

점봉산 거제수나무에서 분리한 차가버섯의 배양특성

박 현* · 이봉훈 · 박원철

국립산림과학원 화학미생물과

Cultural characteristics of *Inonotus obliquus* isolated from *Betula costata* at Mt. Jumbong in Korea

Hyun Park*, Bong-Hun Lee and Won-Chull Bak

Div. of Wood Chem. and Microb., Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

ABSTRACT : The sterile form of *Inonotus obliquus* is used for preparation of the medicine befungin that is effective in the treatment of gastritis, gastric ulcers, and several tumors. The fungus is known to be produced mainly on the stems of *Betula platyphylla* var. *japonica* that grows at high altitudinal (above 1,100 m) region in Korea. But, we found the mushroom on the stem of *Betula costata* at Mt. Jumbong in Korea. We isolated a pure culture of the fungus from the stem of *B. costata* by use of potato dextrose agar (PDA) medium with streptomycin. We could isolate the fungus from plant's tissue filled with hyphae, but not from other parts. The spore collected from the sclerotia showed $6.0\sim 10.0 \times 4.5\sim 6.0\mu\text{m}$ in diameter, and the hypha was $2.5\sim 5.0\mu\text{m}$ in thickness. The colony showed irregular features and scattered yellow color at the center as the culture ages. We could find brownish setae at the yellow region of colony at 20 days of culture, and the size ranged $4\sim 6 \times 100\sim 420\mu\text{m}$. The oatmeal agar (OA) provided best growth for *I. obliquus* among five media (CDA, CMA, MA, OA and PDA). Optimum temperature ranged $25\sim 30^\circ\text{C}$, and optimum pH was relatively alkaline with the range of pH $8.0\sim 9.5$.

KEYWORDS : *Betula costata*, *Inonotus obliquus*, oatmeal agar, setae

차가(*Inonotus obliquus*)는 러시아와 폴란드 등 여러 국가에서 민간요법으로 사용되어 온 균핵(菌核)으로서, 최근에는 배양 균사를 이용하여 배봉진(befungin)이라는 약제가 생산되고 있다(Kukulyanskaya *et al.*, 2002). 우리나라에서도 외국으로부터 도입된 균주에 대한 기초적인 연구나 항돌연변이 활성, 암세포 성장억제, 항산화활성, 유전독성 억제 등의 약리적 효과가 널리 보고되고 있다(함 등, 2003a; 함 등 2003b; 황 등, 2003). 한편, 차가 균핵에서 추출된 멜라닌과 배양 균사에서 합성된 멜라닌의 화학구조가 다르게 나타나 약리성분의 차이가 발생할 수 있을 것으로 여겨지므로(Kukulyanskaya *et al.*, 2002), 배양 균사를 이용하는 연구와 더불어 균핵을 대량으로 생산할 수 있는 방법도 모색되고 있다.

차가(*Inonotus obliquus*)는 핀란드 등 유럽국가에서는 공원수나 가로수로 사용되는 자작나무류에 치명적인 피해를 주는 해균으로 취급되는데(Terho and Hallaksela, 2005), 자작나무류(*Betula* spp.), 오리나무류(*Alnus* spp.), 가래나무류(*Carya* spp.), 너도밤나무류(*Fagus* spp.), 새우나무류(*Ostrya* spp.) 등을 기주로 한다. 차가의 학명에 대하여 일본에서는 *Fuscoporia obliqua*로 명명

한편 러시아와 핀란드에서는 *Inonotus obliquus*라고 명명하였으나 1980년대 이후 학술교류가 진전되면서 두개의 학명 중 먼저 명명한 러시아 쪽의 학명인 *Inonotus obliquus*를 사용하고 있다(김 등, 2004). 일본의 북해도, 러시아 캄차카반도 등과 같은 추운지역에서 주로 나타나며, 20~50년생 자작나무(*Betula platyphylla* var. *japonica*)에 가장 잘 착생하는 것으로 알려져 있다(심 등, 2003; 장, 2002; Farr *et al.*, 1989). 하지만, 우리나라에서는 버섯 채집자들에 의하여 국내에도 자생되고 있는 것으로 알려지고 있을 뿐 학계에 공식적으로 보고된 바가 없었다. 따라서 우리나라 차가 균주를 확보하지 못한 상태에서 외국 균주를 이용한 연구가 추진되고 있었는데, 국내에서 차가 균핵을 발견하여 분리, 동정하고 기본적인 배양특성을 파악하였기에 보고한다.

