

635.8

L293L

U.3

제 3 차 년 도
최 종 보 고 서

느타리버섯 액체종균을 이용한 느타리버섯 생산에 관한 연구

Production of liquid spawn and fruit-body for *Pleurotus* spp.
using the submerged culture.

강원대학교 농과대학



농림부

제 출 문

농 립 부 장관 귀하

본 보고서를 “느타리버섯 액체종균을 이용한 느타리버섯 생산에 관한 연구”과제의 3년차 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12.

주관연구기관명 : 강 원 대 학 교

총괄연구책임자 : 성 재 모

협동연구책임자 : 정 성 모

연 구 원 : 손형락, 문희우

박동수, 김상희

이재근, 강미선

김용욱, 정준호

협동연구기관명 : 강원도농촌진흥원

여 백

요 약 문

I. 제 목

느타리버섯 액체종균을 이용한 느타리버섯 생산에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

느타리버섯은 주름버섯目の 느타리科에 속하는 사물기생균인 백색목재부후균으로 우리나라를 비롯한 세계 각지에 광범위하게 분포할 뿐만 아니라 느타리버섯은 일부 식품류에 비하여 단백질, 탄수화물, 지방, 무기질, 섬유소 및 비타민 등이 풍부하여 영양적 가치가 높은 버섯이다. 또한 항암작용 및 성인병 예방 등과 같은 의학적 가치가 높은 다기능성 버섯이다.

느타리버섯의 재배면적과 생산량 및 소비량은 국내·외적으로 큰 폭의 증가추세를 보이고 있고, 현재 우리나라의 느타리버섯은 소비량의 증가와 함께 생산량도 증가하고 있는 추세이다.

국내 느타리버섯 재배방법의 대부분은 벚짚이나 폐면을 이용한 선반재배법으로 재배시기에 따른 노동력의 편중현상과 함께 재배기질의 수급이 어렵다. 벼농사의 부산물인 벚짚은 농업종사자의 고령화로 인하여 그 수급에 어려움이 발생하고 있으며, 폐면 또한 이용하고자 하는 재배농가도 증가하고 있고 그 수요는 대부분 수입량에 의존해야 하므로 적기 구입에 곤란을 겪고 있다. 재배기술에 있어서도 재배작업의 기계화율과 기계보급율이 낮은 실정으므로 재배를 시작하는 새로운 농가의 경우 타 작물과는 달리 재배법의 습득이 다소 어려운 실정이다.

느타리버섯의 안정적인 생산을 위해서는 우선적으로 우수한 형질의 종균이 확보되어야 하며, 다음으로 느타리버섯의 높은 생산량을 뒷받침할 수 있는 재배기질의 확보 및 안정적 재배를 위한 재배기술이 확보되어야 한다. 그러나 국내의 재배기술은 체계화·정량화 작업이 불충분하여 대부분의 경우 경험적으로 습득해야 하는 어려움이 있다. 느타리버섯의 종균생산은 거의가 톱밥에 미강을 첨가한 톱밥종균을 이용하고 있다. 따라서 톱밥종균은 양송이 재배에서 많이 이용하는 곡립종균과는 달리 종균이 고형화되어 있으므로 종균의 접종전에 반드시 균일한 입자크기로 분쇄하여야 하는 어려움이 있다.

이와 같이 국내의 느타리버섯 재배 사정은 장점보다는 많은 단점에 직면해 있다. 따라서 본 연구개발과제에서는 이러한 고충해결을 위하여 액체종균을 개발·보급시키는데 그 목적이 있다. 식용버섯균의 균사체 액체배양액을 버섯재배의 종균으로 이용하고자 하였던 선각자들의 노력은 금세기 초부터 시작되었으며, 현재는 일부 국가에서 식용버섯 재배에 접목하여 실용화하였다. 그러나 국내 사정은 이에 대한 체계적인 지식의 축적과 액체종균의 이용에 대한 세부적인 실험이 뒷받침되어 있지 못한 실정으로 액체종균의 장점에 대한 충분한 고찰이 부족한 실정이다.

초기 식용버섯균의 액체배양은 영양세대의 균사체를 배양하여 인류에게 필요한 단백질 자원을 확보하기 위해서 또는 식용버섯 중 특유의 향신료 생산을 목적으로 연구되었다. 그 후 천연의 서식지인 고체기질에서 뿐만 아니라 액체배지에서 배양된 균사체가 버섯을 생산할 수 있다는 사실이 밝혀지면서 식용버섯 재배에 이용하려는 연구가 활발히 진행되었다. 일부 문헌은 전통적인 고체배지에서 버섯을 생산하는 것에서 탈피하여 액체배양을 통하여 버섯을 생산하려는 시도 또한 엿볼 수 있었다. 따라서 본 연구개발과제에서는 국내에서 재배되고 있는 버섯 중에서 재배법과 재배기질이 다양하면서도 균사활력이 높은 느타리버섯을 액체종균의 실용화에 대한 연구대상으로 선발하였다.

액체종균을 버섯재배에 이용할 경우 과거의 문헌에서 볼 수 있듯이 톱밥종

균이나 곡립중균 보다 균사 활력이 강하기 때문에 균사배양일수가 단축되고, 균사활착 기간이 단축됨에 따라 초발이 소요일수도 고체중균을 사용할 때 보다 단축된다고 보고하고 있다. 또한 액체중균은 종래의 고체중균에 비하여 잠균에 대한 기질 선택성이 높아짐과 아울러 잠균의 발생율도 감소하게 된다. 이러한 효과가 종합적으로 작용하여 수확량의 증가를 가져오는 결과됨과 동시에 재배자에 대한 경제적인 기여도도 증가하게 된다.

위와 같은 중균의 안정성은 버섯재배에서 가장 중요한 요인으로 작용하며 이후의 재배기술 축적과 함께 버섯의 안전재배가 가능하게 될 것이다. 따라서 버섯재배 농가는 실패율의 감소를 기대할 수 있으며, 안정적인 버섯생산은 소비자의 구매욕구를 충족시키는데 충분할 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

국내에서 버섯재배에 이용되는 느타리버섯 균주로는 농촌진흥청에서 육종 보급한 농기 2-1, 농기 201호, 농기 202호, 사철느타리, 여롭느타리, 원형느타리 1호, 원형느타리 2호, 애느타리 1호 등 8품종이 품종 등록되어 있다.

본 연구개발과제에서는 종래의 톱밥종균과는 그 성상이 다른 액상의 액체종균을 생산하기 위한 연구개발과제로서 액체종균의 생산에 필요한 배양환경 및 산업용 액체배지의 선발과 농업적인 액체배양 장치의 개발과 접종방법, 그리고 생산된 액체종균을 버섯산업에 적용시키기 위하여 다양한 버섯배지 및 재배법에 적용한 버섯재배 실험을 수행하였다. 또한 국내의 재배현실에 알맞은 액체종균의 실용화에 대한 기초연구를 수행하였다.

1. 느타리버섯의 균사생육환경

공시된 느타리버섯 8 균주에 대한 평판배양용 배지의 선발시험을 통하여 맥아즙과 펩톤, 그리고 효모즙을 배지성분으로 하는 MYPA배지를 선발하여 계대배양 및 접종원 배양의 한천배지로 사용하였다. 접종원의 배양은 MYPA 평판배지에서 전배양된 균총의 선단부분을 직경 6mm의 코크보아로 취하여 평판배양(petridish culture) 및 삼각플라스크 배양의 접종원으로 사용하였다.

가. 느타리버섯 8품종에 대한 생육환경

액체종균의 배양을 위해서 느타리버섯 8품종에 대한 균사체의 생육환경으로 최적온도 및 최적 pH 범위를 조사하였다. 그리고 삼각플라스크의 배양조건을 구명하기 위하여 형태가 다른 두 종류의 250ml 삼각플라스크를 비교하였으며, 또한 삼각플라스크의 배양액량이 느타리버섯 8품종의 균사체 생산에 미치

는 영향도 함께 조사하였다.

나. 액체종균의 배양체계 확립

삼각플라스크의 배양방법으로 진탕플라스크에서 배양할 경우 균사체 생산이 가장 우수하였다. 그러나 진탕플라스크는 일반플라스크에 비하여 가격이 높다는 단점을 가지고 있다. 따라서 일반 삼각플라스크에서도 진탕플라스크에서와 같은 균사체 생산을 피하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다. 즉 일반삼각플라스크 배양을 대조구로 하여 삼각플라스크를 45° 경사지워서 배양하는 방법, 그리고 직경이 각각 5mm와 10mm인 길이 60mm의 유리막대를 두 처리구로 하여 배양실험을 수행하였다. 원형느타리2호(PL.7)를 가지고 25℃, 120rpm으로 7일간 진탕배양하여 건조균체량을 얻었다.

8리터 병배양에서의 배양환경을 조사하기 위하여 산업용배지용 구성성분으로 하여 병배양의 삼각플라스크배양 균사체의 접종량 및 병배양에서 균사체 생산에 미치는 통기량의 영향을 조사하였다. 접종량을 조사하기 위하여 접종량은 1~5%(삼각플라스크의 배양액 부피/병배양 배지의 부피)로 각각 달리하였으며, 통기량을 조사하기 위하여 통기량을 0.5~1.5vvm(vol. of air/vol. of medium/min.)으로 달리하여 각각 실험을 수행하였다. 접종원은 직경 10mm의 유리막대를 넣은 250ml삼각플라스크에 배양액량 100ml에서 배양한 다음 각 처리구에 맞는 접종량을 클린벤치에서 측정하여 접종원으로 사용하였다. 통기량을 조사하기 위하여 각 병배양기에 공기의 분당 통기량을 측정할 수 있는 공기량 측정기를 장치하여 실험하였다

2. 산업용 액체배지의 선발

느타리버섯 8품종에 대한 영양환경 조사로 탄소원과 질소원 및 무기염류와

같은 배지성분에 대한 연구를 수행하였다. 여러 문헌에서 느타리속 균의 영양 요구성에 관한 실험을 통하여 느타리버섯의 영양세대인 균사체가 이용할 수 있는 영양원에 대한 다양한 조사가 진행되었으나 그 배지성분의 대부분은 실험실 수준의 시약에 머물러 있기 때문에 산업적으로 실용화하기에는 영양원의 가격이 매우 높은 단점이 있다. 따라서 느타리버섯 8품종의 영양생리에도 적합 하면서 산업적으로 이용이 가능한 영양원 선발시험을 수행하였다.

3. 액체종균 배양장치 및 접종법

가. 액체종균 배양장치 선발

염가의 액체종균 배양장치를 개발하기 위하여 8리터, 10리터 및 20리터의 유리병 배양기를 사업초기에 대량배양용기로 선발하였다. 유리병은 균사생육의 육안적 관찰에는 상당한 이점이 있으나 취급에 상당한 어려움이 있었다. 그래서 균사체의 육안적 관찰에는 다소 문제점이 있으나 취급에 있어서 안정적인 18.9리터 용량의 시판 플라스틱 생수병을 새로운 대량배양용기로 선발하기 위한 실험을 수행하였다. 그리고 배양용기의 밀봉을 위하여 실리콘 마개를 배양용기에 고정하는 방법에 있어서 철사를 이용하여 고정을 사용하였으나 이 방법은 다소 불안정한 기능을 갖는 단점이 있어서 이를 보완하기 위하여 스텐레스 고리와 스텐레스 밴드를 이용한 마개 고정장치의 선발시험을 수행하였다.

또한 동일한 통기조건 하에서 보다 높은 통기효과를 얻기 위하여 공기분산구인 다공성 유리구를 설치하여 그 효과를 꾀하였다. 그러나 다공성의 공기분산구의 사용 횟수가 증가함에 따라 기포발생 면적이 감소할 뿐만 아니라 구멍이 막혀 보다 높은 공기압력을 필요로 하는 등의 문제점이 발생하므로 이에 대한 해결방안을 모색하였다. 사업초기의 액체배양 장치의 배관라인은 복잡하다고 하는 의견이 있어 이에 대한 보완을 목적으로 배관라인의 단순화를 꾀하

기 위한 실험을 수행하였다.

느타리버섯은 호기성 균으로서 균사체의 생육에는 필수적으로 산소의 공급이 반드시 요구된다. 균사체의 고체배양 뿐만 아니라 액체배양에서도 균사밀도에 알맞는 산소요구량을 만족시켜야 하는 동시에 통기되는 공기의 무균적 공급이 선행되어야 한다. 공기제공은 공기를 발생시키는 컴프레서에서 배양장치에 공급되기까지 무균적이고 청정한 조작을 성취하기 위하여 컴프레서, 압축공기의 공급라인 선발시험 및 공기제공 장치인 필터의 선발시험을 수행하였다. 또한 통기배양으로 배양액에서 발생하는 기포의 억제를 위한 소포제의 선발시험을 수행하였다.

나. 접종방법 및 접종기구 선발

각 재배법에 적합한 액체종균의 접종방법 조사를 위하여 선반식재배와 액체종균을 접종원으로 하는 톱밥종균의 생산이나 병재배방법에 적합한 접종방법을 조사하기 위하여 분출식 접종법과 분출식에 압축공기압을 이용한 분사식 접종법을 비교 분석하였다. 또한 선반식 재배에서는 접종과정에서 완전한 무균상태가 확보되지 않아도 되므로 고압에 견디는 스텐레스 탱크에 옮겨서 사용하는 분출방법과 연동펌프(Peristaltic Pump)를 이용한 접종방법을 비교하였다.

접종기구의 개발로 압축공기의 압력을 균사체 배양액, 즉 액체종균의 송출에 이용하는 분출식 접종방법은 배양용기의 압력조절로서 가능하다. 그러나 분사식 접종방법은 배양용기의 압력조절 기구뿐만 아니라 분사를 가능케 하는 압축공기의 조절장치 및 최적의 분사각을 얻기 위한 노즐을 사용하였다

4. 적정배지의 선발 및 부산물 이용

가. 액체종균을 이용한 병재배

애스타리버섯은 느타리버섯 품종중 내열성 용기(폴리프로필렌)내에서 재배가 가능한 것으로 냉난방 시설을 갖춘 현대화된 영구재배사에서 자동화 과정으로 생산할 수 있는 품종이다. 따라서 연중재배가 가능하고, 재배시기를 적절하게 조절할 수 있으며, 생산량을 예측할 수 있고, 병해충에 대한 피해를 최소화하여 안정적으로 생산할 수 있으며 소비자의 기호에 적합하게 소포장이 가능한 장점이 있다. 그러나 최근 버섯 재배면적의 급속한 증가로 주 배지 재료로 이용되는 톱밥은 구득이 점차 어려워지고 있어 새로운 배지재료의 개발이 요구되고 있다. 본 시험에서는 톱밥을 대체하여 이용할 수 있는 농가부산물(팽연왕겨, 옥수수이삭속 등)을 톱밥과 일정 비율로 혼합한 다음 애스타리 액체종균을 접종하여 생육일수 및 생산량 등을 비교하여 조사하였다.

나. 농업부산물과 가공부산물의 이용

배지재료의 물리화학적 비교를 위하여 시험에 사용되는 배지의 주재료인 포플러 톱밥, 옥수수이삭속(옥수수 공이의 분쇄물), 팽연왕겨(왕겨를 순간적으로 고온고압으로 처리하여 조제-철원군 갈말미곡종합처리장 제조)에 대한 물리화학적 비교를 위하여 기존의 배지보다 나은 배지재료를 공시하여 시험을 수행하였다.

배지재료 혼합율에 따른 생육 비교를 위한 시험으로 각각의 주재료에 첨가제를 부피 비율을 달리하여 10%에서 최고 50%까지 10% 간격으로 첨가제를 첨가하여 균사생장량 및 버섯발생수량 등 전 생육기간에 걸쳐 비교 조사하였다.

다. 액체종균과 톱밥종균의 비교

원목재배에서 액체종균 성능시험으로 느타리버섯 액체종균을 원목재배에 적용하여 톱밥종균과 그 성능을 비교하고자 버드나무, 느티나무, 포플러 원목에 각각의 굵기와 길이에 따라 종균을 접종하고, 음지에 원목 길이의 1/3 정도를 매몰하여 균사활착 정도 및 버섯생산량을 조사하였다. 또한 원목을 크기별로 비닐 봉지에 넣어 스펀지 마개를 하고 121℃에서 90분간 고압살균하여 냉각 후 각각 액체종균과 톱밥종균을 접종하여 20℃에서 균사가 만연할 때까지 생육시킨 다음 온도, 습도, 환기가 조절되는 재배사내의 선반상에서 버섯을 발생시켜 생산량을 비교하였다.

비닐봉지 발효배지의 조제를 위한 시험으로 배지재료로 볏짚, 옥수수짚, 콩짚 등을 3~4cm 길이로 절단한 다음 하룻밤 정도 충분히 침수시켜 싹겨를 부피 비율로 10%되게 혼합하고 이것을 각각 내열성 비닐(폭 45cm 길이 60cm)에 함수중량 2kg씩 충전하여 스펀지 마개를 한 다음 농용 건조기로 65℃에서 10시간, 55℃에서 48시간 동안 상압살균 및 발효를 실시하여 여름느타리 액체종균과 톱밥종균을 각각 접종하고 균사 성장량 및 버섯 발생량을 비교 조사하였다. 또한 배지재료의 공극율을 높이기 위하여 위의 배지재료에 각각 포플러톱밥을 부피 비율로 50%로 첨가하여 혼합한 다음 비닐팩에 충전하여 동일한 방법으로 시험을 수행하였다.

상자 발효배지의 조제를 위한 시험으로 폐면을 이용한 배지는 공극이 작아 입상 시에 작은 진압으로도 통기성이 불량하게 되므로 균사생장에 좋지 못하다. 따라서 폐면을 이용한 재배는 적절하게 공극을 유지시켜 줄 수 있는 상자 재배방법으로 배지를 만들어 충전하고 상압살균 및 발효과정을 수행하므로써 액체종균의 성능을 비교하고자 하였다. 본 실험에 사용된 상자는 병재배용 콘테이너(45×45×10cm)와 배지의 진압을 피하고 절충할 수 있는 크기의 상자 두 가지를 사용하였다. 각각의 배지재료를 위 비닐팩 재배와 동일한 과정으로 혼합하여 상자에 비닐을 깔고 잘 포장한 후 동일한 과정으로 상압살균 및 발효

과정을 수행하였으며, 20℃ 배양실에서 배양하여 균사생육 및 자실체 발생량 등을 조사하였다.

라. 액체종균을 이용한 균상 재배

느타리버섯 생산을 위한 재배에서 벧짚이나 폐면을 이용한 선반재배에 대한 액체종균의 적용실험을 수행하였다. 벧짚 또는 폐면배지를 이용하는 통상의 선반식 느타리버섯 재배시 톱밥종균의 접종량은 평당 10~15병으로 부피로 환산하면 평당 약 13리터의 액체종균을 접종하는 것과 같다. 그러면 60평의 재배사를 접종하기 위해서는 많은 양의 액체종균이 소모되므로 최적의 접종량을 규명하고 접종방법에 있어서도 병배지의 접종방법과는 다른 접종기구의 개발이 요구되어 공기압을 이용한 방법과 펌프를 이용하는 방법을 비교하여 조사하였다. 그리고 액체종균과 고체종균을 동일한 조건하에서 생육시키므로 각 종균의 배양조건을 확인하였다.

5. 재배법 개선에 관한 연구

가. 액체종균을 이용한 톱밥종균의 생산

본 연구개발사업으로 배양된 액체종균을 톱밥종균의 접종원으로 이용함으로써 그 적용 가능성 조사를 수행하였다. 현행의 톱밥종균 생산에 이용하는 접종원의 배양방법은 사면배지에서 균사배양된 원균을 톱밥병 배지에서 확대배양하는 방법으로 이에 대한 개선의 일환으로 액체종균의 응용을 검토하였다. 즉 액체접종원과 고체접종원을 비교 접종하여 액체종균의 생산(배양)일수 및 버섯배지에서의 활력에 미치는 영향을 조사하였다.

나. 재배사 관리의 모델화

현재 느타리버섯의 재배에 이용되고 있는 재배시설 및 각각의 환경조절 방법이 매우 다양하므로 각각의 재배시설에 있어서 그 특징을 쉽게 파악하기 어려운 것이 한국 버섯재배의 실정이다. 따라서 이러한 문제점들에 대한 해결을 위한 접근으로 특정 재배시설에 있어서 어느 하나의 환경요인에 대한 조절방법들을 농가견학을 통하여 수집함으로써 현실적으로 보다 유익한 느타리버섯 재배방법에 대한 모델화 검토사업을 수행하였다. 또한 액체종균을 이용할 경우 톱밥종균을 재식한 재배방법과의 비교·검토를 통하여 액체종균을 이용한 재배법의 모델화를 조사하였다

다. 액체종균을 이용한 우량톱밥종균 생산 연구

액체종균을 이용한 톱밥종균을 생산하기 위해 우량한 액체종균생산이 선행되어야 하고, 톱밥종균에 접종하는 접종방법 및 배양 중에 나타날 수 있는 잡균의 오염방지에 대해 조사하였다.

라. 액체종균을 이용한 배양환경규명

액체종균을 이용한 버섯생산에 미치는 환경적 요인 즉 온도조건, 습도조건, 광조건, 환기량을 알아보기 위해 폐면을 이용한 상자재배로 각 요인별 적정처리조건을 조절하므로 고체종균을 이용한 현 재배방법과의 차이점을 조사하였다.

6. 농가실증 실험

가. 액체종균을 이용한 버섯재배

(1) 느타리버섯의 톱밥포트재배

본 연구개발사업의 일환으로 금사작목반에 대한 액체종균의 생산기술 및 버섯재배기술에 대한 기술이전 사업을 수행하였다. 액체종균의 생산공정 및 이용에 있어서 매우 괄목할만한 성장을 꾀하여 현재에는 안정적으로 느타리버섯을 재배하고 있다. 본 작목반에서는 장기적인 액체종균의 이용성을 평가함과 아울러 액체종균의 현실화에 대한 평가시험을 계속 수행하였다.

(2) 느타리버섯의 볏짚다발재배

우리나라의 느타리버섯 생산량에 있어서 대부분을 점유하고 있는 느타리버섯의 선반재배에 대한 액체종균의 적용실험을 수행하기 위하여 느타리버섯 재배경력 10년 이상인 강원도 춘천 소재의 느타리버섯 볏짚다발재배 농가에서 시험사업을 실시하였다.

(3) 느타리버섯의 상자재배

근년에 들어와서 부각되고 있는 느타리버섯의 상자재배에 대한 액체종균의 적용성을 평가하기 위하여 폐면, 볏짚, 톱밥 등을 혼합한 발효배지를 이용한 느타리버섯의 상자재배 시험을 경기도 광주 소재의 농가에서 실시하였다.

나. 액체종균의 농업적 이용성 평가

본 연구개발 사업에 대한 종합평가로서 농업적인 이용에 필요한 염가의 액체배지 성분조성 및 액체종균의 배양장치를 개발함과 아울러 액체종균 생산의 모델화 및 느타리버섯 재배의 모델화를 궁극적 목표로 하여 연구개발사업을 수행하였다.

다. 액체종균의 유전성 조사

액체종균은 생리·생태적으로 다른 배양방법으로 생산되므로 이에 따른 변

이의 가능성을 전제하여 형질변이에 대한 유전적 안정성 조사를 수행하였다. 그 방법으로는 여러 가지의 방법이 생각될 수 있으나 본 연구개발사업에서는 재배를 통하여 버섯의 상품적 가치에 큰 비중을 부여하여 실시하였다

액체종균의 생산과 저장 및 운반에서 나타날 수 있는 불안정한 요소들을 사전에 대비함으로써 액체종균의 활력을 보다 장기간 유지가 가능하며 아울러 종균의 사용대기일수를 연장시키기 위하여 종균의 저장일수와 저장환경에 대한 연구를 수행하였다.

툽밥종균은 동일한 툽밥배지에서 3대 이상 배양할 경우 균의 퇴화 및 잠균 혼입율이 증가하기 때문에 툽밥종균에서는 3대 이상 툽밥배지 상에서 확대배양을 피하고 있다. 이와 같이 동일한 종균을 사용하여 확대배양 할 때 나타나는 문제점이 액체종균생산에도 적용되는지를 알아보기 위해 배양이 완료된 액체종균을 다시 접종원으로 사용하므로 계대가 확대됨에 따라 종균에 나타나는 문제점을 파악하기 위해 이 실험을 하였다. 즉 1대 배양은 5일 간격으로 배양하고 배양이 완료된 종균을 다시 동일한 배지와 배양환경에서 재접종 하여 10대까지 배양을 하고 폐면이 충전된 시험관에 접종하여 균사의 활력과 균체량을 측정하였다..

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 느타리버섯의 군사생육환경

가. 느타리버섯 8품종에 대한 생육환경

본 연구개발과제에서 시험품종으로 공시한 느타리버섯 8품종의 생육환경은 느타리버섯 균의 일반적인 특성과 일치하였다. 본 연구개발과제에서 공시한 8품종에 대한 군사생장 최적온도는 25~30℃로 조사되었으며, 군사생장에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 5.5~6.5 사이에서 가장 우수하였다. 그러나 느타리버섯의 군사배양온도가 자실체 수량에 미치는 영향을 조사한 실험에 의하면, 군사배양의 최적온도인 30℃에서 배양한 처리구에서 보다는 최적온도보다 저온인 25℃에서 배양한 처리구에서 원기형성과 자실체 형성이 우수하였다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구개발과제의 느타리버섯 8품종에 대한 모든 액체배양 실험은 배양온도 25℃에서 수행하였다. 그리고 액체종균 배양에 사용하는 모든 배지의 pH는 자연pH로 하여 배지를 조제하였다.

삼각플라스크 배양환경을 보면 먼저 군사질편(직경6mm)을 1개에서 5개까지 한 개 간격으로 접종 갯수를 달리하여 접종원의 접종량에 따른 군사체 증식을 조사한 결과 접종량이 증가할수록 초기 군사체의 증식은 빠르게 증가함을 관찰할 수 있었으나 군사질편의 접종량 증가는 건조균체량의 증가와 비례하지 않는다는 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 배양액량 및 플라스크의 변화에 따른 군사체 증식효과를 조사한 결과 진탕플라스크가 일반 삼각플라스크에 비해 군사체의 건조량의 증가를 확인할 수 있었고, 배양 액량이 100ml에서 최대 군사체의 건조량을 확인할 수 있었다.

나. 액체종균의 배양체계 확립

진탕플라스크가 아닌 일반 삼각플라스크에서 배양방법을 달리하여 건조균 사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 45° 경사배양과 직경 5mm의 유리막대를 넣고 배양한 처리구에서 균사생육이 우수하였다. 그리고 직경 10mm의 유리막대를 넣은 처리구는 대조구에 비하여 건조균체량은 적었으나 균사체의 생육형이 펄프형으로 균사체가 생육하였다.

8리터 병배양에 접종량을 달리하여 실험한 결과 접종원을 4% 접종한 처리구에서 균사체 생산이 가장 우수하였다. 또한 접종량이 증가할수록 육안으로 확인 가능한 병배양 장치내의 균사밀도는 급격히 증가하였으며, 그 결과 병배양 기간이 단축되는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 통기량을 달리하여 건조균 사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 통기량이 증가할수록 건조균사체 생산량이 증가하였다. 그러나 지나친 통기량에 의한 배지손실량을 가만한다면 0.5vvm(vol. of air/vol. of medium/min) 정도의 통기량으로 모든 실험을 수행하였다.

2 산업용 액체배지의 선발

느타리버섯 8품종에 대한 영양환경의 조사, 즉 액체배양용 배지의 선발을 위한 탄소원 선발 실험에서 느타리버섯 속 균의 모든 공시균주가 거의 대부분의 탄소원을 이용하였다. 탄소원은 미생물의 분해대사 및 합성대사 작용에 필요한 에너지와 생체내의 모든 물질의 골격을 구성하는 기본물질이기 때문에 영양분 중에서 가장 높은 농도로 요구되는 물질이다. 따라서 산업용 배지를 선발하기 위한 가장 중요한 선발기준이 되었던 것은 배지의 단가와 배지조제의 용이성이었다. 다음으로는 배지구입과 보관의 용이성 및 배지성분의 일관성이었다. 이러한 조건에 적합한 배지로서 황백당(탄소원)을 선발하였다. 그리고 질

소원 선발 실험 결과 대두분(질소원)을 주성분으로 하는 산업용 배지를 선발하였다. 그러나 무기염류의 첨가구와 비첨가구에서 균사생장에 대한 뚜렷한 차이를 발견할 수 없어서 산업용 배지에서 제외하여 실험을 수행하였다.

3. 액체종균의 배양 장치 및 접종법

가. 액체종균 배양장치 선발

액체배양용 배양장치의 용기로는 배양액량이 8리터, 10리터, 20리터인 원통형의 내열성 유리병을 선발하였다. 그러나 내열성 유리병은 가격이 고가이면서 취급상의 부주의로 인한 파손 및 배지액량을 완전히 충전된 상태에서는 배양병의 무게가 무거운 단점등이 발견되어서 가격이 싸며 취급이 용이하고 대량의 액체배지를 확보할 수 있는 시판용 생수병(18.9리터)을 사용한 결과 내열성 유리병에 비해 액체종균 생산면에서 뚜렷한 차이점을 발견하지 못하였으나 고온고압의 살균과정에서 급격한 기압변화를 일으켰을 때 유리병에 비해 파손의 확률이 높고, 접종과정에서 높은 공기압을 배양기내로 주었을 때에는 공기압에 의한 배양병의 파손의 단점을 가지고 있다. 그리고 살균과정을 통해 배양병 표면에 작은 금이 형성되어 사용횟수를 증가할수록 배양병의 내구성이 점점 약화되는 것을 관찰할 수 있었다.

그리고 배양라인은 통기배양을 위한 통기관과 배기관, 접종원의 접종관 및 배양액 채취관을 통합하여 각각 1라인씩 연결하였다. 실리콘 마개에 코크보아로 3개의 구멍을 만들어 위의 3라인을 연결하여 배양기를 밀봉하였다. 그리고 통기라인은 배양용기의 제일하부에 놓이게 하였으며, 배기라인은 마개의 말단에 놓이게 하였고, 배양액에 접종 및 배출라인은 바닥으로부터 일정간격을 띄움으로서 배양액의 배출이 쉽게하였다

그리고 배양액의 접종과 배출시 접종관과 접종라인의 신속한 연결을 위하

여 무균연결관(quick connector)를 연결하여 사용하였다. 또한 식용버섯균 한 균주만을 순수배양 하고자 할 경우 삼각플라스크나 시험관 배양에서는 면전을 통하여 유통되는 공기의 무균성 확보가 비교적 쉽게 달성된다. 그러나 통기배양에서는 대기중 부유성 오염원을 포함하고 있는 다량의 공기를 배양액 내부로 강제공급 하게 되기 때문에 통기배양에서는 공기제균 조작성이 배양액의 무균성 확보에 매우 중요한 영향을 미친다.

본 연구에서는 제균효율이 매우 높고 연결 및 취급이 간편한 시판용 공기필터(PVA filter, 0.2 μ m)와 실험실에서 제작한 섬유층진필터(deep filter)를 사용하였다. 섬유층진필터는 외경 19mm, 내경 18mm, 길이 120mm의 스테인레스관에 직경 28mm의 플라스틱 섬유구를 5~7개 층진하였으며, 외경 8mm와 9.5mm의 스테인레스관을 각각 실리콘마개 5호 2개로 양쪽을 막아서 제작하였다.

그리고 호기성 미생물의 발효에서는 배양장치 내부로 산소를 공급하기 위한 통기조작으로 인하여 배지조성과 균주에 의존하여 거품이 발생하게 된다. 배양시 거품의 발생은 배양액의 손실을 초래하는 사이펀(siphon)현상이 일어날 수 있으며, 또한 거품 위로 떠오른 균사체는 영양분의 결핍 또는 자기분해로 사멸하기 때문에 배양기에서 거품의 발생억제는 반드시 필요하다. 그러므로 거품의 발생을 억제할 뿐만 아니라 식용버섯균의 생육촉진 및 에너지원으로 이용된다고 보고된 식물성 기름을 소포제로 사용하였다. 그 첨가량은 약 30 \pm 10 mm로 첨가하였다.

나. 접종방법 및 접종기구의 개발

접종과정 중 무균적으로 접종을 해야하는 병재배 및 톱밥종균의 생산에 사용되는 접종방법에는 분출식 접종법과 분출식에 압축공기압을 이용한 분사식 접종법을 비교 분석하였다. 즉 같은 접종량으로 접종면적을 넓히기 위해서는 분사식 접종방법이 더욱 유리하다. 그리고 이러한 분사식 접종방법에는 일정한 각도로 액체종균을 분사해 주는 노즐 및 압축공기압을 조절하여 사용하여 접

종과정에서 배지이외에 다른부위의 접촉을 방지하므로 잡균의 오염을 최소로 해주어야 한다.

