

목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 적합한 균사생장

이원호 · 김수영 · 박영진 · 김태웅¹ · 김호경² · 성재모*

강원대학교 생물자원공학부, ¹생명과학부, ²주) 머쉬텍

Favorable Conditions for Mycelial Growth of *Phellinus linteus*

Won-Ho Lee, Su-Young Kim, Young-Jin Park, Tae-Woong Kim¹, Ho-Kyung Kim² and Jae-Mo Sung*

Division of Bio-Resources Engineering, ¹Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, and
²Mushtech Co. Ltd., Chuncheon 200-161, Korea

(Received November 9, 2004)

ABSTRACT: The main objectives of the study were to investigate cultural characteristics of *Phellinus linteus*. The optimum culture media for mycelial growth of *P. linteus* were MYA (malt yeast agar) and SMS (soybean powder malt Sucrose). Similarly, optimum temperature and pH were 30°C and 6.0, respectively. Malt extract (2%, v/v) and yeast extract (0.2%, v/v) were optimum carbon and nitrogen sources. Similarly, 0.1% KH₂PO₄ was optimum mineral salt. Highest mycelial growth was observed when C/N ratio was 10 : 1. Optimum inoculum amount for flask culture was 5~6 mycelial discs (6 mm diameter) per 100 ml of liquid medium. Highest mycelial dry weight was obtained when cultured in 100 ml liquid medium in 300 ml shaking flask after 20 days of shaking culture. For mass liquid culture (8 l), flask culture was homogenized and used as an inoculum. Optimum culture period and aeration rate for 8 l fermentation culture were 12 days and 2.0 vvm, respectively.

KEYWORDS: Liquid culture, Mycelial growth, Optimum nutrients, *Phellinus linteus*

진흙버섯속균은 소나무비닐버섯과(Hymenochaetaceae)에 속하는 버섯으로서 뽕나무와 같은 활엽수의 심재에 부후를 일으키며 야생상태에서의 버섯은 2년 이상의 다년생으로 알려져 있다(Lasen *et al.*, 1989).

민간에서는 담자균류 중 *Phellinus*속 버섯이 위암이나 식도암 등 소화기암중에 사용되어 왔다. *Phellinus*속 자실체의 항암효능은 0~99%까지 큰 변이를 나타내며(지, 2000) 동일한 품종이라도 채집장소, 시기, 숙주에 따라 균주의 활성이 다르다. 이는 국내·외 야생종을 채집하여 조직 분리하거나 외국으로부터 자실체나 야생버섯 또는 종균을 반입하는 등의 다양한 경로를 통하여 수집되며, 여러 환경적, 생리적 조건이 달라질 수 있기 때문이다.

최근 관심사가 되고 있는 각종 암이나 노화, 심근경색 등 몸 안의 여러 종류의 성인병은 몸 안에서 Free radical과 상호 관련이 있다고 알려졌다. 생체에 흡입되어진 산소의 일부가 superoxide, 과산화수소 및 hydroxy radical 등과 같은 활성산소 free radical로 변환되면서 지질의 과산화반응을 일으킨다. 생체 내에 지질의 산화가 유도되면서 세포막의 파괴, 노화, 괴사 등 여러 생리적 이상현상 즉, 노화나 암 등의 성인병의 발생에도 큰 영향을 미치고 있다(Chung *et al.*, 1994; Gregory *et al.*, 1996; Ikekawa

et al., 1968; Nomoto *et al.*, 1975).

목질진흙버섯은 다른 버섯들과 같이 자연계에서 발생수가 적어 자연적인 자실체를 구하기가 어렵다고 알려져 왔다. 더욱이 균사체 및 자실체 배양조건에 관한 연구도 잘 진행되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *Phellinus linteus*의 배양적인 특성을 알아내어 대량생산을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 강원대학교 동충하초은행에서 채집 보관 중인 *Phellinus linteus*(PH-1, PH-5, PH-211)와 일본에서 채집된 *Phellinus linteus*(PH-195, PH-198)를 공시균주로 사용하였다. 공시균주는 Malt 배지에 접종하여 15일 마다 계대 배양하면서 접종원으로 사용하였다.

