

차가버섯의 균사체 성장에 대한 배지성분의 영향

최 근 호[†]

한밭대학교 화학공학과
305-719 대전시 유성구 덕명동 산 16-1
(2005년 2월 28일 접수, 2005년 3월 21일 채택)

Effect of Medium Compositions on the Mycelial Growth of *Inonotus obliquus*

Keun Ho Choi[†]

Department of Chemical Engineering, Hanbat National University,
San 16-1, Dukmyoung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-719, Korea
(Received 28 February 2005; accepted 21 March 2005)

요 약

차가버섯(*Inonotus obliquus*) 균사체의 액체배양에서 온도(22-32 °C)와 pH(5-7) 그리고 배지성분의 변화가 차가버섯 균사체의 성장에 미치는 연구를 수행하였다. Glucose, starch, peptone, yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O 그리고 CaCl₂를 각각 30-120 g/L, 0-10 g/L, 0-20 g/L, 0-15 g/L, 0-2 g/L, 0-1.5 g/L, 0-0.5 g/L의 범위로 변화시키면서 실험하였다. 차가버섯 균사체의 성장속도는 26-27 °C, pH 6, glucose 70 g/L, yeast extract 5 g/L 그리고 CaCl₂ 0.1 g/L일 때에 최대값을 나타냈다. Starch와 peptone 그리고 K₂HPO₄의 농도가 증가할수록 차가버섯 균사체의 성장속도는 증가하였으나, MgSO₄·7H₂O의 농도가 증가할수록 차가버섯 균사체의 성장속도는 감소하였다. 차가버섯 균사체의 최대 성장속도를 위한 액체배지는 glucose 70 g/L, peptone 5-20 g/L, starch 10 g/L, yeast extract 5 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L 그리고 CaCl₂ 0.1 g/L로 구성된다.

Abstract – Effect of temperature(22-32 °C), pH(5-7) and medium composition on the mycelial growth for the submerged culture of *Inonotus obliquus*. The concentrations of glucose, starch, peptone, yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O and CaCl₂ were examined in the ranges of 30-120 g/L, 0-10 g/L, 0-20 g/L, 0-15 g/L, 0-2 g/L, 0-1.5 g/L and 0-0.5g/L, respectively. The maximum mycelial growth of *Inonotus obliquus* was obtained for 26-27 °C and pH 6. The concentrations of glucose, yeast extract and CaCl₂, which gave the maximum mycelial growth of *Inonotus obliquus*, were 70 g/L, 5 g/L and 0.1 g/L, respectively. In the cases of starch, peptone and K₂HPO₄, the mycelial growth of *Inonotus obliquus* increased with increasing the concentrations. However, as the concentration of MgSO₄·7H₂O increased, the mycelial growth of *Inonotus obliquus* decreased. The medium for maximum mycelial growth of *Inonotus obliquus* consisted of (per 1 L): glucose, 70 g; peptone, 5-20 g; starch, 10 g; yeast extract, 5 g; K₂HPO₄, 2 g and CaCl₂, 0.1 g.

Key words: *Inonotus obliquus*, Submerged Culture, Mycelial Growth, Medium Composition

1. 서 론

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 소나무비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*)에 속하는 버섯으로 자연적으로는 주로 자작나무의 줄기에 기생하여 자라고, 균핵은 수피 밑에 얇고 넓게 퍼져 있으며 갓을 형성하지 않는다. 주로 약용으로 사용하는 부분은 균핵으로서 균핵의 표면은 검고 종횡으로 균열이 많으며, 내부는 황갈색이고, 직경은 10-20 cm 정도이다. 자생하는 주요 지역은 러시아의 시베리아와 캐나다 그리고 일본의 홋카이도로 알려져 있다[1, 2]. 차가버섯 자실체의 추출물은 암[2-4]과 당뇨병[2] 그리고 에이즈의 치료[5]에 약효가 있는

것으로 보고되고 있다. Chung 등[6]은 차가버섯 추출물이 전립선 비대증 치료와 변비의 예방 및 치료, 통증 완화 그리고 창상 치유의 약효를 갖는다고 보고하였다.

지금까지는 주로 자연산 차가버섯을 채취하여 이용하여 왔지만, 자생하는 차가버섯의 양이 많지 않기 때문에 채취하는 데에 많은 노력이 필요하므로 자연산을 채취하는 것보다 인공배양하는 것이 보다 경제적이다. 인공배양방법으로는 주로 자작나무류의 원목에 차가버섯 균사를 식균하여 생육시켜 자실체를 얻은 방법(원목을 이용한 인공배배)과 나무의 톱밥이나 현미를 주원료로 하여 일부 첨가물을 넣어서 제조한 고체배지의 수분을 조정된 후에 내열성의 용기에 넣어서 가열 멸균한 다음에 균사를 식균하여 장시간 생육시켜 고농도의 균사체를 얻거나 자실체를 얻은 고체배양방법 그리고 액

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: khchoi@hanbat.ac.kr

체배지를 사용하여 균사체를 배양하는 액체배양방법이 있다. 원목을 이용한 인공재배보다는 고체배양과 액체배양이 생육 기간을 줄일 수 있으며[6], 더욱이 균사체와 자실체의 악리 효과가 거의 유사하기 때문에 자연에서 채취하거나 인공으로 배양한 자실체로부터 추출물을 얻는 것보다는 균사체를 액체배양하여 추출물을 얻는 것이 경제적으로 더 유리하다[7].