그리고 선반식 재배방법에는 접종과정에서 병재배와 같이 외부로 종균의 노출을 방지해 주지 않아도 선택적으로 종균과 배지가 외부로 노출되므로 반드시 무균성 확보가 필요하지 않다. 그러므로 병재배식의 접종방법을 사용하여 접종하면 접종관이 수미터가 필요하고, 접종관이 길어서 고압으로 병에 압력을 주어야 하므로 배양병의 물리적 파손의 위험이 있다. 그러므로 고압에 견디는 스텐레스 탱크를 이용한 방법, 즉 배양이 완료된 액체종균을 별도의 스텐레스 탱크에 옮긴 후 탱크내로 고압을 가함으로써 고압에 의한 분출식 방법을 사용한 결과 버섯의 배양과정 중에 다른 잡균의 오염과 같은 불리한 결과를 발견하지 못했다.

그리고 연동펌프(Peristaltic Pump)을 이용할 경우 배출라인에 접종관을 직접 연결하여 사용할 수 있으나 고속의 펌프회전수에 의한 배양 펠렛의 절단된 상태로 버섯배지에 접종하게 되므로 액체종균의 절단현상이 일어난다.

4. 적정배지의 선발 및 부산물 이용

가. 액체종균을 이용한 병재배

툽밥배지에 팽연왕겨 혼합율에 따른 애스타리 수량을 보면 액체종균 접종 배지에서는 배양완성율이 팽연왕겨 혼합율에 따른 경향은 없었으며 93.4% 이상으로 양호하였고 버섯수량도 팽연왕겨 혼합율에 따른 경향은 없이 툽밥배지 100% 수량(57.0%)에 비하여 85.6-113.0%범위의 양호한 수량을 보였으며 특히 툽밥60%+팽연왕겨40% 혼합배지 수량이 64.4g/병으로 13%의 증수를 보여 가장 양호한 배지 조건으로 사료되었다. 툽밥종균을 접종한 배지에서는 배양완성율이 59.8-98.2%범위로 액체종균에 비하여 저조하였으며 수량에 있어서도

현저히 저조한 수량을 보였으나 톱밥 100% 배지 버섯수량(33.8g/병)에 비하여 팽연왕겨 혼합배지가 94.4-157.7%범위의 증수를 보여 팽연왕겨 혼합효과가 현저하였으며 특히 톱밥60%+팽연왕겨 40% 혼합배지가 157.7%, 톱밥50%+팽연왕겨50%혼합배지도 151.8%의 수량증수를 보여 톱밥중균을 사용할 때는 팽연왕겨 혼합배지가 유리한 것으로 확인되었다.

나. 농업부산물과 가공부산물의 이용

(1) 물리적 성질

배지재료의 물리적 성질을 살펴보면 저장 중 수분함량은 톱밥 0.11%, 옥수수이삭속 0.20%, 팽연왕겨 0.13%로 옥수수이삭속이 다소 많은 경향이었으며 배지조제 후는 톱밥 65~67%, 옥수수이삭속 62~65%, 팽연왕겨 58~62%로 팽연왕겨 수분 함량이 가장 적은 경향이였다. 이는 상대적으로 무거운 팽연왕겨가 수분을 잘 흡수하지 못하는 성질을 반영하는 것으로 사료된다. 입도 분포는 톱밥의 경우 1.0mm이하가 30%, 1.0~2.0mm 45%, 2.0mm이상이 25%이었으며 옥수수이삭속은 같은 입도 범위에서 각각 12, 18, 70%였고, 팽연왕겨는 32, 56, 12%로 배지의 공극은 톱밥이 가장 작고 팽연왕겨가 중간정도이며 옥수수이삭속이 가장 큰 것으로 나타났다.

(2) 배지재료의 화학적 성질

배지재료의 산도는 팽연왕겨가 6.5로 톱밥 5.2에 비하여 다소 높으나 옥수수이삭속은 5.3으로 비슷하였다. C/N율은 톱밥이 1120, 옥수수이삭속이 158, 팽연왕겨는 86이었다.

(3) 배지재료 혼합비율별 애스타리 버섯 생산량 비교

배지재료 혼합율에 따른 애스타리 버섯의 생육상황을 알아보기 위하여 중

균 접종 후 7일간의 균사 신장량과 배지조제 전후의 산도 변화 및 전기 전도도를 측정하였다. 균사신장량은 일정한 경향이 없이 50.6~63.0mm 정도였으며 배지조제 후에 배지의 산도는 5.8~6.2범위로 배지조제전과 대차가 없었으며 전기 전도도는 팽연왕겨를 혼합하는 비율이 높아지면 따라서 같이 높아지는 경향이였다.

배지 혼합을별 버섯의 생산량을 비교한 결과 대조구 톱밥배지의 수량 43.8g/병에 비하여 톱밥80%+팽연왕겨20%혼합배지 수량이 41.3g/병으로 94.3%에 달하였고 톱밥80%+탄화왕겨20%혼합배지가 41.7g/병으로 95.2%에 달해 이 두 처리가 수량이 양호한 경향이였다.

다. 액체종균과 톱밥종균의 비교

(1) 액체종균 원목재배 활용 가능성 검토

포플러, 버드나무, 참나무, 자작나무를 20-30cm길이로 절단하여 단목 단면 접충하고 지면에 쌓아 비닐로 피복하고 천막을 덮어 골목화한 다음 지면에서 골목이 3cm정도 남도록 매몰하여 음막을 설치하고 살펴보면 포플러와 버드나무 원목은 톱밥종균 접종에서는 균사활착과 버섯발생이 되었으나 액체종균원목에서 포플러와 버드나무는 균사활착이 확인되었으나 버섯발생은 보이지 않았으며 참나무와 자작나무에 균사활착이 전혀 되지 않는 원인은 재료 확보당시 참나무는 너무 건조되었고 자작나무는 건조되지 않은 생나무였으며 액체종균은 접종 후 균사가 활착되기 전 건조한 것이 원인으로 관찰되었다.

(2) 여름느타리 액체종균 발효배지 비닐포트 재배.

벼짚, 옥수수짚, 콩짚을 사료절단용 컷타기로 길이 3-4cm되게 잘라 24시간 침수 후 건져서 쌀겨를 중량비로 20% 혼합하여 폭45cm 길이60cm P.P비닐에 배지중량 2kg을 담아 병재배용 P.P병마개로 마개를 한 다음 농가용 다목적 건조기에 65℃로 10시간 55℃로 48시간 동안 발효시켜 여름느타리 액체종균을

접종 22℃ 배양실에서 배양하여 재배사균상에 입상 재배한 결과, 콩짚이 167.0 g/풋트 옥수수짚이 106.9 g/풋트로 콩짚과 옥수수짚에 수량이 더 많아 액체종균 활용 배지 재료로 이용가치가 확증되었다.

(3) 애스타리 액체종균 활용 면실박 상자 재배

면실박 발효배지에 애스타리 액체종균 활용성을 검토하기 위하여 병재배용 콘테이너(규격 45×45×10cm)에 침수한 면실박을 10cm 두께로 내열병 P.P비닐로 포장하고 농가용 다목적 건조기에 65℃로 10시간 55℃로 48시간 동안 발효시킨 다음 애스타리 액체종균을 표면 접종하여 피복한 다음 22℃ 항온배양실에서 배양하여 재배사에 입상 18℃로 관리한 결과 3주기까지의 수확량을 보면 2.900 g/상자 이 생산되어 면실박 발효배지의 애스타리 액체종균 활용가능성이 확인되었다.

라. 액체종균을 이용한 균상재배

액체종균을 이용한 균상재배에서 먼저 접종방법을 보면 병재배에 사용하는 접종방법을 이용할 경우 배양병에서 균상의 배지까지의 거리가 멀어 배양병내로 주입되는 공기압이 증가하게 되어 배양병이 고압의 공기압에 의해 물리적 충격에 의해 파손의 위험이 발생하였다. 그러므로 고압의 공기압을 견디는 스텐레스 탱크에 배양이 완료된 액체종균을 넣은 다음 스텐레스 탱크로 공기압을 주입시키므로 고압에 의한 배양병의 파손을 방지하였다. 이 과정은 배양이 완료된 액체배지를 외부에 노출시키는 결과를 초래되나 균상재배는 외부와의 환경에 노출된 상태로 배양이 되므로 고체종균과 동일한 상태로 접종하게 된다. 또한 펌프를 이용한 접종방법으로 이 방법은 직접 배양병에서 종균을 배출시키는 방법이나 펌프를 통하는 과정에서 액체균사체가 약 1/5정도로 균사체가 쪼개어 지므로 균사체에 물리적 충격을 가하게 되나 배양과정에서 큰 문제는 발생하지 않았다.

그리고 액체종균의 접종량을 조사한 결과 평당 약 5~9리터 정도의 접종량에서는 배양에 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 경제적인 측면에서 평당 6리터 정도로 접종하게 되었다.

또한 고체종균에 비해 액체종균이 배양일수에서 거의 비슷하였으며 배양과정에서 균상에 발생하는 병해 피해면적은 액체종균을 접종한 처리구에서는 고체종균을 접종한 처리구에 비해 발병면적이 적었으며 발이수에서는 고체종균의 발이수가 많이 형성된 반면 액체종균의 경우 발이수는 적었다. 그러나 형성된 발이의 대부분은 모두 건실한 자실체로 형성된 반면 고체종균의 경우 발이수에 비해 건실한 자실체수가 적었다. 그러므로 자실체 수량에서 액체종균에서 버섯자실체 수량이 조금 높았다.

5. 재배법개선에 관한 연구

가. 액체종균을 이용한 톱밥종균의 생산

액체 접종원을 사용하여 톱밥종균 생산을 수행한 결과 첫째 접종작업시 접종인력 및 접종시간이 단축되었다. 즉 2인 기준으로 작업을 하였을 때 약 1700병의 톱밥종균을 약 180~200분 정도의 시간이 소요되었다. 그리고 톱밥종균 접종기에 비하여 액체종균 접종기의 가격이 저렴하다. 둘째로 배양일수가 약 2~5일 정도 단축되었으며, 잡균 발생이 대폭 감소하였다. 접종과정은 모두 무균상내에서 작업이 이루어지므로 톱밥종균 배양시에 나타나는 오염원의 접촉을 최대한 낮출 수 있어 기존의 톱밥종균생산 때보다는 오염물이 매우 낮다. 셋째로 버섯배지에서 균사활력이 높아 재배농가로부터 상당히 호평을 받을 수 있었다. 이는 모 균주의 관리를 보다 철저히 해야한다는 것을 시사하고 있다. 따라서 종균배양소에 보다 널리 공급한다면 보다 좋은 종균을 공급하는 것이 가능하리라 사료된다. 액체종균은 톱밥종균에 비해 배지처리 즉 살균 및 후

발효가 잘된 배지에서는 균사생장이 왕성하여 초기에 발생된 잡균의 발생부위의 표면을 점령하기도 한다. 그러나 살균 및 후발효가 불완전한 배지에서는 액체종균이 배지에 적응하는 과정에서 잡균에 의해 배지 전체가 오염되므로 고체종균에 비해 배지상태에 매우 민감하다. 또한, 접종시 고체종균은 톱밥종균병을 부수고 톱밥을 파쇄하는 단계를 걸쳐 배지에 접종하므로 접종시간 및 노동력이 많이 소요되는 반면에 액체종균은 배지에 직접 종균을 접종하므로 접종시간 및 노동력이 적게 소요된다. 그리고 톱밥종균 생산시 액체종균 접종기의 세척 및 살균이 용이하며 접종기의 단가가 낮은 장점이 있다.

나. 재배사 관리의 모델화

현재 느타리버섯의 재배에 이용되고 있는 재배시설 및 각각의 환경조절 방법이 매우 다양하므로 각각의 재배시설에 있어서 그 특징을 쉽게 파악하기가 좀처럼 용이하지는 않았다. 재배사 관리를 위한 환경조절인자로서는 온도, 습도, 광, 공기조성 등이 있다. 그 중에서도 재배 일선에서 실질적으로 그 관리의 어려움으로 나타나는 것은 환기에 따른 공기조성과 온·습도의 변화를 어떻게 하면 효과적으로 제어하느냐 하는 것이다. 온도의 급격한 격차는 심할 경우 갈변병 또는 갈반병의 발생을 가져오게 한다. 따라서 관수시에 사용하는 물은 될 수 있으면 재배사 온도와 거의 비슷하게 사용함으로써 이 병의 발생을 억제할 수 있다고 한다. 또한 선반재배에 있어서 재배사내를 상대습도가 높게 관리하기보다는 버섯 발생 부위의 상대습도를 높일 수 있는 표면 관수가 보다 유리하였다. 표면 관수시 가장 중요한 것은 관수 후 버섯에 잔존하는 물을 최대한 건조시켜 세균성 갈반병을 방제하는 것이다.

선반재배에 액체종균을 이용하여 본 결과 톱밥종균을 재식한 선반재배에서의 재배사 관리와 유사하였다. 그러나 관수에 의해 상대습도를 유지하는 재배의 경우 톱밥종균을 접종한 균상에서 코팅이 두껍게 되어 물이 흘러내리는 것과는 달리 균피의 코팅 정도가 액체종균의 경우 뚜렷하지 않음으로 수분 관리

시 소량 흡수하는 것이 유리하다.

다. 액체종균을 이용한 우량톱밥종균 생산 연구

우량한 톱밥종균을 생산하기 위해서는 접종원으로 사용되는 액체종균이 잠균에 오염이 되지 않는 종균이어야 한다. 액체종균의 검색은 육안적, 후각적 판단에 의해 검색을 할 수 있으나 검색용배지에 배양이 완료된 균사체를 접종하므로 잠균의 오염 여부를 확인할 수 있다. 즉 액체배양에서 발생하는 세균 오염의 판별을 위하여 수분활성이 높고 자화가 용이한 질소원과 영양분이 풍부한 YMA배지를 세균 오염에 대한 검출배지로 사용하였으며, 사상균의 오염을 판별하기 위해서는 수분활성이 낮고 자화할 수 있는 영양분이 부족한 톱밥배지에서 배양하는 것이 한천평판 배지에서 배양하는 것 보다 단기간 배양에 의하여 오염판별을 용이하게 할 수 있었다. 그리고 접종방법에 있어 분사식방법을 이용하므로 종균병내의 배지표면에 종균이 전체적으로 접종할 수 있게 하므로 배양기간의 균일화와 배양기간의 단축효과도 확인할 수 있었고, 외부로 노출된 배지표면에 느타리균의 점령시기를 앞당기므로 배양기간 중에 발생할 수 있는 잠균의 오염을 최소화로 줄일 수 있었다.

그러므로 액체종균을 톱밥종균의 접종원으로 접종한 결과 톱밥종균을 접종하였을 경우에는 배양기간이 약 20~25일 정도 소요된 반면 액체종균을 접종하였을 경우에는 약 18~20일 정도로 배양기간을 단축할 수 있었다. 이는 원균을 직접 액체배양한 균사체의 활력이 고체종균보다 좋고 균일한 접종을 통해 배양기간의 단축된 것으로 사료된다. 그리고 접종과정에서도 액체종균은 접종하는 과정이 단순하면서 간편하여 무균상내에서 접종이 가능하므로 잠균오염률을 낮출 수 있었다.

라. 액체종균을 이용한 배양환경규명

액체종균에 알맞는 재배환경을 확인하기 위해 온도조건과 광주조건은 균자체

의 변화조건이므로 이 조건은 동일하게 주어진 상태에서 실험을 하였고, '종균의 배양조건이 고체상에서 자란것과 액체상에서 자란상태의 차이에 영향을 주는 습도조건과 환기량의 변화에 따라 버섯의 형태나 수확량에 대한 차이를 확인할 수 있었다. 즉 고체종균을 접종한 배지표면은 균사가 완전히 배양이 완료된 상태에는 균사막의 형성이 이루어지나 액체종균을 접종한 배지표면은 고체종균을 접종한 배지에 비해 균사막의 형성이 매우 얇다. 그러므로 외부로 노출된 상태의 발이작업시 건조에 대해 매우 민감하므로 고체종균을 이용한 배지에 비해 약간 높은 습도를 요구한다. 즉 액체종균을 접종한 배지의 표면은 매우 얇은 균막이 형성되므로 발이작업시나 자실체형성시 공급되는 수분의 부족으로 배지 표면이 쉽게 마르게 되며 이후 발이수 및 발이기간이 지연된다. 그러므로 배양이 완료된 배지의 비닐을 제거한 다음부터 수분관리에 주의해야 하고 자실체 형성과정은 톱밥종균을 이용한 환경과 거의 비슷하다.

6. 농가실증 실험

가. 액체종균을 이용한 버섯재배

(1) 느타리버섯의 톱밥포트재배

액체종균의 생산공정 및 이용에 있어서 매우 괄목할만한 성장을 꾀하여 현재에는 안정적으로 느타리버섯을 재배하고 있다. 이와 같이 액체종균을 자체 생산하게 되면서부터 고품질의 우량종균을 농가에서 직접 생산할 수 있음을 입증하는 결과를 얻었다. 따라서 앞으로 더 많은 농가 및 농민이 원하는 경우 액체종균의 배양기술 이전사업을 적극 추진함으로써 버섯재배농가도 종균을 자체 생산할 수 있다는 성취감의 제공과 더불어 국내의 버섯재배농가의 질적인 향상을 꾀할 수 있을 것으로 사료된다.

(2) 느타리버섯의 벗짚다발재배

우리나라의 느타리버섯 생산량에 있어서 대부분을 점유하고 있는 느타리버섯의 선반재배에 대한 액체종균의 적용실험을 수행하기 위하여 느타리버섯 재배경력 10년 이상인 강원도 춘천 소재의 느타리버섯 벗짚다발재배 농가에서 시험사업을 실시하였다. 그 결과 배양과정에서도 툽밥종균에 비해 배양기간 및 자실체형성에서도 불리한 단점을 확인하지 못했다. 그러나 각 농가마다 재배환경이 각기 달라서 종합적인 검토작업에 있어 어려움이 있었다.

(3) 느타리버섯의 상자재배

근년에 들어와서 부각되고 있는 느타리버섯의 상자재배에 대한 액체종균의 적용성을 평가하기 위하여 폐면, 벗짚, 툽밥 등을 혼합한 발효배지를 이용한 느타리버섯의 상자재배 시험을 경기도 광주 소재의 농가에서 실시하였다. 접종량 실험을 위하여 43×43×10cm 상자의 혼합배지(폐면+벗짚+툽밥)에 액체종균을 200ml, 300ml, 400ml, 500ml를 혼합접종 및 상부접종하였다. 그 결과 배양 완료일 수에는 다소의 차이를 보였으나, 접종 25일 만에 모두 배양이 완료되었다. 발생한 버섯의 품질도 양호하여 만족한 결과를 얻을 수 있었다. 재배하는 농민도 액체종균에 대하여 대단한 호감을 가지게 되었다.

나. 액체종균의 농업적 이용성 평가

본 연구개발 사업에 대한 종합평가로서 농업적인 이용에 필요한 염가의 액체배지 성분조성 및 액체종균의 배양장치를 개발함과 아울러 액체종균 생산의 모델화 및 느타리버섯 재배의 모델화를 궁극적 목표로 하여 연구개발사업을 수행하였다. 그 결과 염가의 액체배지로서 산업용배지를 선발함으로써 실험실 수준의 영양원보다 그 배지구입 가격을 대폭 낮춤으로서 액체종균의 농업적인 이용이 가능하리라고 본다. 또한 진탕플라스크 대신 일반삼각플라스크를 이용하여 진탕플라스크 배양의 효과를 피할 수 있었으며, 유리병과 플라스틱 배양

병을 선발함으로써 실험실 수준의 배양장비를 탈피하여 농업적으로 이용이 가능한 배양장치를 개발하였다. 비록 통기 및 교반에 있어서 그 효율이 낮은 병을 액체종균의 배양기로 선발하였으나, 고가의 배양장치가 아니라는 점에서 그 가치를 찾을 수 있다. 그리고 배양장치 및 라인을 단순화함으로써 누구나 단기간에 그 조작 및 배양방법을 쉽게 익힐 수 있다는 것이다.

다. 액체종균의 유전성 조사

액체종균은 생리·생태적으로 톱밥종균과는 다른 배양방법으로 생산되므로 이에 따른 변이의 가능성을 전제하여 형질변이에 대한 유전적 안정성 조사를 수행하였다. 그 방법으로는 여러 가지의 방법이 생각될 수 있으나 본 연구개발 사업에서는 재배를 통하여 버섯의 상품적 가치에 큰 비중을 부여하여 실시하였다.

액체종균의 저장일수 및 운반환경으로 액체종균의 저장에 대한 불안정한 요소로서 온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 5~30℃사이의 범위에서 5℃간격으로 배양이 완료된 액체종균을 저장하면서 5일 간격으로 액체종균을 채취하여 폐면을 충전한 시험관 및 850cc용량의 병에 각각 접종하였다. 그 결과 고온에서부터 저온으로 내려갈수록 저장일수에 따라 균의 활력이 떨어지는 것을 확인하였다. 즉 30℃에 저장한 종균의 경우 저장을 시작한 날로부터 약 15일이 경과하였어도 균사의 활력에는 초기의 상태에 비해 큰 차이가 없었으나 약 20일이 경과한 후 균사활력이 조금씩 떨어지면서 약 25일이 경과한 후에는 완전히 균사활력을 상실하였다. 그리고 25℃에 저장한 액체종균은 약 30일이 경과한 후에서 완전히 균사활력을 상실하였다. 그러므로 배양이 완료된 액체종균은 저장온도에 따라 사용 가능한 저장일수를 고려하여 사용이 가능하다. 그리고 지금까지의 버섯발생 결과를 종합한다면 액체종균을 사용함으로써 어떤 형질변형을 엿볼 수 없었다.

액체종균의 세대별 유전안정성 실험으로 동일한 배지에 계대가 계속됨에 따

라 균사의 유전성에 나타나는 문제점을 확인하기 위해 이 실험을 수행하였다. 즉 1세대의 배양은 5일간 배양하고, 배양이 완료된 종균에서 2%의 접종원을 채취하여 동일한 배지와 배양환경에서 다시 5일간 배양을 계속하므로 톱밥종균에서 나타나는 계대수의 증가에 의한 균의 퇴화등 유전적 안전성이 액체종균에도 적용되는지를 알아본 결과, 10대까지 계대하였으나 1대 배양한 액체종균의 군사활력과 균체량의 차이는 확인할 수 없었다. 그러므로 대량배양에 필요한 접종원을 삼각플라스크를 이용하여 생산할 경우 많은 접종원이 필요하여 작업량이 증가하나 이 실험을 통해 알 수 있듯이 대량배양에 필요한 접종원 배양에 삼각플라스크배양 대신 대량배양기를 이용하여 배양을 하면 많은 양의 접종원을 생산할 수 있다. 이 실험을 통해 동일한 배양체계에서 균사의 생장은 동일한 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 액체배양 군사체인 액체종균을 톱밥배지와 볏짚배지에 접종하여 버섯생산실험을 수행한 결과 버섯의 안정적인 생산을 꾀할 수 있었을 뿐만 아니라 버섯의 품질면에서도 각 품종의 형질변이를 전혀 발견할 수 없었다. 액체종균의 버섯생산 능력이 안정적이라는 사실은 액체의 배양환경 하에서도 변이의 발생이 없다는 것으로 판단하였다. 그래서 톱밥종균의 접종원으로 액체종균을 이용한 결과 종래의 톱밥종균(1세대 또는 2세대의 톱밥종균)을 접종원으로 하여 배양한 톱밥종균에서 보다 볏짚 또는 폐면 선반재배에서 군사활력이 증강되는 것을 관찰할 수 있었다.

라. 액체종균을 이용한 농가에서의 문제점 조사

느타리버섯재배에서 볏짚, 폐면 등의 발효배지를 가장 많이 사용하고 있다. 발효배지는 비선택성 영양원을 미생물의 작용으로 버섯 균만이 선택적으로 이용할 수 있도록 전환시키는 과정이다. 그러므로 배지 조제시 적절한 처리과정을 걸친 배지에 액체종균을 접종하였을때는 균사의 배양과 자실체 형성이 우수하나 불완전한 배지처리에서는 고체종균에 비해 배지 적응력이 떨어지므로 배양이 되기 전에 잡균에 의해 배지가 모두 오염되는 문제점이 나타나 배지처

리과정의 매우 중요함이 관찰되었다. 그리고 액체종균의 균사체는 액상의 배양 단계에서 고체배지로의 전환과정이 필요하므로 이때 고체종균에 비해 건조에 대하여 쉽게 활력이 떨어지는 단점이 관찰되므로 균사 배양시 습도유지에 특별한 관리가 필요하다.

마. 액체종균 보급시 나타날 수 있는 문제점에 대한 조사

액체종균의 제조과정 중에는 외부에 종균이 순간적으로 노출되므로 배양과정에서 잡균에 오염이 쉽게 된다. 그러므로 액체종균의 접종과 배양과정의 오염요인의 경로와 잡균의 유·무를 신속히 파악할 수 있는 기술이 반드시 필요하다. 이는 곧 균에 대해 어느 정도 지식을 갖추어야 하고 무엇보다도 액체종균 생산의 전과정이 무균적 조작성이 가능해야 한다. 액체종균은 식용균이 쉽게 이용할 수 있는 배지에서 선택적으로 배양하는 과정으로 이런 식용균보다 증식속도나 전파력이 강한 잡균과의 경쟁에서 매우 약하므로 액체배지의 살균과 종균의 접종과정 및 배양단계에서도 특별한 주의가 요구된다.

본 연구개발결과는 국내의 버섯산업에 활력소로 작용하기에 충분하다고 사료됨으로 본 연구개발결과의 활용은 국가기관의 주도하에 개인적인 차원의 기술보급 보다는 농민단체나 협회를 통하여 보급하는 것이 알맞을 것이다. 현실적으로 액체종균에 대한 충분한 활용성 실증시험이 부족하다고는 하지만 현실점에서 액체종균 이용상의 문제점을 전혀 발견할 수 없었다는 것이 증명되었다.

액체종균의 활용에 대하여 다음 사항들을 충분히 검토하여야 할 것이다.

첫째, 식용버섯으로 인공재배되고 있는 대부분의 담자균류는 동일한 생활환을 갖지 않으므로 타 버섯품종에 대한 무분별한 응용은 충분한 배양실험결과를 얻은 후에 접목하여야 할 것이다. 특히 식용버섯균류는 고상의 배양환경에서 보다 액상의 생육환경에서 분절포자나 후막포자와 같은 무성생식과 핵의

단핵화가 발생할 확률이 높다고 여러 문헌에서 보고하고 있다.

둘째, 액체종균은 톱밥종균에 비하여 제균과정 즉, 무균화 확보가 어렵다. 액체종균이 톱밥종균보다 배양일수가 짧다는 장점을 갖는 반면 톱밥종균에서 보다 세균이나 곰팡이와 같은 잡균의 피해발생율이 높다는 것과 잡균 오염여부를 판단하기가 매우 어렵다는 단점을 가지고 있다. 따라서 액체종균의 배양을 위해서는 세심한 무균관리가 요구되며, 배양환경에 있어서도 톱밥종균의 배양환경 보다는 매우 깨끗한 배양환경을 요구한다. 또한 통기배양에 의한 공기제균 과정이 반드시 수반되므로 공기청정에 대한 새로운 인식이 필요하다.

셋째, 액체종균 배양과정은 한천배지 상에서 배양된 균사절편을 액체배양기에 이식하여 1회 또는 2회 이상의 삼각플라스크배양을 통하여 배양하고자 하는 액체배지에 적용시키는 종배양을 필요로 한다. 이렇게 배양된 종배양 균사체를 대량의 병배양용기에서 본배양하게 된다. 삼각플라스크배양을 1회 종배양한 균사체 보다는 2회 이상 삼각플라스크 배양한 균사체가 용존산소에 대한 활성이 높다고 보고하고 있다. 그리고 본배양에서 펠렛크기가 보다 작은 균사체를 얻기 위하여 삼각플라스크에서 종배양된 균사체를 접종전에 균질화하는 단계가 첨가될 수도 있다. 이와 같이 외부환경과의 접촉빈도가 증가함에 따라 오염빈도가 증가하게 되므로 무균작업이 엄격히 준수되어야 할 것이다.

넷째, 식용버섯균의 균사체 액체배양 기술을 종균배양소에 보급하여 액체배양한 균사체 배양액을 톱밥종균의 접종원으로 사용할 경우 모균의 순수한 증식을 꾀할 수 있어 고효력의 우량 톱밥종균 배양을 가능하게 한다.

다섯째, 액체종균 배양기술을 버섯재배 단지에 보급하여 종균의 자가생산에 의한 종균의 안정적 확보를 보장할 수 있다. 또한 액체종균을 기존의 종균배양소에서 배양하여 농가에 보급하게 될 경우 톱밥종균에서 보다는 건전한 종균을 보급받게 될 것이다.

SUMMARY

This project was committed to research on the cultivation of Korea oyster mushroom using liquid spawn. It was conducted to select the best cultivation of Korea oyster mushroom and to develop economic cultivation equipment as well. For this purpose, various substrates and techniques for the cultivation of oyster mushroom were tested. Also, we tested the most economic cultivation technique developed in oyster mushroom farm to know its practical application in the agriculture. Followings are the results of our research.

1. The temperature and pH range for the best growth of 8 strains(ASTI 2001, ASTI 2018, ASTI 2072, ASTI 2016, ASTI 2070, ASTI 2180, ASTI 2183, ASTI 2042) of oyster mushroom were about 25~30℃ and pH 5.5~6.5, respectively.
2. The yellow sugar and soybean powder were selected as carbon and nitrogen sources, respectively, which were considered to be available for industrial purpose, Also, 4% molasses and 0.5% corn-steep liquor as by-product were added to the cultural media.
3. Thermostable glass bottles with sizes of 8, 10 and 20 liters and polypropil bottles with sizes of 18.9 liter were selected as equipment of liquid spawn and were jointed to three pipe lines, among which the first one was for the inculation and collection of media, the second one for

aeration the air, and the last one for exhaust the air, respectively. An air was supplied by a compressor, and PVA(poly vinyl alcohol) filter and deep filter were used to refine the air.

4. The result of cultivation of oyster mushroom using liquid spawn showed about 20ml was suitable for the inoculation on to media in bottles and the same volume was applied as a inoculation for the production of sawdust in pots used by oyster mushroom cultivation association. Compressed air was used as a injection method.

5. The oyster mushroom grew well on all of the media inoculated by liquid spawn, indicating that conventional media were suitable for the introduction of liquid spawn. Also, no hereditary change or mutation was not found, suggesting that all media tested had no effects on hereditary stability.

6. The storage temperature and time affected the growth of the spawn of oyster mushroom. The result show that storing mycelium greatly improved the 40days at the 5℃.

7. The liquid spawn has several advantages : liquid spawn is easily handled and large amounts can be produced rapidly and injected into the material culture. The superior quality of the liquid-sawdust spawn is due to the short production time, the uniform age of the cells and the low rate of contamination.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	37
Chapter 2. Material and Method	
1. Strains	46
2. Environments factors for mycelial growth of oyster mushroom	46
3. Selection of industrial medium for liquid culture of the oyster mushroom	50
4. Development of incubation devices an disinfection techniques for liquid spawn cultivation	51
5. Selection of substrate and Used of sludge matrial	53
6. Studies on the improvement of cultivation	56
7. Transfer of incubation technique for the liquid spawn	58
Chapter 3. Results	
1. Environments factors for mycelial growth of oyster mushroom	60
2. Selection of industrial medium for liquid culture of the oyster mushroom	77
3. Development of incubation devices an disinfection techniques for liquid spawn cultivation	80
4. Selection of substrate and Used of sludge matrial	90
5. Studies on the improvement of cultivation	102
6. Transfer of incubation technique for the liquid spawn	105
Chapter 4 Discussion	113
Chapter 5 Summary	125
Chapter 6 References	127

목 차

제 1 장 서 론	37
제 2 장 재료 및 방법	
1. 공시균주	46
2. 느타리버섯의 군사생육환경	46
3. 산업용 액체배지의 선발	50
4. 액체종균의 배양장치 및 무균성 확보	51
5. 적정배지의 선발 및 부산물 이용	53
6. 재배법 개선에 관한 연구	56
7. 농가실증실험	58
제 3 장 결과 및 고찰	
1. 느타리버섯의 군사생육환경	60
2. 산업용 액체배지의 선발	77
3. 액체종균의 배양장치 및 무균성 확보	80
4. 적정배지의 선발 및 부산물 이용	90
5. 재배법 개선에 관한 연구	102
6. 농가실증실험	105
제 4 장 종합결과	113
제 5 장 적 요	125
제 6 장 인용문헌	127

제 1 장 서 론

느타리버섯속(*Pleurotus spp.*)은 주름버섯목(Agaricales)의 느타리과(Pleurotaceae)⁽⁶⁰⁾에 속하는 사물기생균으로 우리나라를 비롯한 세계 각지에 널리 분포한다. 늦가을부터 이듬해 봄에 걸쳐 각종 활엽수의 고사목 또는 살아 있는 나무에 총생 또는 군생으로 발생하는 백색 목재부후균이다^(96,101,105). 갓 색깔은 남청색, 백색, 회색, 갈색, 노란색, 분홍색 등이며, 갓 형태는 조개형, 콩팥형, 깔때기형, 우산형 등 다양하다. 자연발생 시에는 대가 측심생 또는 편심생으로 1~5cm로 짧지만, 인공 재배에서는 상품적 가치가 높은 갓의 색깔이 진하고 중심생이면서 대의 길이가 갓의 2배 이상인 자실체가 생산된다^(30,99,102,110).