배양 특성

적정배지를 선별하기 위하여 PDA(potato dextrose agar)를 비롯한 8종의 배지를 이용하였으며 각각의 배지는 121°C에서 20분간 고압살균 후 살균된 Petri-dish(직경 8.5 cm)에 15~20 ml씩 분주하여 조제하였으며, MYA(malt yeast agar) 배지에서 15일간 배양된 목질진흙버섯균의 균

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

사 선단부분을 직경 6 mm cork borer로 균사체를 조제한 배지의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 25°C의 배양실에서 10일간 배양하여 균사의 생장을 조사하였다. 공시균주의 균사생육 최적 온도를 규명하기 위하여 Malt 배지를 기본배지로 하여 내경 6 mm인 cork-borer로 잘라낸 균사체를 접종하고 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C 등 온도를 달리하여 균사 생장 길이를 측정하였다. 공시균주에 초기 pH가 균사생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH으로 pH를 4.0~9.0 까지 1.0 간격으로 조절하여 배지를 만든 후 Malt에서 배양한 접종원을 접종한 후 24±1°C에서 14일간 배양하여 pH 별로 균사 생장을 측정하였다.

영양원 선발

목질진흙버섯균의 균사생장에 적합한 탄소원 시험으로 MYA를 기본배지로 하여 7종의 탄소원 농도를 2%로 탄소량이 되도록 배지를 조제하였다. 탄소원의 최적농도를 조사하기 위하여 0.5~4.0%(w/v)까지 0.5% 간격으로 탄소원의 농도를 달리하여 조제한 평판배지에서 처리하였다. 질소원 시험으로 MYA를 기본배지로 하여 7종의 질소원 농도를 0.2%로 되도록 배지를 조제한 후 공시균주를 배지의 중앙에 접종하였다. 또한 선발된 질소원의 최적농도를 조사하기 위하여 0.1~0.7%(w/v)까지 0.1% 간격으로 질소원의 농도를 달리하여 조제한 평판배지에서 처리하였다.

무기염류를 선발하기 위하여 MYA를 기본배지로 하여 7종의 무기염류농도를 0.1%로 무기염류를 첨가하여 배지를 조제한 후 공시균주를 배지의 중앙에 접종하였다. 또한 선발된 무기염류의 최적농도를 조사하기 위하여 0.05~0.3%(w/v)까지 0.05% 간격으로 무기염류의 농도를 달리하여 조제한 평판배지에서 처리하였다.

목질진흙버섯균의 균사생장에 적합한 탄소원과 질소원의 함량 비를 알기 위하여 선발된 탄소원과 질소원의 비율을 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0.5:1, 0.2:1, 0.1:1로 배지를 조제하였다.

이렇게 조제된 배지에 MYA배지에서 15일간 배양된 목질진흙버섯균의 균사 선단부분을 직경 6 mm cork borer로 잘라 낸 균사체를 접종하여 24±1°C의 배양실에서 14일간 배양하여 균사의 생육을 조사하였다.

삼각플라스크 배양환경 조사

균사체의 생장에 미치는 배양액량을 알기 위하여 300 ml의 Erlenmeyer flask와 Shake flask에 선발된 배지를 50~200 ml까지 50 ml 간격으로 배양액을 분주하였고, 접종량의 영향을 조사하기 위하여 300 ml의 Shake flask에 100 ml 배양액을 분주한 후 실리콘 마개로 막았다. 조제된 배지는 121°C에서 20분간 가압 살균하여 사용하였다. 접종량을 알기 위하여 살균된 플라스크 병에 6 mm의 cork borer로 잘라 낸 균사체의 접종량을 3~8개씩 1개 간격으로 달리하여 접종하였고 접종기간을 알기 위하여 5개를 접종하고 하루 간격으로 조사하였다. 접종 후 shaking incubator에서 25°C, 125 rpm으로 21일간 진탕배양 하였다. 균사의 생장량은 filter paper(Whatman No.2)에 여과시킨 후 80°C의 dry oven에서 건조하여 균사체의 건조중량을 측정하였다.