Chang 등[1]은 러시아 캄차카반도산 차가버섯으로부터 포자분리를 통하여 균주를 분리하는 한편, 분리한 균주를 사용하여 8가지 수종에서 자실체를 인공재배하였으며, 고체배지의 종류(PDA, CDA, ODA, BDA, YM, MCM, PODA, CHA, MEA)와 온도 그리고 pH에 따른 균사체의 성장속도와 밀도에 대하여 연구하였다.

Kazuo[5]는 차가버섯 균사체의 액체배양에 대한 연구를 수행하였는데, 900 mL의 증류수와 100 mL의 phosphate buffer를 혼합한 용액에 5-15 g의 malt extract, 5-15 g의 glucose, 1-6 g의 peptone, 1-6 g의 yeast extract를 넣어서 만든 배양용액을 사용하였다.

Chung 등[6]은 차가버섯의 추출물을 포함하는 유용한 조성물을 제조할 목적으로, 27 °C와 pH 6인 물에 펩톤, 효모추출물, 탄소원(맥아당, 맥아추출물, 포도당, 가용성 전분 등)을 넣은 액체배지를 제조하고, 이러한 액체배지가 든 5 L의 삼각 플라스크에 차가버섯 종균을 접종하여 25 °C에서 약 25일 동안 액체배양하였다.

Park 등[7]은 핵산, 단백질, 지방, 다당류 등이 포함된 복합추출물을 제조할 목적으로 차가버섯 균사체를 특정 배지성분을 함유한 한천배지에서 1차 배양한 다음, 배양된 균사체의 일부를 액체배지(감자와 물을 1:3 w/v의 비율로 갖는 감자 열수추출물에 glucose 2%를 첨가하여 제조한 배지)에 접종하여 5-15일 동안 2차 배양하였으며, 2차 배양액을 균질화(5,000 rpm, 1-2 min, 1-3회) 하여 5-1,000 L 발효기에 50-75%로 채워진 생선배지(2차 배양과 동일한 배지)에 약 0.5-5.0 v/v%의 비율로 접종하고 22-30 °C와 100-200 ppm의 조건으로 배지 내의 유기탄소 농도가 고갈되는 시점까지 약 10-50일간 3차 배양하였다.

이처럼 몇몇 연구자들에 의해 차가버섯 균사체의 액체배양에 대한 연구가 수행되었으나, 차가버섯 균사체의 액체배양을 통하여 약효를 갖는 물질을 보다 경제적으로 생산하는데 필요한 정보는 아직 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 문헌에 제시되어 있는 기존 배지의 성능을 비교하여 성분이 어느 정도는 정해져 있는 기본 배지를 선정 한 후에 기본배지의 성분 변화가 균사체의 성장에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며, 이를 통하여 균사체의 최대 성장속도를 주는 액체배지를 제안하였다.

2. 실험

2-1. 균주분리

일반적인 버섯균의 분리방법에는 포자분리방법과 조직분리방법이 있다. 본 연구에서는 한밭대학교에 입주해 있는 한스랩으로부터 북한의 개마고원에서 생산된 차가버섯의 자실체를 얻어서 Chang 등[1]이 제안한 다음과 같은 방법으로 차가버섯 균주를 분리하였다. 먼저, 차가버섯의 조직을 24시간 동안 30 °C의 멸균수에 침지하였다. 탈지면을 petri dish에 넣어 140 °C에서 10시간 동안 건열 살균한 후에 24시간 동안 30 °C의 멸균수에 침지하였다. 침지한 탈지면과 차가버섯의 조직을 건열 살균한 petri dish에 넣고 25 °C에 48시간 동안 정치하였다. 백금이를 사용하여 조직표면에 자라난 하얀 균사들

조직으로부터 분리하였다. 이 과정에서 사용된 멸균수는 증류수를 가압멸균장치에서 121 °C, 60분 동안 가열하여 만들었다.

2-2. 종균배양

Chang 등[1]에 의하면 차가버섯 균사체는 PDA배지에서 비교적 잘 자라는 것으로 알려져 있다. 이를 참고하여, 백금이를 사용하여 차가버섯의 조직으로부터 떼어낸 균사를 PDA(potato dextrose agar) 배지 20 mL가 든 petri dish의 중심부에 접종하여 27 °C로 유지되고 있는 배양기 내에서 3일간 배양하였다. 3일간 균사를 배양하면 petri dish의 중심에서부터 반경이 대략 1.5 cm 이내인 부분은 옅은 황갈색을 띠며 이미 균사 밀도가 낮아진 것을 관찰할 수 있으며, 반면에 그 바깥 부분은 흰색을 띠며 상대적으로 아직 균사의 성장이 활동적이고 밀도 또한 높은 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 실험의 일관성을 유지하고자 내경이 7 mm인 cork borer를 사용하여 petri dish로부터 균사가 자라고 있는 고체배지 조각을 균사 밀도의 차이로 인해 나타나는 경계선에 접하게 떼어서 100 mL 종균배양용 배지가 들어있는 250 mL 삼각플라스크 내에 접종하고, 27 °C와 150 rpm으로 유지되고 있는 진탕배양기에 넣고 3일간 배양하여 종균배양액을 제조하였다. 배양 시에는 플라스크 내에 직경이 대략 16 mm인 유리구슬 6개를 넣어서 배양액이 효과적으로 혼합되도록 하였다[8].