느타리버섯은 일부 버섯류에 비하여 단백질, 탄수화물, 지방, 무기물, 섬유소, 비타민 등이 풍부한 영양적 가치^(12,13,14,24,41,52,61,88)와 함께 항암작용, 성인병 예방 등의 의학적 가치^(12,14,66,92,93,94)가 높은 다기능성 버섯이다. 국내 생산량은 1990년 87,038kg이었던 것이 1992년에는 220,427kg으로 짧은 기간 동안 2배 이상으로 생산 및 소비가 급증하는 식용버섯이며⁽¹¹¹⁾, 또한 전세계적으로도 1987년에는 16900만 톤이었던 것이 1990년대에는 90900만 톤으로 생산량이 증가하는 버섯으로⁽⁸⁰⁾ 1986년에서 1991년 사이에 약 44.6% 증가하였다⁽¹²⁾. 국내에서는 옛날부터 미루나무 버섯 또는 버드나무 버섯 등으로 부러졌으며, 일본에서는 그 모양이 평평한 부채꼴을 하고 있어 핑이(Hiratake)라고 부르고, 구미에서는 그 맛과 모양이 굴과 같다하여 굴버섯(Oyster mushroom)이라고 부르고 있다^(96,101,105).

느타리버섯 균의 생육환경^(14,40,45,65,89,95)은 기질에 균사가 만연하는 영양생장과 버섯이 발생·발육하는 생식생장 기간으로 양분된다. 영양생장에 요구되는 최적온도는 23~30℃이나 중고온성 품종의 경우 생식생장에 요구되는 온도는 10~24℃로, 영양생장에 필요한 온도보다는 저온이다⁽⁷⁷⁾. 또한 재배 환경에서 습

도와 공기조성도 영양생장기와 생식생장기에 차이를 보이며, 특히 광조사는 영양생장기에 있는 균사체의 생육을 저해한다^(31,50). 그러나 영양생장에서 생식생장으로 전환시키는 원기형성을 유도하기 위해서는 광조사가 반드시 필수 요인이다^(19,90).

농가에 보급되어 재배되고 있는 느타리버섯 품종으로는 우산형의 질은 희색으로 버섯발생 적온이 10~16℃로 저온성 품종인 느타리 2-1호, 버섯발생 적온이 12~18℃인 중온성 품종인 농기 201호, 중고온성 품종으로 버섯발생 적온이 10~24℃인 농기 202호와 사철느타리, 고온성 품종으로 버섯발생 적온이 18~24℃로서 여름과 같이 고온 시기의 재배에 적합한 여름느타리, 그리고 원형질 융합에 의해 신품종으로 육종된 원형느타리1호와 원형느타리2호가 있다. 또한 톱밥을 이용한 병재배용인 애느타리버섯 1호가 있다^(104,106,107).

재배는 활엽수의 원목을 이용한 단목 또는 장목재배법이 이용되어 왔으나^(21,49), 원목의 수급이 어려워짐에 따라 벚짚, 밀짚, 옥수수, 바나나 등의 농업부산물^(2,3,4,15,16,18,24,25,31,39,40,46,47,53,65,71,74,75,76,82,103,106)을 이용한 재배법뿐만 아니라 커피박, 맥주박, 폐면, 톱밥, 제지박 등의 산업 부산물^(1,8,9,29,48,51,56,64,67,77,84,85,108)을 이용한 재배법이 연구 개발되어 재배에 활용되고 있다. 이와 같이 주재료로서 농업·산업 부산물인 폐자원의 활용과 부재료로서 미강, 밀기울 등 가공산업의 부산물^(2,3,71,89)을 이용함으로써 버섯 생산성이 높은 재배기질의 조제가 간편하게 되었다. 따라서 원목 재배에서보다 균사활력 기간이 단축되어 초발이 기간과 수확 주기가 단축되었으며, 결과적으로 느타리버섯의 연간 생산량 증가를 가져왔다.

이와 같이 버섯을 생산하기 위해서는 종균, 재배기질, 재배시설, 재배기술이 반드시 요구된다⁽⁹⁶⁾. 그 중에서도 유전적으로 안정적이고, 병해에 대한 저항성이 강하며, 버섯 생산성이 높은 종균의 생산은 가장 우선적으로 갖추어야 될 조건이다^(27,64). 이러한 필요조건을 구비한 새로운 종균으로 Humfeld⁽³⁶⁾에 의해 심부발효에 의하여 생산된 액체종균(liquid spawn)의 이용이 제시되었다. 액체

종균은 전통적으로 사용되었고 현재에도 이용하는 고체배지 상에서 증식한 균사체를 종균으로 이용하는 것이 아니라 액체배지에서 액체 배양된 균사체 배양액을 종균으로 이용하는 것이다.

식용버섯균의 액체배양(submerged culture, 심부배양, 액내배양, 통기배양)이란⁽⁹⁷⁾, 버섯균의 생활환 중에서 영양세대에 있는 균사체를 액체배지 중에서 증식시키는 방법이다. 자연계에서는 흙(토양)이나 수목과 같은 고체상의 기질에서 균사가 증식·만연하는 것에 반하여, 이 방법에서는 당류, 유기·무기의 질소화합물, 무기염류 및 미량 영양소(생육촉진인자) 등 버섯 생육에 필요한 물질(영양분)을 혼합한 수용액 중으로 공기를 불어넣어 균사를 증식시킨다. 배양기로 공기를 불어넣어 산소를 공급하는 때도 있지만, 플라스크를 회전시킴으로써 기·액간 접촉면적을 크게 하여 산소를 공급한다. 대량으로 배양할 경우에는 통기교반형 또는 기포탑형의 대형발효조를 이용한다.

식용버섯 균의 액체배양은 Lambert(1938)에 의하여 시작되었으며, Humfeld⁽³⁶⁾에 의하여 자실체를 생산하는 고등균류의 균사체가 리그노-셀룰로스를 함유하는 고체배지에서 뿐만 아니라 경제적 가치가 낮은 부산물을 배지로 하는 액체배지내 에서도 심부발효에 의한 증식이 가능하다는 것을 보고함과 동시에 액체배양 균사체의 산업적인 응용을 최초로 보고하였다. 그는 양송이(*Agaricus campestris*) 균을 맥아즙, 과일 또는 야채쥬스, 포도당 등에 무기염을 첨가한 액체배지에서 액체 배양하였을 때 균사체의 높은 수율과 함께 버섯 특유의 향을 생산한다는 사실과 액체배양에 의하여 생산된 균사체가 상업적으로 생산된 버섯과 단백질, 지방, 회분 등의 성분조성이 유사하다는 사실, 그리고 상업적인 버섯재배시 액체배지에서 배양된 균사체 현탁액을 종균으로 이용할 수 있다는 사실을 시사하였다.

Solomons등^(7,76,78)은 액체배지에서 식용버섯 균의 심부발효에 의한 액체배양 및 액체배양된 생성물의 이용에 관한 종합적인 검토를 행하였다. 이들에 의하여 검토되었던 버섯을 생산하는 고등균류의 액체배양을 이용할 수 있는 분양

로서는

첫째, 배양 균사체의 식량 자원화에 대한 연구^(5,6,10,28,36,44,59,72,83,87)로 식품가공 산업의 부산물, 농업부산물, 그리고 식물의 열수추출물과 같이 인간 또는 가축이 직접 이용할 수 없는 폐자원을 값싼 발효기질로 이용하여 단백질 함량이 높은 고단백균사체를 생산하여 세계적으로 당면한 기아문제의 해결방안으로 제시하였다⁽⁶⁰⁾. 뿐만 아니라 동일한 배지에서도 균사체 생산량이 높은 변이주의 선발⁽⁶⁾과 액체배양된 균사체와 자실체의 일반성분 및 단백질, 아미노산, 지방산, 비타민 등의 함량 및 조성에 대하여 연구^(11,28,50,72)되었다.

둘째로는 전통적인 버섯재배 방법에 의해서만 생산이 가능하다고 믿어 왔던 버섯, 종 특유의 향기성분이 액체배양에 의하여 생산된 균사체 에서도 생산된다는 것이 인식되면서부터, 버섯 특유의 향기성분을 생산하기 위하여 균사체의 생육형태나 배지조성에 따른 향기성분의 축적과 관련된 연구가 진행되었다^(5,7,28,36,44,62).

셋째는 항생물질 발효산업처럼 액체배지 중에서 식용버섯균을 포함하는 고등균류를 배양함으로써 목재 분해효소의 생산^(5,87)과 생리촉진 물질인 생리활성 물질 및 질병의 치료 또는 예방의 효과를 가지는 물질의 생산을 목적으로 하는 기능성 소재의 검색 및 개발^(10,36,83,87)에 대하여 연구되었다.

넷째로는 버섯을 생산하는 고등균류가 고체상의 기질에서뿐만 아니라 액체상의 기질에서도 생육할 수 있다는 것과 액체배양된 균사체를 전통적인 버섯 재배에 이용하고 있는 고체상의 배지에 접종하였을 때 정상적으로 자실체를 형성한다는 사실을 발견하였다. 이를 계기로 버섯 산업에서는 액체종균의 이용에 대한 가능성을 알아보기 위하여 전통적으로 이용되었던 고체종균과 액체종균을 비교·검토하였고, 그 결과 버섯재배의 종균으로서 적합성이 인정되어 새로운 형태의 종균으로 이용할 것을 제안하였다^(14,28,33,36,37,54,59,73,78,79,83,86,87,88,91).

Humfeld⁽³⁶⁾ 등^(10,20,28,44,68,72,81)은 상업적으로 생산되고 있는 식용버섯균을 포함하는 담자균류와 자낭균류에 속하는 사물기생균 및 활물기생균에 대한 액체배

지에서의 생육 가능성을 시험하였으며, 거의 모든 균류가 액체배양이 가능하다는 것이 확인되었다. 그러나 송이버섯 균과 같이 균근을 형성하지 않으면 안되는 일부의 활물기생균에서는 심부배양이 거의 불가능함을 보고하였다⁽⁷⁸⁾.

느타리버섯 균은 호기성 균으로 자실체는 중력의 반대 방향으로 발육하는 배지성과 광을 향하여 생육하는 향광성으로 나타낸다⁽⁹⁾. 그리고 영양세대인 균사체의 증식에 대한 물리·화학적 생육환경으로서 생육온도 범위 및 최적 생육온도^(11,13,17,26,31,32,33)와 생육에 적합한 pH 범위 및 최적 pH^(9,11,17,29,31,32,33,50,95,98)를 조사하였다. Khan⁽⁵⁰⁾ 등^(15,31)은 느타리버섯 균의 액체배양에서 광조사가 균사체 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

식용버섯 균의 액체배양에 적합한 영양원으로는 종에 따른 차이가 있지만 자연계에서 타 균과의 경쟁에서는 영양원으로 이용할 수 없는 단당류, 이당류, 전분, 옥수수 가루 및 밀가루, 유기산 등과 같이 다양한 탄수화물을 탄소원으로 이용할 수 있음을 보고하였다^(9,10,11,26,31,32,34,44,56,68,91). 느타리버섯 균의 영양생장에 대하여 Hasimoto⁽²⁹⁾는 탄소원으로 단당류인 만노스, 글루코스, 프락토스, 이당류인 말토스, 슈크로스, 다당류인 전분 등이 적합함을 보고하였으며, Hadar⁽²⁹⁾는 포도당 뿐만 아니라 당밀도 우수한 탄소원으로 보고하였고, Zadrazil⁽⁹⁵⁾은 아황산 침지액을 유일한 유기원으로 사용할 수 있음을 보고하였다. Khan⁽⁵⁰⁾은 천연 기질인 사탕수수 주스, 사탕무 주스, 당근 주스, 당밀 등에서 탄소원 선별을 위하여 균체량을 조사하였다. 질소원으로서의 증식을 돕는 농도는 각기 다르지만 질소원으로서 펩톤, 단일 아미노산, 요소 및 질산태, 아질산태, 암모니아태 질소화합물 등 다양한 질소 화합물뿐만 아니라 간장, 콩가루, 옥수수 침지액, 효모추출물을 질소원으로 이용할 수 있다고 보고하였다^(9,11,26,31,32,34,44,50,62,68,91). 또한 많은 연구에서 무기염류의 영양요구성을 조사하였으며^(25,31,32,33), 합성배지에서는 무기염류의 첨가 효과가 높지만 천연 배지에서는 그 첨가 효과가 낮은 것이 보고되었다⁽¹¹²⁾. 느타리버섯 균의 영양생장에서 Hasimoto⁽²⁹⁾ 등^(26,33)은 유기산의 첨가 효과를, Block 등^(9,10,29,31,32,33,34,44)은 비타민

의 첨가 효과를 조사하였다. 느타리버섯 균의 액체배양에서 티아민은 첨가시 효과가 있으나 비오틴은 효과가 없음을 보고하였으며, Bukahalo⁽¹¹⁾는 느타리버섯의 영양생장에서 티아민과 식물의 열수추출물의 첨가가, Hong등^(35,57)은 식물성 기름의 첨가가 균사체의 생육촉진 효과가 있음을 보고하였다.

Block⁽⁹⁾은 감귤류 착즙액, 오렌지 주스, 맥아추출물, 영양배지, 옥수수침출액을 영양원으로 하는 부산물을 이용한 배지의 선발 및 Lee⁽⁵⁹⁾는 맥주효모를 이용한 균사체의 생산 가능성을 조사하였다. Jennison⁽⁴⁴⁾은 사상균의 영양생장은 탄수화물이 함유된 대부분의 식품가공 및 농업 부산물을 포함하는 매우 폭넓은 영양분에서 액체배양에 의해 쉽게 증식할 수 있음을 보고하였으며, Martin등⁽⁶³⁾은 양송이에서, Manu-Tawiah등⁽⁶²⁾은 느타리버섯에서 이탄 추출물을 이용한 균사체 생육실험을 하였다.

진탕 및 통기에 의한 버섯균류의 액체배양에서 대부분의 균사체 생육형태는 펠렛형과 펄프형으로 양분되며⁽⁷⁾, 대부분의 생육형태는 펠렛형으로 증식함이 보고되었다^(44,78). Block⁽⁷⁾에 의하면 액체배양 균사체의 생육형태가 펄프형인 것은 미세한 균사체와 2차포자⁽⁸¹⁾와 같은 생리적 돌연변이라고 하였다. Torev⁽⁸⁶⁾은 액체 배양에서 균사체의 생육단계를 5단계로 구분하여 설명하였고, Ivanovich⁽³⁸⁾와 Bukahklo⁽¹⁰⁾는 액체배양에서 후막포자와 분생포자, 분절포자의 생성 및 생성환경에 대하여 보고하였다.

Block⁽⁹⁾은 식용버섯균의 액체배양에서 생육형태가 펠렛형 또는 펄프형인가에 따른 생육효과를 보고하였다. 펠렛의 크기에 관여하는 인자로서, 1) 교반, 통기방법, 배지의 당농도 등^(7,9,23,54)에, 2) 접종량(접종되는 균사절편수)과 배지의 조성 및 물리적인 분산제 농도⁽¹⁰⁾에, 3) 배지점도^(89,91)에 의존함을 보고하였다. 또한 Song등⁽⁷⁹⁾은 접종원의 접종비, 삼각 플라스크에서는 회전수, 발효조에서는 공기 분산방법, 인산이온의 농도 등에 의존한다고 하였다.

Humfeld⁽³⁶⁾는 발효조에서의 배양과정, 발효조 크기에 따른 통기 및 교반방법에 대해서 보고하였다. Kirchhoff등⁽⁵⁴⁾은 10리터의 발효조에서 액량 5리터로

3-5일 동안 배양하였을 때 리터당 펠릿은 500-6000개, 건중량으로 리터당 350 mg이 생산되어 이것을 버섯재배 종균으로 이용하였다고 보고하였다. Shio⁽⁸⁸⁾는 팽이버섯균을 4리터 발효조에서 배양하였고, Song⁽⁷⁹⁾은 배양액량 1.2리터의 기포탑 발효조를 이용하여 액체종균을 생산하였다. Yang⁽⁹¹⁾은 10리터와 5-7천 리터의 발효조에서 단지 2-3일 배양하므로 액체종균의 생산이 가능하다고 보고하였다.

Torev⁽⁸⁶⁾은 액체배양된 균사체를 40℃에서 수분량이 40%가 될 때까지 건조한 후 갈아서 배지 및 환경에 접종하여 버섯재배의 종균으로 사용할 수 있음을 보고하였다. Saito⁽⁷³⁾는 젤리형의 액체종균 분사드릴이 장착된 자동접종기를 이용한 표고골목의 생산자동화를 연구하였다. Stamets 등^(80,91)은 액체배양 균사체를 고체(툽밥, 곡립)종균을 생산하는 접종원으로 이용하였으며, 그 결과 고체 접종원을 이용하였을 때보다 액체 접종원을 이용하였을 때 생산 기간이 약 3-10배는 단축되었다고 보고하였다. Itavavra⁽³⁷⁾는 표고버섯에서 증식율이 높은 액체종균의 대량생산을 위한 연구로 삼각 플라스크에서 정치 및 진탕배양과 발효조배양을 비교했고, 인제션니들의 막힘을 방지하기 위해서는 펄프형의 균사체를 생산하기 위해 균질화가 꼭 필요함을 주장하였으며, 툽밥배지에서 적응력이 높고 접종시 장애가 없었던 것은 발효조로 배양한 균사체였음을 보고하였다. Raaska⁽⁷⁰⁾는 정치배양한 균사체를 균질화 함으로서 증식에 미치는 효과와 종균의 생활력을 조사하기 위하여 균질화 시간에 따른 영향과 정치배양한 균사체를 균질화한 후 분쇄한 균사체를 4℃와 25℃에서 저장하면서 저장 시간에 따른 활력을 조사하였다.

Itavaara⁽³⁷⁾는 양질의 액체종균의 평가기준으로 툽밥배지에서의 빠른 적응성, 생육형태로는 펠릿형보다는 펄프형, 건중량이 높은 것보다는 툽밥배지에서 활착능력 등을 만족해야 한다고 주장하였으며, 액체배양된 균사체의 분쇄는 균사체에 손상을 주어 버섯의 생산량이 감소하였음을 보고하였다. Yang⁽⁹¹⁾은 균사체 현탁액을 접종원으로 고체종균 생산에 이용하기 위해서는 오염원이 없이

순수하고, 펠릿이 작으면서 배양이 완료되어도 배양액과 펠릿이 층으로 분리되지 않고, 균체의 양이 많고, 펠릿 크기가 균일해야 한다고 보고하였다.

Kirchhoff⁽⁵⁴⁾은 액체종균을 이용함으로써 고체종균을 사용했을 때보다 높은 수확량과 좋은 품질을 생산하였다고 보고하였으며, 곡립종균과 액체종균 비교를 위해 상부 접종식과 분사식 접종법을 비교하였고, 발효조에 의한 액체종균의 대량생산이 가능하나 장비가 고가이므로 종균생산비가 증가하므로 실질적인 이용이 가능한 배양장치의 개발을 시사하였다. Song등⁽⁷⁹⁾은 액체종균을 사용함으로써 초발이 소요일수의 단축, 수확주기 단축, 재배시설의 이용률 증가, 빠른 균사확장에 의한 잡균의 피해감소, 고체종균을 사용하는 것보다 총생산량이 증가 등의 효과가 있었음을 보고하였다. Yang⁽⁹¹⁾은 액체종균의 장점으로 생산기간이 짧고, 균사체의 세대수가 균일하고, 노화된 균사가 적고, 오염발생이 적음을 보고하였으며, 액체 접종원으로 생산된 종균을 양송이, 표고버섯, 팽이, 느타리버섯 재배에 사용했을 때 5~25%의 생산량 증가가 있었음을 보고했다.

이와 같이 심부발효에 의해 생산된 식용버섯균의 균사체 현탁액인 액체종균은 버섯균이 자랄 수 있는 기질에서라면 선반식재배, 병재배, 백재배 등의 재배방법에 구애됨이 없이 모두 적용이 가능하다고 하였다⁽¹⁴⁾. 버섯재배에 액체종균을 산업적으로 이용하고자 하였던 예를 찾아볼 수 있다^(22,42,43,58,69)

본 연구개발과제는 느타리버섯 8품종의 균사체 액체배양을 통한 액체종균의 생산과 액체종균을 이용한 느타리버섯 재배방법의 개발에 관한 실험으로서, 첫째 버섯 생산성이 높은 우량종균을 생산하기 위하여 i) 액체배양에 필요한 느타리버섯 균의 물리적 환경요인과 영양생리 조사 및 산업용배지의 선발, ii) 액체종균의 생산을 위한 배양방법의 선발, 그리고 iii)액체종균의 상업적 생산을 위한 배양장치의 개발에 있다. 둘째로 느타리버섯의 생산성 향상에 미치는 액체종균의 효과를 검토하기 위하여 i) 액체종균의 접종량과 접종 방법의 영향 조사 및 접종기구의 개발, ii) 액체종균의 이용이 가능한 기질과 기질의 처

리방법 선발, iii) 생산성 조사로서 생물전환율과 병해의 발생량을 조사한다.
마지막으로 향후 버섯재배에서 액체종균의 이용에 따른 고체종균의 대체효과
를 종합적으로 검토함과 아울러 전통적인 종균의 인식을 전환시킴으로서 상업
적인 액체종균의 생산을 통한 액체종균의 실용화에 있다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 공 시 균 주

본 연구개발에 사용한 균주는 농촌진흥청에서 품종을 육종·보급하여 농가에서 재배되도 있는 느타리버섯(*Pleurotus spp.*)으로 농기 2-1(PL.1), 농기 201호(PL.2), 농기 202호(PL.3), 사철느타리(PL.4), 여름느타리(PL.5), 원형느타리 1호(PL.6), 원형느타리 2호(PL.7), 애느타리(PL.8) 8균주를 강원도 농촌진흥원에 서 분양받아 공기균주로 사용하였다. 공시균주는 4℃의 균주보관용 냉장고에서 3개월 간격으로 표1의 조성을 갖는 MYPA 사면배지 상에서 계대배양하면서 보관하였으며, 또한 보관균주를 MYPA 평판배지의 중앙에 접종하여 25±1℃의 항온에서 배양하여 모든 실험의 접종원으로 사용하였다.

표 1. 느타리버섯 8품종의 균주보관용 배지조성(MYPA)

성 분	농 도 (g/L)
Malt extract	30.0
Yeast extract	2.0
Peptone	1.0
Agar	20.0
Distilled water	1.0 L

2. 느 타 리 버 섯 의 균 사 생 육 환 경

가. 배지의 조제 및 방법

(1) 평판 배양

온도 및 pH 실험에는 기본배지로 선발된 표2의 배지조성을 갖는 액체배지에 한천을 2%(w/v) 첨가하여, 121℃(15psi)에서 20분간 가압살균 후 미리 살균된 페트리디쉬(직경 8.5cm)에 15~20ml씩 분주하여 배지를 조제하였으며, 표1의 배지조성을 갖는 고체배지에서 페트리디쉬 배양된 균총의 선단을 내경 6mm의 cork borer로 취하여 페트리디쉬(직경 8.5cm)의 중앙에 접종하였으며, 온도 실험을 제외하고 25±1℃의 항온배양기에서 암배양하였다.

(2) 삼각플라스크 배양

배지조성이 각기 다른 액체배지를 조제하여 100ml씩 삼각플라스크(250ml)에 분주하여 실리콘 마개를 채운 후 121℃, 15psi(1.2kg/cm²)에서 20분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, 표1의 배지조성을 갖는 고체배지에서 페트리디쉬 배양된 균총의 선단을 내경 6mm의 cork borer로 취하여 삼각플라스크 배양의 접종원으로 사용하였다. 접종량 실험을 제외하고는 직경 6mm의 균사절편을 2개 접종하였으며, 회전형 진탕배양기에서 25±1℃, 120rpm으로 7일간 진탕배양하여 건조균체량을 조사하였다. 병배양에 대한 접종원의 삼각플라스크 배양은 직경 6mm의 균사절편을 2개 접종하여, 25±1℃, 120rpm으로 회전형 진탕배양기에서 5일간 배양하여 병배양의 접종원으로 사용하였다.

표 2. 느타리버섯 8품종에 대한 기본배지

성 분	농 도 (g/L)
Yellow sugar	30.0
Yeast extract	3.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
Distilled water	1.0 L

(3) Carboy 배양

액체종균의 영양원으로 선발된 표8의 배지조성을 갖는 배양액량 8리터의 병 배지를 조제하여 121℃, 15psi(1.2kg/cm²)에서 60분간 가압살균하여 배지를 조제 하였으며, 액체종균의 농업용 배지로 선발된 표8의 배지조성을 갖는 액체배지에서 삼각플라스크 배양된 배양액을 8리터 병배양의 접종원으로 사용하였으며, 25±1℃의 항온수조에서 통기량 0.5vvm으로 5일간 통기배양하여 건조균체량을 조사하였다. 병배양의 접종량 실험을 제외한 모든 병배양의 접종량은 1%로 하여 실험하였으며, 병배양에서 통기시 발생하는 거품의 제거를 위하여 식물성 기름을 첨가하여 거품발생을 방지하였다.

나. 균사체의 정량

(1) 균총의 신장직경

일정 기간 배양 후 접종된 균사절편의 중심의 직교하는 수직선과 수평선을 평판배지인 페트리디쉬의 밑면에 유성펜으로 그렸으며, 배양이 완료되었을 때 종축 및 횡축의 직경을 측정한 후 두 값을 평균하여 균총의 신장직경을 조사하였다. 또한 일정 기간 배양 후 column tube의 접종배지 상단으로부터 길이 성장한 균사의 말단부위에 수직으로 유성펜으로 그린 다음 그 길이를 측정하여 mm로 나타내었다.

(2) 균사체의 건조중량

삼각플라스크 또는 액체종균 배양용기에서 배양된 균사체 현탁액을 200메쉬의 체로 걸러 균사체와 배양액을 분리한 다음 균체에 잔류하는 배지성분을 제거하기 위하여 증류수로 충분히 세척한 후 재차 균사체만을 분리한 후 60℃의 항온기에서 24시간 건조하여 건조균체량을 조사하였다. 건조균체량은 g/L로 환산하여 나타내었다.

(3) Column tube를 이용한 균사생장 측정

균사생장 측정 실험에서는 폐면(건중량 20g)에 수분을 65%로 조화시켜 column tube(길이:300mm, 내경:30mm)에 충전한 후 실리콘 마개로 막은 후 121℃ (15psi)에서 60분간 살균한 후 액체종균 5ml씩 접종하여 균사생장 길이를 측정하였다.

다. 균사체의 배양환경 및 영양원 선별

(1) 온도 및 초기 pH의 영향

느타리버섯 8품종의 균사생육에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 표2의 배지조성을 갖는 평판배지 상에서 15-35℃의 온도범위에서 5℃ 간격으로 조절된 항온기에서 균총의 신장직경을 조사하였다. 또한 초기pH의 영향을 조사하기 위하여 0.1M의 Citric acid 용액과 0.2M의 Na₂HPO₄ 용액의 McIlvaine buffer solution을 가지고 pH미터로 pH 4.0~8.0까지 0.5 간격으로 pH 용액을 조제하였으며, 한천 및 배지성분의 농도가 표2의 배지농도의 2배인 배지를 각각 조제하였다. pH용액과 배지를 각각 다른 삼각플라스크에 분주하여 121℃,15psi에서 20분간 살균 후 1:1의 부피비로 혼합하여 평판배지를 조제하였으며, 25±1℃의 항온기에서 배양하여 균총의 신장직경을 측정하였다.

(2) 영양원의 선별

균사생육에 미치는 탄소원, 질소원 및 무기염류 등의 영양원을 조사하기 위하여 기본배지(표 2)에서 각 영양원의 종류를 달리하여 실험하였다. 탄소원은 3%(w/v), 질소원은 0.3%(w/v), 무기염류는 0.1%(w/v)씩 각각 첨가하여 25±1℃의 항온기에서 배양하여 균총의 신장직경을 측정하였다.

(3) 삼각플라스크에서의 배양환경

느타리버섯의 균사체 생산에 미치는 접종량의 영향을 조사하기 위하여 배양액량 50ml의 250ml 삼각플라스크에 균사절편(내경 6mm)의 접종량을 1~5개씩 1개 간격으로 달리하여 실험하였다. 그리고 250ml의 일반 삼각플라스크와 진탕 삼각플라스크에서 삼각플라스크의 형태 및 배양액량이 느타리버섯의 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 일반 삼각플라스크에서의 배양방법에 따른 균사체의 생육형 및 건조 균체량을 조사하기 위하여 길이 50mm에 직경이 5mm와 10mm인 유리막대를 넣은 2처리구와 삼각플라스크를 경사배양한 1처리구 및 일반 삼각플라스크에서의 배양실험을 수행하였다.

(4) Carboy 배양에서의 배양환경

병배양에서 액체종균의 최적 생산조건을 조사하기 위하여 8L의 유리병 배양장치에서 접종량과 통기량이 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 접종원은 배양액량 100ml의 250ml 삼각플라스크에서 직경 6mm의 균사절편을 2개 접종하여 25±1℃, 120rpm으로 5일 동안 배양하였으며, clean bench에서 접종부피를 1~5%로 조절하여 접종량 실험을 수행하였다. 통기량 실험은 접종량 1%에서 통기량을 0.25~1.5vvm으로 조정하여 건조균사체 생산에 미치는 통기량의 영향을 조사하였다.

3. 산업용 액체배지의 선발

버섯을 생산하는 고등균류 뿐만 아니라 모든 생물체는 물을 필요로 하며, 에너지원으로서 탄소원과 질소원이 반드시 필요하고, 무기물과 비타민 외에도 호기성 균에서는 산소가 필요하다. 배지의 구성성분은 균체라든지 대사산물을 만들기 위해서 필요한 모든 요소를 포함하고 있으며 동시에 생합성이라든지 생

명력의 유지를 위해서, 필요한 에너지를 공급하지 않으면 안 된다. 산업용 배지는 우선 값싼 원료를 사용하지 않으면 안 된다. 배양의 규모가 적은 경우에는 실험실용의 시약을 사용해서 비교적 간단하게 배지를 만들 수 있지만, 산업적인 규모의 배지조제는 그렇게 간단하지가 않다. 즉 액체종균을 생산하는 영양원으로 실험실 수준의 시약을 이용할 경우 액체종균의 생산비가 매우 상승하기 때문이다. 다음으로 단위 기질에 대한 수율이 높고, 품질의 일관성 및 일년 중 구입이 가능하며, 통기 및 교반 등에 문제가 없어야 한다. 그러므로 본 실험에서는 액체종균을 산업적으로 생산하는데 가장 적합한 배지를 선별하기 위하여 탄소원, 질소원 등의 영양원 선별실험을 수행하였다.

액체배지의 영양원으로 선별된 황백당과 대두분을 각각 탄소원과 질소원으로 하는 농업용 배지를 선별하기 위하여, 표 2의 기본배지에 황백당의 농도를 3%로 고정된 후 질소원인 대두분의 농도를 0.1~0.9%로 달리하여 균사체 생산에 미치는 대두분의 영향을 조사하였다. 또한 무기염류의 첨가가 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 무기염류를 0.1% 첨가하여 건조균체량을 조사하였다.

4. 액체종균의 배양장치 및 무균성 확보

가. 배양장치

순수배양을 위한 미생물 배양장치에서 가장 중요한 기능은 배양하고자 하는 미생물의 생육에 필요한 환경을 제공함으로써 원하는 목적생산물을 얻는 것이다. 이와 같이 미생물 생육에 적합한 생육환경을 제공하기 위해서는 배양하려는 균의 배양학적 특성에 알맞는 발효조를 설계, 제작해야 한다. 원하는 식용 버섯 균만을 순수배양하기 위하여 가장 우선적으로 구비되어야 할 것은

발효조의 무균성 확보이다. 그러기 위해서는 세정 및 세척이 용이한 내부 구조를 가져야 하며, 더욱이 가압증기 살균에 견딜 수 있는 재질이어야 한다. 다음에는 온도제어가 용이하고, 배양액의 혼합 특성이 좋고, 또한 느타리버섯 균은 호기성 균이므로 낮은 동력비로서 높은 산소공급속도를 만족시킬 수 있는 구조인 것이 바람직하다. 이외에도 발효조로부터 배지의 증발손실이 극히 적은 것이 바람직하다. 따라서 느타리버섯 균의 심부발효에 의한 액체종균의 생산이 가능한 발효조로서 가격이 저렴하여 액체종균의 산업적인 생산뿐만 아니라 액체종균의 배양학적 특성에 적합한 배양용기를 개발하기 위하여 배양용기의 소재, 배양용기의 형태, 배양기와 연결된 기본라인 디자인 등을 토대로 제작하였다.

