

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A01G 1/04

(11) 공개번호 10-2005-0059916
(43) 공개일자 2005년06월21일

(21) 출원번호 10-2003-0091641
(22) 출원일자 2003년12월15일

(71) 출원인 경상북도(승계청:경상북도농업기술원, 관리청:경상북도 도지사)
대구 북구 동호동 200

(72) 발명자 조우식
대구광역시남구대명10동삼정비취맨션A동305호
류영현
대구광역시북구태전동한일아파트102동506호
최성국
대구광역시달서구상인1동중석타운301호
박승춘
대구광역시북구북현동화성타운102동102호
배재성
대구광역시달서구두류1동1184-318/3

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 톱밥을 포함하는 마른진흙버섯 배양용 배지 및 상기배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공재배하는 방법

요약

본 발명은 마른진흙버섯 배양용 배지 및 상기 배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공재배하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 톱밥을 주성분으로 포함하는 마른진흙버섯 균사체 및 자실체 배양용 배지 및 상기 배지를 이용하여 마른진흙버섯의 종균을 배양하여 균사체를 얻는 단계; 상기 마른진흙버섯 균사체로부터 마른진흙버섯의 자실체 원기를 형성시키는 단계; 및 상기 자실체 원기로부터 자실체를 생육시키는 단계를 포함하는 마른진흙버섯의 인공재배 방법에 관한 것이다. 본 발명의 배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공 재배하면 기존의 원목을 이용한 재배 방법에 비해 수확량이 증대되고 재배 소요일수가 감소하기 때문에 우수한 약리효과를 가지는 마른진흙버섯을 대량으로 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 톱밥 배지의 조성을 달리한 본 발명의 톱밥 배지를 이용하여 마른진흙버섯 균사체를 배양중인 사진이다.

- A: 참나무 톱밥 100%, B: 참나무톱밥 95% + 미강 5%,
- C: 참나무톱밥 90% + 미강 10%, D: 참나무톱밥 85% + 미강 15%,
- E: 참나무톱밥 80% + 미강 20%, F: 참나무톱밥 75% + 미강 25%,
- G: 참나무톱밥 70% + 미강 30%

도 2는 참나무 원목 및 톱밥 배지의 조성을 달리한 본 발명의 톱밥 배지를 이용하여 재배한 마른진흙버섯 자실체의 생육된 형태를 나타낸 사진이다.

- A: 참나무 원목, B: 참나무 톱밥 100%,
- C: 참나무톱밥 95% + 미강 5%, D: 참나무톱밥 90% + 미강 10%,
- E: 참나무톱밥 85% + 미강 15%, F: 참나무톱밥 80% + 미강 20%,
- G: 참나무톱밥 75% + 미강 25%

도 3은 본 발명의 톱밥 배지를 이용하여 배양한 마른진흙버섯의 자실체로부터 증류수를 이용하여 추출한 추출물의 항암 활성을 원목재배된 마른진흙버섯의 자실체 증류수 추출물의 항암 활성과 비교한 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 톱밥 배지를 이용하여 배양한 마른진흙버섯의 자실체로부터 20%, 40% 및 60% 에탄올을 이용하여 추출한 추출물의 항암 활성을 원목재배된 마른진흙버섯 자실체 에탄올 추출물의 항암 활성과 비교한 그래프이다.

도 4b는 본 발명의 톱밥 배지를 이용하여 배양한 마른진흙버섯의 자실체로부터 80% 에탄올을 이용하여 추출한 추출물의 항암 활성을 원목재배된 마른진흙버섯 자실체 에탄올 추출물의 항암 활성과 비교한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 톱밥 배양 배지를 이용하여 마른진흙버섯을 배양하는 과정을 나타낸 공정도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 마른진흙버섯 배양용 배지 및 이를 이용한 마른진흙버섯의 재배방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 톱밥을 주성분으로 포함하는 마른진흙버섯 배양용 배지 및 상기 배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공재배하는 방법에 관한 것이다.

마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)은 상항버섯이라고도 불리며, 민주름버섯목(Aphylophorales), 소나무비닐버섯과(Hymenochaetaeae), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색 부후균으로 주로 참나무, 뽕나무와 같은 활엽수에 발생하는 데, 표고버섯 재배시 참나무 골목에 발생하여 병을 일으킨다(차 등, 1994, 최신버섯재배기술, 농진회, 325p). 마른진흙버섯의 자실체는 코르크질로 단년생 또는 다년생으로 알려져 있으며, 나무에 부착된 편반구형으로 보통 상하가 서로 연결되어있는 균생형으로 발생하고, 크기는 지름 5 내지 12 cm 정도이다. 자실체의 상층표면은 암황갈색으로 융모가 있고, 가장 자리는 갖에 비해서 색이 옅으며, 관공의 표면은 암자갈색으로 mm당 6 내지 8개가 있고, 포자는 4 내지 5 × 3 내지 3.5 μm 로 타원형이며, 표면은 평활하다고 알려져 있다(Ryvardan, L., 1993, European Polypores, Fungiflora, Norway).

마른진흙버섯은 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암을 비롯한 간암의 절제 수술후 화학요법을 병행할 때 면역기능을 향진시키는 것으로 알려져 예로부터 귀중한 한약재로 사용되었다. 또한, 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 장출혈, 오장 및 위장 기능을 활성화시키고 해독작용을 한다. 이케가와 등(Ikegawa et al., *Gann*, 59, 155, 1968)은 마른진흙버섯이 구름버섯(*Coriolus versicolor*)과 표고버섯(*lentinus edodes*)보다 종양 저지율이 높다고 보고하였으며, 메다 등(*Protein Nucleic acid Enzyme*, 21, 426, 1976)은 항암활성이 96.7%라고 보고하였다. 또한, 정 등(*약학회지*, 38, 158, 1994)은 균사체의 단백당당체가 육종(Sarcoma)180 복수암 및 고형암을 효과적으로 억제한다고 하였으며, 김 등(*Arch. Pharm. Res.*, 17, 337, 1994)은 항종양 활성을 갖는 다당류를 분석한 결과, 글루코스가 주를 이루고 있으며, 이외에 갈락토스, 만노스, 아라비노스 등으로 이루어져 있다고 보고하였다. 그리고, 공 등(*생약학회지*, 22, 233, 1991)은 마른진흙버섯 균사체의 열수 추출물이 NK 세포 기능에 작용하여 숙주세포의 비특이적 면역능을 증강시킴으로써 항암활성을 나타내며, 또한 마우스에 투여한 결과 LD₅₀이 1,500 mg/kg 이상으로 나타나 안정성이 있다고 보고하였다.

