lin 등 1974). 자실체 뿐만아니라 균사체에서도 항암효과가 있는 물질이 발견되었는데 *Coriolus versicolor*(운지버섯)균사체로부터 PS-K(krestin), *Schizophyllum commune*(치마버섯)균사체로부터 *Schizophyllan*(Komatsu 등 1969) 등이 생산되었다.

Phellinus pini(낙엽진흙버섯)는 민주름버섯목(Aphylllophorales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 균으로 주로 살아있는 침엽수의 심재부에 백색 부후를 일으키며 드물게 활엽수종류에서도 발생하며 자실체는 목질로 다년생으로 알려져 있다. 자실체는 나무에 부착된 형태로 단생 또는 군생형으로 반원형이나 말굽형으로 발생하며 자실체의 크기는 지름 9×13 cm 두께 8 cm 정도까지 성장하며 갓표면은 밝은 적갈색 내지

는 흑갈색이며 동심원형태의 굴곡이 있으며 가장자리방향으로 움모가 있고 오래된 것은 거북등 껍질처럼 갈라진다. 자실체 가장자리는 얇으며 적갈색이다. 포자공의 표면은 황갈색이며 조직은 적갈색 내지는 황갈색으로 알려져 있으며 포자는 4.5~7×3~5 μm로 난형이고 투명하나 오래된 것은 약간 황색으로 표면은 평활하다고 알려져 있다(Ryvardan and Gilbertson, 1993).

진흙버섯종류 중에서 특히 *Phellinus linteus*(목질진흙버섯)의 자실체 열수추출물은 소화기계통의 암에 저지효과(Ikekawa, 1968)가 있는 것으로 나타나 많은 연구가 진행되어 왔으며 균사체 열수 추출물부터 면역활성(Lee 등 1996), 및 항암활성(정 등, 1994)도 입증되었다. *Phellinus* 속균에 대한 인공재배는 송 등(1997)에 의해서 수행된바 있으며 지 등(1996)과 정 등(1997)에 의해서는 진흙버섯균의 균사배양적 조건과 곡물배지 등을 이용한 균사체배양에 대해서 연구를 수행한바 있다. *Phellinus pini*는 다른 진흙버섯류와 같이 자연계에서 분포와 발생수가 적어 자연적인 자실체를 구하기 어렵다고 알려져 있으나(中國本草圖鑑) 균사체 배양조건이나 자실체 형성에 관한 연구는 진행되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 *Phellinus pini*(낙엽진흙버섯)의 배양적 특성과 원목을 이용한 인공자실체 형성에 대한 연구를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 *Phellinus pini*는 한국유전자은행에서

*Corresponding author

분양받은 것(KCTC 6655)을 사용하였다. 균주보관용 배지는 Potato Dextrose Agar(Difco사)를 사용하였으며 Potato Dextrose Agar에 계대배양하면서 본 실험에 사용하였다.

균사배양

균의 보존용 배지는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco사)를 사용하였고 균사의 성장속도를 비교하기 위한 배지로는 PDA, YM, MCM, Czapek's와 리그닌분해활성을 검정하기 위해서 poly R-478 배지를 사용하였다(Table 1).

각 배지는 121°C에서 15분간 고압살균하여 직경 9cm의 평판배양접시에 20ml씩 분주하였다. 평판배양은 배지종류별로 제조된 평판배지의 중앙에 PDA 배지에서 15일간 배양된 균사의 가장자리의 일정부위를 직경 5mm의 cork borer로 절단하여 접종원으로 사용하였으며 25°C에서 배양하였다.

최적배양온도

균사생장에 적합한 온도를 조사하기 위하여 온도별 배양실험은 PDA 배지에 균을 접종한 다음 15, 20, 25, 30, 35°C로 각각 setting된 항온배양기에서 14일간 배양한 후

배양된 균사체의 직경을 측정하였다.