배양이 끝나면 미리 멸균해둔 300 mL 비커에 배양액을 옮겨 담은 다음에 균질기(센스도깨비방망이 BW-1400A, Boeoon International Co.)를 사용하여 10초간 균질화 하였다. 균질화 하는 과정에서 발생하는 거품이 어느 정도 가라앉도록 잠시(2분) 기다렸다가 종균배양액의 균사체 농도를 결정하기 위한 10 mL 시료를 3번 취한 후에 종균배양액 보관을 위한 20 mL 시료를 3번 취하였다. 가능하면 시료들의 균사체 농도가 유사하도록 하기 위하여 각 시료를 취하기 이전에 반드시 10회 이상 비커를 흔들어서 주었다. 종균배양액이 담긴 튜브는 액체배양에 사용될 때까지 영하 40 °C로 유지되고 있는 저온냉장고에 넣어서 보관하였으며, 사용하기 이전에 꺼내어 상온에서 해동하였다.

종균배양액의 균사체 농도를 측정하기 위하여 채취한 10 mL의 시료를 무게를 알고 있는 원심분리기용 튜브에 넣고 3,000 rpm으로 유지되고 있는 원심분리기(Centrifuge MF550, Hanil Co.)를 사용하여 15분간 원심 분리하였다. 균사체의 세척을 위하여 상등액을 제거한 다음 소량의 증류수를 가한 다음 균사체층을 혼합기(Mixer M37615, Barnstead/Thermolyne)를 사용하여 2-3번 흐트러뜨린 후에 증류수를 더 채워서 전체 부피를 대략 10 mL로 만들어서 같은 조건에서 원심 분리한다. 이러한 세척 과정을 한 번 더 수행한 후에 상등액을 제거하고 균사체가 들어 있는 튜브를 100 °C로 유지되고 있는 건조기에 넣어서 24시간 동안 건조시킨다. 건조기에서 꺼낸 튜브를 식힌 다음 무게를 측정해서 건조균체량과 종균배양액의 균사체 농도를 구하였다. 한편, 기본배지의 선정을 위한 실험방법은 종균배양의 실험방법과 같았다.

2-3. 액체배양

앞의 단계에서 측정된 종균배양액의 균사체 농도를 기준으로 하여 건조균체량이 10 mg이 되도록 해동한 종균배양액 시료의 일부를 취해서 미리 조제한 100 mL의 액체배지가 들어 있는 삼각 플라스크에 접종한 다음 27 °C, 150 rpm으로 유지되고 있는 진탕배양기

에 넣고 3일간 액체배양하였다.

pH의 영향에 대한 실험을 제외한 다른 실험에 사용한 각종 액체 배지는 먼저 증류수 100 mL에 일정량의 성분들을 넣은 다음에 0.1 N HCl 용액과 0.01 N HCl 용액을 사용하여 배지용액의 pH를 6으로 조정하고, 고압멸균기에 넣어서 121 °C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 그리고 배양 시에는 플라스크 내에 직경이 대략 16 mm 인 유리구슬 6개를 넣어서 배양액이 효과적으로 혼합되도록 하였다[8].

액체배양이 끝나면 무게를 아는 거름종이(Whatman 41)를 사용하여 가능한 한 신속하게 배양액으로부터 균사체를 걸러낸 후에 100 mL의 증류수를 사용하여 균사체를 세척하였다. 세척이 끝난 균사체를 거름종이와 함께 증발접시에 담아서 100 °C로 유지되고 있는 건조기에서 24시간 동안 건조한 다음에 상온으로 식혀서 거름종이와 건조균체의 합친 무게를 측정하였다. 그 값에 미리 측정해둔 같은 건조기간 동안의 거름종이의 수분함량 변화를 고려하여 건조균체량을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 온도의 영향

균사체의 성장속도에 대한 배양온도의 영향을 알아보기 위하여, 내경이 7 mm인 cork borer를 사용하여 접종 후 3일간 배양한 PDA 배지에서 떼어낸 배지 조각을 PDA 배지 20 mL가 든 다른 petri dish의 중심부에 접종한 후에 항온기 내에서 3일간 배양하여 colony의 직경을 측정하였다. Fig. 1은 온도의 변화에 따른 colony의 직경의 변화를 나타내고 있다. 배양온도가 22-32 °C의 범위에서 변화하는 동안에 colony의 직경은 증가하여서 최대값을 보여준 후에 다시 감소하는 경향을 보여주었다. 본 실험에서는 26 °C와 27 °C에서 가장 큰 colony의 직경이 얻어졌다. 곡선의 모양을 감안하면 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 차가버섯의 균사체가 26 °C와 27 °C 사이에서 가장 빨리 성장한다는 것을 의미한다. 본 연구에서 얻은 최적온도는 Kim과 Kim[9]이 보고한 차가버섯 균사체의 생육 최적온도인 23-27 °C와는 부분적으로 일치하지만 Chang 등[1]이 얻은 최적온도보다는 조금 낮다. Chang 등[1]은 러시아 캅카스반도에서 채취한 차가버섯으로부터 분리한 차가버섯균(KNAC 3001, KNAC