이와 같이 마른진흙버섯이 항암활성과 면역증강 효과가 우수하다고 보고된 이후 국내에서도 민방에서 항암치료를 위해 마른진흙버섯을 고가로 시판하고 있다. 그러나, 자연산 마른진흙버섯은 희귀하며 가격 또한 매우 고가이기 때문에 입수하기가 곤란한 것으로 알려져 있으며, 산지와 종균에 따라 약리효과도 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 이에, 마른진흙버섯을 인공재배하려는 연구가 많이 이루어지고 있다.

종래의 마른진흙버섯 인공재배는 통상 균주를 확보하고, 균사체 배양배지에서 균주로부터 균사체를 배양한 다음, 자실체 형성 배지에서 상기 균사체로부터 자실체를 형성시켜 마른진흙버섯을 생육시키는 순서로 재배된다.

마른진흙버섯의 균주는 야생 마른진흙버섯을 채취하여 이로부터 균주를 얻거나, 미생물 기탁 연구 기관으로부터 균주를 분양받아 사용하는 방법이 있다. 그러나, 야생 마른진흙버섯은 마찬가지로 자연계에 적게 분포하고, 발생수가 적기 때문에 이로부터 종균을 얻는 것이 쉽지 않아서 통상 국내의 특정 종균배양소로부터 종균을 구입하여 사용하는 실정이다.

마른진흙버섯의 균사체 배양배지는 영양공급원으로서 뽕나무 또는 참나무를 주성분으로 하여 기타 다른 나무들을 톱밥 상태로 만든 후 여기에 쌀겨 등을 첨가하여 준비한다. 이러한 배양배지는 마른진흙버섯이 충분히 성장할 수 있도록 탄소원, 질소원 및 무기질원 등을 공급하여 주는 역할을 하므로 이들의 적당한 배합비율은 최종 성장된 마른진흙버섯의 질과

생장속도에 많은 영향을 미친다. 군사체를 배양하기 위한 종래의 배양배지는 뽕나무 톱밥을 30%로 하여 여기에 쌀겨를 10% 첨가한 것을 기본으로 하고 미루나무나 참나무 또는 오리나무를 각각 30% 정도 배합한 후 여기에 물을 공급하여 조성한다. 경우에 따라서는 쌀을 주성분으로 한 순수한 식용 곡류만을 사용하기도 한다. 그리고, 이러한 배지성분을 저장하는 배양용기로는 유리나 플라스틱 또는 폴리 프로필렌(PP)으로 만들어진 병모양의 것이 많이 사용되고 있다.

마른진흙버섯의 군사체가 충분히 배양되면 이를 자실체 형성 배양배지로 옮겨 자실체를 형성시킴으로써 양질의 마른진흙버섯을 생산할 수 있다. 현재까지 자실체를 형성하기 위한 배양 배지로는 원목을 주로 사용한다. 그러나, 실제 인공재배시 자실체의 형성은 어려운 점이 많기 때문에 군사체들이 뭉친 균막 제품이 민간에서 거래되고 있으며, 일부 인공 재배한 버섯이 고가에 거래되고 있는 실정이다. 그러나, 아직까지는 마른진흙버섯을 재배하기 위한 기술이 일반적으로 이루어지고 있지 않은 실정이며, 원목배양시의 관리가 까다로와 오염이 쉽다는 단점이 있다.

이에 본 발명자들은 우수한 약리효과를 가진 마른진흙버섯을 인공 배양하여 대량으로 생산하기 위해 실제 버섯으로 생장하게 하는 과정인 자실체 형성 과정에 사용되는 배양 배지를 개선시키기 위해 노력하던 중 기존에 사용하는 원목 대신에 톱밥 배양 배지를 사용해 인공재배한 결과 기존의 원목 재배에 비해 자실체의 형성이 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 톱밥을 주성분으로 포함하는 마른진흙버섯 군사체 및 자실체 배양용 배지를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공재배하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은 톱밥을 주성분으로 포함하는 마른진흙버섯 군사체 및 자실체 배양용 배지를 제공한다.

또한, 본 발명은

- 1) 상기 배지를 이용하여 마른진흙버섯의 종균을 배양해 군사체를 얻는 단계; 및
- 2) 상기 배지를 이용하여 상기 마른진흙버섯의 군사체로부터 마른진흙버섯 자실체를 배양하는 단계를 포함하는 마른진흙버섯을 배양하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 톱밥을 주성분으로 포함하는 마른진흙버섯 군사체 및 자실체 배양용 배지를 제공한다.

본 발명의 배지에 있어서, 톱밥의 재료로 사용되는 원목은 참나무, 뽕나무, 느릅나무 및 사과나무로 구성된 균으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있으며, 참나무(*Quercus sp.*)를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 수액의 이동이 정지된 11월경부터 이듬해 2월 사이에 벌채된 참나무 원목을 사용하였으며, 벌목한 참나무 원목을 음지에서 건조하여 수분함량이 35 내지 45%일 때 톱밥 제조기를 사용하여 톱밥을 제조하였다. 제조된 톱밥은 무균상태를 유지하기 위해 121℃에서 90분간 고압살균하였다.

본 발명의 배지는 주요성분으로 톱밥을 사용하며, 이에 추가로 영양원을 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 한다. 상기 영양원으로는 미강, 밀기울, 콘코브, 왕겨 및 땅콩껍질로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하며, 미강인 것이 더욱 바람직하다.