나. 무균성 확보

생물반응기는 한 균주만의 발효에 사용되는 것이 아니라 여러종의 미생물 발효에 사용될 수 있는 것이기 때문에, 배양기의 무균성은 모든 발효에 견디어 낼 수 있도록 매우 엄격한 것이 아니면 안된다. 멸균이 가능하고, 발효조와 그 내용물인 배양액은 발효의 시작에서 종료까지 완전한 순수배양으로 보존되어야 한다. 이러한 생물반응기의 무균성 확보에 영향을 미치는 주요인으로는 배지의 멸균, 종균의 첨가, 발효거품의 제거 등이 있으며, 또한 통기발효에 의한 호기성균의 배양시에서는 공기의 제균이 무엇보다도 중요한 인자가 된다. 따라서 느타리버섯 균의 심부발효에 의한 액체종균의 생산에 알맞는 공기제균 방법과 통기발효와 동반하여 발생하는 거품의 제어를 위하여 소포제를 선발하였으며, 실험실용 가압살균술을 이용하여 배지의 조성 및 배지부피의 변화에 따른 배지멸균에 대한 실험을 수행하였다.

다. 접종방법 및 접종기구의 선발

(1) 접종 방법

각 재배법에 적합한 액체종균의 접종방법 조사를 위하여 병재배 및 액체종균을 접종원으로 한 톱밥종균의 생산에 적합한 접종방법을 조사하기 위하여 분출식 접종법과 분출식에 압축공기압을 이용한 분사식 접종법을 비교 분석하였다. 그리고 선반식 재배에서는 접종과정에서 접종라인이 5~7m정도로 매우 길어 액체종균의 분출을 위하여 배양기내로 주입되는 공기압이 매우 높게 되어 배양기에 물리적 충격으로 인한 배양기의 파손 등의 위험이 발생할 수 있고, 접종과정에서 액체종균의 무균상태가 확보되지 않아도 되므로 고압에 견디는 스텐레스 탱크에 옮겨서 사용하는 분출방법과 배양기에 공기압을 주입시키는 방법과는 달리 배양기내의 액체종균을 강제적으로 빨아내는 연동펌프(Peristaltic Pump)를 이용한 접종방법을 비교하였다.

(2) 접종기구의 선발

접종기구는 먼저 무균 확보가 가능해야 한다. 그리고 고압살균용 배지의 접종은 잡균의 오염률이 낮은 무균상 내에서 수행되므로 고정된 장치에 조절밸브와 분사각을 줄 수 있는 노즐을 설치하였다. 그리고 균상 재배에 사용되는 접종기구는 단순하면서도 이동이 자유로운 장치로 일정한 분사각으로 배지에 고른 접종이 가능한 노즐 및 접종라인이 길어지므로 배양기에 가해지는 공기압이 증가 하게되어 배양기에 물리적인 충격이 가하게 된다. 그러므로 고압에 견디는 스텐레스 탱크의 사용성에 대해 조사하였다.

5. 적정배지의 선발 및 부산물 이용

가. 액체종균을 이용한 병재배

애스타라버섯(PL.8)은 느타리버섯 품종 중 내열성 용기(폴리프로필렌)내에서 재배가 가능한 것으로 냉난방 시설을 갖춘 현대화된 영구 재배사에서 자동화 과정으로 생산할 수 있는 품종이다. 따라서 연중재배가 가능하고, 재배시기를 적절하게 조절하게 조절할 수 있으며, 생산량을 예측할 수 있고, 병해충에 대한 피해를 최소화하여 안정적으로 생산할 수 있으며 소비자의 기호에 적합하게 소포장이 가능한 장점이 있다.

본 시험에서는 톱밥을 대체하여 이용할 수 있는 농가부산물(팽연왕겨, 옥수수 이삭속 등)을 톱밥과 일정 비율로 혼합한 다음 애스타리 액체종균을 접종하여 생육일수 및 생산량을 비교하여 조사하였다.

나. 농업부산물과 가공부산물의 이용

배지재료의 물리화학적 비교를 위하여 시험에 사용되는 배지의 주재료로 포플라 톱밥, 옥수수이삭속(옥수수 공이의 분쇄물), 팽연왕겨(왕겨를 순간적으로 고온고압으로 처리하여 조제-철원군 갈말미곡종합처리장 제조), 코코아박(수입산), 면실박(중국산) 등과 첨가제로 콩비지, 영양제로 쌀겨 등에 대한 물리화학적 성을 비교하여 기존의 재배시보다 나은 배지재료를 공시하여 시험을 수행하였다.

배지재료 혼합율에 따른 생육 비교를 위한 시험으로 각각의 주재료에 첨가제를 부피 비율을 달리하여 10%에서 최고 50%까지 10% 간격으로 첨가제를 첨가하여 균사생장량 및 버섯발생 수량등 전 생육기간에 걸쳐 비교 조사하였다.

다. 액체종균과 톱밥종균의 비교

(1) 원목재배

원목재배에서 액체종균 성능시험으로 느타리버섯 액체종균을 원목재배에 적용하여 톱밥종균과 그 성능을 비교하고자 버드나무, 느티나무, 포플러 원목에 각각의 굵기와 길이에 따라 종균을 접종하고, 음지에 원목 길이의 1/3 정도를 매몰하여 균사활착 정도 및 버섯생산량을 조사하였다. 또한 원목을 크기별로 비닐 봉지에 넣어 스펀지 마개를 하고 121℃(15psi)에서 90분간 고압살균하여 냉각 후 각각 액체종균과 톱밥종균을 접종하여 20℃에서 균사가 만연할 때까지 생육시킨 다음 온도, 습도, 환기가 조절되는 재배사내의 선반상에서 버섯을 발생시켜 생산량을 비교하였다.

(2) 비닐봉지 발효배지 재배

비닐봉지 발효배지의 조제를 위한 실험으로 배지재료로 볏짚, 옥수수짚, 콩짚 등을 3~4cm길이로 절단한 다음 24시간 충분히 침수시켜 쌀겨를 부피 비율로 10%되게 혼합하고 이것을 각각 내열성 비닐(폭 45cm, 길이 60cm)에 함수중량 2kg씩 충전하여 스펀지 마개를 한 다음 농용 건조기로 65℃에서 10시간, 55℃에서 48시간 동안 상압살균 및 발효를 실시하여 여름느타리(PL 5)액체종균과 톱밥종균을 각각 접종하고 균사 성장량 및 버섯 발생량을 비교 조사하였다. 또한 배지재료의 공극율을 높이기 위하여 위의 배지재료에 각각 포플라톱밥을 부피비율로 50%로 첨가하여 혼합한 다음 비닐팩에 충전하여 동일한 방법으로 시험을 수행하였다.

(3) 상자 발효배지 재배

상자 발효배지의 조제를 위한 시험으로 폐면을 이용한 배지는 공극이 작아 입상시에 작은 진압으로도 통기성이 불량하게 되므로 균사생장에 좋지 않다. 따라서 폐면을 이용한 재배는 적절하게 공극을 유지시켜 줄 수 있는 상자재배 방법으로 배지를 만들어 충전하고 상압살균 및 발효과정을 수행하므로 액체종

균의 성능을 비교하고자 하였다. 본 실험에 사용된 상자는 병재배용 컨테이너 (45×45×10cm)와 배지의 진압을 피하고 적층할 수 있는 크기의 상자 두 가지를 사용하였다. 각각의 배지재료를 위 비닐팩 재배와 동일한 과정으로 혼합하여 상자에 비닐을 깔고 잘 포장한 후 동일한 과정으로 상압살균 및 발효과정을 수행하였으며, 20℃ 배양실에서 배양하여 균사생육 및 자실체 발생량 등을 조사하였다.

라. 액체종균을 이용한 균상재배

느타리버섯 생산을 위한 재배에서 벚짚이나 폐면을 이용한 선반재배에 대한 액체종균의 적용실험을 수행하였다. 벚짚 또는 폐면배지를 이용하는 통상의 선반식 느타리버섯 재배시 톱밥종균의 접종량은 평당 10~15병으로 부피로 환산하며 평당 약 13리터의 액체종균을 접종하는 것과 같다. 그러면 60평의 재배사를 접종하기 위해서는 많은 양의 액체종균이 소모되므로 최적의 접종량을 규명하였다.

6. 재배법 개선에 관한 연구

가. 액체종균을 이용한 톱밥종균의 생산

본 연구개발사업으로 배양된 액체종균을 톱밥종균의 접종원으로 이용함으로써 그 적용 가능성 조사를 수행하였다. 현행의 톱밥종균 생산에 이용하는 접종원의 배양방법은 사면배지에서 균사배양된 원균을 톱밥병배지에서 확대배양하는 방법으로 이에 대한 개선의 일환으로 액체종균의 응용을 검토하였다. 즉 액체접종원과 고체접종원을 비교 접종하여 액체종균의 생산(배양)일수 및 버섯배

지에서 활력에 미치는 영향을 조사하였다.

나. 재배사 관리의 모델화

현재 느타리버섯의 재배에 이용되고 있는 재배시설 및 각각의 환경조절 방법이 매우 다양하므로 각각의 재배시설에 있어서 그 특징을 쉽게 파악하기 어려운 것이 한국 버섯재배의 실정이다. 따라서 이러한 문제점들에 대한 해결을 위한 접근으로 특정 재배시설에 있어서 어느 하나의 환경요인에 대한 조절방법들을 농가견학을 통하여 수집함으로써 현실적으로 보다 유익한 느타리버섯 재배방법에 대한 모델화 검토사업을 수행하였다. 또한 액체종균을 이용할 경우 톱밥종균을 재식한 재배방법과의 비교·검토를 통하여 액체종균을 이용한 재배법의 모델화를 조사하였다.

다. 액체종균을 이용한 우량톱밥종균 생산 연구

액체종균을 이용한 톱밥종균을 생산하기 위해 우량한 액체종균생산이 선행되어야하고, 톱밥종균에 접종하는 접종방법 및 배양 중에 나타날 수 있는 잡균의 오염방지에 대해 조사하였다.

라. 액체종균을 이용한 배양환경규명

액체종균을 이용한 버섯생산에 미치는 환경적 요인 즉 온도조건, 습도조건, 광조건, 환기량을 알아보기 위해 폐면을 이용한 상자재배로 각 요인별 적정처리조건을 조절함으로써 고체종균을 이용한 현 재배방법과의 차이점을 조사하였다.

7. 농가실증실험

가. 액체종균을 이용한 버섯재배

(1) 느타리버섯의 톱밥포트재배

본 연구개발사업의 일환으로 금사작목반에 대한 액체종균의 생산기술 및 버섯재배기술에 대한 기술이전 사업을 수행하였다. 액체종균의 생산공정 및 이용에 있어서 매우 괄목할만한 성장을 꾀하여 현재에는 안정적으로 느타리버섯을 재배하고 있다. 본 작목반에서는 장기적인 액체종균의 이용성을 평가함과 아울러 액체종균의 현실화에 대한 평가시험을 계속 수행하였다.

(2) 느타리버섯의 벚짚다발재배

우리나라의 느타리버섯 생산량에 있어서 대부분을 점유하고 있는 느타리버섯의 선반재배에 대한 액체종균의 적용실험을 수행하기 위하여 느타리버섯 재배경력 10년 이상인 강원도 춘천 소재의 느타리버섯 벚짚다발재배 농가에서 시험사업을 실시하였다.

(3) 느타리버섯의 상자재배

근년에 들어와서 부각되고 있는 느타리버섯의 상자재배에 대한 액체종균의 적용성을 평가하기 위하여 폐면, 벚짚, 톱밥 등을 혼합한 발효배지를 이용한 느타리버섯의 상자재배 시험을 경기도 광주 소재의 농가에서 실시하였다.

나. 액체종균의 농업적 이용성 평가

본 연구개발 사업에 대한 종합평가로서 농업적인 이용에 필요한 염가의 액

채배지 성분조성 및 액체종균의 배양장치를 개발함과 아울러 액체종균 생산의 모델화 및 느타리버섯 재배의 모델화를 궁극적 목표로 하여 연구개발사업을 수행하였다.

다. 액체종균의 유전성 조사

액체종균은 생리·생태적으로 다른 배양방법으로 생산되므로 이에 따른 변이의 가능성을 전제하여 형질변이에 대한 유전적 안전성 조사를 수행하였다. 그 방법으로는 여러 가지의 방법이 생각될 수 있으나 본 연구개발사업에서는 재배를 통하여 버섯의 상품적 가치에 큰 비중을 부여하여 실시하였다.

(1). 저장일수 및 운반환경 규명

생산이 완료된 액체종균의 저장 및 운반에서 나타날 수 있는 불안정한 요소들을 사전에 대비함으로서 액체종균의 활력을 장기간 유지가 가능하며 아울러 종균의 사용대기일수를 연장시키기 위하여 저장온도를 5℃에서부터 30℃까지 5℃간격으로 저장가용일수를 확인하기 위해 군사활력실험을 수행하였다.

(2). 액체종균의 세대별 유전안전성 규명

툽밥종균은 동일한 툽밥배지에서 3대 이상 배양할 경우 종균의 퇴화 및 잡균 혼입률이 증가하기 때문에 툽밥종균에서는 3대 이상 툽밥배지 상에서 확대 배양을 피하고 있다. 이와 같이 동일한 종균을 사용하여 확대 배양할 때 나타나는 문제점이 액체종균 생산에도 적용가능성을 알아보기 위해 배양이 완료된 액체종균을 다시 접종원으로 사용하였다. 계대는 1대에서 10대까지 수행하였고 2L배양기에 5일간 배양하였으며, 배양이 완료된 액체종균을 폐면이 충전된 시험관(길이 300mm, 직경 30mm)에 접종하여 군사의 활력과 건조균체량을 측정하였다.

제 3 장 결 과

1. 느타리버섯의 균사생육환경

가. 배지의 선발

(1). 균주보관용 한천배지

감자한천(PDA)배지와 MYPA배지 및 YMA배지에 느타리버섯 8품종을 페트리디쉬 배양하였을 때, 공시균주 모두 MYPA배지에서 균사생장이 우수하였다(표 3). 따라서 본 실험에서는 MYPA배지를 균주보관용 사면배지 및 원균증식용 평판배지로 선발하여 사용하였다.

표 3. 느타리버섯 8품종에 대한 균주보관용 한천배지의 선발.

배 지	균총의 신장직경.(mm/5일)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
MYPA ¹	45	60	47	53	64	67	61	38
PDA ²	39	52	30	51	51	63	56	26
YMA ³	40	58	45	48	58	65	56	31

1.MYPA ; malt extract 30g, yeast extract 2g, peptone 1g, agar 20g, distilled water 1(L)

2.PDA ; potato 200g, dextrose 20g, agar 20g, distilled water 1(L)

3.YMA ; yeast extract 3g, meat extract 3g, peptone 5g, dextrose 10g, agar 20g, distilled water 1(L)

(2). 기본배지

공시균주의 생육환경 및 영양원 선발 시험의 기본배지를 선발하기 위하여 Hadar⁽²⁰⁾, Hasimoto⁽²¹⁾, Torev⁽⁵⁸⁾, B.M 배지 상에서 공시균주인 느타리버섯 8 품종을 페트리디쉬 배양하였을 때, 균사생장이 우수한 표 2.의 배지조성을 갖는 B.M 배지를 기본배지로 선발하여 사용하였다(표 4).

표 4. 느타리버섯 8품종의 기본배지 선발.

배 지	균총의 신장직경.(mm/7일)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
Hadar ¹	40.3	57.5	43.3	44.7	35.7	53.7	69.7	34.7
Hasimoto ²	42.0	52.7	39.3	45.3	29.0	57.3	71.3	33.7
Torev ³	21.7	32.7	15.3	20.3	20.7	22.7	46.0	23.0
BM ⁴	60.7	62.0	55.7	58.3	54.0	63.7	64.3	44.0

1.Hadar(28) ; glucose 20g, asparagine 0.65g, yeast extract(Difco) 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 1g, KCl 0.5g, distilled water 1(L)

2Hasimoto(29) ; D-glucose 20g, peptone 2g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, CaCl₂ 0.1g, thiamine hydrochloride 100µg, distilled water 1(L)

3Torev(87) ; glucose 20g, NH₄NO₃ 2g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, ZnSO₄ 0.001g, distilled water 1(L)

4BM ; yellow sugar 30g, yeast extract 3g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄ · 7H₂O 1g, distilled water 1(L)

(3). 잡균검색 및 활력검정 배지

액체종균 생산을 위한 균사체 액체배양 실험에서 발생하는 오염원의 검사를 위하여 표 5. 및 표 6.의 배지조성을 갖는 배지를 조제하여 사용하였다. 액체배

양에서 발생하는 세균오염의 판별을 위하여 수분활성이 높고 자화가 용이한 질소원과 영양분이 풍부한 YMA배지를 세균 오염에 대한 검출배지로 사용하였으며, 사상균의 오염을 판별하기 위해서는 수분활성이 낮고 자화할 수 있는 영양분이 부족한 톱밥배지에서 배양하는 것이 한천평판 배지에서 배양하는 것보다 단기간 배양에 의하여 오염판별을 용이하게 할 수 있었다.

표 5. 세균 오염에 대한 검색용 배지의 조성.

성 분	농 도 (g/L)
Malt extract	3
Yeast extract	3
Peptone	5
Dextrose	10
Agar	20

또한 액체 배양된 느타리버섯 균사체의 활력측정을 위하여 표6의 톱밥배지를 페트리디쉬에 약 3mm의 두께로 첨가한 후 121℃, 15psi에서 30분 동안 살균하여, 액체배양 된 느타리버섯 균의 균사현탁액 1ml를 접종하여 25℃에서 배양하여 균사의 활력을 조사하였다.

표 6. 사상균 오염에 대한 검색용 배지의 조성

성 분	조 성 (%v/v)
톱 밥	80.0
미 강	20.0
수 분	65.0

세균 및 사상균과 같은 오염원의 검색을 위하여 배양병의 접종구(또는 균사체 현탁액 배출구)에 연결된 연결관(aseptic or quick connector)을 분리하여 YMA 평판배지에 배양액을 약 5ml 정도 취한 다음 페트리디쉬의 뚜껑을 약간 열어서 틈을 만들어 기울어지게 하여 배지표면의 유리수를 제거한다. 그런 다음 배양액이 접종된 평판배지에서 육안으로 식별이 가능한 균사체(펠릿)를 백금선으로 취하여 활엽수 톱밥배지가 첨가된 시험관에 접종한다. 검색하고자 하는 배양액이 접종된 시험관과 페트리디쉬를 각각 25℃와 30℃의 항온기에서 배양하여 잠균의 존재 유무를 판별한다. 특히 불완전균의 무성포자를 짧은 기간에 유도하기 위해서는 광조사 하에서 배양하였다.

나. 균사체의 배양환경 및 영양원 선발

(1). 온도 및 초기 pH의 영향

공시균의 균사생장에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, 공시균주 중에서 원형2호(PL.7)가 25℃에서 균사생장이 우수한 것을 제외하고는 나머지 7품종 모두 30℃에서 균사생장이 가장 우수하였다(그림 1).

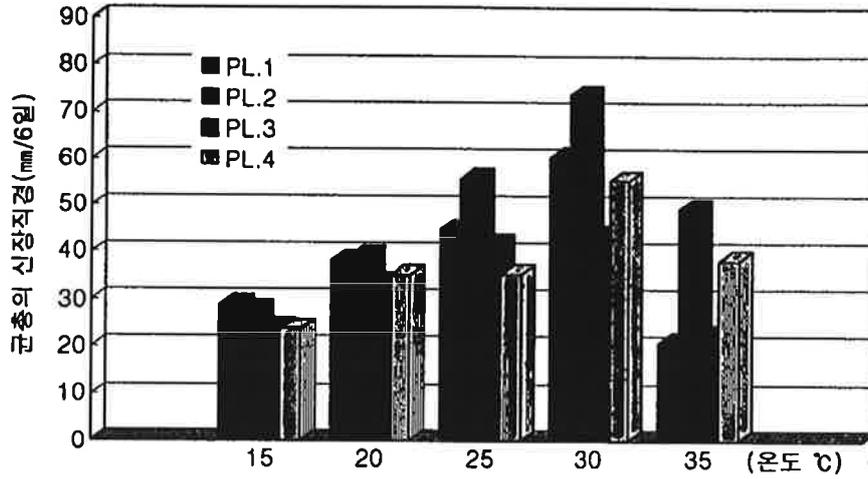


그림 1-1. 배양온도가 느타리버섯 8품종의 균사생장에 미치는 영향

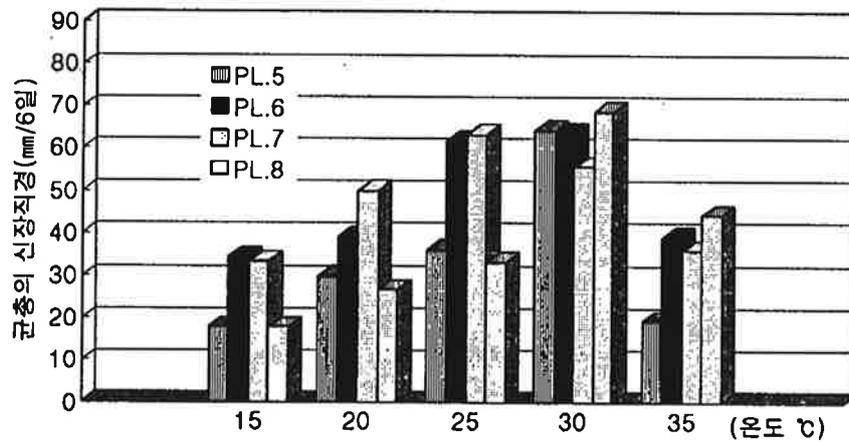


그림 1-2. 배양온도가 느타리버섯 8품종의 균사생장에 미치는 영향

또한 균사체 생육에 미치는 초기 pH의 영향을 조사한 결과, 애스타리버섯 (PL.8)은 pH 5.5에서 균사생육이 가장 우수하였으며, 나머지 공시균주는 pH 6.5에서 균사생장이 가장 우수하였다(그림 2). 그러나 초기 pH의 적응범위가 넓은 것을 확인할 수 있었다.

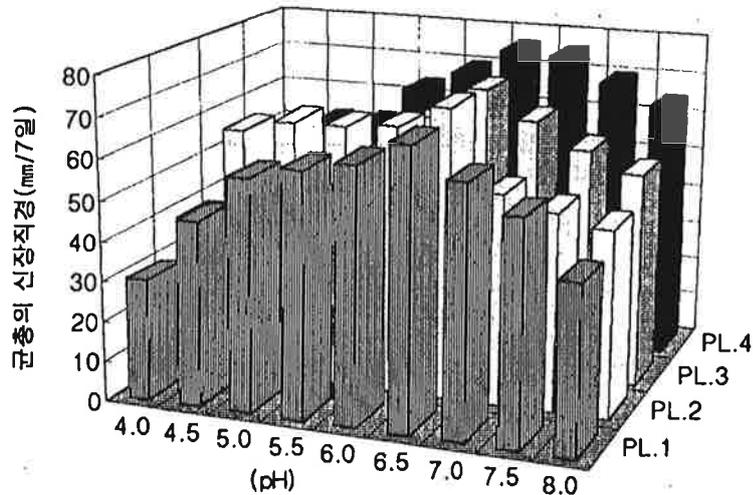


그림 2-1. 초기pH가 느타리버섯 8품종의 균사생장에 미치는 영향

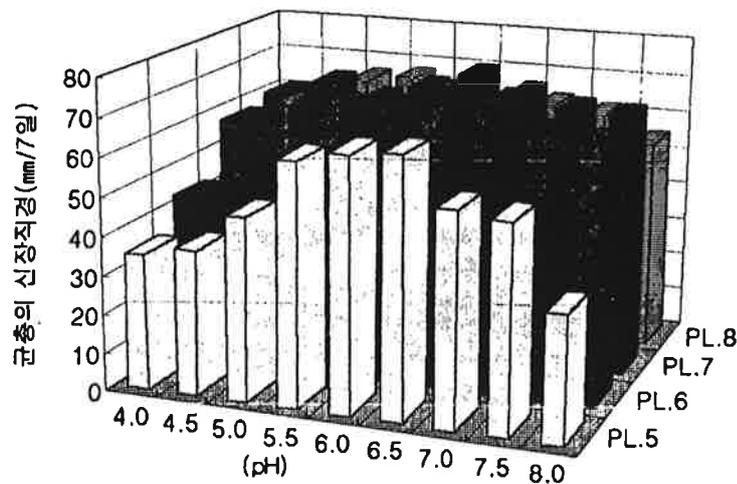


그림 2-2. 초기pH가 느타리버섯 8품종의 균사생장에 미치는 영향

(2). 영양원의 선발

(가). 탄소원 선발

느타리버섯 8품종의 균사체 생육에 미치는 영양원의 영향을 시험하여 Table 7, 8, 9의 결과를 얻었다. 탄소원 실험에서는 monosaccharide인 glucose에서 보다는 disaccharide 및 polysaccharide인 황백당, 옥수수가루, 밀가루 등에서 건조균사체의 생산량이 더욱 높은 것을 확인할 수 있었다(표 7).

표 7. 균사생장에 대한 탄소원의 영향

탄소원의 종 류	균 종 의 신 장 직 경.(mm/5일)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
옛	67.0	71.7	61.3	70.3	60.7	74.0	75.0	59.0
옥수수가루	73.3	76.2	66.5	76.8	69.3	79.5	80.0	57.3
옥수수전분	66.3	66.0	58.7	69.7	62.0	70.3	70.8	49.8
포도당	35.0	68.0	54.7	49.0	40.7	45.7	50.7	28.3
당밀	61.0	65.7	64.3	64.7	71.0	70.7	71.3	57.7
감자전분	64.7	65.7	51.0	58.7	57.2	70.3	66.5	42.7
밀가루	74.2	79.2	71.7	73.5	64.8	79.0	78.5	65.5
황백당	74.0	77.3	72.3	73.3	69.0	80.0	78.7	59.0

Medium contents ; Each carbon sources were added 3%, Yeast extract 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%.

(나). 질소원 선발

질소원의 선발실험에서는 대두분에서 공시균주 모두 균사생장이 가장 우수하였으며, 다음으로는 yeast extract, peptone, 옥수수침출액 순으로 균사생장이 감소하였다(표 8).

표 8. 균사생장에 대한 질소원의 영향

질소원의 종 류	균 총 의 신 장 직 경.(mm/5일)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
옥수수침지액	59.3	63.0	39.3	38.7	52.0	61.7	52.7	49.7
펩톤	69.7	64.2	40.3	59.7	60.3	70.3	72.5	31.8
대두분	72.3	68.8	61.7	74.0	77.8	79.7	80.0	43.0
효모즙	69.2	69.2	52.5	64.5	58.5	70.7	73.0	40.3

Medium contents ; Yellow sugar 3%, each nitrogen sources were added 0.3%,
KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%.

(다) 무기염류 선발

또한 무기염류의 첨가가 공시균주의 균사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지(B.M.)에 CaCl₂, CaSO₄ · 2H₂O, KH₂PO₄, MgSO₄ · 7H₂O를 각각 0.1%(w/v)씩 첨가하여 페트리디쉬 배양한 결과 대조구와 처리구 사이에서의 뚜렷한 첨가의 효과를 확인할 수 없었다(표 9).

표 9. 균사생장에 대한 무기염류의 영향

무기염류 종류(0.1%)	균 총 의 신 장 직 경(mm/6일)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
대 조 구	54.0	69.8	63.5	61.5	59.5	67.5	67.8	46.0
염화칼슘	54.0	68.8	65.0	64.0	63.0	72.5	70.0	51.0
황산칼슘	52.5	70.5	64.0	65.5	60.5	70.5	70.3	48.2
인산칼륨	48.8	63.5	58.3	58.8	54.3	64.3	66.3	44.3
황산마그네슘	53.3	70.0	63.3	61.8	60.8	69.5	69.5	46.3

Medium contents ; Yellow sugar 3%, Yeast extract 0.3%, each mineral salts were added 0.1%.

다. 삼각플라스크에서의 배양환경

삼각플라스크의 배양환경이 느타리버섯 8품종의 균사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 접종량과 배양액량 및 삼각플라스크의 종류와 배양시간에 따른 영향을 조사하였다.

(1). 접종량의 영향

접종원의 접종량 변화에 따른 균사체 증식을 조사하기 위하여 평판배양된 균사절편(직경 6mm)을 1개에서 5개까지 한 개 간격으로 접종갯수를 달리하여 50ml의 기본배지(표2)가 분주된 250ml의 삼각플라스크에서 배양하여 접종량에 따른 균사체의 증식 효과를 건조량으로 조사하였다. 공시균주는 원형느타리 2호(PL.7)를 사용하였으며, 회전형 진탕 항온배양기에서 120rpm으로 25±1℃에서 7일간 배양하였다. 접종량이 증가할수록 초기 균사체의 증식은 빠르게 증가함을 알 수 있었다. 그리고 접종량의 증가는 건조균체량의 증가와 비례하지 않

는다는 결과를 얻을 수 있었다.(그림 3)

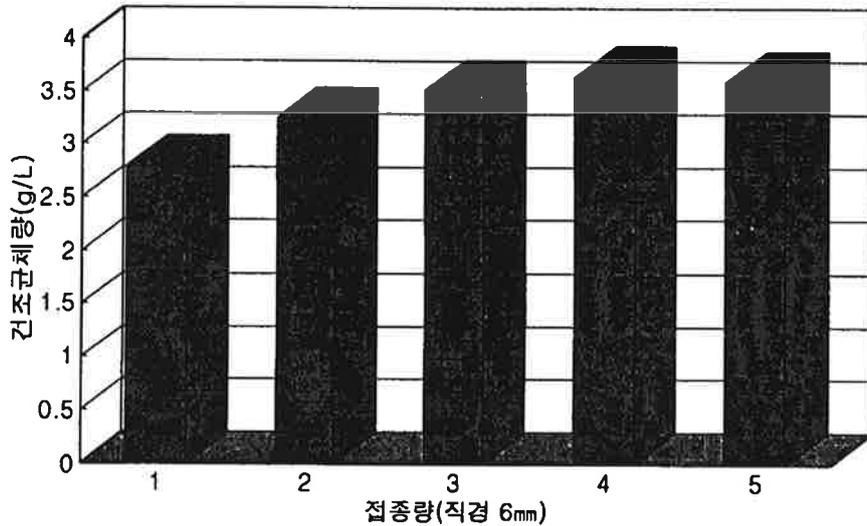


그림 3. 균사체 생산에 미치는 접종량의 영향

(2). 배양액량 및 플라스크의 영향

배양액량 및 플라스크의 형태에 따른 균사체 증식효과를 조사하기 위하여 250ml의 일반 삼각플라스크와 진탕배양용 삼각플라스크에 MYPA평판배지에서 배양한 균사절편(직경 6mm)을 접종하여 배지액량에 따른 건조균체량을 조사하였다.

공시균주는 원형느타리 2호(PL.7)로 MYPA평판배지에서 배양한 균사절편을 삼각플라스크에 접종하였으며, 회전형 진탕 항온배양기에서 120rpm으로 25±1℃에서 7일간 진탕배양 하였다.

삼각플라스크에서 배양액량의 변화가 균체생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 배지액량을 배양용기 부피의 20~60%로 달리하여 배양한 결과, 용기부피

250ml의 일반 삼각플라스크와 진탕용 삼각플라스크 모두 100ml(용기대 배양액량의 부피비 40%)에서 균사체 생산량이 가장 우수하였다. 또 일반 삼각플라스크에서 보다 진탕배양용 삼각플라스크에서 균체 생산량이 더욱 높음을 확인하였다. 따라서 본 연구개발과제에서는 250ml의 진탕배양용 삼각플라스크에 배양액량을 100ml하여 모두 삼각플라스크 배양을 실시하였다.