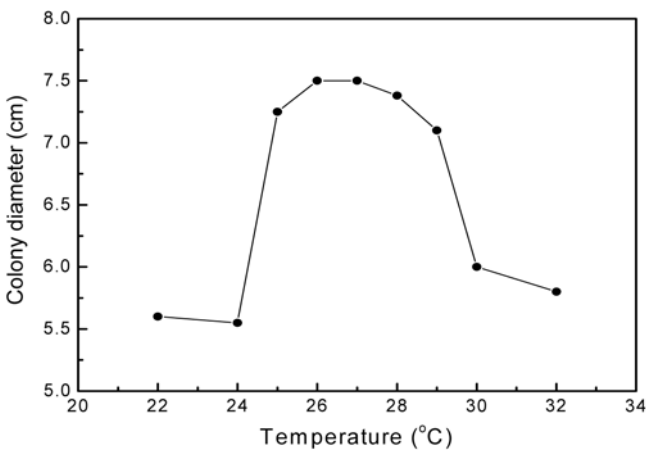


Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

3002)은 30 °C에서 가장 왕성하게 성장하며, 35 °C 이상에서는 사멸하고, 저온인 5 °C에서는 사멸하지는 않으나 성장은 아주 느리다고 보고한 바가 있다. 이렇게 최적온도가 다소 다른 것은 아마도 실험에 사용된 종균이 서로 다르기 때문으로 여겨진다. 그리고 본 연구에서는 향후 모든 배양실험을 27 °C에서 행하였다. 한편, Chung과 Sung[10]은 차가버섯 균주 슬러리를 얻기 위한 균사체의 액체배양과 균사체로부터 자실체를 받아내기 위한 1차 고체배양을 24 °C 또는 25 °C에서 수행하였으며, 발아된 자실체의 2차 고체배양을 27 °C 또는 28 °C에서 수행하였다.

3-2. 기본배지의 선정

버섯의 종류에 따라서 균사체의 액체배양을 위한 최적배지는 조금씩 다른 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 성분이 어느 정도 정해져 있는 기본배지를 선정하기 위하여 Kazuo[5]가 제안한 배지 1과 Park 등[7]이 제안한 배지 2, Choi[8]가 제안한 배지 3 그리고 본 연구에서 제안한 배지 4의 성능을 비교하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 배지를 만들 때 사용하는 원료성분의 수가 적은 배지 2가 가장 작은 건조균체량을 보여주었다. 이러한 결과가 얻어진 이유는 감자를 단순히 열수 추출하여 얻어지는 액체에는 다른 배지에는 들어있는 peptone과 yeast extract와 같은 차가버섯 균사체의 성장에 유용한 성분들이 포함되어 있지 않기 때문이다. 배지 1은 배지 2보다 2배가량의 큰 건조균체량을 보여주었다. 그리고 상황버섯 (*Phellinus linteus*) 균사체의 액체배양에서 높은 균사체 성장속도를 보여주었던 배지 3도 유용한 성분을 더 많이 포함하고있기 때문에 배지 1과 배지 2보다 큰 건조균체량을 보여주었다. 성분의 수는 배지 3과 같으나 질소원으로 1 g/L의 KH_2PO_4 대신에 0.5 g/L의 K_2HPO_4 를 함유하는 배지 4가 가장 높은 건조균체량을 보여준 것은

Table 1. Experimental results for the choice of a basic medium

No. of medium	Composition of medium	Dry weight of mycelium (mg/mL)	Reference
1	Distilled water Phosphate buffer solution Malt extract Glucose Peptone Yeast extract	900 mL 100 mL 5-15 g 5-15 g 1-6 g 1-6 g	7.2 Kazuo[5]
2	Potato extract by hot water (weight of potato : volume of water=1:3 w/v) glucose	2%	3.2 Park et al. [7]
3	Distilled water Glucose Peptone Starch Yeast extract KH_2PO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ CaCl_2	1 L 90 g 10 g 10 g 3 g 1 g 1 g 0.1 g	11.5 Choi[8]
4	Distilled water Glucose Peptone Starch Yeast extract K_2HPO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ CaCl_2	1 L 90 g 10 g 10 g 3 g 0.5 g 1 g 0.1 g	12.7 This study

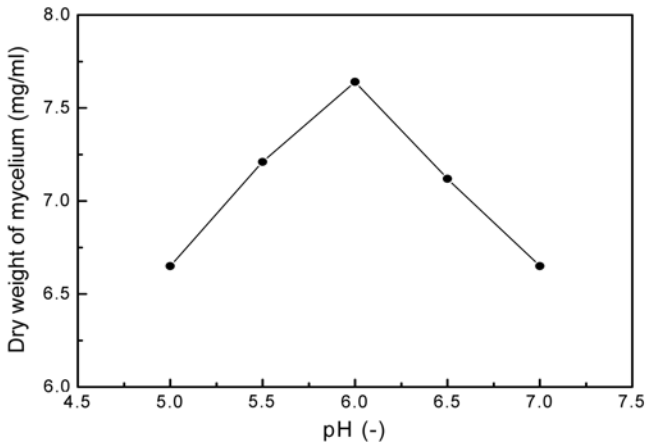


Fig. 2. Effect of pH on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

인산 공급원의 종류 또는 양의 변화가 차가버섯 균사체의 성장속도에 큰 영향을 줄을 의미한다. 본 연구에서는 배지 4를 기본배지로 선정하는 한편 종균배양용 배지로 사용하였다.