본 발명에서는 톱밥에 미강을 혼합하여 배양배지를 제조하였으며, 톱밥과 미강은 8:2 내지 10:0의 비율로 혼합하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 참나무 톱밥과 미강을 각각 10:0, 9.5:5, 9:1, 8.5:1.5, 8:2, 7.5:2.5, 7:3의 비율로 혼합하여 톱밥 배지를 제조하였으며, 이를 이용하여 마른진흙버섯을 배양한 결과, 10:0 내지 8:2의 비율로 혼합하여 제조한 배지에서의 평균 생장속도가 우수함을 확인하여 참나무 톱밥과 미강의 혼합비율은 10:0 내지 8:2의 비율로 혼합하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

또한, 본 발명은

- 1) 본 발명의 톱밥을 함유하는 배지로 마른진흙버섯의 종균을 배양하여 군사체를 얻는 단계;
- 2) 단계 1의 군사체를 본 발명의 톱밥을 함유하는 배지로 배양하여 자실체 원기를 형성시키는 단계; 및
- 3) 단계 2에서 형성된 자실체 원기를 본 발명의 톱밥을 함유하는 배지로 배양하여 자실체를 생육시키는 단계를 포함하는 마른진흙버섯의 인공재배 방법을 제공한다.

본 발명의 인공재배 방법에 있어서, 단계 1의 마른진흙버섯의 종균을 배양하는 것은 본 발명의 톱밥 배양 배지를 사용하여 온도 25 내지 30℃로 25 내지 30일간 배양하는 것이 바람직하다.

또한, 단계 2의 자실체 원기를 형성시키는 것은 본 발명의 톱밥 배양 배지를 사용하여 습도 90% 이상, 온도 22 내지 27℃로 약 15일간 배양하는 것이 바람직하다.

또한, 단계 3의 자실체를 생육시키는 것은 본 발명의 톱밥 배양 배지를 사용하여 습도 70 내지 85%, 온도 25 내지 32℃에서 배양하는 것이 바람직하다.

본 발명의 마른진흙버섯 인공재배 방법을 자세히 설명하면 하기와 같으며, 제조 과정은 도 5에 간략하게 도시하였다.

<제 1 공정> 종균의 준비

마른진흙버섯 원균을 무균상에서 PDA, MEA 배지 등에 이식한 다음 배양온도 25 내지 30℃의 항온기에서 10 내지 15일간 균사배양을 완료시킨다. 121℃에서 90분간 고압살균된 참나무톱밥 + 미강(8:2) 톱밥배지에 배양된 마른진흙버섯균을 이식한다. 균 이식이 완성된 톱밥종균은 온도 25 내지 30℃에서 25 내지 30일간 종균배양한다.

<제 2 공정> 배지재료준비(톱밥, 미강)

배지 주재료로 사용한 나무는 참나무(Quercus sp.)로 이를 톱밥과 원목으로 사용한다. 원목의 벌채는 수액의 이동이 정지된 11월경부터 이듬해 2월 사이에 벌채된 것을 사용하며 벌목후 음지에서 자연건조한다. 원목은 수분함량이 35 내지 45%일 때 지름 12 내지 15 cm, 길이 20 cm(약 900 g) 정도로 절단하여 사용하며, 톱밥재배용 톱밥은 톱밥제조기로 제조하여 3개월정도 야적한 후 사용하고 첨가제로서는 신선하게 건조된 미강을 사용한다.

<제 3 공정> 배지제조 및 살균

마른상황버섯 배지제조시 주재료인 참나무톱밥(수분조절전 중량 900g)에 영양원으로 미강을 부피비율(V/V)로 각 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%씩 첨가하여 균일하게 혼합한다. 배지의 수분함량을 65%로 조절한다. 내열성 폴리프로필렌 봉지에 약 2 kg씩 넣고 마개를 닫아 이를 121℃에서 90분간 고압살균한다. 종균 접종전에 고압살균된 배지를 15℃ 정도로 식힌다.

<제 4 공정> 종균접종 및 배양

무균실이나 무균상에서 제1공정에서 배양된 마른진흙버섯종균을 15℃로 유지되는 접종실에서 살균, 냉각이 완료된 톱밥 배지에 접종한다. 접종방법은 톱밥배지 2 kg당 종균을 100 g 정도 넣는다. 이때 내열성비닐봉지를 열고 닫는 작업은 노출 시간이 최대한 적게 가능한 빨리 실시하여 잡균에 의해 오염되지 않도록 한다. 접종이 끝난 톱밥배지는 온도 20 내지 25℃로 유지되는 배양실에서 25 내지 30일간 배양을 실시한다. 배양시 초기에는 온도를 20 내지 22℃ 정도로 7일 정도 유지한 다음 마른진흙버섯균이 톱밥배지에 활착된 다음부터는 25℃ 정도에서 배양을 실시한다.

<제 5 공정> 버섯자실체 발이유도

자실체 발생을 위한 토질은 배수 및 수분유지에 유리한 모래를 선택하며 재배사는 영지버섯재배사를 기준으로 설치한다. 버섯 종균의 배양이 완료되면 톱밥 배지중에서 오염된 배지를 선별하여 폐기한다. 즉, 배양실에서 균사배양이 완료된 배지를 상층부로부터 약 70% 제거한후 충분히 관수하여 버섯발생을 유도한다. 버섯자실체 형성 유도를 위해 습도 90%이상, 온도 22 내지 27℃정도에서 약 15일간 관리하는데 이 시기에 마른진흙버섯의 자실체원기가 형성되며, 자실체원기의 형성을 확인한 다음 습도 70 내지 85%, 온도 25 내지 32℃의 조건으로 버섯생육을 진행한다.

<제 6 공정> 자실체 생육 및 수확

마른진흙버섯 자실체 원기가 발생하고, 정상적으로 생육이 진행된다면 40 내지 60일 정도 되었을때 갓 직경이 3 내지 10 cm 정도로 성장하며, 생육중인 자실체의 가장자리는 노랑색을 나타내고 생장이 거의 완성된 자실체는 노랑색이 사라지고 자실체가 암갈색으로 되는데 이때 버섯을 수확하여 40 내지 50℃ 건조기에서 2 내지 3일간 버섯을 건조한다.

본 발명의 톱밥 배양 배지를 사용하여 배양된 마른진흙버섯은 기존의 원목을 사용하여 배양된 마른진흙버섯에 비해 균사의 성장 속도가 약 2배 정도 빠를 뿐만 아니라(표 3 참조), 자실체의 생산 효율도 2배 이상 향상되었다(표 4 참조). 또한, 배양된 버섯 자실체의 일반성분 및 원소성분도 그대로 유지되었다(표 2 및 표 5 참조).