재료 및 방법

차가 균핵 채취

강원도 인제군 기린면 진동리의 점봉산 자락, 해발고도 약 900m 지점의 북동쪽 경사면에 소규모 균락을 형성한 흉고직경 25.5cm의 거제수나무에서 분리된 직경 8.5cm의 거제수나무(*Betula costata*) 차가 균핵을 채집하였다

*Corresponding author: <hyunpark@foa.go.kr>

(Figure 1). 점봉산 정상부(해발고 1300m 내외)에 분포하는 사스레나무(*Betula ermanii*) 군락은 대체로 낮은 수고(7~8m)를 형성하고 있었으나 차가를 찾기 어려웠다. 또한, 점봉산 단목령과 곰배령 사이의 능선에 위치한 대형 거제수나무 군락은 뽕나무버섯균에 의하여 나무가 죽어가는 상태로 지표면으로 노출된 천마 꽃대를 확인할 수 있었으며, 차가는 찾기 어려웠다.



Fig. 1. *Inonotus obliquus* occurred on the branch of *Betula costata*.

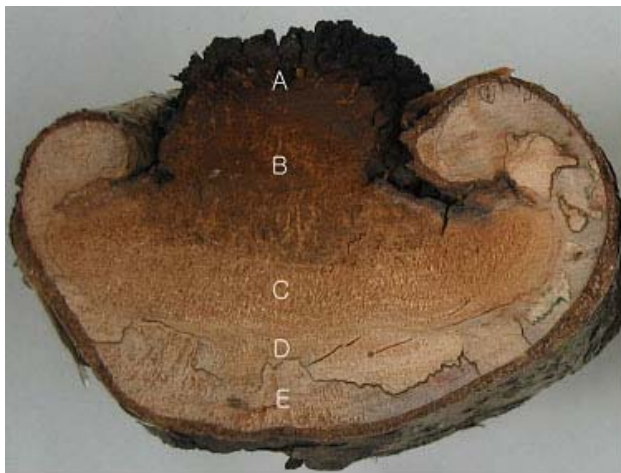


Fig. 2. The portion of isolation of *Inonotus obliquus*.

- A : Surface of sclerotium B : Center of sclerotium
 C : Plant's tissue filled with mycelia of *Inonotus obliquus*
 D : Plant's tissue contains front layer of *Inonotus obliquus*
 E : Outer layer of mycelia of *Inonotus obliquus*

균 분리

균 분리에 있어서 적합한 부위를 찾기 위하여 차가 균핵이 붙어있는 상태에서 나무를 절단하여 균핵의 표면(A), 균핵의 중간부위(B), 차가버섯 균이 만들어진 나무조직(C),

차가 균이 거의 들어가지 않은 것으로 여겨지는 부분(E), C와 E 사이(D) 등 5부분으로 나누었다(Figure 2). 각 부위에서 떼어낸 조각을 스트렙토마이신 100 ppm이 첨가된 PDA에 올려놓고 25°C, 암조건에서 배양하며 균 분리를 시도하였다.

동정

PDA에서의 배양 약 20일 경과 후 해부현미경과 광학현미경을 이용하여 균총 및 균사의 특성, 강모의 형성 유무와 특성을 확인한 다음 관련된 문헌(Breitenbach and Krözl, 1986.) 및 감차카반도에서 수집된 균주 등과 비교하여 본 분리 균에 대한 동정을 시도하였다.

배양특성 조사

분리 균의 균사 생장에 적합한 온도를 확인하기 위해 PDA에서 배양한 균사의 선단부를 직경 5mm cork borer로 떼어내어 PDA 배지에 이식하였다. 이식한 PDA는 5~35까지 5 간격으로 설정된 항온기에 넣고 15일간 배양한 후 균총의 지름을 측정하였으며, 매 처리는 5반복으로 실시하였다.

균사 생장에 적합한 배지를 선발하기 위해 CDA (czapek-dox broth(Difco)+agar), CMA(corn meal agar(BBL)), MA(malt extract agar(Difco)), OA(oatmeal agar(Difco)), PDA(potato dextrose agar(Difco)) 등 5가지 배지를 사용하였다. 균은 온도조사와 동일한 방법으로 이식하였고 배양 10일 후 관찰하였으며, 5반복으로 실험을 진행하였다. 균사 생장에 적합한 pH를 확인하기 위해 4.0~9.5까지 0.5 간격으로 pH를 조절 한 다음 온도조사와 동일한 방법으로 균을 이식한 후 25에서 15일간 배양한 후 균총의 지름을 측정하였다. pH 조절에는 1N NaOH와 1N HCl을 사용하였고, 각 처리는 5반복으로 실시하였다.