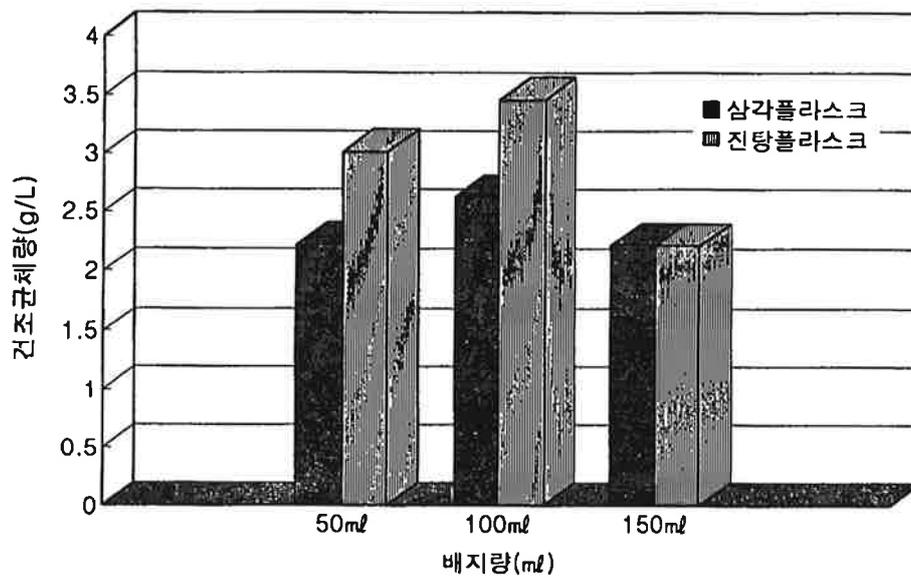


그림 4. 삼각플라스크 형태 및 배양액량이 균사체 생산에 미치는 영향

(3). 일반 삼각플라스크의 배양방법

다음으로 진탕플라스크가 아닌 일반 삼각플라스크에서 표 10과 같이 배양 방법을 달리하여 건조균체량 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조구에 비하여 45° 경사배양과 직경 5mm의 유리막대를 넣고 배양한 처리구에서 균사생육이 우수하였다. 그리고 직경 10mm의 유리막대를 넣은 처리구는 대조구에 비하여 건조균체량은 작았으나 균사체의 생육형이 펄프형으로 균사체가 생육하였다.

표 10. 삼각플라스크에서의 배양방법에 의한 균체량 조사.

배양방법	건조균체량(g/L)	생육형	크기(mm)
control	5.36	pellet	2±0.5
5mm	5.43	pellet	1±0.5
10mm	4.79	pulp	-
45° 사면배양	5.55	pellet	1±0.5

Medium contents ; Yellow sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%.

(4). 배양시간에 따른 영향

균사체 생산에 미치는 배양 시간의 영향을 조사하기 위하여 250ml의 일반 삼각플라스크에서 배양일수에 따른 건조균체량을 조사하였다. 기본배지(표2) 50ml가 분주된 삼각플라스크에 애스타리(PL. 8)의 균사절편(직경 6mm)을 1개 접종하여, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 120rpm에서 항온 진탕배양하였다. 총 샘플링 숫자만큼 삼각플라스크를 배양하였으며, 각 처리구의 건조균체량을 구했으며, 반복수로 나눈 평균 건조균체량을 환산하여 건조균체량을 정량하였다. 그 결과 기본배지에 접종량을 균사절편 1개로 하여 250ml의 일반 삼각플라스크에서 배양하였을 때 배양 12일 만에 건조균체 생산량이 가장 높은 것을 알수 있었다.(그림 5)

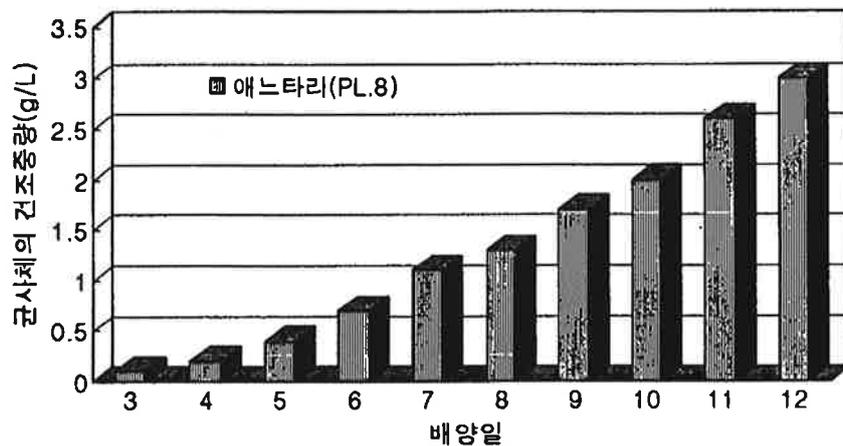


그림 5. 기본배지에서 배양시간에 따른 영향

라. Carboy에서의 배양환경

(1). 접종량 실험

병배양에 접종량을 달리하여 실험한 결과 접종원을 4% 접종한 처리구에서 균사체 생산이 가장 우수하였다(그림 6). 또한 접종량이 증가할수록 육안으로 확인 가능한 병배양 장치내의 균사밀도는 급격히 증가하였으며, 그 결과 병배양 기간이 단축되는 것을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서는 접종량을 1%로 선발하여 이후의 실험을 수행하였다.

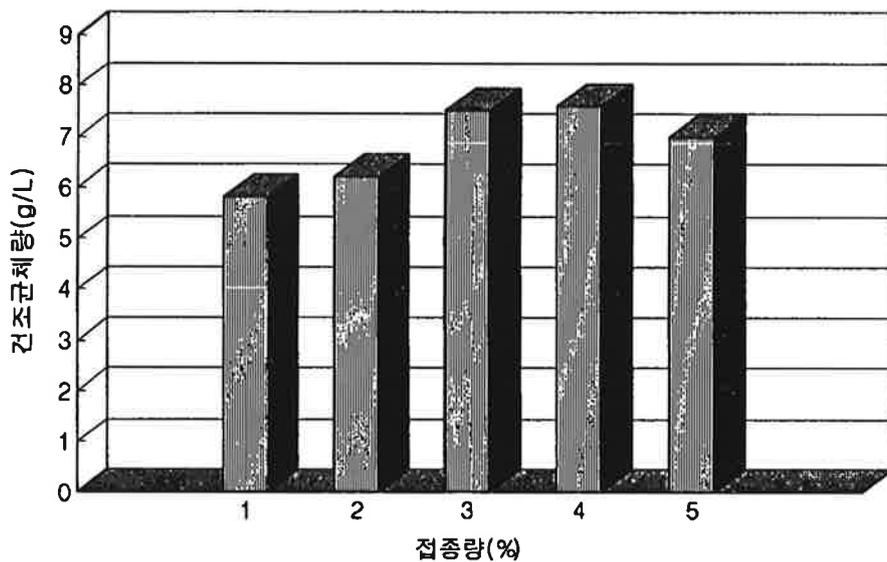


그림 6. 병배양에서 접종량에 따른 균체량 변화

(2) 통기량 실험

통기량을 달리하여 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 통기량이 증가할수록 건조균사체 생산량이 증가하였다(그림. 7). 그러나 본 연구의 배양장치에는 배기되는 공기중의 수분을 응축할 수 있는 condenser를 배기구에 설치하지 않았기 때문에 통기량이 증가할수록 배양기로부터 배양액의 손실이 증가함을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 배양액의 혼합효과를 피할 수 있는 최소의 통기량인 0.5vvm으로 이후의 실험을 수행하였다.

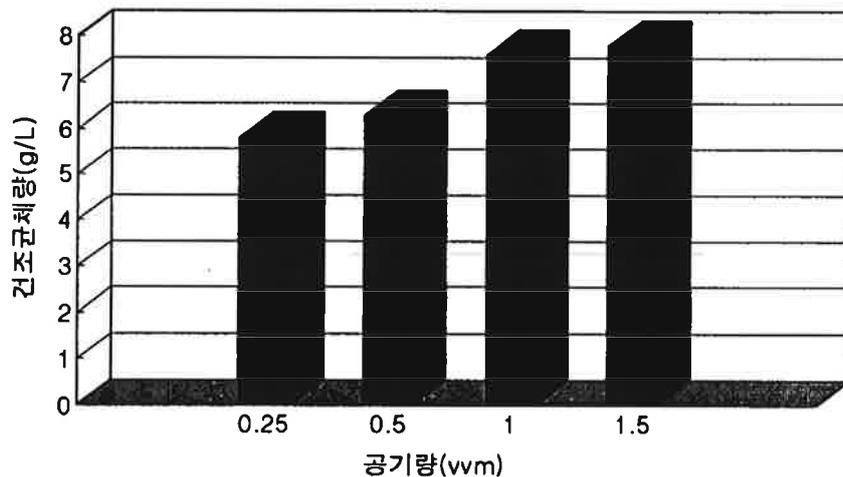


그림 7. 병배양에서 공기량에 따른 건조균체량 변화

(3). 느타리버섯 8품종의 병배양

위에서 얻은 결과를 토대로 느타리버섯 8품종에 대하여 접종량 1%와 통기량 0.5vvm으로 5일간 carboys 배양하였을 때 다음의 결과를 얻었다(그림. 8) 배양이 완료된 다음 배양병을 방치하여도 균사체와 배양액의 분리는 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 액체종균의 병배양 조건으로 접종량 1%와 통기량 0.5vvm으로 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5일간 배양하여 액체종균을 생산할 수 있었다.

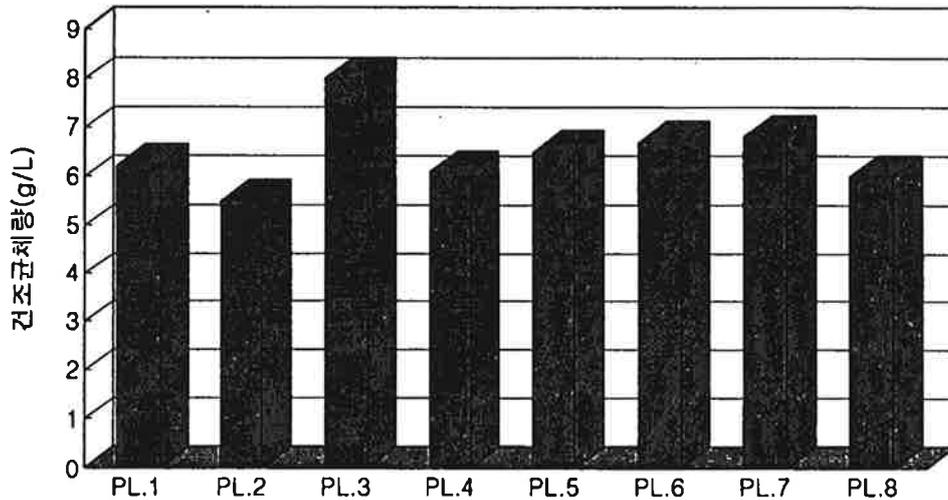


그림 8. 느타리 8품종의 병배양시 균체량의 변화

(4). 배양장치에 통기할 수 있는 공기량

본 연구의 액체종균 배양장치로 선발된 병배양장치는 통기하는 공기가 배양액 하부로 유입되면서 배양기 내부에 기포가 발생하게되며, 이렇게 발생된 기포는 결과적으로 배양액 상부와 하부에 밀도차를 유발하게 된다. 즉 배양장치내의 배양액의 혼합효과는 기포에 의해서 발생된 상·하부간의 밀도 구배에 의해서 달성된다고 할 수 있다. 따라서 본 연구의 발효형식으로 선발된 기포탑형 배양장치의 조작시 통기하는 공기량을 배양액의 혼합에만 주목할 경우 무리한 통기에 의한 배양액의 손실은 물론 운전비용의 증가를 초래하게 된다.

그러므로 본 실험에서는 이와 같은 결점을 보완할 수 있는 배양방법으로 표 11과 같이 4개의 배양병을 직렬로 연결하여 배양실험을 수행하였다. 그 결과 1개의 배양장치에 통기할 수 있는 공기량으로 4개의 병배양이 가능하였다. 그러나 배양장치의 연결 숫자가 증가할수록 첫 번째 배양장치에 높은 압력이 걸리게 되어 배양라인이 불안정하므로 특히 주의하여야할 것으로 사료된다.

표 11. 일정한 통기량에 대한 연결 가능한 배양기

	Carboy culture			
	1st	2nd	3rd	4th
배양기내의 압력(kg/cm ²)	0.7	0.6	0.4	0.2
건조균체량(g/L)	6.12	5.62	6.78	7.23

Medium contents ; Yellow sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%.

2. 산업용 액체배지의 선발

가. 대두분의 첨가량 실험

농업용 최적배지의 탄소원으로 선발된 황백당(3%)에 대두분의 첨가량을 달리하여 느타리버섯 8품종의 균사체를 삼각플라스크 배양하여 다음의 결과를 얻을 수 있었다(표 12). 대두분의 첨가량 증가와 함께 건조균사체 생산이 증가하였으나 본 실험에서는 대두분의 첨가량을 0.3%로하여 농업용 최적배지의 선발시험을 수행하였다.(표 12)

표 12. 대두분 농도에 대한 균체량의 변화

대두분의 농도	건조균체량(g/L)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
0.1%	1.38	1.61	1.81	1.99	1.57	1.76	1.64	1.30
0.3%	2.27	4.16	3.79	2.48	2.10	2.67	3.34	2.32
0.5%	3.00	4.75	6.73	4.66	2.86	4.05	4.04	3.78
0.7%	3.63	6.50	8.96	6.62	4.69	5.74	5.02	5.30
0.9%(w/v)	4.28	7.28	10.80	6.58	4.22	7.86	5.58	6.29

Medium contents ; Yellow sugar 3%, Soybean flour were added at 0.1~0.9%,
KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%.

나. 무기염류의 첨가

또한 무기염류의 첨가가 느타리버섯의 균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 영양원 선발시험에서 균사체의 신장직경을 조사한 표 9의 실험 결과와는 달리 $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 1:1 혼합물을 0.1% 첨가한 처리구가 대조구에 비하여 건조균사체의 생산량이 높았다(표 13).

표 13. 무기염류의 첨가에 의한 균체량의 변화

무기염류의 종 류	건 조 균 체 량(g/L)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
대 조 구	1.74	2.99	4.19	3.05	2.04	2.21	2.60	2.52
염화칼슘	2.70	3.48	4.39	3.64	3.58	2.92	3.31	3.16
인산칼륨(A)	1.97	3.38	3.98	4.60	2.75	3.45	3.32	2.94
황산마그네슘(B)	2.41	3.26	4.46	4.23	3.09	3.49	3.65	3.46
(A) + (B)	2.73	4.16	4.65	5.10	4.30	3.86	3.98	3.44

Medium contents ; Yellow sugar 3%, Soybean flour 0.3%, Mineral salts were added at 0.1%(w/v). It was incubated at 25°C, 120rpm for 7days.

다. 농업용 최적 배지

본 연구의 농업용 최적배지의 선발시험에서는 황백당·대두분을 배지조성으로 하는 표 14의 액체배지를 액체종균의 생산용 최적배지로 선발하여 사용하였다.

표 14. 농업용 최적배지의 선발

성분	농도(g/L)
Yellow sugar	30.0
Soybean flour	3.0
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5

액체종균의 생산을 위한 농업용 최적배지로 선발된 표 14의 성분을 배지 조성으로 하여 250ml의 삼각플라스크에서 배양한 결과, 접종하여 배양 7일만에 stationary phase에 도달됨을 확인할 수 있었다(그림. 9). 따라서 본 실험의 병 배양에 대한 접종원은 250ml의 삼각플라스크에서 배양액량 100ml로 25℃, 120rpm으로 5일간 삼각플라스크에서 배양하여 사용하였다.

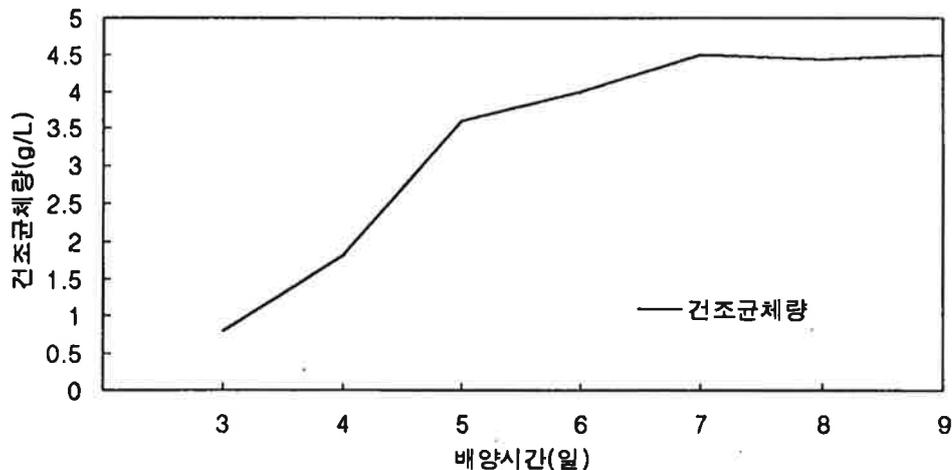


그림 12. 산업용 배지에서 배양시간에 따른 영향

3. 액체종균의 배양장치 및 무균성 확보

가. 배양용기의 선발

발효용기의 소재로는 유리와 철제가 있으며, 40리터까지는 내열성 유리소재의 적용이 가능하나 배양액량이 40리터 이상 되면 배지의 살균시 발생하는 압력에 의하여 배양용기의 손상이 발생하기 때문에 스테인레스와 같은 철제를 이용한다. 내열성 유리를 이용한 배양용기의 형태는 양방향으로 뚫린 원기둥(column)의 모양과 한쪽만이 막힌 병모양이 있다. 원기둥의 형태는 밀봉장치에 세심한 주의가 요구하게 된다. 병모양의 것은 터진쪽이 배양병의 폭과 같은 것, 그리고 배양병의 폭보다 작은 입구(주둥이)를 가진 것이 있다. 주둥이가 배양병의 폭과 같은 것은 원기둥형태에서와 같이 배양기의 밀봉이 까다로운 단점이 있다. 따라서 배양용기는 병형태의 것으로서 주둥이가 작은 내열성 유리소재의 유리병을 배양용기로 선발하였다.

배양용기의 형태는 배양기내의 균일성 확보를 위한 통기·교반에 큰 영향을 주게 된다. 배양기내의 균일성 유지와 통기·교반을 행하는 방법에 따라 생물반응기를 크게 교반조형 발효조와 기포탑형 발효조를 구분한다. 교반조형 발효조는 배양기의 형태인 폭과 높이의 비(W/H)가 1:2로서 임펠러를 장치한 생물반응기를 칭하며, 기포탑형 발효조는 교반조형 발효조에서 처럼 기계적인 힘으로 임펠러를 회전시켜 배양기의 균일성을 유지하는 것이 아니라 압축공기를 발효조의 바닥으로부터 공급함으로써 배양기내의 밀도차를 유도하여 교반효과를 얻는다. 따라서 기포탑형 발효조에서는 (폭대 높이의 비가 최소한 1:4 이상으로 배양기를 제작함)으로서 보다 높은 밀도구배를 형성하여 배양액의 혼합효과를 증가시켜 배양액의 균일성을 유지시킬 수 있다. 그러나 실질적으로 5~20리터 용량의 유리병을 제작하는데 있어서 위의 조건을 만족하는 형태는 가

능하나 살균과 취급에 있어서 간편해야 한다는 기준에서 벗어나므로 실제 배양병 제작시 위와 같은 근거를 참고자료서 이용하였다.

배양용기의 알맞는 형태를 조사하기 위하여 주둥이가 작은 유리병으로 형태(W/H비)가 다양한 유리병을 사용했으며, 주둥이의 밀봉을 위하여 실리콘마개를 사용하였다. 예비실험을 행한 결과 혼합효과에 있어서 폭 대 높이의 비가 배양액의 교반에 미치는 영향이 크다는 것을 관찰할 수 있었다. 5ℓ~25ℓ의 유리병(carboy)을 이용한 미생물의 배양방법은 오래 전부터 행하여져 왔으며, 실용적으로 발효에 직접 이용되기보다는 배양용 배지의 보관병 및 배양액을 회수하기 위한 용기로서 이용되어 왔다. 또한 카보이배양은 본 배양에 대한 접종을 생산하는 종배양(seed culture)에 이용되었으나, 본 연구개발과제에서는 본배양용 배양용기로 사용하였다.

액체배양용 배양장치의 용기로는 배양액량이 8리터, 10리터, 20리터인 원통형의 내열성 유리병을 선발하였다. 그러나 내열성 유리병은 가격이 고가이면서 취급상의 부주의로 인한 파손 및 배지액량을 완전히 충전된 상태에서는 배양병의 무게가 무거운 단점등이 발견되어서 가격이 싸며, 취급이 용이하고 대량의 액체배지를 확보할 수 있는 시판용 생수병(18.9리터)을 사용한 결과 내열성 유리병에 비해 액체중균 생산면에서 뚜렷한 차이점을 발견하지 못하였으나 고온고압의 살균과정에서 급격한 기압변화를 일으켰을 때 유리병에 비해 파손의 확률이 높고, 접종과정에서 높은 공기압을 배양기내로 주었을 때에는 공기압에 의한 배양병의 파손의 단점을 가지고 있다. 그리고 살균과정을 통해 배양병표면에 잔은 금이 형성되어 사용횟수를 증가할수록 배양병의 내구성이 점점 약화되는 것을 관찰할 수 있었다.(사진1)



사진 1. 배양병의 종류(左:일반삼각플라스크,中:8리터배양병,右:18.9리터 생수병)

나. 배관라인 설계

Type A : 통기관, 배기관, 배양액 채취관, 접종관이 각각 1라인의 총 4개 라인

Type B : 배양액 채취관과 접종관을 겸용하는 총 3개 라인

Type C : 통기관과 배양액 채취관 및 접종관을 겸용하는 총 2개 라인

카보이 배양기에 배양액을 넣어 살균 후 실온으로 냉각하여 배지를 접종하고, 통기배양을 위하여 압축공기를 공급함과 동시에 배양기에서 공기를 배출하고, 배양이 완료되면 심부배양된 균사현탁액을 버섯배지에 접종하여 종균으로 이용하게 된다.

이와 같이 배양병에는 접종원의 접종관 1개, 압축공기의 통기관 1개, 배기관 1개, 균사체 현탁액의 채취관 1개로서 도합 4개의 연결라인이 필요하다. 접종관은 카보이배양기 내로 종 배양한 접종원을 공급하는 라인으로 배양기의 바닥까지 또는 배양기내의 공기층에 연결되어 있어도 문제점이 발생하지 않지만 압축공기의 통기라인과 현탁액 채취라인은 반드시 배양용기의 바닥까지 연결되어야 한다. 그리고 공기의 배기관은 반드시 배양용기의 기층 최상부에 위치하여야 한다.

유리병의 밀봉방법으로는 실리콘 마개를 사용하므로 코크보아를 이용하여 구멍을 만들어서 배양에 필요한 각 라인을 연결하였다. 실리콘 마개와 연결라인의 밀착을 위하여 처음에는 유리관을 세공 엘보우를 제작하여 사용하였으나 충격에 약한 단점이 있어 부식에 강하면서도 충격에 강한 소재로서 스테인레스로 엘보우를 제작 사용하였다. 배양병의 연결라인으로는 최소한 접종원의 접종관, 압축공기의 통기관 및 배기관, 배양액의 채취관인 4개 라인이 기본적으로 필요하다는 전제하에 연결라인을 줄일 수 있는 방법을 고안하여 보았다. 배지를 살균하기 위해서는 배지가 들어있는 배양병 내부와 외부가 통하게 해야

하므로 배기라인을 가압살균하는 동안 살균술(autoclave)내에서 개방시켰다. 즉 배양병과 외부를 완전히 차단하면 살균하는 동안 발생하는 온도변화와 압력변화가 배양기로 쉽게 전달되지 않을 뿐만 아니라 살균초기의 살균술은 배양병에 대하여 상대적으로 고압이 되므로 배양병의 손상이 발생할 수 있다. 접종원의 접종라인은 배양병내의 바닥 또는 기층에 위치하여도 문제점이 발생하지 않는다는 점을 고려할 때 접종구를 독립되게 만들지 않아도 Quick connector(무균 연결관)를 이용한다면 다른 연결라인을 이용하여도 목적에 알맞는 결과를 얻을 수 있다는 생각하에 적합한 연결라인을 분석한 결과 배양액의 배출라인을 접종라인과 병행하기로 하였다. 압축공기의 통기라인은 배양병의 바닥까지 연결되도록 독립적으로 설치하였으며, 공기의 배출라인은 배양병의 기층 최상부에 라인의 말단이 오도록 설계하였다. 그러므로 본 연구개발과제에 적합한 본배양 용기로 Type B의 배관라인을 설계하여 액체종균을 배양하였다.(사진 2)

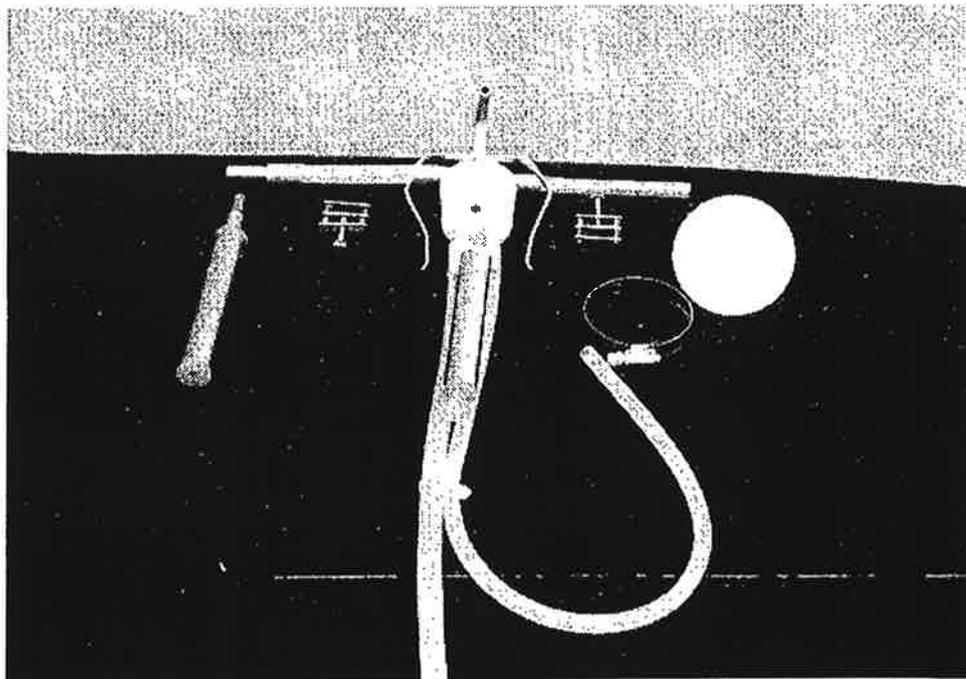


사진 2. 배관라인(左:접종관 및 배출관,中:배기관,右:통기관)

다. 무균 접종방법

Type ① : 카보이 배양병의 실리콘 마개를 열고 직접 접종원을 접종하는 방법.

Type ② : 카보이 배양병의 배관설계시 quick connector를 배양액 배출라인의 필터 안쪽으로 설치(Type B)하고 또한 삼각플라스크에도 접종라인에 quick connector를 설치하고 반대라인인 공기 송기라인에 헤파필터를 장착 압축공기를 이용하여 삼각플라스크에 있는 접종원을 본배양병으로 접종하는 방법.

Type ①은 배양병의 마개를 직접 개방하게 되므로 외부공기와 접촉할 수 있는 위험성이 내재하는 단점이 있다. 반면 Type ②는 Type ①과 같은 단점을 극복할 수 있어 보다 무균적인 접종방법이 될 수 있다. 그러므로 본 연구개발 과정의 접종원 접종방법으로는 Type ②를 선발하여 사용하였다.

라. 배지 및 공기의 제균

(1) 배지의 멸균

실험실에서 일반적으로 사용하는 autoclave에서 배지의 멸균 조건은 121℃, 15psi(1.2kg/cm²)에서 15~30분이다. 그러나 배지 액량이 증가할 경우 배양액 전체가 위의 멸균조건에 도달하는 시간이 각기 다르게 되어 불완전한 멸균을 초래한다. 그러므로 배지 액량이 증가할 경우 멸균온도보다 저온에서 충분한 가온을 실시하여 되도록 멸균시간의 단축을 피하는 동시에, 고온에 의해서 파괴되는 영양분의 손실을 최소화하여야 할 것으로 사료된다.

본 실험에서는 병배양장치 8개를 넣을 수 있는 1100리터 용량의 살균술과 100kg/시간 용량의 스팀보일러를 이용하여 배지를 멸균하였다. 먼저 충분한 배기를 행하면서 살균술내의 온도가 100℃에 도달하면, 배기밸브를 닫고 105℃에서 약 60~90분간 유지한 다음 살균술 내의 온도를 승온시켜 121℃(1.2kg/cm²)에 도달하면서부터 60분간을 멸균시간으로 하였다.

(2) 공기의 제균

목적으로 하는 식용버섯 균 단일 균주만을 순수배양 하고자 할 때 삼각플라스크나 시험관에서는 면전을 통하여 유통되는 공기의 무균확보가 비교적 쉽게 달성된다. 그러나 통기배양에서는 대기중 부유성 오염원을 포함하고 있는 다량의 공기를 배양기 중으로 강제 공급하게 되므로 배양기간 중의 무균성 확보를 보장하는 공기제균 조치가 매우 중요한 인자로서 작용한다. 공기제균 방법에는 열처리법, 화학처리법, 여과법이 있다. 그러나 열처리법은 가열과 냉각에 대한 열처리 비용이 높고, 살균제와 같은 화학처리법은 화학물질로 처리된 공기를 통기하게 될 때 발생할 수 있는 안정성의 확보가 곤란하므로 필터를 이용하는 여과법에 의한 공기제균법이 널리 이용되고 있다.

여과에 의한 공기제균에 이용되는 필터의 종류는 크게 섬유층진 필터(deep filter)와 일정한 입자크기를 갖는 다공성 막(membrane)을 여재로 사용하는 PVA필터로 양분된다. 섬유층진 필터는 유리섬유나 솜과 같은 섬유를 충전하여 공기중에 존재하는 오염원을 섬유층에 흡착·포집하여 제거하게 된다. 따라서 섬유층진필터에 포집이나 흡착되는 입자 크기 즉, 필터의 제균효율은 섬유의 직경과 충전율에 큰 영향을 받는다. PVA필터(membrane filter)는 막에 일정한 크기의 구멍을 갖고 있는 것으로 구멍의 직경보다 큰 입자는 통과할 수 없는 장점을 가지고 있는 반면에 필터에 의한 여과저항이 크다는 단점이 있다.

본 실험에서는 제균효율이 매우 높고 연결 및 취급이 간편한 Gelman Sciences社의 Acro[®] 50(P/N 4251, Lot No. 5359)과 실험실에서 제작한 섬유층진필터를 사용하였다. 섬유층진필터는 외경 19mm, 내경 18mm, 길이 120mm의 스테인레스관에 직경 28mm의 플라스틱 섬유구를 5~7개 충전하였으며, 외경 8mm와 9.5mm의 스테인레스관을 각각 끼운 실리콘마개 5호 2개로 양쪽을 막아서 제작하였다.(사진 3)

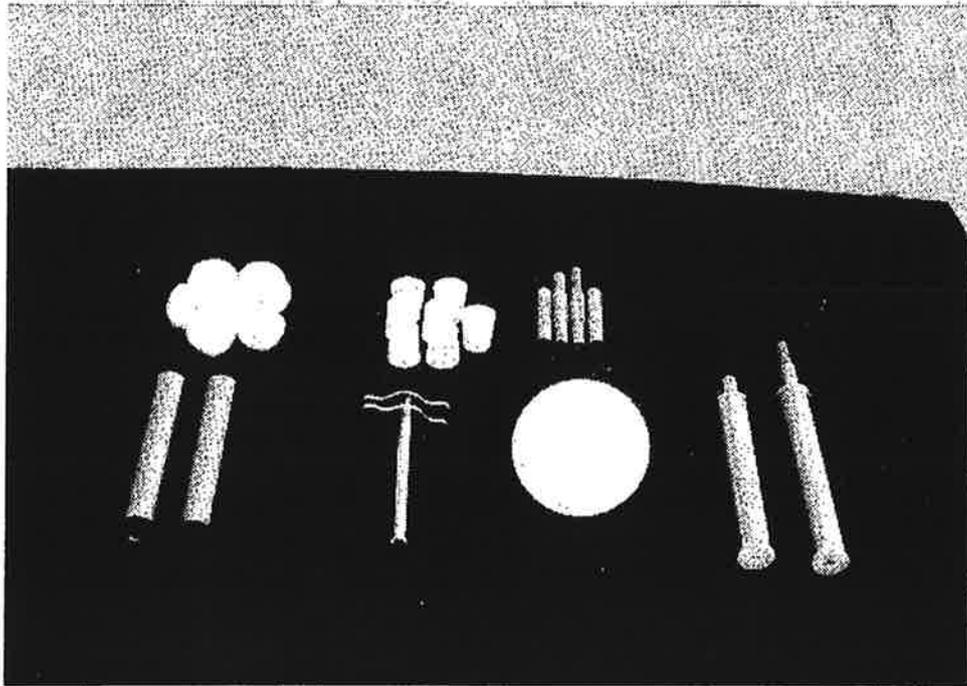


사진 3. 공기여과용 필터의 종류 및 섬유층진필터의 제작

또한 강제적으로 공기를 제공해 주는 컴프레서를 선택할 때에는 배양에 필요한 통기량에 대하여 컴프레서가 과부하로 되지 않는 한도내에서 용량을 반드시 고려하여야 한다. 공기를 압축할 때 고열이 발생하게 되므로 컴프레서는 실외의 신선하고 차가운 공기가 존재하는 곳에 설치하여 열의 발생을 억제함과 동시에 깨끗한 공기를 배양기로 공급하게 된다. 공기를 압축할 때에는 열의 발생과 함께 대기중에 존재하던 수분이 응축하여 물로 변하므로 정기적으로 컴프레서의 탱크에서 물을 빼주어야 한다. 만일의 경우 물을 배수하지 않고 계속하여 사용하다 보면 이것이 배양기로 공급되어, 미생물 생육에 치명적인 피해를 가하게 된다. 이러한 피해를 극복하기 위해서는 오일압축방식의 컴프레서보다는 무오일압축방식의 컴프레서(oiless compressor)를 사용하는 것이 편리하다.