아울러, 마른진흙버섯은 항암 활성을 가지고 있다고 밝혀져 있는데, 본 발명의 톱밥 배양 배지를 사용하여 배양된 마른진흙버섯 자실체로부터 물 또는 에탄올을 이용하여 추출한 추출물은 원목 배지를 사용하여 배양된 마른진흙버섯 자실체의 추출물에 비해 훨씬 높은 항암활성을 나타냄을 확인하였다(도 3, 도 4a 및 도 4b 참조).

따라서, 기존의 원목을 이용한 재배방법에 비해 톱밥 배양배지를 이용하여 인공재배하는 본 발명의 방법을 이용하면 수확량 증대 및 재배소요일수 단축 효과를 볼 수 있으며, 톱밥 배양배지를 이용한 재배는 원목을 이용한 재배와는 달리 작업 과정 상당부분을 기계화 가능하고, 1년에 동일장소에서 2 내지 3기작 재배가 가능하기 때문에 다양한 약리효과를 가지는 마른진흙버섯을 대량으로, 저렴한 비용으로 생산할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 마른진흙버섯 종균의 배양

<1-1> 마른진흙버섯균의 배양적 특성 조사

마른진흙버섯 원균(*Phellinus gilvus*)(생명공학연구원 유전자은행 KCTC 6653)을 5 mm 원형 × 5 mm 두께로 PDA(MERCK), MEA(MERCK), YEA(MERCK) 또는 Czapek(MERCK) 배지 20 ml에 이식한 다음 배양온도 10 내지 35℃의 항온기에서 10일간 균사 배양하였다. 각 배양배지에서 균사를 배양한 후 배양 배지 및 배양 온도에 따른 균사 성장량을 측정하였다.

그 결과, 마른진흙버섯 균사는 PDA, MEA 배지에서 생육이 양호하며, 배양온도는 25 내지 30℃에서 생육이 가장 빠르다는 것을 알 수 있었다(표 1).

표 1.
마른진흙버섯균의 배양적 특성

온도(℃)	균사생장량(mm/10일)			
	PDA	MEA	YEA	Czapek
10	5	5	5	5
15	12	16	12	11
20	29	40	31	11
25	41	52	40	13
30	81	55	50	14
35	38	31	45	11

<1-2> 마른진흙버섯의 종균 배양

종균 배양 배지로는 121℃에서 90분간 고압살균한 참나무(*Quercus sp.*)의 톱밥과 미강을 혼합하여 사용하였다. 대조군으로는 참나무 원목을 사용하였다. 참나무 원목의 벌채는 수액의 이동이 정지된 11월경부터 이듬해 2월 사이에 벌채된 것을 사용하였으며 벌목후 음지에서 자연건조하였다. 원목의 절단은 수분함량이 35 내지 45%일 때 지름 12 내지 15 cm, 길이 20 cm(약 900 g) 정도로 해서 사용하였으며, 톱밥재배용 톱밥은 톱밥제조기로 제조하여 3개월 정도 야적한후 사용하였고, 첨가한 미강은 신선하게 건조된 미강(칠곡농약사, 정미소)을 사용하였다. 먼저 종균 배양용 배지의 주성분인 참나무톱밥과 미강의 이화학적 성분을 분석하였다. 성분의 이화학적 분석은 농촌진흥청의 토양이화학분석법(한기학, 1988)에 따라 수행하였다. CaO, MgO, K₂O는 조제된 공시시료 10 g을 삼각 플라스크에 평량한 후 0.1 N HCl 용액 50 ml을 가하고, 상온에서 회전진탕기로 1시간 동안 진탕한 후에 여과지로 여과한 다음 그 여액을 원자흡수분광기(Atomic Absorption Spectrophotometer)(Perkin Elmer 2380)로 측정하였다. 전탄수화물은 티우린법(Tyurin)으로, 전질소는 젤달법(Kjeldahl)으로, P₂O₅는 비색법으로, pH는 건조시료 5 g을 증류수 25 ml에 30분간 침적시킨 후 pH 미터(Fisher model-50)로 분석하였(한기학, 1988, 토양이화학분석법, 농촌진흥청, 26~214).

그 결과, T-C는 참나무톱밥(32.2%)과 미강(38.9%)이 비슷하였고, T-N은 미강(2.2%)이 참나무톱밥(0.58%)보다 더 높았으며, C/N비는 참나무톱밥이 32.2%, 미강이 17.7%로 나타났고, P₂O₅, MgO, K₂O는 미강이 참나무톱밥보다 많이 함유하고 있었다(표 2).

표 2.
배지재료의 이화학적 성분 분석

배지재료	pH	함유량(%)						
		T-C	T-N	C/N	P ₂ O ₅	CaO	MgO	K ₂ O
참나무톱밥	4.6	32.2	0.58	55.5	0.01	0.90	0.07	0.34
미강	6.6	38.9	2.20	17.7	3.09	tr	1.83	2.86

상기에서 tr은 함유량이 극미하여 측정할 수 없음을 나타낸다.

배지 조성물의 함유량을 측정된 참나무톱밥과 미강을 혼합하여 종균 배양용 배지를 제조하였다. 참나무톱밥(수분조절 전 중량 900 g)과 영양원인 미강을 각각 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 및 70:30의 부피비(v/v %)로 균일하게 혼합하였다. 배지의 수분함량을 65%로 조절한다음 내열성 폴리프로필렌 봉지에 약 2 kg씩 넣고 마개를 닫아 이를 121℃에서 90분간 고압살균하였다. 종균 접종전에 고압살균된 배지가 15℃ 정도가 되도록 식혔다. 이렇게 제조된 각각의 톱밥 배지 2 kg에 PDA 또는 MEA 배지에서 25 내지 30℃로 10일간 균사 배양한 원균 100 g을 접종하였다. 접종시 내열성비닐 봉지를 열고 닫는 작업은 노출시간이 최대한 적도록 가능한 빨리 실시하여 잡균에 의해 오염되지 않도록 하였다. 접종이 끝난 톱밥배지는 온도 20 내지 25℃로 유지되는 배양실에서 25 내지 30일간 배양을 실시하였다. 배양시 초기에는 온도를 20 내지 22℃ 정도로 7일정도 유지하였으며, 마른진흙버섯균이 톱밥배지에 활착된 다음부터는 25℃ 정도에서 배양하였다. 또한, 대조군으로는 참나무 원목에 상기 원균을 이식하여 약 56일 동안 배양하였다. 배양후 각 배양배지에 따른 마른진흙버섯 균사의 밀도를 측정하여 균사 성장 속도를 확인하였다.