결과 및 고찰

균 분리 및 동정

차가 균은 5개 부위 중 C(차가 균으로 만들어진 나무조직)와 D(차가 선단부)에서 분리될 뿐 A, B, E에서는 분리가 어려웠다. 균핵에 해당하는 A, B 부분에서 차가버섯 균이 분리되지 않는 것은 균핵이 형성되고 난 다음에는 다른 잡균에 쉽게 노출되기 때문인 것으로 생각되며, E 부분에서 분리되지 않는 것은 D와 접해 있는 부분에 검은색 대선이 만들어진 것으로 보아 다른 균이 선점했기 때문인 것으로 생각된다.

균총은 불규칙한 모양을 띄었다. 배양 초기에는 흰색의 기중균사가 많이 발달하지만 시간이 경과할수록 균총의 중간 중간이 노란색으로 변색되었다(Figure 3). 이는 Stalpers(1978)의 처음에는 흰색을 띄지만 시간이 경과

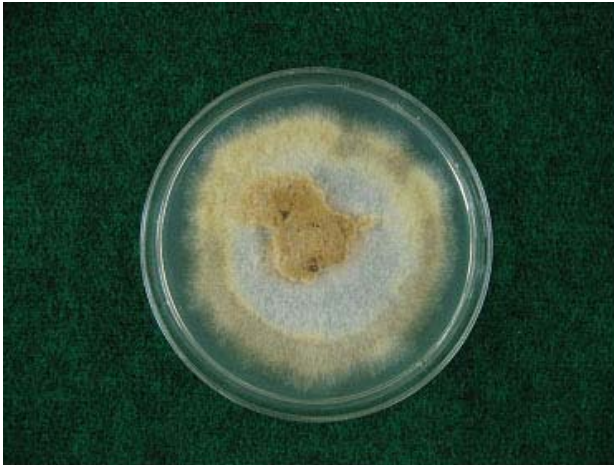


Fig. 3. Mycelial growth of *Inonotus obliquus* on PDA.

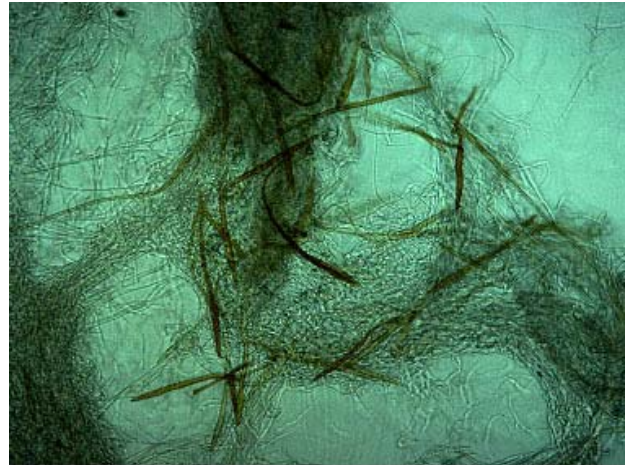


Fig. 4. Setae of *Inonotus obliquus* formed on PDA.

Table 1. Characteristics of *Inonotus obliquus* and that of fungus isolated from *Betula costata* in Korea

	<i>Inonotus obliquus</i> ^{a)}	Isolated fungus
basidiospore	8 ~ 10 × 5 ~ 7.5 μm elliptical, hyaline	6 ~ 10 × 4.5 ~ 6 μm elliptical, hyaline ~ pale brown
setae	(20)50 ~ 100 × 5 ~ 10 μm brown-red, thick-walled	100 ~ 420 × 4 ~ 6 μm brown-red, thick-walled
mycelium	2 ~ 7 μm without clamps	2.5 ~ 5 μm without clamps

^{a)}Breitenbach and Kränzlin (1986)

할수록 갈색으로 변해간다는 보고와 일치한다. 약 20일이 경과하면 노란색으로 변색된 부분에서 적갈색의 강모 (setae)를 확인할 수 있는데, 강모의 크기는 4~6 × 100~420 μm이었다(Figure 4). 균사 굵기는 2.5~5 μm이었고, 균핵에서 확인한 포자는 6~10 × 4.5~6 μm 크기를 나타내었다. 분리 균의 이러한 특성들은 여러 문헌과 비교했을 때, *Inonotus obliquus*와 여러 면에서 일치하기 때문에 본 분리균을 *Inonotus obliquus*로 동정하였다(Table 1).