3-3. pH의 영향

건조균체량 또는 균사체 성장속도에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여, 기본배지의 pH를 5-7로 변화시키면서 액체배양 실험을 수행하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 배지의 pH가 증가할수록 배양 후 차가버섯의 건조균체량은 증가하였다가 감소하였으며, pH 6에서 최대값을 보여주었다. 이러한 결과는 차가버섯 균사체의 성장속도가 pH 6일 때에 가장 빠름을 의미하는데, 유사한 결과가 캄차카산 차가버섯균(KNAC 3001, KNAC 3002)에서도 얻어진 바가 있다[1].

3-4. 배지성분의 변화가 균사체 성장에 미치는 영향

먼저 다른 성분의 농도는 기본배지와 같게 유지하고 포도당 (glucose)의 농도를 30-120 g/L로 변화시키면서 포도당의 온도가 균사체 성장에 미치는 영향을 알아본 결과는 Fig. 3과 같았다. 건조균체량은 포도당의 농도가 증가함에 따라서 대략적으로 증가하였다가

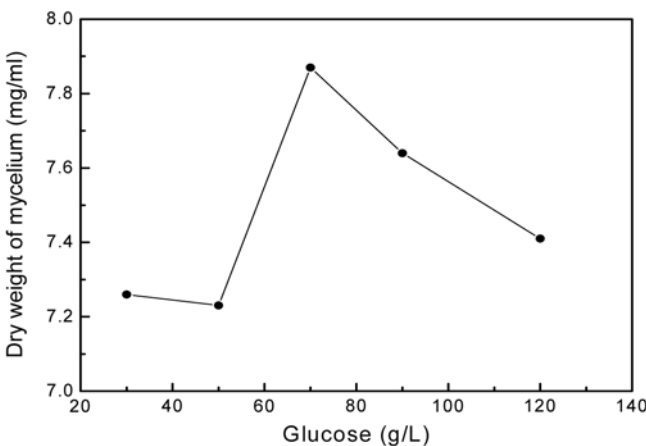


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

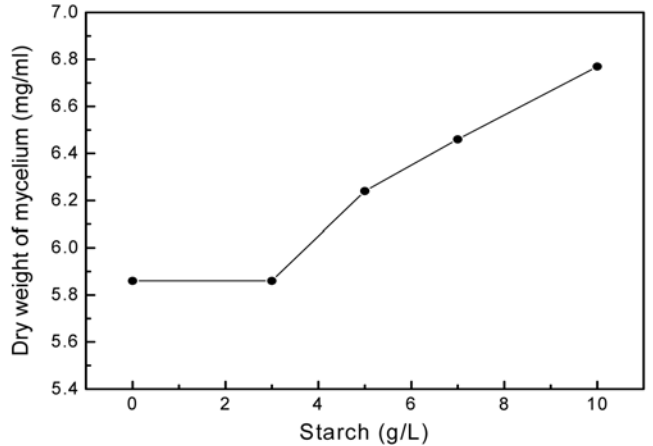


Fig. 4. Effect of starch concentration on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

최대값을 보여준 후에는 감소하는 경향을 보여주었으며, 포도당의 농도가 70 g/L일 때에 가장 많은 건조균체량을 얻을 수 있었다. 이러한 실험결과는 기본배지의 성분 중에서 포도당의 농도만을 변화시키면 포도당의 농도가 70 g/L일 때에 균사체의 성장속도가 가장 빠르다는 것을 의미한다. Choi[8]는 상황버섯의 경우에 포도당의 농도가 90 g/L까지 증가할수록 건조균체량이 증가한다고 보고한 바가 있다.

Fig. 4에 가용성 전분(starch)의 농도가 균사체 성장에 미치는 영향을 나타내었다. 이때에 사용한 배지는 앞의 연구 결과를 토대로 포도당의 농도를 70 g/L로 하는 한편, 전분을 제외한 다른 성분의 농도는 기본배지와 같게 제조한 배지를 사용하였다. 전분의 농도가 3 g/L이하일 때에는 건조균체량에 대한 전분의 영향은 크지 않았지만 전반적으로 건조균체량은 전분의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보여주어서, 전분의 농도가 10 g/L일 때에 가장 큰 건조균체량이 얻어졌다. 이러한 결과는 본 연구에서 실험한 농도범위에서 전분의 농도가 증가할수록 균사체의 성장속도가 증가하는 것을 의미하는데, 이와 유사한 결과가 상황버섯의 경우에 얻어진 바가 있다[8]. 전분의 최적농도를 알아내려면 전분의 농도가 10 g/L보다 클 때에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

Fig. 5는 peptone이 농도가 균사체 성장에 미치는 영향을 나타내

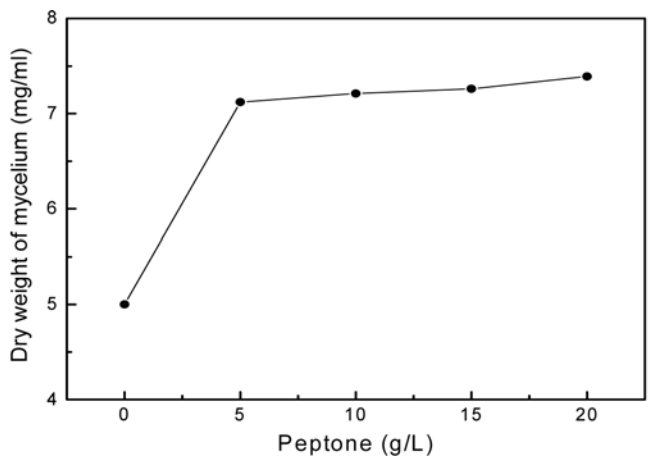


Fig. 5. Effect of peptone concentration on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