(3). 소포제의 선발

호기성 미생물의 발효에서는 배양장치 내부로 산소를 공급하기 위한 통기 조작으로 인하여 배지조성과 균주에 의존하여 거품이 발생하게 된다. 배양시 거품의 발생은 배양액의 손실을 초래하는 사이펀(siphon)현상이 일어날 수 있으며, 또한 거품 위로 떠오른 균사체는 영양분의 결핍 또는 자기분해로 사멸하기 때문에 배양기에서 거품의 발생억제는 반드시 필요하다.

거품발생을 감소시키는 방법에는 물리적인 방법과 화학적인 방법이 있다. 유리병을 이용한 카보이 배양에서는 기계적인 소포법의 이용보다는 화학적인 소포법이 유리하므로 화학적인 소포법을 이용한다. 소포제에는 시약으로 판매되고 있는 시약과 동·식물성의 지방산이 있다. 시약으로 시판되는 소포제는 소량으로도 소포효과가 높은 것과 동시에 물질전달을 방해하는 정도가 미미한 데 비하여 동·식물성 기름은 화학적 소포제에 비해 다량이 첨가됨과 아울러 물질전달을 억제시키는 작용을 일으킨다. 그러나 화학적 소포제는 단지 소포작용만을 하지만 동물 또는 식물 유래의 기름은 소포작용과 함께 생육촉진물질과 에너지원으로도 작용하는 장점을 가지고 있다.

본 실험에서는 거품의 발생을 억제할 뿐만 아니라 식용버섯 균의 생육촉진 및 에너지원으로 이용된다고 보고된 식물성 기름을 소포제로 사용하였다. 그 첨가량은 약 $30 \pm 10 \text{mm}$ 를 첨가하였다.

마. 접종방법 및 접종기구의 선발

(1). 접종 방법

접종과정 중 무균적으로 접종을 해야하는 병재배 및 톱밥종균의 생산에 사용되는 접종방법에는 분출식 접종법과 분출식에 압축공기압을 이용한 분사식 접종법을 비교 분석하였다. 분석결과 같은 접종량으로 접종면적을 넓히기 위해서는 분사식 접종방법이 적합하였다. 병배지에 접종한 액체종균의 접종면적을 넓

게 접종시 배양일수의 단축과 균일한 배양기간이 가능하고 배지표면에 균사활착이 빨라 잡균의 오염률을 낮추게 된다. 그리고 액체종균을 분사해 주는 노즐 및 압축공기압을 조절하여 사용하여 접종과정에서 배지이외의 다른 부위의 접촉을 방지하므로 잡균의 오염을 최소로 해주었다.

그리고 선반식 재배에서는 접종과정에서 완전한 무균상태가 확보되지 않아도 접종이 가능하므로 고압에 견디는 스테레스 탱크에 액체종균을 옮겨서 사용하였다. 이 과정에서 액체종균을 옮기는 과정이 별도로 첨가되나 배양된 종균에는 물리적 충격을 가하지 않고 사용할 수 있고, 종균의 접종에도 고압으로 종균을 분산시켜 접종하므로 별도의 노즐을 사용하지 않아도 분사각을 이루어 접종면적을 넓힐 수 있었다.

(2). 접종기구의 선발

접종기구는 먼저 무균확보가 가능해야 하므로 접종라인과 노즐의 살균이 가능한 재료를 선발하여 사용하였다. 병재배나 종균생산에 사용되는 액체종균의 접종기구로는 접종장소가 무균성이 확보되는 무균상내에서 작업이 이루어지므로 스탠드에 접종기구를 부착하여 발로서 스위치를 조작할 수 있거나 접종기구를 손으로 조작하여 접종할 수 있었다. 그리고 선반식 접종에 사용되는 접종기구는 가벼우면서 개·폐 동작을 신속히 조작할 수 있어야 한다. 그래서 본 연구과제에 사용한 접종기구는 기본적으로 두 라인이 연결되었고 스위치 및 분사노즐로 구성되었다. 두 라인중 한 라인은 배양이 완료된 액체종균이 배양기로부터 분출되는 라인과 별도의 공기를 주입시켜 분사노즐에서 액체종균과 공기압이 혼합되면서 배지로 분출된다. 별도의 공기압은 소형 컴프레서를 이용하여 분출압을 압력계를 이용하여 제어하였고, 분사노즐은 여러 형태의 각을 이루는 노즐을 선택하여 사용하였다.

4 . 적정배지의 선발 및 부산물 이용

가. 배지재료의 이화학적 성질

(1). 물리적 성질

배지재료의 물리적 성질을 살펴보면, 표 8에서와 같이 저장 중 수분함량은 톱밥 0.11%, 옥수수이삭속 0.20%, 팽연왕겨 0.13%로 옥수수이삭속이 다소 많은 경향이었으며 배지조제 후는 톱밥 65~67%, 옥수수이삭속 62~65%, 팽연왕겨 58~62%로 팽연왕겨 수분함량이 가장 적은 경향이였다. 이는 상대적으로 무거운 팽연왕겨가 수분을 잘 흡수하지 못하는 성질을 반영하는 것으로 사료된다. 입도분포는 톱밥의 경우 1.0mm이하가 30%, 1.0~2.0mm가 45%, 2.0mm이상 이 25%였으며 옥수수이삭속은 같은 입도범위에서 각각 12, 18, 70%였고, 팽연왕겨는 32, 56, 12%로 배지의 공극은 톱밥이 가장 작고 팽연왕겨가 중간정도 이며 옥수수이삭속이 가장 큰 것으로 나타났다.

표 15. 배지재료의 물리적 성질

배지재료	수분량(%)		입도분포(%)		
	저장중	사용시	<1.0mm	1.0~2.0mm	2.0mm>
톱 밥	0.11	65 - 67	30	45	25
옥수수이삭속	0.20	62 - 65	12	18	70
팽 연 왕 겨	0.13	67 - 70	32	56	12

(2). 배지재료이 화학적 성질

배지재료의 산도는 팽연왕겨가 6.5로 톱밥 5.2에 비하여 다소 높으나 옥수수이삭속은 5.3으로 비슷하였다. C/N률은 톱밥이 1120, 옥수수이삭속이 158, 팽연왕겨는 86이었다.

표 16. 배지재료의 화학적 성질

배지재료	pH (1:10)	T-C (%)	T-N (%)	C/N율	P ₂ O ₅ (ppm)	K ₂ O (%)	CaO (%)	MgO (%)
톱밥	5.2	56	0.05	1120	30	0.04	0.21	0.02
옥수수이삭속	5.3	57	0.36	158	30	0.52	0.08	0.39
팽연왕겨	6.5	45	0.52	86	0.15	0.72	0.23	0.43

(3). 기본배지의 이화학성 비교

기본배지의 이화학성을 비교해 보면 표 10에서 나타난 것과 같이 수분함량은 옥수수이삭속 0.20, 건비지 0.27로 다른 배지에 비해 다소 높은 경향이었으며 그 외의 배지재료는 0.15% 이하였다.

표 17. 기본배지 재료별 이화학성 비교

배지재료	수분량(%)	pH	E.C(1/μΩ · cm)
톱밥	0.11	5.6	412
미강	0.11	6.2	2087
옥수수이삭속	0.20	6.2	1272
팽연왕겨	0.13	6.3	1270
야자박	0.15	5.3	1290
면실박	0.12	6.2	1460
건비지	0.27	5.2	2435

배지의 산도는 5.2~6.3 범위였고 전기전도도(E.C)는 미강 2087, 건비지 2435로 높았으나 톱밥은 412로 가장 낮은 경향이였다.

나. 액체종균을 이용한 병재배

(1). 기본배지 추출 한천배지의 애스타리 균사신장량 비교

기본배지 추출액 한천배지 상에서의 균사신장량을 비교해 본 결과 표 18과

같았다. 톱밥이 42.8mm로 가장 생장이 늦었으며 옥수수이삭속이 69.8mm로 가장 양호하였다. 군사밀도는 옥수수이삭속, 팽연왕겨, 면실박, 건비지가 치밀하였고, 균체증량은 팽연왕겨가 207mg/L로 가장 양호한 반면 톱밥은 35mg/L로 가장 불량하였다.

표 18. 배지재료 추출 한천배지에서 애너타리 군사신장량

배지재료	톱밥	옥수수이삭속	미강	팽연왕겨	야자박	면실박	건비지
신장량(mm)	42.8	69.8	52.2	56.4	46.0	52.4	53.4
군사밀도	+	+++	++	+++	++	+++	+++
균체량(mg)	35	113	45	207	98	166	147

(2). 배지재료 혼합 추출물 한천배지에서 애너타리 군사생장량 및 버섯수량

(가) 군사신장량

표 19.에 배지재료 혼합 추출물 한천배지에서 애너타리 군사생장 및 버섯수량을 나타내었다. 톱밥(대조구) 군사신장량 78.7mm에 비해 팽연왕겨를 톱밥 10~50% 혼합배지에서 모두 군사신장량이 적어 톱밥배지 단독보다 혼합배지가 불량하였다.

표 19. 팽연왕겨 혼합율별 추출물 한천배지상에서의 군사신장량

배지혼합율 (%)	톱밥100 (대조)	톱밥 90 왕겨 10	톱밥 80 왕겨 20	톱밥 70 왕겨 30	톱밥 60 왕겨 40	톱밥 50 왕겨 50	왕겨100
신장량(mm)	78.7	71.3	72.7	69.3	71.0	70.7	78.3

(나) 버섯 수량

팽연왕겨 혼합배지의 버섯수량을 조사한 결과, 표 20과 같았다. 톱밥배지 수량 (42.5g/병)에 비해 팽연왕겨 혼합배지 수량이 48.8g/병으로 14.8%가 증수되어 가장 양호하였고 그 외 혼합배지에서도 톱밥배지 수량이 85.9%이상의 수량을 나타내어 팽연왕겨를 톱밥과 혼합하여 사용하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

표 20. 팽연왕겨 혼합배지의 버섯수량

배지혼합율(%)	톱밥 왕겨	90	80	70	60	50	톱밥100 (대조)	왕겨100
개체수 (개)		7.5	11.3	7.8	8.6	10.8	7.4	10.9
수량 (g/병)		36.5	48.8	37.8	43.0	40.5	42.5	39.9
수 량 지 수		85.9	114.8	88.9	101.2	93.5	100	93.9

다. 농업부산물과 가공부산물의 이용

(1). 혼합배지별 애너타리 균사신장량 칼럼테스트 조사

표 21.에서 혼합배지별 애너타리 균사신장량 칼럼테스트 결과를 보면 톱밥+팽연왕겨 균사신장량이 102.3~109.3mm로 톱밥 단독배지 117.0mm보다 다소 적은 편이었으며 톱밥+옥수수이삭속 배지는 148.3~178.3mm로 톱밥 단독배지 170.0mm보다 신장량이 커 가장 빠른 것으로 나타났고, 옥수수이삭속+팽연왕겨 배지는 균사신장량이 88.3~125.0mm로 옥수수이삭속 단독배지 51.7mm보다 컸으나 균사신장속도는 가장 늦은 것으로 나타났다.

표 21. 혼합배지별 애너타리 균사신장량 column test조사

배지혼합 율(%)	톱밥 90 첨가 10	톱밥 80 첨가 20	톱밥 70 첨가 30	톱밥 60 첨가 40	톱밥 50 첨가 50	톱밥100 (대조)	옥수수이 삭속(100)	왕겨100
톱밥 + 팽연왕겨	108.3	109.3	108.0	103.3	102.3	117.0	-	87.3
톱밥 + 옥수수이 삭속	175.0	178.3	108.0	161.7	148.3	170.0	138.3	-
옥수수이 삭속 + 팽연왕겨	92.3	88.3	161.7	115.0	125.0	-	51.7	-

(2). 배지재료 혼합비율별 애너타리 버섯 생산량 비교

배지재료 혼합율에 따른 애너타리 버섯의 생육상황을 알아보기 위하여 종균 접종후 7일간의 균사신장량과 배지조제 전후의 산도 변화 및 전기전도도를 측정하였다. 또한 동일한 처리로 병배지를 만들어 버섯 생산량을 조사하였다. 표 22에서와 같이 균사신장량은 일정한 경향이 없이 50.6~63.0mm정도였으며 배지조제 후에 배지의 산도는 5.8~6.2범위로 배지조제전과 대차가 없었으며 전기전도도는 팽연왕겨를 혼합하는 비율이 높아지면 따라서 같이 높아지는 경향이 있었다.

배지 혼합율별 버섯의 생산량을 비교한 결과 대조구 톱밥배지의 수량 43.8g/병에 비하여 톱밥80%+팽연왕겨20% 혼합배지 수량이 41.3g/병으로 94.3%에 달하였고 톱밥80%+탄화왕겨20% 혼합배지가 41.7g/ 병으로 95.2%에 달해 이 두 처리가 수량이 양호한 경향이였다.

표 22. 배지재료 혼합비율별 애스타리버섯 생산량 비교

배지혼합율(%)	균사신장량 (mm/7일)	pH	E.C	버섯 생산량		
				개체수 (개)	중량 (g/병)	수량지수 (%)
톱밥 100	53.3	6.0	1.390	6.3	43.8	100
톱밥80+팽연20	55.3	6.0	1.525	8.5	41.3	94.3
톱밥75+팽연25	54.3	5.9	1.525	8.9	39.8	90.9
톱밥50+팽연50	63.0	5.8	1.560	7.8	32.8	74.9
톱밥80+탄왕20	62.0	6.2	1.490	8.6	41.7	95.2
톱밥75+탄왕25	50.6	6.2	1.570	8.6	25.3	57.8
톱밥50+탄왕50	61.3	6.2	1.715	7.2	26.5	60.5
톱밥80+옥공20	56.3	6.0	1.760	6.7	20.0	45.7
톱밥75+옥공25	62.0	6.0	1.725	6.3	28.7	65.5
톱밥50+옥공50	55.0	5.8	2.680	6.3	25.0	57.1

(3). 팽연왕겨 혼합율이 애스타리 버섯수량에 미치는 영향

톱밥배지에 팽연왕겨 혼합율에 따른 애스타리 수량을 표 16에서 살펴보면 액체종균 접종배지에서는 배양완성율이 팽연왕겨 혼합율에 따른 경향은 없었으며 93.4% 이상으로 양호하였고 버섯수량도 팽연왕겨 혼합율에 따른 경향은 없이 톱밥배지 100% 수량(57.0%)에 비하여 85.6-113.0% 범위의 양호한 수량 보였으며 특히 톱밥60%+팽연왕겨40% 혼합배지 수량이 64.4g/병으로 13%의 증수를 보여 가장 양호한 배지 조건으로 사료되었다. 톱밥중균을 접종한 배지에서는 배양 완성율이 59.8-98.2%범위로 액체종균에 비하여 저조하였으며, 수량에 있어서도 현저히 저조한 수량을 보였으나 톱밥 100% 배지 버섯수량(33.8g/병)에 비하여 팽연왕겨 혼합배지가 94.4-157.7% 범위의 증수를 보여 팽연왕겨 혼합효과가 현저하였으며 특히 톱밥60+팽연왕겨40% 혼합배지가 157.7%, 톱밥50%+팽연왕겨50% 혼합배지도 151.8%의 수량증수를 보여 톱밥중균을 사용할 때는 팽연왕겨 혼합배지가 유리한 것으로 확인되었다.

표 23. 톱밥+팽연왕겨 혼합율이 애너타리 버섯 수량에 미치는 영향

배지조성(%)	배양완성율(%)*			생육상황	
	액체종균	톱밥종균	개체수(수)	수량(g/병)	수량지수(%)
톱밥 90 + 왕겨 10	100	79.9	13.2	53.7	94.2
톱밥 80 + 왕겨 20	96.6	69.6	10.9	48.8	116.6
톱밥 70 + 왕겨 30	93.4	65.8	13.0	55.8	85.6
톱밥 60 + 왕겨 40	99.2	98.2	15.3	64.4	94.4
톱밥 50 + 왕겨 50	95.7	69.3	15.3	55.5	97.9
톱밥 100	100	59.0	13.2	57.0	103.0

* 액체종균 접종 15일, 톱밥종균 접종 20일후 조사

(4). 옥수수이삭속 배지에 팽연왕겨 첨가 효과

옥수수이삭속 배지에 팽연왕겨 첨가 효과를 표 24에서 살펴보면 톱밥 100% 배지의 배양완성율이 43%인데 비해 옥수수이삭속 배지는 95%이상으로 현저하게 양호하였고, 수량도 톱밥배지 38.6g/병에 비해 옥수수이삭속 배지가 170.2% 이상의 수량을 보여 톱밥배지보다 옥수수이삭속 배지가 월등히 유리한 것으로 나타났으며 옥수수이삭속 단독배지 버섯수량(69.4g/병)보다 옥수수이삭속70%+팽연왕겨30%배지의 수량이 78.4g/병으로 203.1%의 증수를 보여 옥수수이삭속배지 단독보다는 팽연왕겨를 혼합 사용하는 배지가 월등히 유리한 것으로 인정되었다.

표 24. 애너타리 액체종균을 사용하여 옥수수이삭속 배지에서의 팽연왕겨 첨가 효과

배지혼합율(%)	배양완성율(%)*	수량상황		
		개체수(개)	수량(g/병)	지수(%)
톱밥 100	43	6.0	36.8	100.0
옥수수이삭속100	98	16.7	69.4	179.8
옥속90 + 왕겨10	95	12.9	75.0	194.3
옥속80 + 왕겨20	96	13.1	65.7	170.2
옥속70 + 왕겨30	95	13.9	78.4	203.1

*액체종균 접종 22일째 조사

라. 액체종균과 톱밥종균의 비교

(1). 액체종균 원목재배 활용 가능성 검토

포플러, 버드나무, 참나무, 자작나무를 20-30cm길이로 절단하여 단목단면 접종하고 지면에 쌓아 비닐로 피복하고 천막을 덮어 골목화한 다음 8월 30일에 지면에서 골목이 3cm정도 남도록 매몰하여 움막을 설치하고 9월 26일 현재 조사한 결과를 표 18에서 살펴보면 포플러와 버드나무 원목은 톱밥종균 접종에서는 균사활착과 버섯발생이 되었으나 액체종균원목은 달관적으로 포플러와 버드나무는 균사활착이 확인되었으나 버섯발생은 보이지 않았으며 참나무와 자작나무에 균사활착이 전혀 되지 않는 원인은 재료 확보 당시 참나무는 너무 건조되었고 자작나무는 건조되지 않은 생나무였으며 액체종균은 접종 후 균사가 활착되기 전 건조한 것이 원인으로 관찰되었다.

표 25. 액체종균 원목재배 활용

원목수종	접종(월/일)	구분	원목규격(cm)			
			15	20	25	30
포플라	3/31	균사활착	+	+	+	+
		버섯발생	-	-	-	-
버드나무	4/24	균사활착	+	+	+	+
		버섯발생	-	-	-	-
참나무	5/7	균사활착	-	-	-	-
		버섯발생	-	-	-	-
자작나무	5/7	균사활착	-	-	-	-
		버섯발생	-	-	-	-

(2). 원목균상재배의 애스타리 액체종균 활용성 검토

원목 균상재배의 애스타리 액체종균 활용성을 검토하기 위하여 생참나무 원목을 길이 15-35cm로 절단 P.P(폴리프로필렌)비닐로 피복하여 고압살균기에 15기압 121℃로 90분간 살균하여 액체종균을 접종하고 22℃ 항온배양실에서 3개월간 골목화 한 다음 비닐을 제거하고 재배사 균상에 입상하여 버섯발생 상황을 조사하였다. 표 26에서 처럼 원목의 길이가 25cm이하에서 43.8~63.8g/개 이하의 수량을 보여 균상에서의 원목재배는 25cm이하의 단목이 유리한 것으로 인정되었다.

표 26. 참나무 원목 균상재배시 애스타리 액체종균 활용 효과

원목길이 (cm)	개체수 (개)	버섯 생육 상황(cm)			수량(g)
		경장	갓경	경태	
15	10.3	6.3	3.9	1.0	53.8
20	8.0	6.9	4.1	1.3	43.8
25	8.5	7.4	4.7	1.2	63.8
30	3.0	6.7	4.5	1.3	30.0
35	7.5	6.6	4.0	0.8	25.0

(3). 여름느타리 액체종균 발효배지 비닐포트 재배

벼짚, 옥수수짚, 콩짚을 사료절단용 컷타기로 길이 3-4cm되게 잘라 24시간 침수후 건져서 싹겨를 중량비로 20% 혼합하여 폭45cm, 길이 60cm의 P.P비닐로 배지중량 2kg을 담아 병재배용 P.P병마개로 마개를 한 다음 농가용 다목적 건조기에 65℃로 10시간, 55℃로 48시간 동안 발효시켜 여름느타리 액체종균을 접종하고 22℃배양실에서 배양하여 재배사 균상에 입상 재배한 결과, 콩짚이 167.0g/포트, 옥수수짚이 106.9g/포트로 콩짚과 옥수수짚에 수량이 더 많아 액체종균 활용 배지 재료로 이용가치가 확증되었다.

표 27. 여름느타리 액체종균 활용 비닐포트 재배 배지별 수량

배지종류	개체수(개)	경장(cm)	갓경(cm)	경태(cm)	수량(g/포트)
벼짚	14.33	5.6	5.5	0.9	90.4
옥수수짚	15.90	3.9	5.2	1.2	106.9
콩짚	23.60	5.8	5.3	1.0	167.0

(4). 애느타리 액체종균 활용 면실박 상자 재배

면실박 발효배지에 애느타리 액체종균 활용성을 검토하기 위하여 병재배용 콘테이너(45×45×10cm)에 침수한 면실박을 10cm 두께로 내열성 P.P비닐로 포장하고 농가용 다목적 건조기에 65℃로 10시간, 55℃로 48시간 동안 발효시킨 다음 애느타리 액체종균을 표면 접종하여 피복한 다음 22℃ 항온배양실에서 배양하여 재배사에 입상 18℃로 관리한 결과를 표 23에서 살펴보면 3주기에 2,900g/상자가 생산되어 면실박 발효배지의 애느타리 액체종균 활용가능성이 확인되었다.

표 28. 애너타리 액체중균 활용 면실박 상자재배 생산량

수확주기	개체수(개)	버섯 생육 상황			수량(g)	합계(g)
		경장(cm)	갓경(cm)	경태(cm)		
1주기	170	4.4	4.4	1.0	1,150	1,150
2주기	80	5.0	5.4	1.2	1,150	2,300
3주기	43	4.4	5.1	1.1	600	2900

마. 액체중균을 이용한 균상재배

액체중균을 이용한 균상재배에서 먼저 접종방법을 보면 병재배에 사용하는 접종방법을 이용할 경우 배양병에서 균상의 배지까지의 거리가 멀어 배양병내로 주입되는 공기압이 증가하게 되어 배양병이 고압의 공기압에 의해 물리적 충격에 의한 파손의 위험이 발생하였다. 그러므로 고압의 공기압을 견디는 스텐레스탱크에 배양이 완료된 액체중균을 넣은 다음 스텐레스탱크로 공기압을 주입시키므로 고압에 의한 배양병의 파손을 방지하였다. 이 과정은 배양이 완료된 액체배지를 외부에 노출시키는 결과를 가져 오게되나 균상재배는 외부와의 환경에 노출된 상태로 배양이 되므로 고체중균과 동일한 상태로 접종하게 된다. 또한 연동펌프를 이용하여 중균을 접종할 때 액체균사체가 약 1/5정도로 균사체가 쪼개어 지므로 균사체에 물리적 충격을 가하게 되나 배양과정에서 큰 문제는 발생하기 않았다.

그리고 액체중균의 접종량을 조사한 결과 평당 약 5~9리터정도의 접종량에서는 배양에 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러므로 경제적인 측면에서 평당 약 6리터 정도로 접종하게 되었다.

또한 고체중균에 비해 액체중균이 배양일수에서 거의 비슷하였으며, 배양과정에서 균상에 발생하는 병해 피해면적은 액체중균이 고체중균을 접종한 배지에 비해 발병면적이 적었다. 그리고 균사배양 후 형성되는 발이수가 고체중균을 접종한 배지가 액체중균을 접종한 배지보다 많이 형성되었으나 건실한 자실체

로 형성되는 수가 액체종균을 접종한 배지에서 오히려 많아 수량면에서 증수의 효과가 있었다.(사진 4)

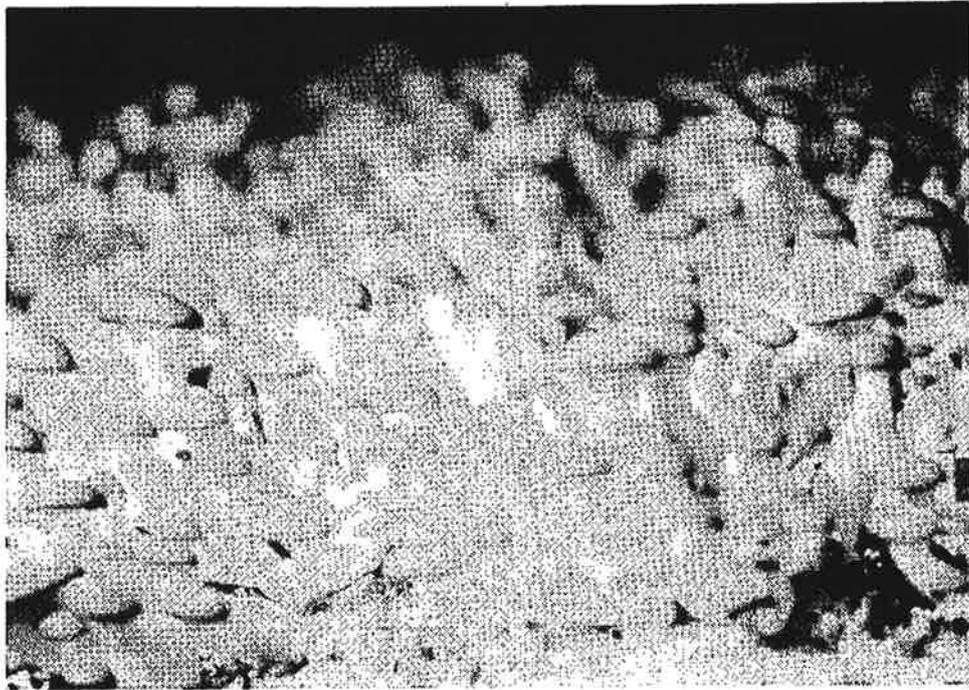


사진 4. 액체종균을 이용한 원형느타리버섯 자실체 형성

5. 재배법 개선에 관한 연구

가. 액체종균을 이용한 톱밥종균의 생산

톱밥종균을 생산하는 접종원으로서 공시된 느타리버섯 균 중에서 원형느타리 1호(PL.6)와 원형느타리 2호(PL.7)를 액체배양하여 종균을 생산하였으며, 균의 활력 및 버섯생산성을 시험하였다 액체종균을 접종원으로 이용할 경우 첫째 접종 작업시 접종인력 및 접종시간이 단축되었다. 즉 2인 기준으로 접종 작업을 수행하였을 때 약 1700병의 톱밥종균을 약 180~200분 정도의 시간이 소요되었다.

둘째 배양일수가 약 2~5일 정도 단축되었다. 고체종균을 이용한 종균생산시 배양기간을 약 25일정도 소요되고 있으나 액체종균을 이용한 종균생산시 배양기간 약 20~23일정도 소요된다. 즉 액체종균을 톱밥종균에 접종시 접종면적이 균일하고 전체적으로 접종되고, 접종된 액체종균은 배지에서 균사활착이 약 24시간이후부터 배지의 균사가 형성되면서 톱밥배지 전체로 뻗어 나가게 된다. 그러므로 배양과정에서 발생하는 잡균의 오염률이 감소하게 된다.

셋째 접종과정에서 발생하는 잡균의 오염률이 매우 낮다. 즉 액체종균의 접종기는 접종라인과 노즐로 구성되어 무균상내에서 작업이 가능하여 접종과정에 무균적으로 작업이 이루어진다.

넷째 액체종균을 접종한 톱밥종균은 균사배양이 빠르면서도 오염률이 낮은 우량한 톱밥종균의 생산이 가능하여 이런 톱밥종균을 실제로 버섯재배에 접종하였을 때 재배농가로부터 상당히 호평을 받을 수 있었다. 이는 모균주의 관리를 보다 철저히 해야한다는 것을 시사하고 있다. 따라서 종균배양소에 보다 널리 공급한다면 보다 우수한 종균을 공급하는 것이 가능하리라 사료된다.

나. 재배사 관리의 모델화

현재 느타리버섯의 재배에 이용되고 있는 재배시설 및 각각의 환경조절 방법이 매우 다양하므로 각각의 재배시설에 있어서 그 특징을 쉽게 파악하기가 좀처럼 용이하지는 않았다. 재배사 관리를 위한 환경조절인자로서는 온도, 습도, 광, 공기조성 등이 있다. 그 중에서도 재배 일선에서 실질적으로 그 관리의 어려움으로 나타나는 것은 환기에 따른 공기조성과 온·습도의 변화를 어떻게 하면 효과적으로 제어하느냐 하는 것이다. 온도의 급격한 격차는 심할 경우 갈반병의 발생을 가져오게 된다. 따라서 관수시에 사용하는 물은 될 수 있으면 재배사 온도와 거의 비슷하게 사용함으로써 이 병의 발생을 억제할 수 있다고 한다. 또한 선반재배에 있어서 재배사내를 상대습도가 높게 관리하기보다는 버섯 발생 부위의 상대습도를 높일 수 있는 표면관수가 보다 유리하였다. 표면관수시 가장 중요한 것은 관수 후 버섯에 잔존하는 물을 최대한 건조시켜 세균성 갈반병을 억제하는 것이다.

선반재배에 액체종균을 이용하여 본 결과 톱밥종균을 재식한 선반재배에서의 재배사 관리와 유사하였다. 그러나 관수에 의한 상대습도를 유지하는 재배의 경우 톱밥종균을 접종한 균상에서 코팅이 두껍게 되어 물이 흘러내리는 것과는 달리 균피의 코팅 정도가 액체종균의 경우 얇아서 수분 관리시 소량 급수하는 것이 유리하였다.

다. 액체종균을 이용한 우량톱밥종균 생산 연구

우량한 톱밥종균을 생산하기 위해서는 접종원으로 사용되는 액체종균이 잡균에 오염이 되지 않는 종균이어야 한다. 액체종균의 검색은 육안적, 후각적 판단에 의해 검색을 할 수 있으나 검색용배지에 배양이 완료된 균사체를 접종하므로써 잡균의 오염 여부를 확인할 수 있다. 그리고 액체배양에서 발생하는 세

균오염의 판별을 위하여 수분활성이 높고 자화가 용이한 질소원과 영양분이 풍부한 YMA배지를 세균 오염에 대한 검출배지로 사용하였으며, 사상균의 오염을 판별하기 위해서는 수분활성이 낮고 자화할 수 있는 영양분이 부족한 톱밥배지에서 배양하는 것이 한천평판 배지에서 배양하는 것보다 단기간 배양에 의하여 오염판별을 용이하게 할 수 있었다. 그리고 접종방법에 있어 분사식방법을 이용하므로 종균병내의 배지표면에 종균이 전체적으로 접종할 수 있게 하므로 배양기간의 균일화와 배양기간의 단축효과도 확인할 수 있었고, 외부로 노출된 배지표면에 느타리 균의 활착을 앞당기므로 배양기간 중에 발생할 수 있는 잡균의 오염을 최소화로 줄일 수 있었다.

라. 액체종균을 이용한 배양환경규명

환경요인으로는 온도, 습도, 광 및 환기조건 등이 있으나 상대습도에 따른 자실체 형성을 알아보기 위하여 이 실험을 수행하였다. 폐면을 이용한 상자재 배로 2주기까지의 자실체 수량을 수확한 결과 버섯의 자실체 형성시 습도조건인 80~90%에서 939.2g의 가장 높은 자실체 수량을 보였고 B,E(%)도 40.8%으로 가장 높았다. 그러므로 고체종균을 이용한 버섯형성 습도조건과 비슷함을 확인하였다.(표 29).