최적 pH

pH별 배양실험은 250 ml 삼각플라스크에 MCM 액체배지 50 ml를 0.1 N HCl과 NaOH로 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 각각 pH 조절된 액체배지를 25°C, 120 rpm으로 진탕배양한 다음 균사체를 증류수로 세척한 후 80°C에서 48시간 건조시켜 균사체량을 측정하였다.

최적톱밥배지의 선발

톱밥배지별 균사생장은 20 × 300 mm의 column tube에 톱밥배지(Table 2)를 충전하여 121°C에서 20분간 살균한 후 PDA 배지에서 15일간 배양된 균사체 가장자리의 일정부위를 직경 5mm의 cork borer로 절단하여 접종원으로 사용하였으며 25°C에서 배양하였다.

종균제조는 850 ml polypropylene bottle에 참나무 톱밥과 미강 10%를 첨가한 톱밥배지를 121°C에서 2시간 동안 고압멸균 후 5°C로 급속냉각시킨 다음 무균상에서 종균을 병당 20 g 정도씩을 접종한 후 25°C에서 40일간 배양한 다

Table 1. Composition of media

Media reagent	Media and composition (g/l)						
	PDA	YM	MCM	Czapek's	Poly R-478	Oak Extr.	Pine Extr.
potato	200						
glucose	20	10	20				
yeast extract		3	2				
malt extract		3				3	3
peptone		5	2				
sucrose				30		20	20
sorbitol					20		
MgSO ₄ · 7H ₂ O			0.5	0.5	0.2		
KH ₂ PO ₄			0.46				
K ₂ HPO ₄			1	1			
KCl				0.5	0.2		
NaNO ₃				3			
FeSO ₄ · 7H ₂ O				0.01			
NH ₄ H ₂ PO ₄					1		
MnSO ₄					0.2		
Poly R-478					0.2		
Oak sawdust						200	
Pine sawdust							200
Agar	20	20	20	20	20	20	20

Table 2. Composition of sawdust media (Oak: *Quercus acutissima* sawdust, Willow: *Salix koreensis* sawdust, Pine: *Pinus densiflora* sawdust, Bran: rice bran)

Media reagent	Sawdust media and composition (V/V)					
	Oak	Oak + Bran	Oak + Willow	Oak + Willow + Bran	Pine + Bran	Oak + Pine + Bran
Oak	100	90	50	45		45
willow	20		50	45		
Pine					90	45
bran		10		10	10	10
Density (g/ml)	0.66	0.68	0.65	0.61	0.59	0.61

Table 3. Effects of solid medium on the mycelial growth of *Phellinus pini*

medium	PDA	YM	MCM	Czapek's	Poly R-478	Oak Extr.	Pine Extr.
growth (mm)	29.7±0.6 ^{c)}	24±3	27.7±2	8.7±2.3	25.7±0.6	17.3±1.1	3±0.1
density ^{a)}	C	C	C	T	ST	SC	SC
color ^{b)}	Br.	Y	Br.	W	Y	W	W

^{a)}C: compact, SC: somewhat compact, ST: somewhat thin, T: thin.

^{b)}Br.: brownish, Y: yellowish, W: whitish.

^{c)}Colony diameter was measured after 10 days of incubation at each medium. Values are mean±SD.

음 원목접종용 종균으로 사용하였다.

원목의 종균접종

원목접종용 나무는 상수리나무(*Quercus acutissima*)와 소나무(*Pinus densiflora*)를 사용하였다. 원목의 벌채는 수액의 이동이 정지된 시기이며 저장양분이 가장 많이 포함된 11월경에서 이듬해 2월사이에 벌채된 것을 사용하였으며 벌목 후 음지에서 2개월간 자연건조하였다. 원목의 절단은 수분함량이 40~50%일 때 직경 10~15 cm, 길이 20~25 cm로 토막내어 단목으로 사용하였다.

절단된 원목을 0.05 mm polypropylene bag에 넣어 면전 한 다음 상압스팀멸균기에서 105°C에서 15시간 멸균한 후 5°C로 급속냉각하여 오염을 방지하였다. 종균의 접종은 살균된 원목의 상층부에서 약 200 g 정도를 골고루 펼쳐 접종한 다음 polypropylene막개로 고정시킨 후 면전하였다.