그 결과, 본 발명에서 제조한 톱밥배지에 따른 배양완성일수는 25 내지 30일로 대조군인 원목배지의 배양완성일수 56일보다 배양소요일수가 약 1/2로 단축되었다. 같은 배양일수 25일 내지 30일에서도 원목배지의 균사밀도보다 더 높게 나타났다. 균사의 성장 속도는 미강 5% 및 10% 함유 톱밥배지가 25일로 가장 빨랐다. 또한, 균사의 밀도는 미강을 20% 및 25% 함유하는 톱밥배지가 높은 것으로 나타나 미강의 첨가밀도가 높아질수록 균사밀도도 높아짐을 알 수 있었다. 그러나, 미강 30%를 함유하는 톱밥배지는 푸른곰팡이(*Trichoderma* sp.)에 모두 오염되었다. 이는 배지내 영양성분 과다로 오염 병원균의 서식이 용이한 것으로 판단되었다(표 3 및 도 1).

표 3. 마른진흙버섯의 배지재료별 균사성장 특성(25℃)

배양 배지		배양소요일수(일)	균사밀도*
참나무톱밥 (v/v,%)	미강(v/v,%)		
100	0	28	+++
95	5	25	+++
90	10	25	+++
85	15	28	+++
80	20	28	++++
75	25	30	++++
70	30	-	-
참나무원목		56	+++

* 균사밀도 : ++ = 저, +++ = 중, ++++ = 고

<실시예 2> 톱밥 배지를 이용한 마른진흙버섯 자실체의 배양

실시예 1에서 마른진흙버섯 종균의 배양을 완료한 뒤 톱밥배지중에서 오염된 배지를 선별하여 폐기하였다. 자실체 배양을 위한 토질은 배수 및 수분유지에 유리한 모래를 선택하였으며, 재배사는 영지버섯 재배사를 기준으로 설치하였다. 배양실에서 균사배양이 완료된 후 내열성 폴리프로필렌 봉지의 상층부로부터 약 70%의 배지를 제거한 후 충분히 관수하여 버섯 발생을 유도하였다. 버섯자실체 형성 유도를 위해 습도 90% 이상, 배양 온도 22 내지 27℃ 정도에서 약 15일간 배양하여 마른진흙버섯의 자실체가 원기를 형성하도록 하였다. 자실체의 원기 형성을 확인한 다음 습도 70 내지 85%, 온도 25 내지 32℃의 조건으로 버섯생육을 진행하였다. 마른진흙버섯 자실체 원기가 형성되고 정상적으로 생육이 진행된다면 40 내지 60일 정도 될때에 갓 직경이 3 내지 10 cm 정도로 성장하며, 생육중인 자실체의 가장자리는 노랑색을 나타내고 생장이 거의 완성된 자실체는 노랑색이 사라지고 자실체가 암갈색으로 되는데 이때 버섯을 수확하여 40 내지 50℃ 건조기에서 2 내지 3일간 버섯을 건조하였다. 버섯이 생산되고 난뒤 초발이 소요일수, 자실체 생체중(g), 자실체 건물중(g)을 측정하여 배양배지에 따른 버섯 자실체의 생산효율을 확인하였다.

그 결과, 내열성 폴리프로필렌 봉지를 제거하고 관수로 버섯발생을 유도한후 버섯원기가 형성되는 초발이 소요일수는 톱밥배지 처리별로 11 내지 13일로 나타나 대조군인 원목배지 배양에서의 초발이 소요일수 12일과 비슷하였다. 또한, 대조군인 원목 배지에서의 생체중은 231 g, 건물중은 38.7 g, 생산효율은 25.6%로 나타난 것에 비해 미강을 10% 첨가한 톱밥배지의 생체중은 577 g, 건물중은 97 g, 생산효율은 64.1%로 나타나 참나무 원목을 그대로 사용하는 것 보다는 톱밥배지를 사용하는 것이 생산효율이 높았으며, 톱밥 배지에 포함되는 미강은 0 내지 20% 부피비로 함유되는 것이 생산효율이 좋았다(표 4 및 도 2). 따라서, 도 2에서 보는 바와 같이 참나무 원목 배지를 이용하여 재배한 마른진흙버섯에 비해 톱밥 배양배지(톱밥 자체 또는 미강 첨가 배지)를 이용하여 재배한 마른진흙버섯의 자실체 생체중이 훨씬 커서 수확량이 우수함을 알 수 있다.

표 4. 톱밥 배양 배지별 자실체 생산효율

배양 배지		초발이 소요일수(일)	자실체 생체중(g)	자실체 건물중(g)	생산효율 ^a (%)	수량지수 (건물중)
참나무톱밥 (v/v,%)	미강 (v/v,%)					
100	0	11	570	92	63.3	232
95	5	11	421	66	46.8	167
90	10	12	577	97	64.1	222
85	15	12	550	81	61.1	201
80	20	12	382	83	42.4	210
75	25	13	166	39	18.4	99
70	30	-	-	-	-	-
참나무원목		12	231	38.7	25.6	100

상기에서 a = (자실체 생체중/배지재료 건물중) × 100

<실시예 3> 톱밥 배지 배양된 마른진흙버섯의 구성성분 조사

이에, 경북농업기술원에서 2 내지 5개월 동안 톱밥으로 재배된 마른진흙버섯(*P. gilvus*)과 3년에 걸쳐 재배된 고려상황버섯(*P. linteus*) 및 장수상황버섯(*P. baumi*)의 원소 함량의 구성비를 비교하여 그 결과를 표 5에 나타내었다. 품종별 진흙버섯에 대한 자실체의 원소함량은 탄소가 45.6% 내지 46.8%, 산소가 40.1% 내지 42.1%, 수소가 5.3% 내지 5.5%, 질소가 0.8% 내지 1.2%, 황은 분석되지 않아 등으로 버섯간의 차이점은 발견되지 않았고, 또한, 원목재배한 진흙버섯과도 성분 함량이 거의 동일하였다. 또한, 일반성분을 분석한 결과를 표 6에 나타내었다. 마른진흙버섯의 수분 함량은 10%로 가장 적은 수분의 함량을 나타내었으며 총식이섬유는 29% 내지 33%를 보여주어 품종 간에 차이점을 보여주지 않았다. 또한, 조회분, 단백질, 비타민 C 등 모든 함량 비교에서 뚜렷한 차이점을 보이지는 않았다. 따라서, 톱밥배지로 재배하여도 마른진흙버섯의 일반성분 및 원소성분은 그대로 유지됨을 알 수 있었다.