고 있다. 이때에 peptone을 제외한 배지 1 L 내에 들어 있는 다른 성분의 양은 glucose 70 g, starch 10 g, yeast extract 3 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g 그리고 $CaCl_2$ 0.1 g였다. 본 연구의 범위에서 peptone의 농도가 증가할수록 건조균체량은 전반적으로 증가하는 경향을 보였으며, 건조균체량에 대한 peptone 농도의 영향은 5 g/L 이하에서는 상당히 크지만 그 이상에서는 매우 작아져서 peptone의 농도가 증가하여도 건조균체량은 큰 차이가 없었다. 따라서, 본 연구에서 최대 균사체 성장을 보여주는 peptone의 농도는 5-20 g/L라고 볼 수 있으며, 이러한 농도는 Hong 등[11]이 느타리버섯의 배양에서 얻은 최적농도인 0.2%를 포함하나, Park과 Lee[12]가 구름버섯(*Coriolus versicolor*)과 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 배양에서 얻은 최적농도인 0.4%에 비해서는 상당히 작다.

Fig. 6은 효모추출물(yeast extract)의 농도가 균사체 성장에 미치는 영향을 나타내고 있다. 이때에 yeast extract를 제외한 다른 성분의 양은 glucose 70 g, peptone 20 g, starch 10 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g 그리고 $CaCl_2$ 0.1 g였다. 효모추출물의 농도를 증가할수록 건조균체량은 증가하였다가 최대값을 보인 다음에 감소하였다. 효모추출물이 들어있을 때가 들어있지 않았을 때보다 더 큰 건조균체량을 보여주었다. 가장 큰 건조균체량은 효모추출물의 농도가 5 g/L일 때 얻어졌다. 본 연구에서 최대의 균사체 성장을 보여주는 효모추출물의 농도는 Park과 Lee[12]가 구름버섯과 표고버섯의 배양에서 얻은 최적 농도인 0.6%에 가까운 값이다.

K_2HPO_4 의 농도가 균사체 성장에 미치는 영향을 Fig. 7에 나타내었다. 이때에 K_2HPO_4 를 제외한 다른 성분의 양은 glucose 70 g, peptone 20 g, starch 10 g, yeast extract 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g 그리고 $CaCl_2$ 0.1 g였다. K_2HPO_4 의 농도가 증가할수록 차가버섯 균사체의 성장속도는 전반적으로 증가한다고 볼 수 있으며, K_2HPO_4 의 농도가 2 g/L일 때에 가장 큰 건조균체량이 얻어졌다.

Fig. 8에 황산마그네슘7수화물($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)의 농도에 따른 건조균체량의 변화를 나타내었다. 이때에 황산마그네슘7수화물을 제외한 다른 성분의 양은 glucose 70 g, peptone 20 g, starch 10 g, yeast extract 5 g, K_2HPO_4 2 g 그리고 $CaCl_2$ 0.1 g였다. 차가버섯의 건조균체량은 황산마그네슘7수화물의 농도가 증가할수록 점차 감소하였다. 다시 말해 황산마그네슘7수화물을 넣지 않았을 때에 가장 큰 값의 차가버섯 균사체의 성장속도가 얻어졌다. 이러한

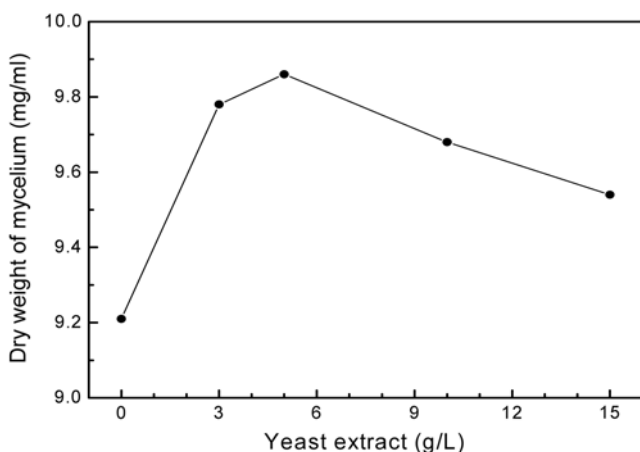


Fig. 6. Effect of yeast extract concentration on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

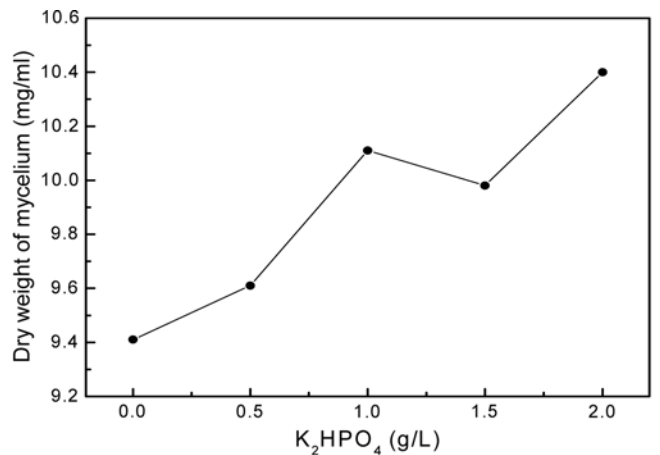


Fig. 7. Effect of K_2HPO_4 concentration on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