표 29. 버섯자실체 형성 최적 상대습도 조건

상대습도 (%)	건배지무게 (kg)	수확량(g)	B.E(%)	자실체수	1개자실체 중량(g)
75~80	2.3	720.34	31.32	276.3	10.44
85~90	2.3	939.22	40.84	242.8	11.64
90이상	2.3	774.89	33.69	260.1	8.94

6. 농가실증실험

가. 액체종균을 이용한 버섯재배

(1). 느타리버섯의 톱밥포트재배

본 연구개발사업의 일환으로 금사작목반에 대한 액체종균의 생산기술 및 버섯재배기술에 대한 기술이전 사업을 수행하였다. 액체종균의 생산공정 및 이용에 있어서 매우 괄목할만한 성장을 꾀하여 현재에는 안정적으로 느타리버섯을 재배하고 있다. 이와 같이 액체종균을 자체 생산하게 되면서부터 고품질의 우량종균을 농가에서 직접 생산할 수 있음을 입증하는 결과를 얻었다. 따라서 앞으로 더 많은 농가 및 농민이 원하는 경우 액체종균의 배양기술 이전사업을 적극추진 함으로서 버섯재배농가도 종균을 자체 생산할 수 있다는 성취감의 제공과 더불어 국내의 버섯재배농가의 질적인 향상을 꾀할 수 있을 것으로 사료된다.(사진 5)

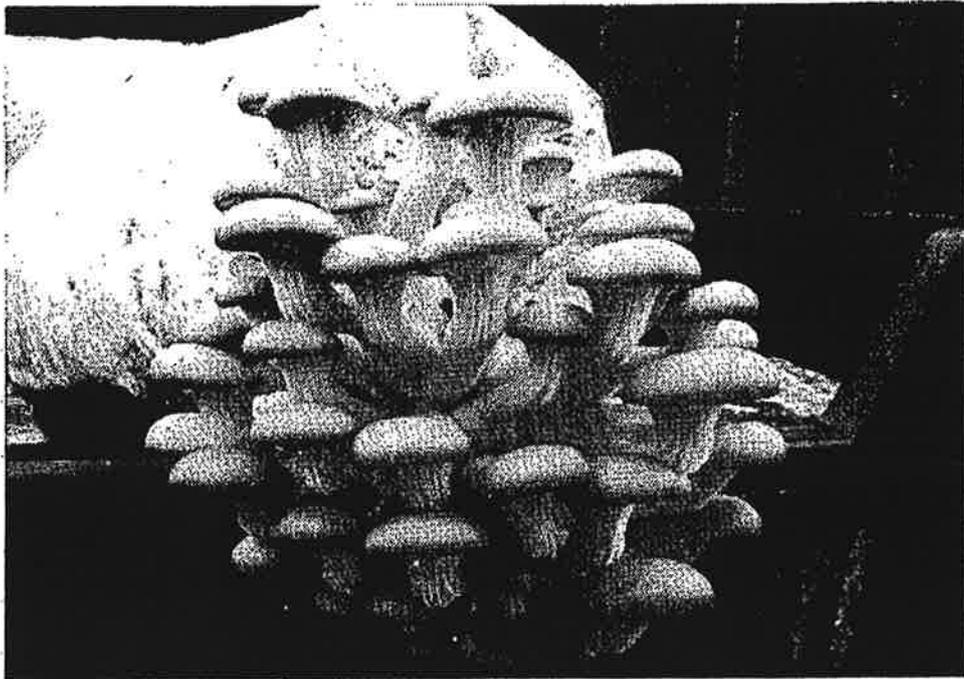


사진 5. 액체종균을 이용한 느타리버섯의 톱밥포트재배

(2). 느타리버섯의 벚짚다발재배

우리나라의 느타리버섯 생산량에 있어서 대부분을 점유하고 있는 느타리버섯의 선반재배에 대한 액체종균의 적용실험을 수행하기 위하여 느타리버섯 재배경력 10년 이상인 강원도 춘천 소재의 느타리버섯 벚짚다발재배 농가에서 시험사업을 실시하였다. 접종량 시험을 위하여 평당 4리터, 8리터를 1단의 전균상 및 2단, 3단, 4단의 선반에 액체종균을 접종하였다. 그러나 그 결과 배양 일수에는 다소의 차이는 있었으나 접종 30일 만에 거의 배양이 완료되었다. 그러나 톱밥종균과의 비교실험에 있어서는 톱밥종균의 접종배지에서 푸른곰팡이병이 대량으로 발생하여 정확한 비교실험이 불가능하였다. 그러나 액체종균을 접종한 배지에서는 푸른곰팡이병이 거의 발생되지 않았다. 따라서 액체종균의 선반재배에서의 접종량 구명도 잠정인 결과로 해석하였다. 그러나 톱밥종균의

접종배지에서 보다 액체종균을 접종한 배지에서 잠균 발생이 거의 없었으며, 발생된 버섯의 품질 또한 매우 우수하였다.

또한 춘천 소재의 다른 느타리버섯 벗짚다발재배 농가에서 시험사업을 실시하였다. 춘천 근교의 벗짚다발재배 농가에서 액체종균과 톱밥종균을 동일한 조건에서 재배하므로 그 장단점을 비교하였다. 먼저 배양일수에서는 액체종균을 이용한 균상에서는 약 30일 정도 소요되었고, 톱밥종균을 이용한 균상에서는 이보다 약 3일 정도 늦은 약 33일 정도 소요되었다. 그리고 발이기간은 거의 비슷하였다. 1주기 평당 수량면에서 톱밥종균의 경우 0.68평당 4718.5g이었고, 다발수는 62.6개이며 1다발에는 8.43개의 자실체수를 나타내었다. 이에 반해 액체종균의 경우 0.68평당 5992.6g이었고, 다발수는 85개이며, 1다발에는 5.96개의 자실체수를 나타내었다. 따라서 액체종균이 톱밥종균보다 수량면에서 우수하였고, 형성된 다발수에서도 많았고, 1개체의 자실체 중량도 무거웠다.(사진6)



사진 6. 액체종균을 이용한 느타리버섯의 벗짚다발재배

(3). 느타리버섯의 상자재배

근년에 들어와서 부각되고 있는 느타리버섯의 상자재배에 대한 액체종균의 적용성을 평가하기 위하여 폐면, 볏짚, 톱밥 등을 혼합한 발효배지를 이용한 느타리버섯의 상자재배 시험을 경기도 광주 소재의 농가에서 실시하였다. 접종량 실험을 위하여 43×43×10cm 상자의 혼합배지(폐면+볏짚+톱밥)에 액체종균을 200ml, 300ml, 400ml, 500ml를 혼합접종 및 표면 접종하였다. 그 결과 배양 완료일 수에는 다소의 차이는 있었으나, 접종 25일 만에 모두 배양이 완료되었다. 발생된 버섯의 품질도 양호하여 만족한 결과를 얻을 수 있었다. 재배하는 농민도 액체종균에 대하여 대단한 호감을 가지게 되었다.(사진 7)

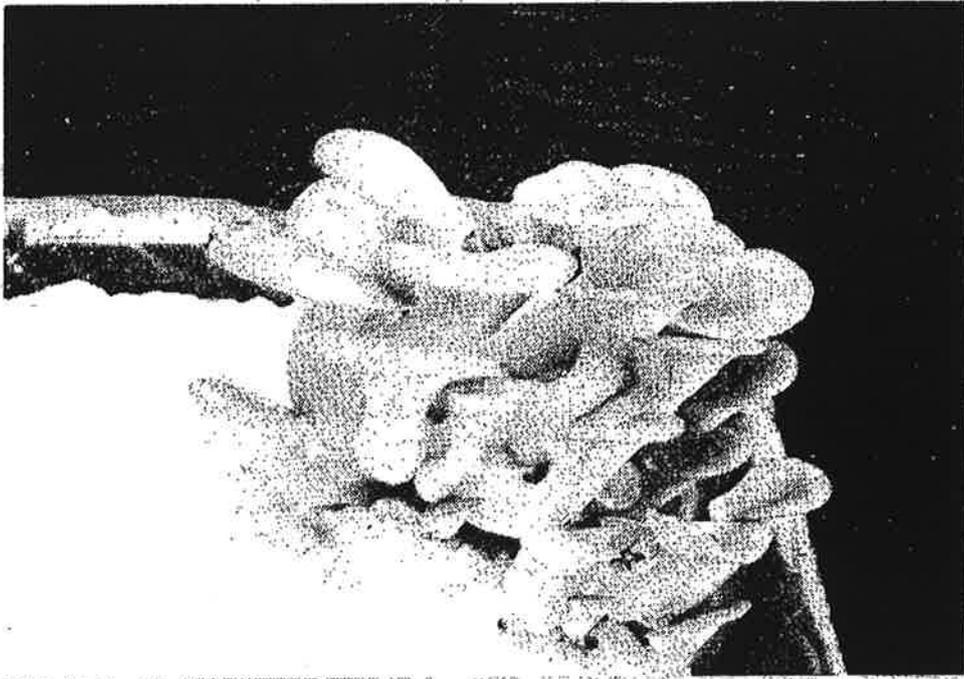


사진 7. 액체종균을 이용한 느타리버섯의 상자재배

나. 액체종균의 농업적 이용성 평가

본 연구개발 사업에 대한 종합평가로서 농업적인 이용에 필요한 염가의 액체배지 성분조성 및 액체종균의 배양장치를 개발함과 아울러 액체종균 생산의 모델화 및 느타리버섯 재배의 모델화를 궁극적 목표로 하여 연구개발사업을 수행하였다. 그 결과 염가의 액체배지로서 산업용배지를 선발함으로써 실험실 수준의 영양원보다 그 배지구입 가격을 대폭 낮춤으로서 액체종균의 농업적인 이용이 가능하리라고 본다. 또한 진탕플라스크 대신 일반삼각플라스크를 이용하여 진탕플라스크 배양의 효과를 피할 수 있었으며, 유리병과 플라스틱 배양병을 선발함으로써 실험실 수준의 배양장비를 탈피하여 농업적으로 이용이 가능한 배양장치를 개발하였다. 비록 통기 및 교반에 있어서 그 효율이 낮은 병을 액체종균의 배양기로 선발하였으나, 고가의 배양장치가 아니라는 점에서 그 가치를 찾을 수 있다. 그리고 배양장치 및 라인을 단순화함으로써 누구나 단기간에 그 조작 및 배양방법을 쉽게 익힐 수 있다는 것이다.(사진 8)

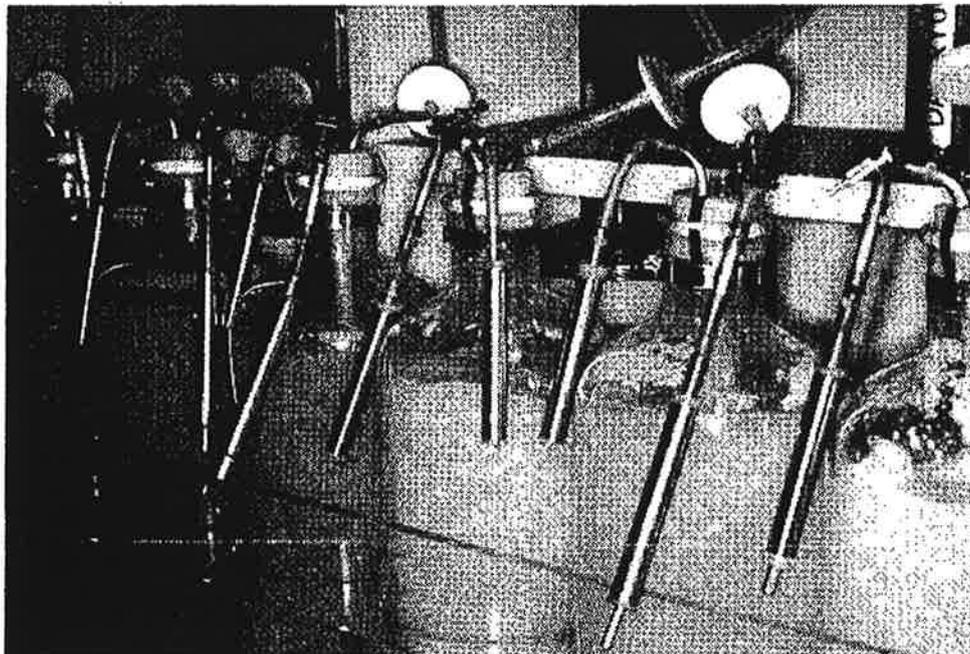


사진 8. 느타리버섯 액체종균의 대량배양

다. 액체종균의 유전성 조사

액체종균은 생리·생태적으로 톱밥종균과는 다른 배양방법으로 생산되므로 이에 따른 변이의 가능성을 전제하여 형질변이에 대한 유전적 안전성 조사를 수행하였다. 그 방법으로는 여러 가지의 방법이 생각될 수 있으나 본 연구개발 사업에서는 재배를 통하여 버섯의 상품적 가치에 큰 비중을 부여하여 실시하였다.

(1). 저장일수 및 운반환경 규명

배양이 완료된 액체종균의 저장환경을 확인하므로 액체종균의 대기일수를 연장하여 액체종균의 확보를 위해 5℃에서부터 30℃까지 5℃간격으로 온도를 달리하였고, 5일 간격으로 균사의 활력을 측정하기 위해 폐면이 충전된 시험관에 액체종균을 접종하였다. 그 결과 30℃에 저장한 액체종균의 경우 약 15일까지 균사의 활력을 유지하였으나 균사활력이 저장일수가 길어지면서 감소하였다. 그리고 20℃에서 저장한 액체종균의 균사활력의 경우 약 20일까지 배양초기의 균사생장과 차이가 없었으나 25일에서는 초기균사생장에 비해 균사활력이 절반으로 감소하였고 30일 저장하였을 때는 완전히 균사생장이 사멸하였다. 그러므로 저장가능일수는 25일까지 가능하나 종균으로서는 약 20일까지가 한계 저장일수라고 사료된다. 그리고 저온인 5~10℃에 저장한 액체종균의 경우 배지에 접종하였을 때 배지의 활착이 1~2일 정도 지연되었다가 정상적으로 균사가 형성되었다. 이것은 저온의 환경에서 실온으로 전환되면서 온도의 적응 시기가 필요한 것으로 사료된다.(그림. 13)

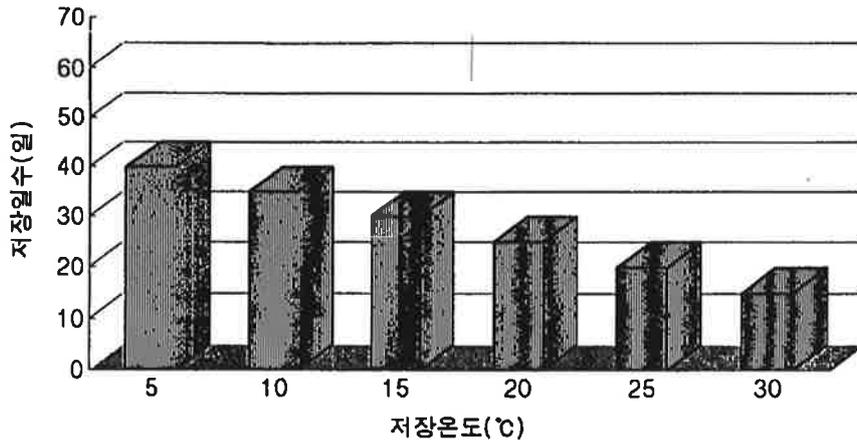


그림 13 . 원형느타리버섯 액체종균의 저장일수

(2). 액체종균의 세대별 유전안전성 규명

동일한 배지조건에서 5일간 배양된 종균을 다시 접종하여 10대까지 계대배양하면서 건조균체량과 균사의 활력의 변화를 확인하였다. 건조균체량의 경우 1대에서 10대까지 배양초기의 균체량과의 변화는 거의 없었다.(그림. 14)

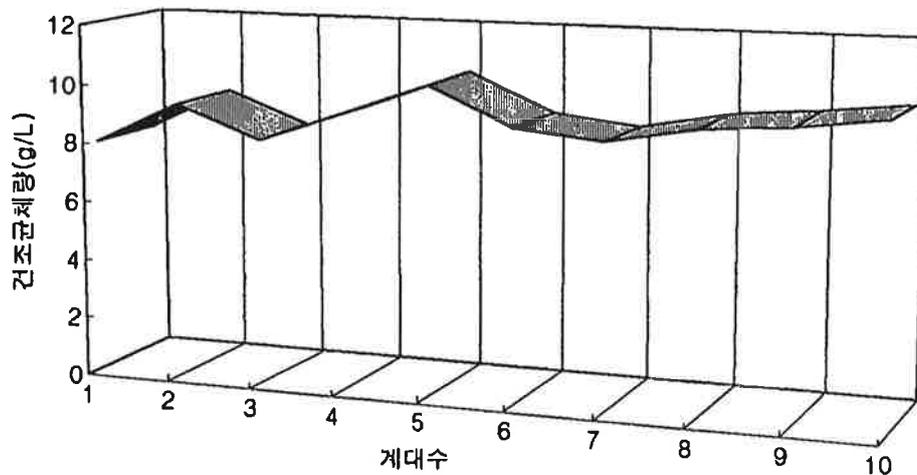


그림 14. 계대에 따른 건조균체량

계대에 따른 군사의 활력을 측정한 결과 군사의 활력에서도 초기 계대의 군사의 활력과 10대까지의 군사활력에서도 큰 변화는 없는 것으로 보아 계대수에 따른 종균의 안전성에는 이상이 없었다. (그림. 15)

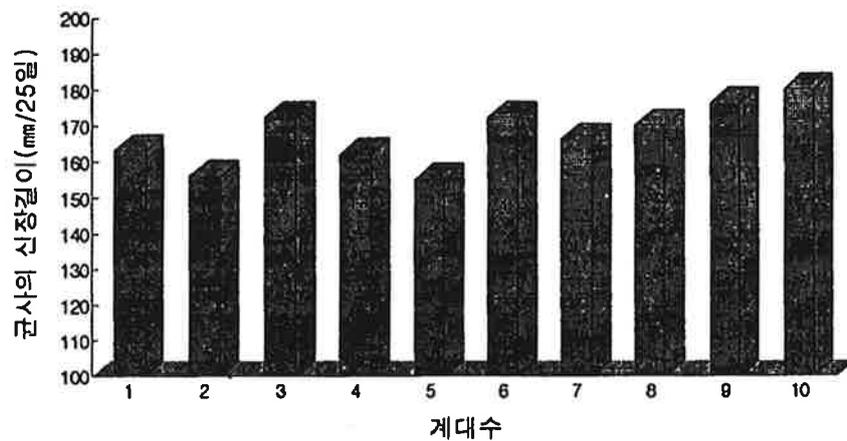


그림 15. 계대에 따른 군사성장량

그 결과 평판배양에서 병배양으로 액체종균을 생산하는 배양과정으로 액체종균을 생산한 경우 모든 느타리버섯 품종에서 건전한 버섯을 생산할 수 있었으며, 20℃에서 병배양된 액체종균을 20일간 저장한 다음 톱밥병배지에서 버섯형성시험을 수행한 결과 역시 어떤 기형버섯의 발생도 없었다. 따라서 지금까지의 버섯발생 결과를 종합한다면 액체종균을 사용함으로써 어떤 형질변이의 가능성도 엿볼 수 없었다. 그러므로 차후 버섯재배에 이용하여도 무방할 것으로 사료된다.

제 4 장 종합결과

1. 느타리버섯의 생육환경

공시된 느타리버섯 8 균주에 대한 평판배양용 배지의 선발시험을 통하여 맥아추출물과 펩톤, 그리고 효모추출물을 배지성분으로 하는 MYPA 배지를 선발하여 계대배양 및 접종원 배양의 한천배지로 이용하였다. 접종원의 배양은 MYPA 평판배지에서 전배양된 균총의 선단부분을 직경 6mm의 코크보러로 취하여 평판배양(petridish culture) 및 삼각플라스크 배양의 접종원으로 사용하였다.

본 연구개발과제에서 시험품종으로 공시한 느타리버섯 8품종의 생육환경은 느타리버섯 균의 일반적인 특성과 일치하였다. 본 연구개발과제에서 공시한 8 품종에 대한 균사생장 최적온도는 25~30℃로 조사되었으며, 균사생장에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 5.5~6.5 사이에서 가장 우수하였다. 그리고 액체종균 배양에 사용하는 모든 배지의 pH는 자연 pH로 하여 배지를 조제하였다.

삼각플라스크 배양환경을 보면 먼저 균사절편(직경6mm)을 1개에서 5개까지 한 개 간격으로 접종갯수를 달하여 접종원의 접종량에 따른 균사체 증식을 조사한 결과 접종량이 증가할수록 초기 균사체의 증식은 빠르게 증가함을 관찰할 수 있었으나 균사절편의 접종량 증가는 건조균체량의 증가와 비례하지 않는다는 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 삼각플라스크의 배양액량이 균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 배양액량이 100ml에서 최대 균사체의 건조량을 확인할 수 있었다. 그리고 삼각플라스크의 형태와 배양액량이 느타리버섯 8품종의 균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 삼각플라스크의 형태가 균

사체의 생산에 미치는 영향은 일반 삼각플라스크에서 보다 배플(baffle)이 있는 진탕용 삼각플라스크에서 균사체 생산량이 많았다.

진탕플라스크가 아닌 일반 삼각플라스크에서 배양방법을 달리하여 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 45° 경사배양과 직경 5mm의 유리막대를 넣고 배양한 처리구에서 균사생육이 우수하였다. 그리고 직경 10mm의 유리막대를 넣은 처리구는 대조구에 비하여 건조균체량은 적었으나 균사체의 생육형이 펄프형으로 균사체가 생육하였다.

8리터병배양에 접종량을 달리하여 실험한 결과 접종원을 4% 접종한 처리구에서 균사체 생산이 가장 우수하였다. 또한 접종량이 증가할수록 육안으로 확인 가능한 병배양 장치내의 균사밀도는 급격히 증가하였으며, 그 결과 병배양 기간이 단축되는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 통기량을 달리하여 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 통기량이 증가할수록 건조균사체 생산량이 증가하였다. 그러나 지나친 통기량에 의한 배지손실량을 가만한다면 0.5vvm(vol. of air/vol. of medium/min) 정도의 통기량으로 모든 실험을 수행하였다.

2 산업용 액체배지의 선발

느타리버섯 8품종에 대한 영양환경의 조사, 즉 액체배양용 배지의 선발을 위한 탄소원선발 실험에서 느타리버섯 속균의 모든 공시균주가 거의 대부분의 탄소원을 이용하였다. 탄소원은 미생물의 분해대사 및 합성대사 작용에 필요한 에너지와 생체내의 모든 물질의 골격을 구성하는 기본물질이기 때문에 영양분 중에서 가장 높은 농도로 요구되는 물질이다. 따라서 산업용 배지를 선발하기 위한 가장 중요한 선발기준이 되었던 것은 배지의 단가와 배지조제의 용이성이었다. 다음으로는 배지구입과 보관의 용이성 및 배지성분의 일관성이었다.

이러한 조건에 적합한 배지로서 탄소원으로 황백당을 선발하였고, 그리고 질소 원으로는 대두분을 산업용 배지로 선발하였다. 그러나 무기염류의 첨가구와 비첨가구에서 균사생장에 대한 뚜렷한 차이를 발견할 수 없어서 산업용 배지에서 제외하여 실험을 수행하였다.

3. 액체종균의 배양 장치 및 접종법

가. 배양장치

농업적으로 이용할 수 있는 액체종균 배양장치로 식용버섯 균의 균사체 배양이 가능하여 액체종균의 생산시 문제점이 전혀 발생하지 않는 염가의 액체 배양장치를 개발하기 위하여 장치비가 낮으며, 구조가 간단한 기포탑형의 배양 용기를 선발하였다. 기포탑형 발효조는 통기에 의한 산소전달의 목적 달성 외에도 통기에 의한 밀도구배의 발생으로 배양액의 혼합이 달성되는 이중의 효과를 갖게 된다.

액체배양용 배양장치의 용기로는 배양액량이 8리터, 10리터, 20리터인 원통형의 내열성 유리병을 선발하여 배양용기의 적합성을 시험하였다. 그 결과 본 연구개발과제에서 시행하는 기포탑형 배양방식에는 배양용기의 높이 대 직경의 비가 높은 배양액량 8리터의 원통형 유리병을 본 배양용 배양용기로 선발하였다. 그러나 내열성 유리병은 가격이 고가이면서 취급상의 부주의로 인한 파손 및 배지액량을 완전히 충전된 상태에서는 배양병의 무게가 무거운 단점 등이 발견되어서 가격이 싸며 취급이 용이하고 대량의 액체배지를 확보할 수 있는 시판용 생수병(18.9리터)을 사용한 결과 내열성 유리병에 비해 액체종균 생산면에서 뚜렷한 차이점을 발견하지 못하였으나 고온고압의 살균과정에서 급격한 기압변화를 일으켰을 때 유리병에 비해 파손의 확률이 높고, 접종과정에서 높은 공기압을 배양기내로 주었을 때에는 공기압에 의한 배양병의 파손

의 단점을 가지고 있다. 그리고 살균과정을 통해 배양병 표면에 작은 금이 형성되어 사용횟수를 증가할수록 배양병의 내구성이 점점 약화되는 것을 관찰할 수 있었다.

그리고 배양라인은 통기배양을 위한 통기관과 배기관, 접종원의 접종관 및 배양액 채취관을 통합하여 각각 1라인씩 연결하였다. 실리콘 마개에 코크보아로 3개의 구멍을 만들어 위의 3라인을 연결하여 배양기를 밀봉하였다. 그리고 통기라인은 배양용기의 제일하부에 놓이게 하였으며, 배기라인은 마개의 말단에 놓이게 하였고, 배양액에 접종 및 배출라인은 바닥으로부터 일정간격을 띄움으로서 배양액의 배출이 쉽게하였다

그리고 배양액의 접종과 배출시 접종관과 접종라인의 신속한 연결을 위하여 무균연결관(quick connector)를 연결하여 사용하였다. 또한 식용버섯 균 한 균주만을 순수 배양하고자 할 경우 삼각플라스크나 시험관 배양에서는 면전을 통하여 유통되는 공기의 무균성 확보가 비교적 쉽게 달성된다. 그러나 통기배양에서는 대기중 부유성 오염원을 포함하고 있는 다량의 공기를 배양액 내부로 강제 공급하게 되기 때문에 통기배양에서는 공기제균 조치가 배양액의 무균성 확보에 매우 중요한 영향을 미친다.

본 연구에서는 제균효율이 매우 높고 연결 및 취급이 간편한 시판용 공기필터(PVA filter, 0.2 μ m)와 실험실에서 제작한 섬유층진필터(deep filter)를 사용하였다. 섬유층진필터는 외경 19mm, 내경 18mm, 길이 120mm의 스테인레스관에 직경 28mm의 플라스틱 섬유구를 5~7개 충전하였으며, 외경 8mm와 9.5mm의 스테인레스관을 각각 실리콘마개 5호 2개로 양쪽을 막아서 제작하였다.

그리고 호기성 미생물의 발효에서는 배양장치 내부로 산소를 공급하기 위한 통기조작으로 인하여 배지조성과 균주에 의존하여 거품이 발생하게 된다. 배양시 거품의 발생은 배양액의 손실을 초래하는 사이펀(siphon)현상이 일어날 수 있으며, 또한 거품 위로 떠오른 균사체는 영양분의 결핍 또는 자기분해로 사멸하기 때문에 배양기에서 거품의 발생억제는 반드시 필요하다. 그러므로 거

품의 발생을 억제할 뿐만 아니라 식용버섯 균의 생육촉진 및 에너지원으로 이용된다고 보고된 식물성 기름을 소포제로 사용하였다. 그 첨가량은 약 30 ± 10 ㎍로 첨가하였다.

나. 접종방법 및 접종기구의 개발

접종과정 중 무균적으로 접종을 해야하는 병재배 및 톱밥종균의 생산에 사용되는 접종방법에는 분출식 접종법과 분출식에 압축공기압을 이용한 분사식 접종법을 비교 분석하였다. 즉 같은 접종량으로 접종면적을 넓히기 위해서는 분사식 접종방법이 더욱 유리하다. 그리고 이러한 분사식 접종방법에는 일정한 각도로 액체종균을 분사해 주는 노즐 및 압축공기압을 조절하여 사용하여 접종과정에서 배지이외에 다른 부위의 접촉을 방지하므로 잡균의 오염을 최소로 해주어야 한다.

그리고 선반식 재배방법에는 접종과정에서 병재배와 같이 외부로 종균의 노출을 방지해 주지 않아도 선택적으로 종균과 배지가 외부로 노출되므로 반드시 무균성 확보가 필요하지 않았다. 그러므로 병재배식의 접종방법을 사용하여 접종하면 접종관이 수미터가 필요하고, 접종관이 길어져 고압으로 병에 압력을 주어야 하므로 배양병의 물리적 파손의 위험이 있다. 그러므로 고압에 견디는 스텐레스탱크를 이용한 방법, 즉 배양이 완료된 액체종균을 별도의 스텐레스탱크에 옮긴 후 탱크내로 고압을 가함으로써 고압에 의한 분출식 방법을 사용한 결과 버섯의 배양과정 중에 다른 잡균의 오염과 같은 불리한 결과를 발견하지 못했다.

그리고 연동펌프(Peristaltic Pump)을 이용할 경우 배출라인에 접종관을 직접 연결하여 사용할 수 있으나 고속의 펌프회전수에 의한 배양된 펠렛의 절단된 상태로 버섯배지에 접종하게 되므로 액체종균의 절단현상이 일어난다.

4. 적정배지의 선발 및 부산물 이용

액체종균을 이용한 병재배에서 톱밥배지에 팽연왕겨 혼합물에 따른 에너타리 수량을 보면 액체종균 접종배지에서는 배양완성율이 팽연왕겨 혼합물에 따른 경향은 없었으며 93.4% 이상으로 양호하였고 버섯수량도 팽연왕겨 혼합물에 따른 경향은 없이 톱밥배지 100% 수량(57.0%)에 비하여 85.6-113.0%범위의 양호한 수량을 보였으며 특히 톱밥60%+팽연왕겨40% 혼합배지 수량이 64.4g/병으로 13%의 증수를 보여 가장 양호한 배지 조건으로 사료되었다. 톱밥종균을 접종한 배지에서는 배양완성율이 59.8-98.2%범위로 액체종균에 비하여 저조하였으며 수량에 있어서도 현저히 저조한 수량을 보였으나 톱밥 100% 배지 버섯수량(33.8g/병)에 비하여 팽연왕겨 혼합배지가 94.4-157.7%범위의 증수를 보여 팽연왕겨 혼합효과가 현저하였으며 특히 톱밥60%+팽연왕겨 40% 혼합배지가 157.7%, 톱밥50%+팽연왕겨50%혼합배지도 151.8%의 수량증수를 보여 톱밥종균을 사용할 때는 팽연왕겨 혼합배지가 유리한 것으로 확인되었다.

농업부산물과 가공부산물의 이용으로 각 배지의 물리성을 보면 저장 중 수분함량은 톱밥 0.11%, 옥수수이삭속 0.20%, 팽연왕겨 0.13%로 옥수수이삭속이 다소 많은 경향이었으며 배지조제 후는 톱밥 65~67%, 옥수수이삭속 62~65%, 팽연왕겨 58~62%로 팽연왕겨 수분함량이 가장 적은 경향이였다. 이는 상대적으로 무거운 팽연왕겨가 수분을 잘 흡수하지 못하는 성질을 반영하는 것으로 사료된다. 입도분포는 톱밥의 경우 1.0mm이하가 30%, 1.0~2.0mm 45%, 2.0mm이상 25%였으며 옥수수이삭속은 같은 입도범위에서 각각 12, 18, 70%였고, 팽연왕겨는 32, 56, 12%로 배지의 공극은 톱밥이 가장 작고 팽연왕겨가 중간정도이며 옥수수이삭속이 가장 큰 것으로 나타났다. 또한 화학적 성질을 보면 배지재료의 산도는 팽연왕겨가 6.5로 톱밥 5.2에 비하여 다소 높으나 옥수수이삭속은 5.3으로 비슷하였다. C/N율은 톱밥이 1120, 옥수수이삭속

이 158, 팽연왕겨는 86이었다.

배지재료 혼합율에 따른 애스타리 버섯의 생육상황을 보면 균사신장량은 일정한 경향이 없이 50.6~63.0mm정도였으며 배지조제 후에 배지의 산도는 5.8~6.2범위로 배지조제전과 대차가 없었으며 전기전도도는 팽연왕겨를 혼합하는 비율이 높아지면 따라서 같이 높아지는 경향이었다.