균사체배양 최적온도는 25°C였으나 초기에는 잡균의 발생을 최소화시키기 위하여 22°C 정도로 배양하다가 25~30 일 후 균사체가 원목표면에 활착되어 균사생장이 시작될 때 부터는 최적온도인 25°C를 유지하였다. 접종 후 60일에 원목을 세로로 가른 후 다시 polypropylene bag으로 밀봉한 다음 다시 5일 경과 후 원목내의 균사체생육길이를 측정하였다. 이시기에 균사활착된 원목의 polypropylene bag을 해체하고 자실체 발생을 위해서 버섯재배사로 옮겨심기 작업을 하였다.

자실체유도 및 형성

자실체 발생을 위한 토양은 모래가 적당히 섞여있어 배수가 잘 되는 토양을 선택하였으며 재배사는 영지버섯재배용 간이재배사를 기준으로 설치하였다(차 등, 1991).

배양실에서 균사체배양이 완료된 원목을 충분히 관수하고 토양에 옮겨 심을 때 지상부로부터 5~7 cm 정도를 돌출시켜 매몰하여 종균접종을 하였던 상층부에 모래를 얇게 깔아 습도유지와 측면의 버섯발생을 유도하였다. 약 50 일 후 버섯원기형성(Primordia formation)이 시작되었을 때 환기구를 통하여 충분히 환기시키면 약 6개월 이후 부터는 자실체의 형태가 형성되기 시작했다.

결과 및 고찰

*Phellinus pini*의 균사 배양적 특성

배양온도. 온도별 균사배양에서는 20°C(20 mm/14일)에

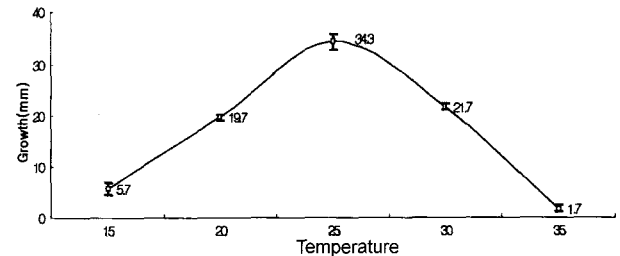


Fig. 1. Effect of temperature (°C) on the mycelial growth of *Phellinus pini* (Colony diameter was measured after 14 days of incubation in PDA medium).

서 30°C(22 mm/14일)사이가 배양적으로 나타났으며 특히 25°C(34 mm/14일)에서 균사생육이 가장 왕성하였는데 (Fig. 1). 이는 목질진흙버섯의 최적온도가 25~30°C라는 보고(지 등, 1996)와 비교해볼 때 낙엽진흙버섯과 목질진흙버섯의 최적생육온도는 유사한 경향임을 나타내었다.

pH별 균사생장. pH별 균사생장에서는 다른 담자균류와 유사하게 산성 pH 영역(pH 5~6)에서 균사체량이 197~201 mg 정도로 균사생장이 가장 양호하였다. 또한 pH 4.0 정도와 pH 8.0 정도에서는 균사생장량이 급격히 떨어지는 경향을 보였는데 목질진흙버섯이 pH 6.0~7.0(지 등, 1996)에서 생육이 양호하다는 것과 비교해볼 때 낙엽진흙버섯은 목질진흙버섯에서 비해서 좀더 산성영역에서 생육이 양호함을 알 수 있다.