배양특성

생육 배지 : 균주 배양을 위하여 사용한 CDA, CMA, MEA, OA, PDA 배지 가운데 OA 배지가 다른 배지에 비하여 2배 이상의 균사생장을 나타내었다(Figure 5). MEA에서는 거의 생장을 하지 않았으며, CDA와 CMA에서는 PDA에서와 비슷한 정도로 생장을 했지만 균총의 특성을 파악하기 어려울 정도로 배지 바닥에 깔려서 생장을 했다. 한편 OA 배지에서의 균사 생장은 빠르지만 배지의 색깔과 균사의 색깔이 비슷하여 육안으로 균총의 특성을 파악하기 어려웠다. 따라서 재배를 목적으로 하는 배양에는 OA 배지가 적합하지만 균의 특성을 확인하는 실내 실험으로는 적당하지 않았다. 이에 따라 균사의 특성 확인을 위한 실내실험에는 PDA 배지를 사용하였다.

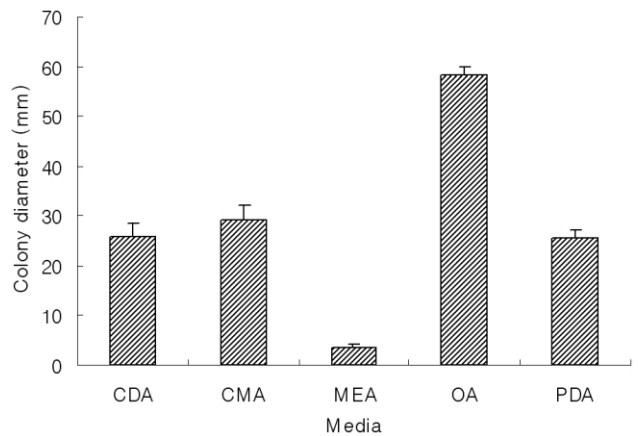


Fig. 5. Mycelial growth of *Inonotus obliquus* on various media.

생장 온도 : 차가버섯 균은 온도에 따라 성장력의 차이가 크며, 실험결과 균사 생장에 적합한 온도 범위는 25~30℃이었다. 추운지방에서 나타나는 균임에도 불구하고 5℃에서는 균사 생장이 극히 미약하였다. 한편, 30℃에서 최대 성장률을 나타내고 25℃에서는 최적온도 대비 88%의 생장을 보인 반면, 35℃에서는 최대 성장률의 3%에 해당하는 생장을 나타내었다(Figure 6). 이는 차가버섯 균이 일

반적인 균류의 성장 온도인 25°C 보다는 높은 온도를 좋아 하지만 온도가 30°C를 넘어가게 되면 온도가 낮을 때 보다 상대적으로 더 급격히 성장력이 떨어질 수 있음을 시사한다. 즉, 배양온도는 30°C를 넘지 않도록 유의하여야 한다.

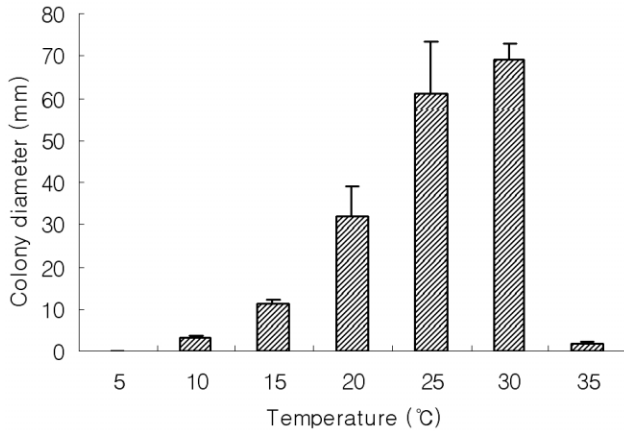


Fig. 6. Mycelial growth of *Inonotus obliquus* on PDA medium at various temperatures.

적정 pH : 균사 생장에 적합한 pH는 8.0~9.5로 비교적 높은 산도를 좋아하는 것으로 나타났다(Figure 7). pH 6.5에서 최적 pH 대비 86%의 성장을 보이는 것으로 보아 pH가 6.5~9.5 사이라면 차가버섯 균은 생장에 큰 영향을 받지 않을 것으로 생각된다. 이는 장(2002)이 보고한 적정 균사생장 pH 보다 약간 높은 pH이다. 하지만 pH 4.0, 5.0에서는 최적 pH 대비 47%, 58%의 성장을 각각 보여 위 보고와 유사한 특성을 나타냈다.