8 l 배양병을 이용한 액체종균 배양조건

삼각플라스크에서 배양된 접종원의 균질기의 사용에 따라 균체 건조중량을 알아보기 위하여 8 l 배양병에 MYB배지를 조제한 후 homogenizer한 것과 하지 않은 것을 각각 접종하였다. 접종 후 air-filter를 통해 다른 균을 제거한 공기로 통기를 실시하였으며, 온도 24±1°C인 배양실에서 배양하였다. 대량배양에서의 생육측정은 배양된 배양액을 100 mesh의 체로 균사체와 배양액을 분리하였으며, 80°C의 dry oven에서 건조하여 건조중량을 측정하였다. 대량배양 시 배양기간에 따른 공시균주의 생육을 알아보기 위하여 접종량을 100 ml로 조절하고 통기량은 2 vvm으로 배양하여 1일 간격으로 균체의 무게를 조사하였고 대량배양할 때 통기량에 따른 공시균주의 생육을 알아보기 위하여 접종량은 100 ml, 통기량은 0.5 vvm~3.0 vvm로 0.5 vvm 간격으로 조절하여 7일간 배양 후 균체의 무게를 조사하였다. 생육측정은 배양된 배양액을 100 mesh의 체로 균사체와 배양액을 분리하였으며, 80°C의 dry oven에서 건조하여 건조중량을 측정하였다.

결 과

배양 특성

목질진흙버섯의 기본적정 배지를 선발하기 위하여

Table 1. Effect of medium on mycelial growth of *Phellinus linteus*

Isolate	PDA	MYA	BMYA	MYSG	GP	SMS	BMY	HMA
PH-1	36.2 ^a	43.9	38.0	41.3	37.8	44.6	40.1	29.8
	+++ ^b	+++	+++	++	+	++	+	+
PH-5	40.8	46.7	38.2	43.4	43.4	45.1	42.1	38.7
	+++	+++	+++	++	+	+++	+	+

^aColony diameter (mm/14 days).

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

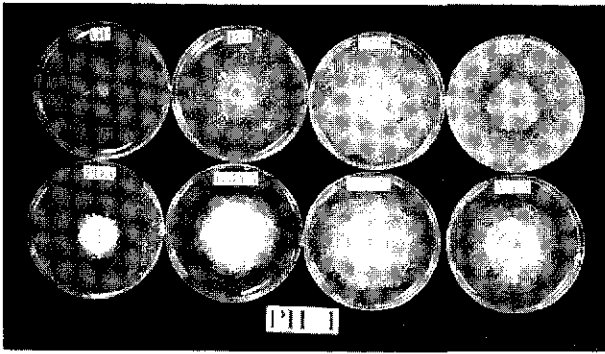


Fig. 1. Effect of cultural media on mycelial growth of *Phellinus linteus* (PH-1).

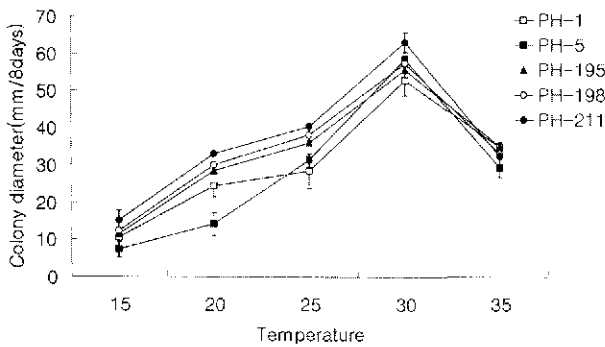


Fig. 2. Effect of temperature on mycelial growth of *Phellinus linteus*.

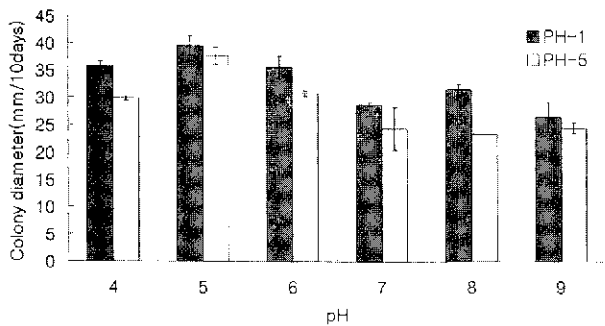


Fig. 3. Effect of pH on mycelial growth of *Phellinus linteus*.

PDA를 비롯한 8가지의 배지를 이용한 실험 결과, MYA와 SMS 배지에서 균사의 생장 및 밀도가 우수하게 나타났다(Table 1, Fig. 1). 온도는 30°C에서 균사생장 및 밀도가 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 2). pH 6.0의 배지에서 균사 생장이 양호한 것으로 나타났다(Fig. 3).