인공배지 및 톱밥배지별 균사생장. 인공배지별 균사생육에서는 PDA(30 mm/14일) 배지와 MCM(28 mm/14일)에서 균사생육이 좋았으며 리그닌분해력을 보기위한 poly R-478 배지에서는 균사생육과 함께 clear zone을 형성하여 리그닌분해력이 활발함을 보여 주었다. 톱밥추출물을 이용한 배지에서 참나무톱밥추출배지(17 mm/14일)가 소나무톱

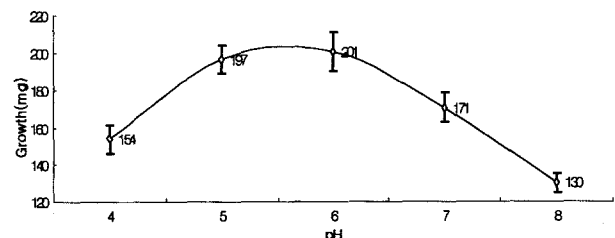


Fig. 2. Effect of pH on the mycelial growth of *Phellinus pini* (Dry mycelium weight was measured after 14 days of culture in 50 ml of MCM medium at 25°C).

Table 4. Effects of sawdust medium on the mycelial growth of *Phellinus pini* incubated at 25°C for 20 days in tube column (300×20 mm)

medium ^{a)}	Oak	Oak + Bran	Oak + Willow	Oak + Willow + Bran	Pine + Bran	Oak + Pine + Bran
growth (mm)	34.7±3 ^{d)}	41±3.6	35.3±0.6	46.3±1.5	41.3±3.5	49.3±1.1
density ^{b)}	T	C	T	ST	C	SC
color ^{c)}	W	Y	W	W	Y	Y

^{a)}Oak: Oak sawdust 100%, Oak + bran: Oak sawdust 90% + Rice bran 10%, Oak + Will.: Oak sawdust 50% + willow sawdust 50%, Oak + Willow + Bran: Oak sawdust 45% + willow sawdust 45% + rice bran 10%, Pine + bran: Pine sawdust 90% + rice bran 10%, Oak + pine + Bran: Oak sawdust 45% + pine sawdust 45% + rice bran 10% (mixed as V/V).

^{b)}C: compact, SC: somewhat compact, ST: somewhat thin, T: thin.

^{c)}Br.: brownish, Y: yellowish, W: whitish.

^{d)}Values are mean±SD.

밥추출배지(2 mm/14일) 보다 균사생육이 더 좋았다.

툽밥배지를 이용한 coulumn tube상에서의 균사생장은 참나무 + 소나무 + 미강(4.5 : 4.5 : 1) 배지상에서의 균사생육이 49 mm/20일로 균사생장이 가장 좋았으며 참나무 + 미강(9 : 1)은 이보다 균사생육이 다소 낮았으나(41 mm/20일) 균사체 밀도는 가장 높았다(Table 4).

***Phellinus pini*의 원목접종 및 자실체발생 특성**

참나무와 소나무원목에 각각 접종한 후 60일이 경과한 후 원목내의 균사생장은 참나무에서 40 mm로 나타났으나 소나무원목에서는 20 mm정도로 나타나 참나무원목에 비해서 낮은 균사생장을 보였다(Table 5). 이것은 *Phellinus pini*가 원래 침엽수에서 주로 발생되나 인공재배를 위한 소나무원목의 살균작업시 원목에서 흘러나온 송진의 영향으로 균사활착이 불량해진 결과로 생각되어 진다. 그러나 소나무툽밥에 미강을 첨가한 툽밥배지에서는 왕성한 균사생육이 일어났기 때문에 소나무원목에서의 송진제거와 같은 방법들이 먼저 진행되어야 균사활착도 가능하리라 생각되어지며 또한 참나무원목에서의 버섯발생율도 8% 정도에 그쳐 원목재배에 관해서는 좀더 많은 연구가 이루어야 할 것으로 생각된다. 송 등(1997)이 수행한 *Phellinus linteus*의 인공재배에서는 뽕나무에 비해서 상수리나무를 이용시 재배가 더 용이함을 보였는데 이는 살균시의 온도 조건 등에 의해서 뽕나무원목이 상수리나무에 비해서 원목배지가 쉽게 손상된 결과로 생각되는데 *Phellinus pini*의

Table 5. Inoculation on tree log and fruitbody primordia formation

	Mycelial growth ^{a)}	Rate of successful inoculation ^{b)}	Days for primordia formation ^{c)}	Rate of primordia formation (n=14)
Oak	40 mm	26%	110	8%
Pine	20 mm	12%	-	-

-: No growth. ^{a)}Mycelial growth was measured in the inner surface of tree log after 60 days of incubation.