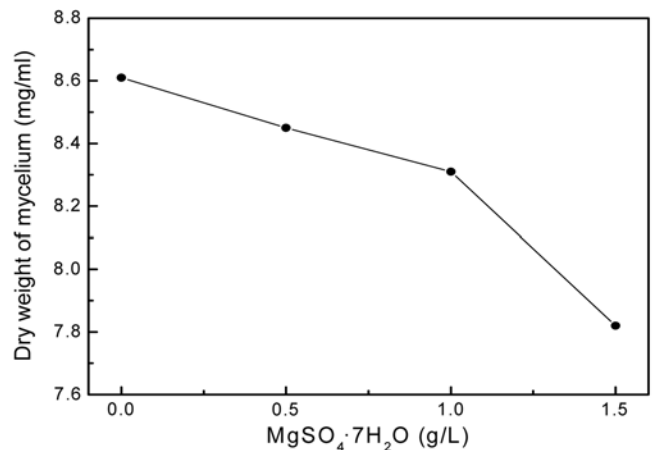


Fig. 8. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

결과는 차가버섯 균사체의 경우 다른 버섯의 균사체와는 달리 성장하는 데에 황산마그네슘7수화물의 첨가 또는 증가가 부정적으로 작용함을 의미한다. Hong 등[11]은 느타리버섯의 경우 황산마그네슘7수화물의 최적농도는 0.04-0.08%라고 보고하였으며, Choi[8]는 상항버섯의 경우 황산마그네슘7수화물의 최적농도는 1.0 g/L라고 보고한 바가 있다.

Fig. 9는 염화칼슘($CaCl_2$)의 농도가 건조균체량에 미치는 영향을 나타내고 있다. 이때에 염화칼슘을 제외한 다른 성분의 양은 glucose 70 g, peptone 20 g, starch 10 g, yeast extract 5 g 그리고 K_2HPO_4 2 g였다. 차가버섯의 건조균체량은 염화칼슘을 넣지 않았을 때가 가장 작았으며, 염화칼슘의 농도가 0.1 g/L일 때에 최대값을 보여준 다음에 계속하여 염화칼슘의 농도가 증가하면 점차 감소하는 경향을 보여주었다. 이러한 염화칼슘의 최적농도는 Choi[8]가 상항버섯 균사체의 액체배양에서 얻은 값과 동일하나, Park과 Lee[12]가 구름버섯과 표고버섯의 배양에서 얻은 최적농도인 0.046%보다는 상당히 큰 값이다.

차가버섯 균사체의 비중이 배양액의 비중보다 작기 때문에 고농도로 배양하게 되면 배양액 표면이 접하는 플라스크 벽면에 고리모양의 균사체층이 수 밀리미터의 두께로 형성된다. 그러므로 배양액

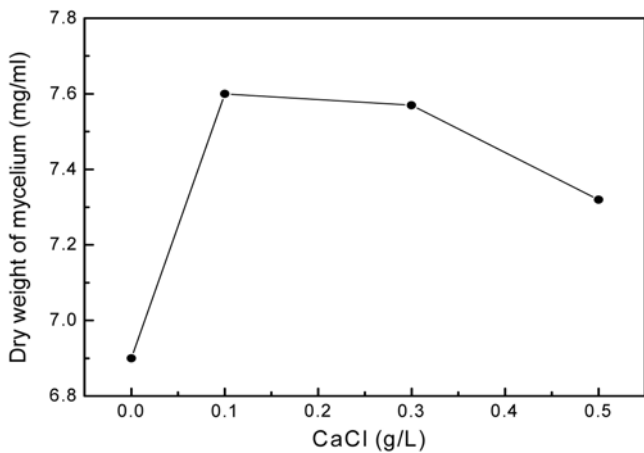


Fig. 9. Effect of calcium chloride concentration on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*.