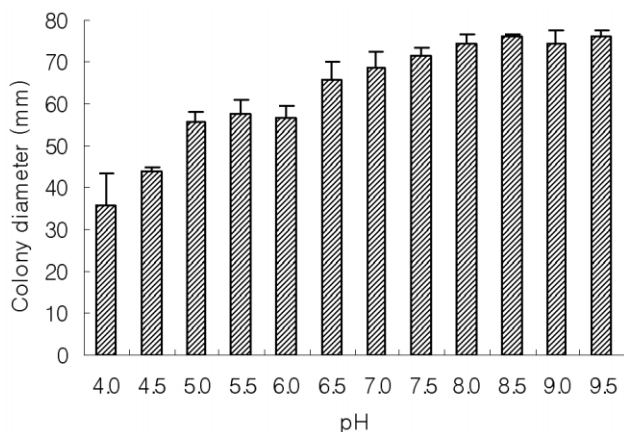


Fig. 7. Mycelial growth of *Inonotus obliquus* on PDA medium at various pH.

적 요

차가는 배양균사로부터 위염, 위궤양 및 여러 가지 암에 효력을 나타내는 것으로 알려진 베폭진(befungin) 약제의

생산을 위하여 사용되고 있다. 차가는 자작나무 줄기에서 주로 생산되는 것으로 알려져 있는데, 우리나라의 경우 자작나무 자생지는 해발고도 1,100m 이상에만 나타난다. 하지만, 우리는 점봉산의 거제수나무에서 차가버섯을 채집할 수 있었으며, 스트렙토마이신을 첨가한 PDA 배지를 이용하여 균주를 분리할 수 있었다. 차가 균은 5개 부위 중 차가 균으로 만연된 나무조직에서 분리될 뿐 다른 부분에서는 분리가 어려웠다.

균핵에서 확인한 포자는 $6.0 \sim 10.0 \times 4.5 \sim 6.0 \mu\text{m}$ 크기를 나타내었고, 균사 굵기는 $2.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 이었다. 실내 배양에서 균총은 불규칙한 모양을 띄며, 시간이 경과할수록 균총의 중간 중간이 노란색으로 변색되었다. 약 20일이 경과하면 노란색으로 변색된 부분에서 적갈색의 강모(setae)를 확인할 수 있으며, 강모의 크기는 $4 \sim 6 \times 100 \sim 420 \mu\text{m}$ 이었다.

차가의 균사생장에 가장 좋은 배지는 OA(oatmeal agar)이었다. 적합한 온도 범위는 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 이었으며, 균사생장에 적합한 pH는 8.0~9.5로 비교적 높은 산도를 좋아하는 것으로 나타났다.

참고문헌

- 김성윤, 이재윤, 김기영, 박재민, 김문옥, 이태호, 이재동. 2004. ITS 열기서열에 기초한 차가버섯과 근연속간 유연관계분석. 한국균학회지 32(2): 152-157.
- 심재성, 이병화, 강석중. 2003. 차가버섯의 실제와 응용. 국제농업개발원. 286pp.
- 장현유. 2002. 차가버섯(*Inonotus obliquus*) 인공재배를 위한 균사 배양적 특성. 한국자연식물학회지 15(1): 135-143.
- 함승시, 오상화, 김영관, 신광순, 장현유, 정국훈. 2003a. 차가버섯 분획물의 항돌연변이 활성 및 암세포 성장억제효과. 한국식품영양과학회지 32(7): 1088-1094.
- 함승시, 오상화, 김영관, 신광순, 장현유, 정국훈. 2003b. 차가버섯 분획물의 항산화활성 및 유전독성 억제효과. 한국식품영양과학회지 32(7): 1071-1075.
- 황용주, 노건웅, 김선희. 2003. 차가버섯 추출물이 소화기계 암세포의 증식 및 Caspase-3 활성화에 미치는 영향. 한국영양학회지 36(1): 18-23.
- Breitenbach, J. and Kränzlin, F. 1986. Fungi of Switzerland (Volume 2. Non gilled fungi). Verlag Mykologia, Switzerland. pp.252-253.
- Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. and Rossman, A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, St. Paul, MN. p.749.
- Kukulyanskaya, T. A., Kurchenko, N. V., Kurchenko, V. P. and Babitskaya, V. G. 2002. Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of *Inonotus obliquus* in natural and cultivated fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology* 38(1): 58-61.
- Stalpers, J. A. 1978. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. *Studies in Mycology* 16: 212.
- Terho, M. and Hallaksela, A-M. 2005. Potential hazard characteristics of *Tilia*, *Betula*, and *Acer* trees removed in the Helsinki City Area during 2001-2003. *Urban Forestry & Urban Greening* 3: 113-120.