^{b)}((No. of inoculated tree log-No. of contaminated tree log)/No. of inoculated tree log)×100.

^{c)}After inoculation

자연발생 원목인 침엽수의 경우에서도 소나무원목의 살균 과정의 방법이 개선되어야 소나무원목을 이용한 재배방법이 확립될 수 있을 것이다.

앞으로 소나무원목에 대한 송진제거와 같은 전처리방법의 개발이나 다년재배에 관련된 연구와 함께 툽밥과 영양분의 첨가에 의한 연중 재배방법에 응용할 수 있을 것이며 이에 성공한다면 자동화에 의한 대량생산의 가능성도 있을 것이다

또한 *Phellinus pini*에 대한 약리효과 및 기타생리활성 효과에 대한 연구가 동시에 진행된다면 농가소득에도 상당한 기여를 할 것으로 전망된다.

적 요

*Phellinus pini*는 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 버섯으로 진흙버섯속 버섯 중에서 항암저지율이 가장 높다고 알려져 있다(中國本草圖鑑).

온도별 배양결과 25°C에서 34 mm/14일(PDA 배지)로 생육이 가장 좋았고 배지별 시험에서는 PDA 배지에서 30 mm/10일, MCM 배지에서 28 mm/10일로 나타났으며 pH 5-6에서 균사생장이 양호하였다.

시험관을 이용한 툽밥배지 배양에서는 참나무툽밥 + 버드나무툽밥 + 미강(4.5 : 4.5 : 1)과 참나무툽밥 + 소나무툽밥 + 미강(4.5 : 4.5 : 1)에서 균사생장이 가장 빨랐고 균사밀도는 참나무툽밥 + 미강(9 : 1)과 소나무툽밥 + 미강(9 : 1) 배지가 가장 높았다.

참나무원목에 접종한 결과 접종 60일 경과시 원목내 균사생장은 40 mm로 나타났으며 균사활착율은 26% 정도였고 최초 발이 소요기간은 접종 후 110일 정도로 나타났다.

참고문헌

송치현, 문혜연, 류충현, 1997. *Phellinus linteus*의 인공재배. 한국균학회지 25(2): 130-132.
 정인창, 김신희, 권용일, 김소연, 이종숙, 박 신, 박경숙, 이재성, 1997. 화학합성배지 및 곡물을 이용한 *Phellinus igniarius*의 균사체 배양조건. 한국균학회지 25(2): 133-142.
 中國本草圖鑑. 1994. 第1卷, 驪江出版社.

- 지정현, 하태문, 김영호, 노영덕. 1996. 목질진흙버섯균의 균사체 생육에 미치는 주요 인자에 관한 연구. *한국균학회지* **24**(3): 214-222.
- 차동열, 유창현, 김광포. 1991. 최신펙재배기술. 농진회.
- Chihara, G., Maeda, Y., Humuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Nature* **222**: 687-688.
- Hartwell, J. L. 1971. Plants used against cancer. A. Survey. *Lloydia*. **34**: 386-389.
- Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**: 155-157.
- Komatsu, J., Terekawa, H., Nakamishi, K. and Watanabe, Y. 1963. Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumor activities. *J. Antibiot., Ser. A*. **16**: 139-141.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S. 1963. Host-mediated antitumor action of Schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* **60**: 137-138.
- Lee, J. H., Cho S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharide from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**(3): 213-218.
- Lin, J. Y., Lin, Y. J., Chen, C. C., Wu, H. L., Shi, G. Y. and Jeng, T. W. 1974. Cardiotoxic protein from edible mushroom. *Nature* **252**: 235-237.
- Maeda, Y. Y. and Chihara, G. 1971. Lentinan, a new immunaccelerator of cell-mediated responses. *Nature* **229**: 634-636.
- Ryvardan, L. and Gilvertson, R. L. 1993. European Polypores, Fungiflora, Norway.