영양원 선별

탄소원 선별 실험 결과, 균사생장과 밀도 면에서 볼 때 malt extract가 가장 좋은 탄소원으로 조사되었으며, xylose를 첨가한 배지에서는 control 배지보다 균사 생장이 낮게

나타났다. 선별된 malt extract의 농도는 2%이었을 때 균사생장 및 밀도가 높게 나타났고, 탄소원이 증가함에 따른 균사생장은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 질소원 선별에서는 균사생장 및 밀도가 yeast extract에서 가장 높게 나타났으나, peptone과 NH₄NO₃ 첨가배지에서는 질소원을 첨가하지 않은 배지보다 균사생장이 떨어졌다. 선별된 yeast extract의 농도는 0.2%이었을 때 균사

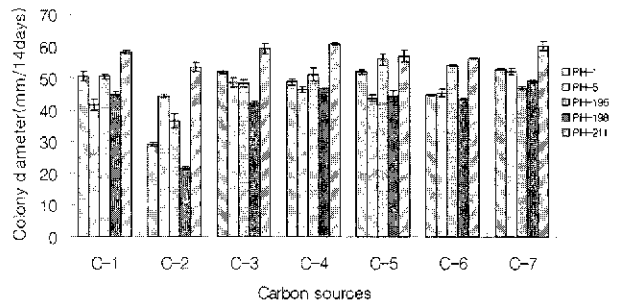


Fig. 4. Effect of carbon source on mycelial growth of *Phellinus linteus*. C-1, Control (no carbon source). C-2, Xylose. C-3, Glucose. C-4, Fructose. C-5, Sucrose. C-6, Soluble starch. C-7, Malt extract.

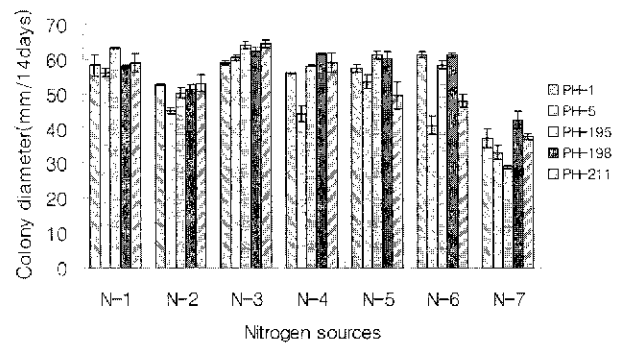


Fig. 5. Effect of nitrogen source on mycelial growth of *Phellinus linteus*. N-1, Control (no nitrogen source). N-2, Peptone. N-3, Yeast extract. N-4, Asparagine. N-5, NaNO₃. N-6, KNO₃. N-7, NH₄NO₃.

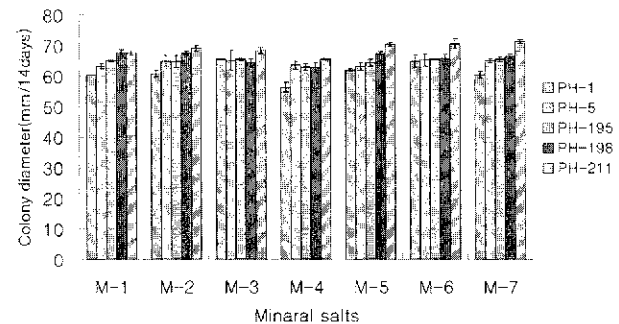


Fig. 6. Effect of mineral salt on mycelial growth of *Phellinus linteus*. M-1, Control (no mineral salt). M-2, MgSO₄·7H₂O. M-3, KCl. M-4, CaCl₂. M-5, KH₂PO₄. M-6, K₂HPO₄. M-7, NaCl.