내의 균사체 농도를 균일하게 하려면 균질화가 필요하다. 그러나 균질화를 하면 거품이 많이 발생하며 이때 발생한 거품은 짧은 시간 동안에 가라앉지 않기 때문에 거품이 가라앉기를 기다리는 동안에 배양액이 다시 불균일하게 된다. 결국, 본 연구에서는 가능하면 균사체 농도가 유사한 종균배양액 시료를 얻기 위하여 2분 동안 거품이 어느 정도 가라앉기를 기다린 후에 종균배양액의 시료를 채취하는 한편 배양 시료를 채취하기 이전에 비커를 10번 정도 흔들어서 주긴 하였지만, 채취된 시료 간의 균사체 농도의 차이를 없앨 수는 없었다. 한편, 종균배양을 위하여 매번 계대배양한 고체배지로부터 같은 활성을 지닌 일정한 양의 균사체를 떼어내기는 거의 불가능하기 때문에 3일 배양 후에 얻어지는 종균배양액 내에 들어있는 균사체의 농도와 활성에는 차이가 있었다. 이러한 이유들로 인하여 각각의 성분에 대한 실험에 사용된 종균의 농도와 활성이 매번 달라질 수밖에 없었다. 따라서, 본 연구에서는 배지 조성이 같더라도 다른 종균배양 시료를 사용하였기에 실험한 날에 따라서 차이가 있는 건조균체량의 값이 얻어졌다. 그럼에도, 불구하고 본 연구에서 실험된 액체배지 중에서 증류수 1 L에 glucose 70 g, peptone 5-20 g, starch 10 g, yeast extract 5 g, K₂HPO₄ 2 g 그리고 CaCl₂ 0.1 g를 넣어서 제조한 배지가 가장 큰 건조균사체량을 주는 액체배지라고 판단할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 차가버섯 균사체를 보다 경제적으로 액체배양하기 위한 기초적인 정보를 획득하기 위하여, 온도(22-32 °C)와 pH(5-7) 그리고 배지 성분의 농도 변화가 균사체의 성장에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다. 기존 배지들과 성능을 비교해본 결과, glucose, starch, peptone, yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O 그리고 CaCl₂를 성분으로 포함하는 본 연구에서 제안한 배지가 기본배지로 선정되었다. 그 결과를 바탕으로 glucose, starch, peptone, yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O 그리고 CaCl₂의 농도를 각각 30-120 g/L, 0-10 g/L, 0-20 g/L, 0-15 g/L, 0-2 g/L, 0-1.5 g/L, 0-0.5 g/L의 범위로 변화시키면서 성분의 농도변화가 균사체의 성장에 미치는 영향에 대해 실험하였다. 차가버섯의 건조균체량은 26-27 °C, pH 6, glucose 70 g/L, yeast extract 5 g/L 그리고 CaCl₂ 0.1 g/L에서 최대 값을 나타냈다. 본 연구에서 사용된 농도범위에서는 starch와

peptone 그리고 K₂HPO₄의 농도가 증가할수록 차가버섯의 건조균체량은 증가하였으나, MgSO₄·7H₂O의 농도가 증가할수록 차가버섯의 건조균체량은 감소하였다. 본 연구에서 얻어진 실험 결과를 종합할 때에 차가버섯 균사체의 최대 성장을 위한 액체배지에 들어있는 각 성분의 농도는 glucose 70 g/L, peptone 5-20 g/L, starch 10 g/L, yeast extract 5 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L 그리고 CaCl₂ 0.1 g/L임을 알 수 있었다.

감 사

이 논문은 2004년도 한밭대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 작성되었으며, 이에 대해 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Chang, H. Y., Lee, B. H. and Ko, I. W., "Inonotus obliqua Strain, Method for Separating It, and Method for Mass Production of Its Fruitbody," Korean Patent No. 10-0339701-0000(2002).
2. Hwang, Y. J., Noh, G. W. and Kim, S. H., "Effect of *Inonotus obliquus* Extracts on Proliferation and Caspase-3 Activity in Human Gastro-Intestinal Cancer Cell Lines," *J. Korean Nutr. Soc.*, **36**(1), 18-23(2003).
3. Ham, S. S., Oh, S. W., Kim, Y. K., Shin, K. S., Chang, H. Y. and Chung, G. H., "Antimutagenic and Cytotoxic Effects of Ethanol Extract from the *Inonotus obliquus*," *J. Korean, Soc. Food Sci. Nutr.*, **32**(7), 1088-1094(2003).
4. Goun, E. A., Petrichenko, V. M., Solodnikov, S. U., Suhinina, T. V., Kline, M. A., Cunningham, G., Nguyen C. and Mile, H., "Anticancer and Antithrombin Activity of Russian Plants," *Journal of Ethnopharmacol.*, **81**, 337-342(2002).
5. Kazuo, S., "Liquid Culture of *Fuscopia Obliqua* (FR.) Aoshima," Japan Patent No. 10,191,783(1997).
6. Chung, K. H., Han, J. J., Lee, C. W., Park, J. D. and Ko, E. C., "Composition Containing Chaga Mushroom Extract as an Active Ingredient," Korean Patent Unexamined Publication No. 10-2003-0065964(2003).
7. Park, H. J., Kim, Y. J. and Lee, D. S., "Manufacture Method of a Functional Tea and Food, Using Extract of Mushroom Mycelium by New Extraction Technique," Korean Patent Unexamined Publication No. 10-2003-0072417(2003).
8. Choi, K. H., "Development of a New Synthetic Medium Composition for the Submerged Culture of *Phellinus linteus*," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(2), 167-173(1999).
9. Kim, J. M. and Kim, W. J., "The Chaga Mycelium Culturing Method by Using Unpolished Rice," Korean Patent No. 10-0431327(2004).
10. Chung, H. Y. and Sung, K. H., "Method for Cultivating *Inonotus obliqua*," Korean Patent Unexamined Publication No. 10-2004-0039936(2004).
11. Hong, J. S., Yun, S. E., Kim, Y. S. and Lee, J. B., "Synthesis of Trehalose by *Pleurotus* spp.-Cultural Conditions," *Kor. J. Mycol.*, **15**(2), 108-115(1987).
12. Park, K. H. and Lee, J. S., "Optimization of Media Composition and Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **6**(1), 91-98(1991).