표 5.
고려상황, 장수상황, 마른진흙버섯 원소성분 비교

종	탄소(%)	수소(%)	질소(%)	산소(%)	황(%)
고려상황버섯	46.8	5.5	0.8	42.0	ND
장수상황버섯	45.3	5.3	1.0	40.1	ND
마른진흙버섯	45.6	5.5	1.2	40.3	ND

상기에서 ND는 검출되지 않은 것을 나타낸다.

표 6.
고려상황, 장수상황, 마른진흙버섯 일반성분 비교

성분	고려상황버섯	장수상황버섯	마른진흙버섯
지방	0.23%	0.27%	0.22%
전체 식이 섬유	33%	29%	31%
전체 당	0%	0%	0%
수분	135	15%	10%
회분	1.1%	1.1%	1%
단백질(% N × 6.25)	3.63%	4.32%	3.73%
비타민 C	1.5%	2.1%	1.5%

<실시예 4> 톱밥 배지 배양된 마른진흙버섯의 항암활성

톱밥 배지에서 배양된 마른진흙버섯 자실체로부터 추출물을 분리하여 항암활성을 측정하였다. 먼저 상황버섯 자실체를 잘게 부순후 30배 부피의 멸균증류수를 첨가하여 추출하였다. 추출후 10배로 감압농축을 실시한후 0.45 마이크론 필터로 여과하였다. 필터된 상황버섯 농축액의 총당을 측정하기 위해 안스론 방법(Anthrone method)을 실시하였다(Pons A, et al., *J Biochem Biophys Methods*, 1981, Mar, 4(3-4):227-31; Pollard MA, et al., *Caries Res*, 1996, 30(2):132-7). 항암활성을 측정하기 위해 마우스 유래 암세포인 육종고형암(sarcoma) 180 세포(한국세포주은행, KCLB 40066)와 p388 세포(한국세포주은행, KCLB 10046)를 이용하고 SRB 분석법과 MTT 분석법을 이용하였다. 우선 SRB 방법은 세포의 증식 정도만을 측정할 수 있으며, MTT 방법은 세포가 대사과정을 거친 후 그 증식 정도를 알 수 있는 방법으로 이것이 이 두 실험 방법의 차이점이다.

<4-1> SRB 분석

먼저 SRB(sulforhodamine B) 방법을 수행하였다. 암세포를 96웰 플레이트에 웰 당 3 만개 정도 접종을 한 후 24시간 동안 RPMI 배지(GIBCO)에서 배양을 하였다. 배양된 암세포에 마른진흙버섯, 고려상황버섯 및 장수상황버섯의 자실체로부터 증류수로 추출한 추출물을 각각 7.5, 15 및 30 µg/ml 농도로 처리하였다. 비교군으로 항암제의 일종인 독소루비신(Ildong Pharm., Korea)은 0.001, 0.01, 0.1, 1 또는 10 µM 농도로 처리하였다. 각 시료를 세포에 처리한 후 48시간 동안 암세포를 더 배양한 뒤 50% TCA(SIGMA)를 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 세포를 고정시켰다. 고정 후 증류수로 5회 정도 플레이트를 세척하고 공기건조 시켰다. 공기건조 후 0.4 % SRB 염색약(SIGMA)을 첨가하여 30분 동안 염색하였다. 염색이 종료된 후 1% 아세트산으로 5회 세척하고 공기건조하였다. 공기건조 후 트리스염(Tris base)을 첨가하여 염색약을 녹여내었다. 그 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 생존정도를 측정하였다.

그 결과, 비교군으로 항암제인 독소루비신은 처리 농도가 증가함에 따라 암세포의 세포생존률이 감소하는 경향을 나타내었으며, 톱밥배지에서 배양한 마른진흙버섯과 함께 상황버섯의 일종인 고려상황버섯과 장수상황버섯 추출물 모두도 처리 농도가 증가함에 따라 암세포의 세포생존률이 감소하였다(표 7). 따라서, 톱밥배지에서 배양한 마른진흙버섯은 항암활성을 나타냄을 알 수 있었다.

표 7.

시료	처리 농도	세포생존률(%)	
버섯 추출물		육종고형암 180	P388

마른진흙버섯 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.5	89	88
	15	87	83
	30	68	76
고려상황버섯 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.5	87	92
	15	81	82
	30	46	82
장수상황버섯 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.5	100	100
	15	100	100
	30	49	99
독소루비신 (μM)	0.001	100	97
	0.01	98	91
	0.1	73	68
	1	34	32
	10	12	29

<4-2> MTT 분석

다음으로 MTT 분석 방법을 수행하였다(Cross P, et al, Radiat Oncol Investig, 1994, 1:261-269). 암세포를 96웰 플레이트에 웰당 5천개 정도 접종한 후 톱밥 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯, 고려상황버섯, 장수상황버섯의 자실체로부터 물로 추출한 추출물을 각각 7.5, 15 및 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였다. 비교군으로 항암제의 일종인 독소루비신을 0.001, 0.01, 0.1, 1 또는 10 μM 농도로 처리하였다. 처리후 4일 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)를 각 웰에 접종하고 4시간 더 배양하였다. 배양이 종료된 후 플레이트를 5분 동안 450 ×g에서 원심분리하고 플레이트에 있는 배지를 주의 깊게 제거한 뒤 DMSO 150 μl 를 첨가하였다. DMSO를 첨가한 후 MTT 시약에 있는 포르마잔 크리스탈(formazan crystal)을 녹이기 위해 약 10분 동안 배양하였다. 그 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 생존정도를 측정하였다.

그 결과, 비교군으로 항암제인 독소루비신은 처리 농도가 증가함에 따라 암세포의 세포생존률이 감소하는 경향을 나타내었으며, 톱밥배지에서 배양한 마른진흙버섯과 함께 상황버섯의 일종인 고려상황버섯과 장수상황버섯 추출물 모두도 처리 농도가 증가함에 따라 암세포의 세포생존률이 감소하였다(표 8). 따라서, 톱밥배지에서 배양한 마른진흙버섯은 항암활성을 나타냄을 알 수 있었다.