Table 2. Effect of C/N ratio on mycelial growth of *Phellinus linteus*

Isolate	C/N ratio									
	40 : 1	30 : 1	20 : 1	10 : 1	5 : 1	2 : 1	1 : 1	0.5 : 1	0.2 : 1	0.1 : 1
PH-1	58.6 ^a +++ ^b	55.8 +++	55.9 +++	51.0 +++	48.4 ++	46.4 ++	49.0 ++	47.2 +	45.6 +	51.1 +
PH-5	64.3 +++	63.9 +++	64.2 +++	61.9 +++	55.2 ++	51.2 ++	55.3 +	54.2 +	54.7 +	53.5 +
PH-195	61.7 +++	62.1 +++	62.2 +++	61.1 +++	58.9 +++	53.1 ++	57.7 ++	56.1 +	59.9 +	58.3 +
PH-198	60.5 +++	61.1 +++	60.7 +++	62.3 +++	56.2 +++	55.7 ++	57.9 +	61.1 +	61.2 +	59.3 +
PH-211	79.2 +++	79.2 +++	77.5 +++	72.7 +++	69.3 ++	63.5 ++	60.9 +	57.6 +	54.7 +	55.6 +

^aColony diameter (mm/14 days).

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

생장 및 밀도가 높게 나타났고, 질소원의 증가에 따른 균사생장은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 무기염류에 따라서는 균사생장 및 밀도가 큰 차이를 보이지 않았지만, KH_2PO_4 에서 약간의 높은 균사생장을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 선발된 KH_2PO_4 의 농도는 0.1% 첨가하였을 때 양호한 생장을 보였다(Fig. 6). 탄소원과 질소원의 실험결과, 10 : 1에서 균사생장 및 밀도가 양호하였

다(Table 2).

삼각플라스크 배양환경 조사

배양액 100 ml의 삼각플라스크에서 균사의 생육이 우수하게 나타났다. 플라스크의 형태에 따른 공시균주의 생육 결과를 보면 큰 차이를 보이지는 않았지만 shake flask보다 erlenmeyer flask에서 약간 높은 균체 건중량을 나타내는 것을 보였고 Shake flask에서는 pellet이 많이 형성되

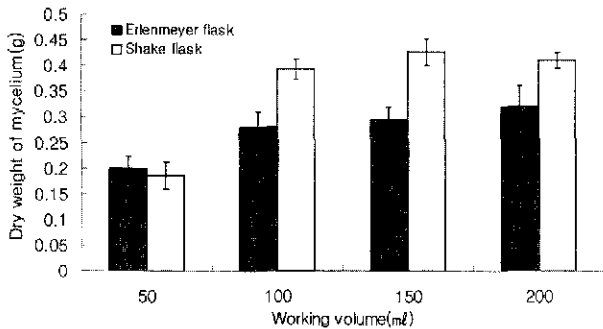


Fig. 7. Effect of working volume and flask type on mycelial growth of *P. linteus* using 300 ml flask culture, incubated at 25°C, 125 rpm for 21 days.

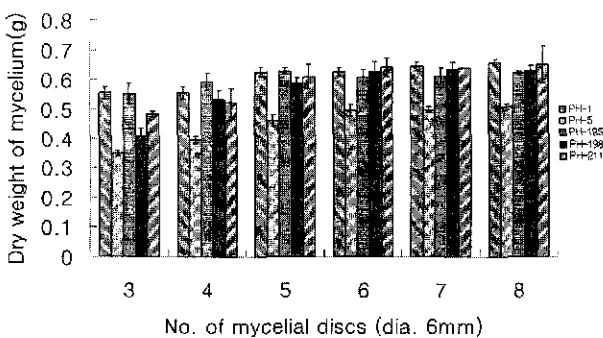


Fig. 8. Effect of inoculum amount on mycelial growth of *Phellinus linteus* in 300 ml flask culture at 25°C, 125 rpm for 21 days.

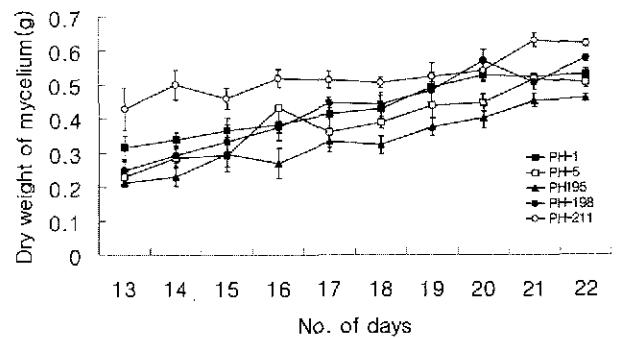


Fig. 9. Effect of culture period on mycelial growth of *Phellinus linteus* in shake flask culture, incubated at 25°C, 125 rpm.