표 8.

시료	처리농도	세포생존률(%)	
		육종고형암 180	P388
마른진흙버섯 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.5	84	92
	15	86	70
	30	55	35
고려상황버섯 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.5	74	86
	15	75	41
	30	47	21
장수상황버섯 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.5	100	100
	15	85	100
	30	51	68
독소루비신 (μM)	0.001	93	87
	0.01	90	83
	0.1	53	40
	1	16	12
	10	10	4

<4-3> 원목 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 증류수 추출물과의 항암 활성 비교

톱밥 배양배지에서 배양한 마른진흙버섯 자실체의 항암활성을 참나무 원목에서 배양한 마른진흙버섯 자실체의 항암활성과 비교하기 위해 마른진흙버섯 자실체로부터 증류수를 이용하여 추출물을 제조하여 항암 활성을 측정하였다. 톱밥 배양배지 또는 원목 배양배지에서 생산된 마른진흙버섯 자실체에 30배 분량의 증류수를 첨가하여 8시간동안 추출하여 마른진흙버섯 증류수 추출물을 제조하였다. 각 증류수 추출물을 18.75, 37.5, 75, 150 및 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 육종고형암 180 암세포에 처리하여 SRB 분석 방법으로 항암활성을 측정하였다.

그 결과, 톱밥 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체의 증류수 추출물은 같은 처리 농도에서 원목 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체의 증류수 추출물에 비해 낮은 세포 생존률을 나타내었으며, 처리 농도가 증가함에 따라 세포의 생존률이 비례적으로 감소하였다(표 9 및 도 3). 따라서, 톱밥 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체 증류수 추출물은 원목 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체 증류수 추출물에 비해 항암활성이 뛰어난 것을 알 수 있다.

표 9.

물 추출물	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	세포생존률(%)
톱밥재배 추출물	18.75	89.25
	37.5	75.25
	75	40
	150	14.5
	300	10.75
원목재배 추출물	18.75	96.5
	37.5	87.75
	75	78.5
	150	49.5
	300	31.25

<4-4> 마른진흙버섯 에탄올 추출물의 항암 활성

톱밥 배양배지에서 배양한 마른진흙버섯 자실체의 증류수 추출물 이외에 에탄올을 용매로 하여 추출한 추출물이 항암활성을 나타내는지, 참나무 원목에서 배양한 마른진흙버섯 자실체의 항암활성과 어떠한 차이가 나는지 비교하였다. 톱밥 배양배지 또는 원목 배양배지에서 생산된 마른진흙버섯 자실체에 20%, 40%, 60% 및 80% 농도의 에탄올을 첨가하여 4시간 동안 추출하였다. 에탄올 농도별 추출액을 각각 6.25 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 0.625 내지 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 육종고형암 180 암 세포에 처리하여 SRB 분석 방법으로 항암활성을 측정하였다.

그 결과, 각 농도의 에탄올 추출물에 대해 톱밥 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체의 에탄올 추출물은 같은 처리 농도에서 원목 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체의 에탄올 추출물에 비해 낮은 세포 생존률을 나타내었으며, 처리 농도 및 추출용매인 에탄올의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존률이 비례적으로 감소하였다(표 10, 도 4a 및 도 4b). 따라서, 톱밥 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체 에탄올 추출물은 증류수 추출물과 함께 항암활성을 갖고 있으며, 원목 배양배지에서 성장한 마른진흙버섯 자실체의 에탄올 추출물에 비해 항암활성이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

표 10.

에탄올 추출물	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	세포생존률(%)	에탄올 추출물	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	세포생존률(%)
톱밥재배 추출물 (20% 에탄올)	6.25	95.75	원목재배 추출물 (20% 에탄올)	6.25	93.5
	12.5	85.25		12.5	89
	25	58.5		25	88.5
	50	29.25		50	87
	100	16.5		100	49
톱밥재배 추출물 (40% 에탄올)	6.25	91.25	원목재배 추출물 (40% 에탄올)	6.25	93.75
	12.5	51.25		12.5	84.75
	25	25		25	76.5
	50	18.5		50	68.75
	100	11.25		100	40.25
톱밥재배 추출물 (60% 에탄올)	6.25	80.5	원목재배 추출물 (60% 에탄올)	6.25	99.75
	12.5	45.5		12.5	82.5
	25	22.5		25	77.75
	50	16.25		50	67.25
	100	22.5		100	32.25
톱밥재배 추출물 (80% 에탄올)	0.625	89.25	원목재배 추출물 (80% 에탄올)	0.625	94.5
	1.25	67.25		1.25	80
	2.5	26.25		2.5	73.5
	5	21.5		5	39
	10	19.75		10	23.5

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 톱밥을 주성분으로 함유하는 배지를 이용하여 마른진흙버섯을 배양하면 기존의 원목재배된 버섯 자실체에 비해 배양소요일수가 짧고, 수확량이 높아 다양한 약리효과를 가진 마른진흙버섯을 대량 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

톱밥을 주성분으로 포함하는 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*) 균사체 및 자실체 배양용 배지.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 톱밥은 참나무(*Quercus sp.*)를 이용하여 제조한 톱밥인 것을 특징으로 하는 마른진흙버섯 균사체 및 자실체 배양용 배지.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 마른진흙버섯 배양용 배지는 추가적으로 영양원을 포함하는 것을 특징으로 하는 마른진흙버섯 균사체 및 자실체 배양용 배지.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 영양원은 미강, 밀기울, 콘코브, 왕겨 및 땅콩껍질로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 마른진흙버섯 균사체 및 자실체 배양용 배지.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 영양원은 미강인 것을 특징으로 하는 마른진흙버섯 균사체 및 자실체 배양용 배지.

청구항 6.

제 4항에 있어서, 상기 톱밥과 미강은 8:2 내지 10:0의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는 마른진흙버섯 균사체 및 자실체 배양용 배지.

청구항 7.