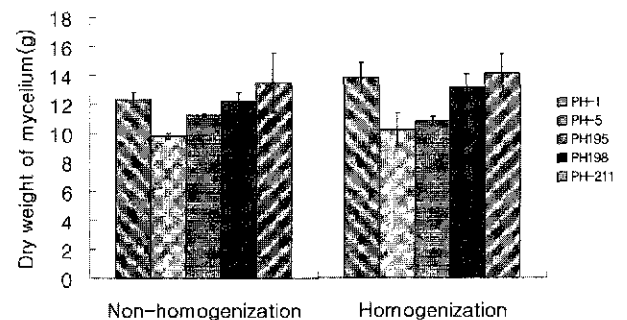


Fig. 10. Effect of homogenization on mycelium dry wt. of *P. linteus* after 12 days of fermentation culture.

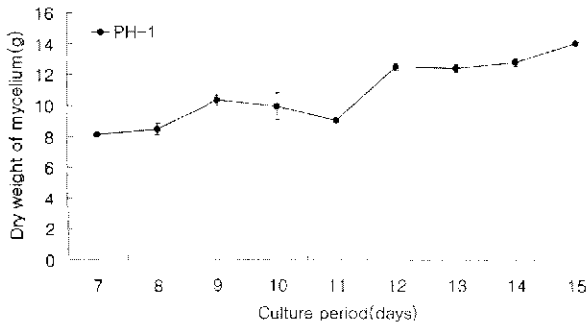


Fig. 11. Effect of culture period on mycelial growth of *Phellinus linteus* in 8 l air-lift fermenter.

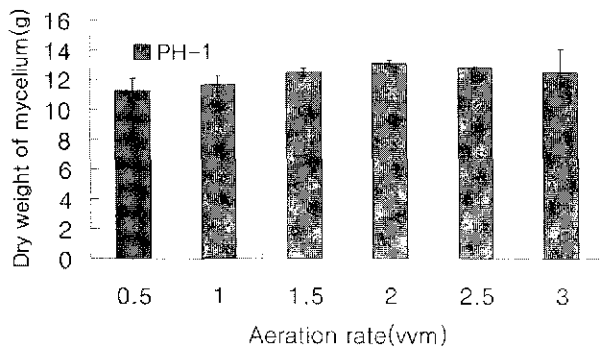


Fig. 12. Effect of aeration rate on mycelial growth of *Phellinus linteus* in 8 l air-lift fermenter.

는 것을 보였다(Fig. 7). 접종량에 따른 균체 건중량 조사에서는 균사절편 5~6개를 접종하는 것이 삼각플라스크 배양에 적당한 것으로 나타났다(Fig. 8). 또한 배양기간에 따른 균체건중량 조사 결과, 접종 후 20일까지는 균체건중량이 증가하였다(Fig. 9).

대량 액체종균 배양조건

균질기를 이용한 마쇄여부에 따른 균체건중량 조사 결과, 접종원을 homogenize한 것이 하지 않은 것 보다 높은 균체건중량을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10). 배양기간을 12일로 하였을 때 높은 균체건중량을 보였다(Fig. 11). 또한 통기량에 따른 균체건중량은 큰 차이를 보이지 않았지만 2.0 vvm으로 하였을 때 가장 좋은 균체건중량을 나타냈다(Fig. 12).

고 찰

상황버섯은 목질진흠버섯의 상품명으로 많은 농가에서 재배되고 산업적으로 이용되고 있으나 이에 대한 기초적인 아직 미흡한 편이다. 분리된 균주의 배양적인 특성은 PDA나 MYA 배지에서 이식하여 배양할 경우 초기에는 백색을 띠는 백색부후균으로 균사생장이 점점 이루어짐에 따라 황색에서 진한 황색으로 변하는 것이 기존의 보고와

일치했다. 균사생장이 30°C에서 가장 양호한 것은 복질진흠버섯이 열대지방에서 자실체를 형성하는 균으로 적정온도가 28°C~30°C라는 보고와 일치하는 경향이 있었다(Song et al., 1997). 산도에서는 다른 진균이 잘 자라는 산성에 가까운 pH는 pH 5.0과 pH 6.0에서 생육이 양호하였으며 다른 연구자의 발표와 차이가 없었다(Song et al., 1997; 지 등, 1996; 김, 2000).

목질진흠버섯균은 malt extract 2%, yeast extract 0.2%와 KH_2PO_4 0.1% 첨가배지에서 잘 성장을 하였다. 특히 다른 균과는 달리 malt extract가 목질진흠버섯균의 생장에 좋은 효과를 준 결과는 앞으로 산업적으로 본 균을 대량 배양할 때 malt extract가 중요. 탄소원으로 사용되어야 함을 시사한다. C/N율에서도 탄소원인 malt extract와 질소원인 yeast extract를 10:1로 처리하면 균사생장 및 밀도가 높게 나타났다. 이러한 결과는 김(2000)에 의하여 보고된 결과와 일치한다.

*Phellinus linteus*의 액체배양을 위해서는 300 ml의 삼각플라스크에 100 ml의 배양액을 넣고 균사체 6 조각을 접종하여 20일간 배양할 때 최적의 균사 증식을 얻었다. 한편, 대량 배양방법을 위해서는 삼각플라스크에서 배양된 접종원을 균질기를 이용하여 마쇄한 후 8 l 배양병에 분주하고 2.0 vvm으로 공기를 넣어 주면서 12일간 배양하면 대량의 균사체를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 앞으로 상황버섯이 제품화되어 대량으로 생산하는데 기초 자료로 이용되리라 본다.

적 요

목질진흠버섯의 균사생육에 적합한 배지로는 MYA(malt yeast agar)와 SMS(soybean flour malt extract sugar)이며, MYA를 기본배지로 사용하였다. 균사생육은 30°C의 온도와 pH는 5.0에서 생장이 양호하였다. 영양원으로는 malt extract 2%, yeast extract 0.2%와 KH_2PO_4 0.1% 상태에서 균사생장 및 밀도가 양호하였다. C/N비는 10:1의 비율이 가장 적합하였다. 삼각플라스크배양을 위해서는 용기 부피 300 ml Shake flask에 100 ml의 배양액을 넣고 5~6개 균사체 절편을 접종하여 20일간 배양하면 높은 고립상의 균체를 양호하게 증식시킬 수 있었다. 대량 액체종균 배양을 위해 접종원을 균질기로 분쇄하여 통기량 2.0 vvm의 조건에서 12일 배양하면 높은 균사의 생장을 보였고 접종에도 수월하였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 국책연구개발사업인 유전자원 지원 활용사업단의 연구비와 농림기술관리센터 현장애로 지원 사업의 의해 수행되었습니다. 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Chung, K. S. and Kim, S. S. 1994. Effect of Kp. an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cell. *Arch. Pharm. Res.* **16**: 336-338.
- Day, P. R. 1978. Evolutionary of incompatibility. In *Genetics and morphogenesis in the Basidiomycetes*, Academic press : New York. pp. 67-69.
- Gregory, F. T., Healy, E. M., Agerbody, H. P. K. Jr. and Warren, G. H. 1996. Studies on antitumor substances produced by basidiomycetes. *Mycologia.* **58**: 80-90.
- Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-157.
- Lasen, M. J. and Cobb-Poullé, L. A. 1989. *Phellinus* (hymenochaceae) a survey of the world taxa. *Synopsis fungorum* 3. 206 p.
- Lasen, M. J. and Lombard, F. F. 1989. Taxonomy and nomenclature of North America. Proc. 7th Int. Conference. Root and Butt Rots. IUFRO S2. 06. 01. Victoria, B. C. Canada. 573-578.
- Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, Fuji, T. and Takeya, K. 1975. Restoration of antibody-forming capacities by PS-K in tumor-bearing mice. *Gann* **66**: 365.
- Song, C. H., Moon, H. Y. and Ryu, C. H. 1997. Artificial cultivation of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* **25**(2): 130-132.
- 김수호. 2000. 형태적 · 배양적인 특성과 ITS region을 근거로 한 목질진흠버섯균(*Phellinus linteus*)의 탐색. 강원대학교 석사학위 논문.
- 지정환. 2000. 상항버섯(*Phellinus linteus*)과 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei*)의 생리활성기능 검색에 관한 연구. 강원대학교 대학원 77p.
- 지정현, 하태문, 노영덕, 김영호. 1996. 목질진흠버섯균 *Phellinus linteus*의 균사생육에 미치는 주요 인자에 관한 연구. *한국균학회지* **24**(3): 214-222.