- 1) 제 1항의 배양배지로 마른진흙버섯의 종균을 배양하여 균사체를 얻는 단계;
- 2) 단계 1의 균사체를 제 1항의 배양배지로 배양하여 자실체 원기를 형성시키는 단계; 및
- 3) 단계 2에서 형성된 자실체 원기를 제 1항의 배양배지로 배양하여 자실체를 생육시키는 단계를 포함하는 마른진흙버섯의 인공재배 방법.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 단계 1의 마른진흙버섯의 종균을 배양하는 것은 25 내지 30℃에서 25 내지 30일간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

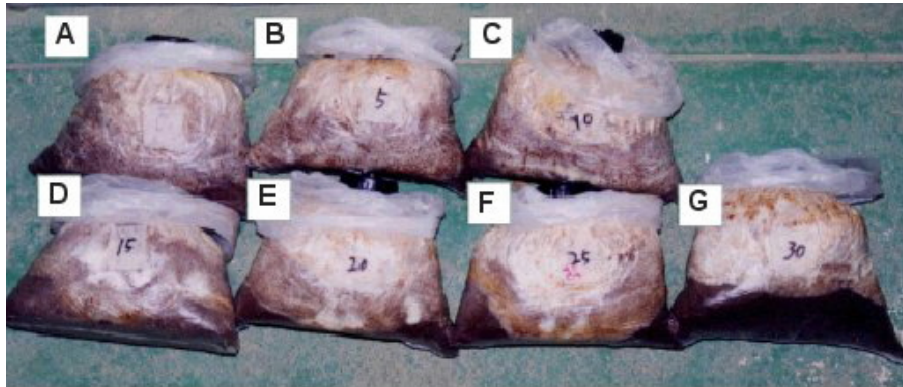
제 7항에 있어서, 단계 2의 자실체의 원기를 형성시키는 것은 습도 90% 이상, 온도 22 내지 27℃에서 약 15일간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

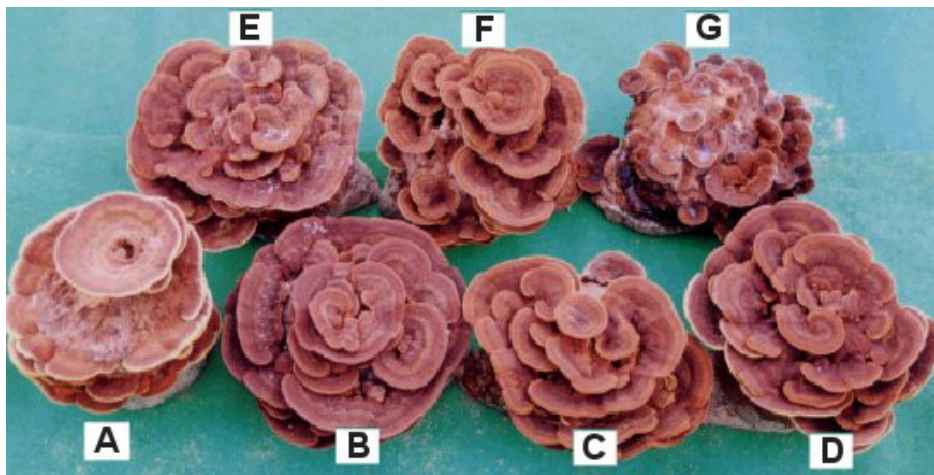
제 7항에 있어서, 단계 3의 자실체를 생육시키는 것은 습도 70 내지 85%, 온도 25 내지 32℃에서 자실체를 생육시키는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

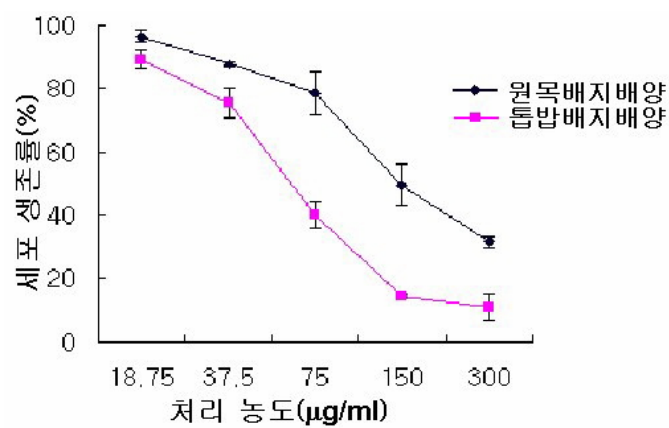
도면1



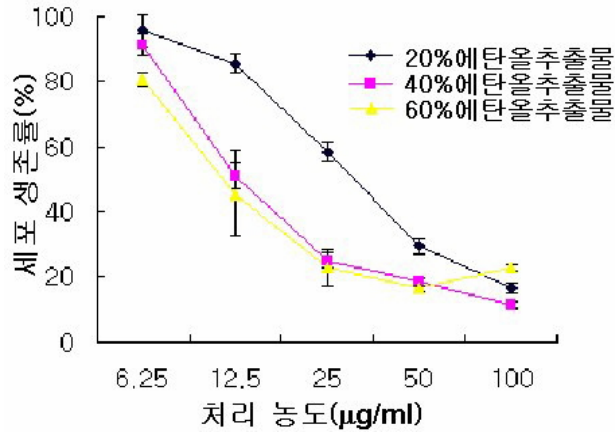
도면2



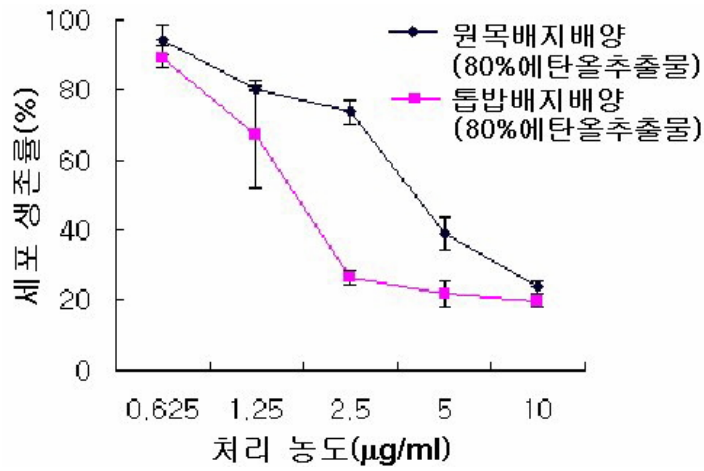
도면3



도면4a



도면4b



도면5