배지 혼합율별 버섯의 생산량을 비교한 결과 대조구 톱밥배지의 수량 43.8g/병에 비하여 톱밥80%+팽연왕겨20%혼합배지 수량이 41.3g/병으로 94.3%에 달하였고 톱밥80%+탄화왕겨20%혼합배지가 41.7g/병으로 95.2%에 달해 이 두 처리가 수량이 양호한 경향이었다.

액체종균 원목재배 활용 가능성 검토에서는 포플리와 버드나무 원목은 톱밥종균 접종에서는 균사활착과 버섯발생이 되었으나 액체종균원목에서 포플리와 버드나무는 균사활착이 확인되었으나 버섯발생은 보이지 않았다.

여름느타리 액체종균을 이용한 발효배지 비닐포트 재배에서 콩짚이 167.0g/포트 옥수수짚이 106.9g/포트로 콩짚과 옥수수짚에 수량이 더 많아 액체종균 활용 배지 재료로 이용가치가 확증되었다.

면실박 발효배지에 애스타리 액체종균 활용성을 검토한 결과 3주기까지의 수확량을 보면 2.900g/상자 이 생산되어 면실박 발효배지의 애스타리 액체종균 활용가능성이 확인되었다.

액체종균을 이용한 균상재배에서 액체종균의 접종량을 조사한 결과 평당 약 5~9리터정도의 접종량에서는 배양에 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 경제적인 측면에서 평당 6리터 정도로 접종하게 되었다. 또한 고체종균에 비해 액체종균이 배양일수에서 거의 비슷하였으며 배양과정에서 균상에 발생하는 병해 피해면적은 액체종균을 접종한 처리구에서는 고체종균을 접종한 처리구에 비해 발병면적이 적었으며 발이수에서는 고체종균의 발이수가 많이 형성된 반면 액체종균의 경우 발이수는 적은 적었다. 그러나 형성된 발이의 대부분은 모두 건실한 자실체로 형성된 반면 고체종균의 경우 발이수에 비해 건실한 자

실체수가 적었다. 그러므로 자실체 수량에서 거의 차이가 없었다.

5. 재배법개선에 관한 연구

액체접종원을 사용하여 톱밥종균 생산을 수행한 결과 먼저 접종 작업시 접종인력 및 접종시간이 단축되었다. 그리고 배양일수가 약 2~5일 정도 단축되었으며, 잡균 발생이 대폭 감소하였다. 또한 버섯배지에서 균사활력이 높아 재배농가로부터 상당히 호평을 받을 수 있었다. 이는 모균주의 관리를 보다 철저히 해야한다는 것을 시사하고 있다. 따라서 종균배양소에 보다 널리 공급한다면 보다 좋은 종균을 공급하는 것이 가능하리라 사료된다. 그러나 살균 및 후발효가 불완전한 배지에서는 액체종균이 배지에 적응하는 과정에서 잡균에 의해 배지 전체가 오염되므로 고체종균에 비해 배지상태에 매우 민감하다. 또한 접종시 고체종균은 톱밥종균병을 부수고 톱밥을 파쇄하는 단계를 걸쳐 배지에 접종하므로 접종시간 및 노동력이 많이 소요되는 반면에 액체종균은 배지에 직접 종균을 뿌려 주므로 접종시간 및 노동력이 적게 소요된다. 그리고 톱밥종균 생산시 액체종균 접종기의 세척 및 살균이 용이하며 접종기의 단가가 낮은 장점이 있다.

현재 느타리버섯의 재배에 이용되고 있는 재배시설 및 각각의 환경조절 방법이 매우 다양하므로 각각의 재배시설에 있어서 그 특징을 쉽게 파악하기가 좀처럼 용이하지는 않았다.

선반재배에 액체종균을 이용하여 본 결과 톱밥종균을 재식한 선반재배에서의 재배사 관리와 유사하였다. 그러나 관수에 의해 상대습도를 유지하는 재배의 경우 톱밥종균을 접종한 균상에서 코팅이 두껍게 되어 물이 흘러내리는 것과는 달리 균피의 코팅 정도가 액체종균의 경우 뚜렷하지 않음으로 수분 관리시 소량 급수하는 것이 유리하다.

우량한 톱밥종균을 생산하기 위해서는 접종원으로 사용되는 액체종균이 잡균에 오염이 되지 않는 종균이어야 한다. 액체종균의 검색은 육안적, 후각적 판단에 의해 검색을 할 수 있으나 검색용배지에 배양이 완료된 균사체를 접종하므로 잡균의 오염 여부를 확인할 수 있다. 그리고 접종방법에 있어 분사식방법을 이용하므로 종균병내의 배지표면에 종균이 전체적으로 접종할 수 있게 하므로 배양기간의 균일화와 배양기간의 단축효과도 확인할 수 있었고, 외부로 노출된 배지표면에 느타리 균의 접령 시기를 앞당기므로 배양기간 중에 발생할 수 있는 잡균의 오염을 최소화할 수 있었다.

그러므로 액체종균을 톱밥종균의 접종원으로 접종한 결과 톱밥종균을 접종하였을 경우에는 배양기간이 약 20~25일 정도 소요된 반면 액체종균을 접종하였을 경우에는 약 18~20일 정도로 배양기간을 단축할 수 있었다. 이는 원균을 직접 액체배양한 균사체의 활력이 고체종균보다 좋고 균일한 접종을 통해 배양기간의 단축된 것으로 사료된다. 그리고 접종과정에서도 액체종균은 접종하는 과정이 단순하면서 간편하여 무균상내에서 접종이 가능하므로 잡균오염률을 낮출 수 있었다.

6. 농가실증 실험

느타리버섯의 톱밥포트재배로 액체배양으로 생산된 액체종균을 접종원으로 하여 톱밥포트재배를 농가에서 실시한 결과 톱밥종균을 접종원으로 사용할 때보다 접종작업이 용이하였으며, 접종능률도 증가하였다.

우리나라의 느타리버섯 생산량에 있어서 대부분을 점유하고 있는 느타리버섯의 선반재배에 대한 액체종균의 적용실험을 수행하기 위하여 느타리버섯 재배경력 10년 이상인 강원도 춘천 소재의 느타리버섯 벗짚다발재배 농가에서 시험사업을 실시하였다. 그 결과 배양과정에서도 톱밥종균에 비해 배양기간 및

자실체 형성에서도 불리한 단점을 확인하지 못했다. 그러나 각 농가마다 재배 환경이 각기 달라서 종합적인 검토작업에 있어 어려움이 있었다.

근년에 들어와서 부각되고 있는 느타리버섯의 상자재배에 대한 액체종균의 적용성을 평가하기 위하여 폐면, 벚짖, 톱밥 등을 혼합한 발효배지를 이용한 느타리버섯의 상자재배 시험을 경기도 광주 소재의 농가에서 실시하였다. 접종량 실험을 위하여 43×43×10cm 상자의 혼합배지(폐면+벚짖+톱밥)에 액체종균을 200ml, 300ml, 400ml, 500ml를 혼합접종 및 표면 접종하였다. 그 결과 배양 완료일 수에는 다소의 차이는 보였으나, 접종 25일 만에 모두 배양이 완료되었다. 발생된 버섯의 품질도 양호하여 만족한 결과를 얻을 수 있었다. 재배하는 농민도 액체종균에 대하여 대단한 호감을 가지게 되었다.

본 연구개발 사업에 대한 종합평가로서 농업적인 이용에 필요한 염가의 액체배지 성분조성 및 액체종균의 배양장치를 개발함과 아울러 액체종균 생산의 모델화 및 느타리버섯 재배의 모델화를 궁극적 목표로 하여 연구개발사업을 수행하였다. 그 결과 염가의 액체배지로서 산업용배지를 선발함으로써 실험실 수준의 영양원보다 그 배지구입 가격을 대폭 낮춤으로서 액체종균의 농업적인 이용이 가능하리라고 본다. 또한 진탕플라스크 대신 일반삼각플라스크를 이용하여 진탕플라스크 배양의 효과를 피할 수 있었으며, 유리병과 플라스틱 배양병을 선발함으로써 실험실 수준의 배양장비를 탈피하여 농업적으로 이용이 가능한 배양장치를 개발하였다. 비록 통기 및 교반에 있어서 그 효율이 낮은 병을 액체종균의 배양기로 선발하였으나, 고가의 배양장치가 아니라는 점에서 그 가치를 찾을 수 있다. 그리고 배양장치 및 라인을 단순화함으로써 누구나 단기간에 그 조작 및 배양방법을 쉽게 익힐 수 있다는 것이다.

액체종균은 생리·생태적으로 톱밥종균과는 다른 배양방법으로 생산되므로 이에 따른 변이의 가능성을 전제하여 형질변이에 대한 유전적 안정성 조사를 수행하였다. 먼저 액체종균의 저장일수 및 운반환경으로 액체종균의 저장에 대한 불안정한 요소로서 온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 5~30℃사이의 범

위에서 5℃간격으로 배양이 완료된 액체종균을 저장하면서 5일 간격으로 액체종균을 채취하여 폐면을 충전한 시험관 및 850cc용량의 병에 각각 접종하였다. 그 결과 고온에서부터 저온으로 내려갈수록 저장일수에 따라 균의 활력이 떨어지는 것을 확인하였다. 즉 30℃에 저장한 종균의 경우 저장을 시작한 날로부터 약 15일이 경과하였어도 균사의 활력에는 초기의 상태에 비해 큰 차이가 없었으나 약 20일이 경과한 후 균사활력이 조금씩 떨어지면서 약 25일이 경과한 후에는 완전히 균사활력을 상실하였다. 그리고 25℃에 저장한 액체종균은 약 30일이 경과한 후에서 완전히 균사활력을 상실하였다. 그러므로 배양이 완료된 액체종균은 저장온도에 따라 사용 가능한 저장일수를 고려하여 사용이 가능하다. 그리고 지금까지의 버섯발생 결과를 종합한다면 액체종균을 사용함으로써 어떤 형질변형을 엿볼 수 없었다.

액체종균의 세대별 유전안정성 실험으로 동일한 배지에 계대가 계속됨에 따라 균사의 유전성에 나타나는 문제점을 확인하기 위해 이 실험을 수행하였다. 즉 1세대의 배양은 5일간 배양하고, 배양이 완료된 종균에서 2%의 접종원을 채취하여 동일한 배지와 배양환경에서 다시 5일간 배양을 계속하므로 톱밥종균에서 나타나는 계대수의 증가에 의한 균의 퇴화등 유전적 안전성이 액체종균에도 적용되는지를 알아본 결과, 10대까지 계대하였으나 1대 배양한 액체종균의 균사활력과 균체량의 차이는 확인할 수 없었다. 그러므로 대량배양에 필요한 접종원을 삼각플라스크를 이용하여 생산할 경우 많은 접종원이 필요하여 작업량이 증가하나 이 실험을 통해 알 수 있듯이 대량배양에 필요한 접종원 배양에 삼각플라스크배양 대신 유리배양기를 이용하여 배양을 하면 많은 양의 접종원을 생산할 수 있다. 이 실험을 통해 동일한 배양체제에서 균사의 생장은 동일한 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 액체배양 균사체인 액체종균을 톱밥배지와 벗짚배지에 접종하여 버섯생산실험을 수행한 결과 버섯의 안정적인 생산을 꾀할 수 있었을 뿐만 아니라 버섯의 품질면에서도 각 품종의 형질변이를 전혀 발견할 수 없었다. 액체종균의 버섯생산 능력이 안정적이라는 사실은 액

상의 배양환경 하에서도 변이의 발생이 없다는 것으로 판단하였다. 그래서 톱밥종균의 접종원으로 액체종균을 이용한 결과 종래의 톱밥종균(1세대 또는 2세대의 톱밥종균)을 접종원으로 하여 배양한 톱밥종균에서 보다 벗짚 또는 폐면 선반재배에서 균사활력이 증강되는 것을 관찰할 수 있었다.

7. 액체종균을 이용한 농가에서의 문제점 조사

느타리버섯재배에서 벗짚, 폐면 등의 발효배지를 가장 많이 사용하고 있다. 발효배지는 비선택성 영양원을 미생물의 작용으로 버섯균만이 선택적으로 이용할 수 있도록 전환시키는 과정이다. 그러므로 배지 조제시 적절한 처리과정을 걸친 배지에 액체종균을 접종하였을 때는 균사의 배양과 자실체 형성이 우수하나 불완전한 배지처리에서는 고체종균에 비해 배지적용력이 떨어지므로 배양이 되기 전에 잡균에 의해 배지가 모두 오염되는 문제점이 나타나 배지처리과정이 매우 중요함이 관찰되었다. 그리고 액체종균의 균사체는 액상의 배양단계에서 고체배지로의 전환과정이 필요하므로 이때 고체종균에 비해 건조에 대하여 쉽게 활력이 떨어지는 단점이 관찰되므로 균사배양시 습도유지에 특별한 관리가 필요하다.

그리고 액체종균의 제조과정 중에는 외부에 종균이 순간적으로 노출되므로 배양과정에서 잡균에 오염이 쉽게 된다. 그러므로 액체종균의 접종과 배양과정의 오염요인의 경로와 잡균의 유·무를 신속히 파악할 수 있는 기술이 반드시 필요하다. 이는 곧 균에 대해 어느 정도 지식을 갖추어야 하고 무엇보다도 액체종균 생산의 전과정이 무균적 조작이 가능해야 한다. 액체종균은 식용균이 쉽게 이용할 수 있는 배지에서 선택적으로 배양하는 과정으로 이런 식용균보다 증식속도나 전파력이 강한 잡균과의 경쟁에서 매우 약하므로 액체배지의 살균과 종균의 접종과정 및 배양단계에서도 특별한 주의가 요구된다.

제 5 장 적 요

본 연구개발과제에서는 느타리버섯 액체종균을 이용한 느타리버섯의 생산에 관한 연구로서 국내에서 재배되고 있는 느타리버섯의 균사영양환경에 알맞는 액체배지를 선발하여 액체종균을 배양함과 동시에 농업적으로 이용이 가능한 염가의 배양장치를 개발하는데 그 목적이 있다. 다음으로 액체종균의 실용화에 대한 기초 연구로서 다양한 재배기질과 재배법에서 액체종균을 이용하여 버섯 재배를 수행하였다. 또 액체종균을 이용한 느타리버섯 재배를 농가에서 실시함으로써 액체종균 배양기술의 이전에 따른 문제점을 해결함으로써 장래 액체종균을 농가에서 이용하는데 필요한 실용적인 측면을 연구하였다.

가. 본 연구개발과제의 공시균주인 느타리버섯 8품종(농기 2-1, 농기 201호, 농기 202호, 사철느타리, 여름느타리, 원형느타리 1호, 원형느타리 2호, 애느타리 1호)의 균사생육에 적합한 온도 및 pH는 각각 25~30℃와 5.5~6.5로 조사되었다.

나. 농업적으로 이용이 가능한 산업용 액체배지의 탄소원으로 황백당을, 그리고 질소원으로는 대두분을 각각 선발하였다. 그리고 부산물을 이용한 배지성분으로는 당밀 4%와 옥수수침지액 0.5%를 조성으로 하는 부산물 배지를 선발하였다.

다. 액체배양장치로는 배양액량이 8리터인 원통형의 내열성 유리병을 선발하였으며, 배관으로는 집중라인과 배양액 채취라인을 겸하는 라인 1개에 통기관과 배기관을 각각 1개 라인씩 총 3개 라인을 연결하였다. 압축공기는 컴프레서를

이용하여 공급하였으며, PVA필터와 섬유층진필터로 공기제균을 행하였다. 그리고 소포제로서는 시판 소포제와 식물성 유지를 사용하였다.

라. 액체종균을 이용하기에 적당한 기질은 기존의 버섯배지이면 충분하였다. 즉 국내의 톱밥종균으로 생산되는 병배지에서 액체종균을 접종하여 버섯을 재배하였을 때 어떠한 문제점을 발견할 수 없었다. 또 품종의 형질변화와 같은 문제점을 현재까지 발견할 수 없었던 것으로 미루어 액체종균 사용에 따른 유전적 안정성에는 이상이 없었다.

마. 액체종균을 농가에 보급하여 실용화시키는 농가실증시험을 실시한 결과 액체종균 배양기술의 습득과 이용에는 다소 어려움이 있었으나 현재 금사느타리 버섯 작목반에서는 자가 배양된 느타리버섯 액체종균으로 버섯을 재배하는데 성공하였다.

바. 액체종균의 저장실험을 수행하였다. 즉 5℃에서는 약40일까지 저장이 가능하다. 그리고 액체종균을 이용한 느타리버섯 재배환경은 톱밥종균을 이용한 버섯재배환경과 거의 비슷하였다.

사. 액체종균의 장점으로서는 종균의 생산일수와 대량확보가 쉽다. 그리고 배지에 접종과정이 간편하다. 또한 톱밥종균 생산에 적용시 배양기간의 단축, 균일한 균의 연령, 오염률이 낮다.

제 6 장 인 용 문 헌

1. Alum, A. and Khan, S. M. 1989. Utilization of sugar industry for the production of filamentous protein in Pakistan. *Mushroom Sci.* 12(2) : 15-22.
2. Bano, Z. and Rajarathnam, S. 1982. Studies on the cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. *J. Mushroom* 115 : 243-245.
3. Bano, Z., Rajarathnam, S. and Nagaraja, N. 1978. Some aspects on the cultivation of *Pleurotus flabellatus* in India. *Mushroom Sci.* 10(2) : 597-608.
4. Bano, Z. and Strivastava, H. C. 1962. Studies on the cultivation of *Pleurotus* spp. on paddy-straw. *Food Science* 12 : 363-365.
5. Bassous, C., Chahal, D. S. and Mathieu, L. G. 1989. Bioconversion of corn stover into fungal biomass rich in protein with *Pleurotus sajor-caju*. *Mushroom Sci.* 12(2) : 57-66.
6. Block, S. S., Stearns, T. W., Stephens, R. L. and McCandless, R. F. 1953. Mushroom mycelium experiments with submerged culture. *Mushroom Sci.* 3 : 261-268.
7. Block, S. S. 1959. Developments in the production of mushroom mycelium in submerged liquid culture. *Mushroom Sci.* 4 : 287-293.
8. Block, S. S., Tsao, G. and Han, L. 1958. Production of mushroom from sawdust. *J. Agric. Food. Chem.* 6 : 923-927.
9. Block, S. S., Tsao, G. and Han, L. 1959. Experiments in the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Sci.* 4 : 309-325.
10. Bukahalo, A. S. 1974. Cultural studies on edible palisade fungi of Ukraine. *Mushroom Sci.* 9(1) : 707-713.
11. Bukahalo, A. S. and Solomko, E. F. 1978. Submerged culture growth of

Pleurotus ostreatus(Fr.) Kumn. on complex media. *Mushroom Sci.* 10(1) : 833-841.

12. Chang, S. T., Buswel, J. A. and Chiu, S. W. 1993. Mushroom biology and mushroom products. The Chinese University Press.

13. Chang, S. T. and Hayes, W. A. 1978. The biology and cultivation of edible mushroom. Academic press. New York.

14. Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. "Edible mushrooms and their cultivation". CRC press, Inc., 27-40, 185.

15. Cho, K. Y., Nair, N. G., Bruniges, P. A. and New, P. B. 1981. The use of cotton seed hulls for the cultivation of *Pleurotus sajor-caju* in Australia. *Mushroom Sci.* 11(1) : 679-690.

16. Chung, H. C. 1983. Studies on the fermentation of rice straw substrates for cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 11 : 177-181.

17. Chung, H. C., Park, Y. H. and Kim, Y. S. 1981. Basic informations on the characteristics of strains of oyster mushroom. *Kor. J. Mycol.* 9(3) : 129-132.

18. Danai, O., Levanon, D. and Silanikove, N. 1989. Cotton straw silage as a substrate for *Pleurotus* spp. cultivation. *Mushroom Sci.* 12(2) : 81-90.

19. Eger, G., Gottwald, H. D. and von-Netzer, U. 1974. The action of light and other factors on sporophore initiation in *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Sci.* 9(1) : 575-583.

20. Espenshade, M. A. 1962. Mushrooms and Toadstools their growth in liquid media using deep culture techniques. *Mushroom Sci.* 5 : 213-217.

21. Falck, R. 1917. Uber die Waldkultur des Austernpilzes(*Agaricus ostreatus*) auf Laubholzstubben. *Z. Forest-Jagdwes.* 49 : 159-165.

22. Fortin et al. 1990. Production of edible mushroom, particulary *Pleurotus*

or *Volvariella*, with liquid spawn and pasteurized substrate. *U. S. Patent*, 4,997,702.

23. Fukushima, Y., Okada, K., Kawai, G. and Motai, H. 1991. Efficient production of mycelium of *Lentinus edodes* by a continuous culture. *Mushroom Sci.* 13(2) : 721-725.

24. Ganeshan, G., Tewari, R. P. and Bhargava, B. S. 1989. Influence of residual vegetable crop biomass on yield and mineral content of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Mushroom Sci.* 12(2) : 91-97.

25. Go, S. J., Park, Y. H. and Cha, D. Y. 1981. Studies on the artificial substrates with rice straw and the spawning for the *Pleurotus florida* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 9(2) : 67-72.

26. Go, S. J., You, C. H. and Park, Y. H. 1984. Effects of temperature, pH, carbon and nitrogen nutritions on mycelial growth of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. and *P. ostreatus* (Fr.) Quel. *Kor. J. Mycol.* 12(1) : 15-19.

27. Goltapeh, E. M. and Kapoor, J. M. 1989. New substrates for spawn production of button mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Singer. *Mushroom Sci.* 12(1) : 281-285.

28. Hadar, Y. and Cohen-Arazi, E. 1986. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(6) : 1352-1354.

29. Hasimoto, K. and Takahashi, Z. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Sci.* 9(1) : 585-593.

30. Hilber, O. 1989. Valid, invalid and confusing taxa of the Genus *Pleurotus*. *Mushroom Sci.* 12(2) : 241-248.

31. Hong, J. S. 1978. Studies on the physio-chemical properties and the cultivation of oyster mushroom(*Pleurotus ostreatus*). *J. Kor. Agri. Chem. Soc.* 21 : 150-184.

32. Hong, J. S. and Kag, K. H. 1983. Fruit-body formation of *Pleurotus florida* on the synthetic medium. *Kor. J. Mycol.* 11(3) : 121-128.
33. Hong, J. S., Kwon, Y. J. and Jung, G. T. 1983. Production of mushroom mycelium(*Pleurotus ostreatus* and *Auricularia auricula-judae*) in shaking culture. *Kor. J. Mycol.* 11(1) : 1-7.
34. Hong, J. S., Lee, K. S. and Choi, D. S. 1981. Studies on Basidiomycetes(I). On the mycelium growth of *Agaricus bitorquis* and *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 9(1) : 19-24.
35. Hong, B. S., Kim, S. J., Song, C. H., Hwang, S. Y. and Yang, H. C. 1992. Development of substrate and cultural method for the cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. *Kor. J. Mycol.* 20(4) : 354-359.
36. Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium(*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Science.* 107 : 373
37. Itävaara, M. 1987. Comparison of three methods to produce liquid spawn for commercial cultivation of shiitake. *Mushroom Sci.* 12(1) : 309-315.
38. Ivanovich, B. B. 1965. Cytological behaviour in mushroom mycelium grown in submerged liquid culture. *Mushroom Sci.* 6 : 91-101.
39. Jandaik, C. L. 1974. Artificial cultivation of *Pleurotus sajor-caju*(Fr.) Singer. *Mushroom J.* 22 : 405.
40. Jandaik, C. L. and Kapoor, J. N. 1974. Studies on cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Mushroom Sci.* 9(1) : 667-672.
41. Jandaik, C. L. and Rangad, C. O. 1978. Biochemical changes in *Pleurotus* species with respect to different growth stages. *Mushroom Sci.* 10(1) : 419-426.
42. Japan patent 43- 37047(1970) *Flammulina velutipes*, *Pholiota nameko*.
43. Japan patent 44- 18638(1972) *Agaricus bisporus*.

44. Jennison, M. W. 1953. Cultivation of mushroom mycelium in submerged culture. *Mushroom Sci.* 3 : 268-269.
45. Kalberer, P. P. 1970. The cultivation of *Pleurotus ostreatus* : Experiments to elucidate the influence of different culture conditions on the crop yield. *Mushroom Sci.* 9(1) : 653-661.
46. Khan, S. M., Kausar, A. G. and Ali, M. A. 1981. Yield performance of different strains of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on paddy straw in Pakistan. *Mushroom Sci.* 11(1) : 675-678.
47. Khan, S. M. and Ali, M. A. 1981. Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) on cotton boll locules. *Mushroom Sci.* 11(1) : 691-696.
48. Khan, S. M. and Chaudhary, I. A. 1989. Some studies on oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) on the waste material of corn industry in Pakistan. *Mushroom Sci.* 12(2) : 23-29.
49. Khan, S. M. and Khatoon, A. 1989. Oyster mushroom cultivation on soft woods of swat valley, Pakistan. *Mushroom Sci.* 12(2) : 31-34.
50. Khan, S. M. and Qadir, M. A. 1989. Some studies on oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) fungus in liquid media in Pakistan. *Mushroom Sci.* 12(2) : 73-79.
51. Khan, S. M. and Siddiqui, M. A. 1989. Some studies on the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) on ligno-cellulosic by-products of textile industry. *Mushroom Sci.* 12(2) : 121-128.
52. Khanna, P. and Garcha, H. S. 1981. Nutritive value of mushroom *Pleurotus florida*. *Mushroom Sci.* 11(2) : 561-572.
53. Khanna, P. and Garcha, H. S. 1981. Introducing the cultivation of *Pleurotus florida* in the plains of India. *Mushroom Sci.* 11(1) : 655-666.
54. Kirchhoff, B. and Lelley, J. 1991. Investigations of Shiitake (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) bag-log cultivation to increase the yield in Germany.

Mushroom Sci. 13(2) : 509-516.

55. Kostadinov, I., Torev, A. and Rantcheva, Tz. 1972. Some aspects of the production of *Pleurotus ostreatus* Fr. *Mushroom Sci.* 8 : 253-256.

56. Kulkarni, R. K. 1989. Cultivation of *Pleurotus* species on cotton waste. *Mushroom Sci.* 12(2) : 129-133.

57. Kurtzman, R. H. 1974. The metabolism of fatty substrates by the oyster mushroom. *Mushroom Sci.* 9(1) : 557-565.

58. Laniece, A. et al. 1966. Production and use of liquid mushroom spawn. *U.S. Patent No.* 3,286,399.

59. Lee, J. Y., An, W. G. and Lee, J. D. 1994. Studies on the submerged culture of *Lentinus edodes* mycelia in Brewer's yeast extract medium. *Kor. J. Mycol.* 22 : 266-275.

60. Lee, T. S. 1990. The Full List of Recorded Mushrooms in Korea. *Kor. J. Mycol.* 18(4) : 233-259

61. Levai, Jadit. 1989. Nutritional and utilizable value of some cultivated mushrooms. *Mushroom Sci.* 12(1) : 295-304.

62. Manu-Tawiah, W. and Martin, A. M. 1989. Use of nitrogen-supplemented peat extracts for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* mycelium. *Mushroom Sci.* 12(2) : 157-167.

63. Martin, A. M. and Bailey, V. I. 1985. Growth of *Agaricus campestris* NRRL 2334 in the form of pellets. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6) : 1052-1056.

64. Martinez-Correra, D. 1989. Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffee pulp in the tropics. *Mushroom Sci.* 12(2) : 169-178.

65. Mehta, K. B. and Jandaik, C. L. 1989. Cultivation of *Pleurotus* cfr. *sapidus* (Schulzer) Kalchbr. in India. *Mushroom Sci.* 12(2) : 179-185.

66. Mori, K., Toyomasu, T., Nanba, H. and Kuroda, H. 1989. Antitumor action of fruit bodies of edible mushrooms orally administered to mice. *Mushroom Sci.* 12(1) : 653-660.
67. Omori, S. 1974. Some discussions about the cultivation of *Pleurotus ostreatus* on sawdust bed. *Mushroom Sci.* 9(1) : 663-666.
68. Oyama, Y., Yoshida, T. and Taguchi, H. 1974. The artificial cultivation of mycorrhiza-forming Basidiomycetes. *Mushroom Sci.* 9(1) : 719-731.
69. Pellinen, M., Mälkki, Y. and Niskanen A. 1987. Method of growing edible mushrooms. *U.S. Patent No.* 4,637,163.
70. Raaska, L. 1989. The effect of homogenization on the growth of commercially produced Shiitake(*Lentinus edodes*) spawn. *Mushroom Sci.* 12(2) : 327-335.
71. Rinker, D. L. 1989. Response of the oyster mushroom to supplementation prior to pasteurization. *Mushroom Sci.* 12(2) : 187-198.
72. Samajpati, N. 1978. Nutritive value of some Indian edible mushrooms. *Mushroom Sci.* 10(2) : 695-703.
73. Saito, C. 1974. A study on spawning by the injection technique. *Mushroom Sci.* 9(1) : 405-413.
74. Senyah, J. K., Robinson, R. K. and Smith, J. H. 1989. The cultivation of the oyster mushroom - *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer - on cocoa shell waste. *Mushroom Sci.* 12(2) : 207-218.
75. Singh, R. P. 1981. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. mushroom. *Mushroom Sci.* 11(1) : 667-673.
76. Sivaprakasam, K. and Kandaswamy, T. K. 1981. Waste materials for the cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. *The Mushroom Journal.* 101 : 178-179.

77. Sohi, H. S. and Upadhyay, R. C. 1989. Effect of temperature on mycelial growth of *Pleurotus species* and their yield performance on selected substrates. *Mushroom Sci.* 12(2) : 49-56.
78. Solomons, G. L. 1975. Submerged Culture Production of Mycelial Biomass. In *Industrial Mycology* (J. E. Smith, D. R. Berry eds.), Vol. 1 : 249-264, Edward Arnold, London 248.
79. Song, C. H. and Cho, K. Y. 1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* 79(6) : 866-876.
80. Stamets, P. and Chilton J. S. 1983. The mushroom cultivator. Agarikon Press, Olympia, Washington.
81. Sugihara, T. F. and Humfeld, H. 1954. Submerged culture of the mycelium of various species of mushrooms. *Appl. Microbiol.* 2 : 170-172.
82. Sun, P. J. and Yu, J. J. 1989. The cultivation of *Pleurotus* mushrooms on unsterilized substrates in the field. *Mushroom Sci.* 12(2) : 219-228.
83. Szuecs, J. 1956. Submerged culture. *Mushroom Sci.* 3 : 269-272.
84. Tan, K. K. 1981. Cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* on cotton waste. *Mushroom Sci.* 11(2) : 697-703.
85. Tan, K. K. 1981. Cotton waste is a good substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus* the oyster mushroom. *Mushroom Sci.* 11(1) : 705-710.
86. Torev, A. 1965. Biological peculiarities of the mycelium of higher mushrooms grown in submerged culture. *Mushroom Sci.* 6 : 83-89.
87. Torev, A. 1968. Submerged culture of higher fungi mycelium on industrial scale. *Mushroom Sci.* 7 : 585-593.
88. Shiio, T., Okunishi, M. and Okumura, S. 1974. Fundamental studies on the large-scale cultivation of edible fungi. *Mushroom Sci.* 9(1) : 799-808.

89. Visscher, H. R. 1989. Supplementation of the substrate for *Pleurotus* - species at filling. *Mushroom Sci.* 12(2) : 229-240.
90. Von Netzer, U. 1978. Investigation of primordia formation in the *Pleurotus ostreatus* dikaryon "868×381". *Mushroom Sci.* 10(1) : 703-711.
91. Yang, Q. Y. and Jong, S. C. 1989. A quick and efficient method of making mushroom spawn. *Mushroom Sci.* 12(1) : 317-324.
92. Yang, Q. Y. and Jong, S. C. 1989. Medical mushrooms in China. *Mushroom Sci.* 12(1) : 631-643.
93. Yoshioka, Y., Tabeta, R., Saito, H., Uehara, N. and Fukuoka, F. 1985. Antitumor polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*(Fr.) Quel.; Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research* 140 : 93-100.
94. Yoshioka, P., Ikikawa, T., Noda, M. and Fukuoka, F. 1972. Studies on antitumor activity of some fractions from Basidiomycetes I, An antitumor acidic polysaccharide fraction from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel. *Chem. Pharm. Bull.* 20 : 1175-1180.
95. Zdražil, F. 1974. The ecology on industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*. *Mushroom Sci.* 9(1) : 621-652.
96. 姜安錫 外 12名. 1989. 最新버섯栽培技術. 圖書出版 常綠社. 서울
97. 古川 久彦. 1992.きのこの學, 7章 菌絲體生産, 10章 菌體利用. 共立出版株式會社. 東京.
98. 谷口 實. 1992.きのこの増殖と育種, 最新バイオテクノロジー-全書⑦, 編者 最新バイオテクノロジー-全書編集委員會, pp. 46-61. 農業圖書株式會社. 東京.
99. 金三純, 金養燮. 1990. 韓國産버섯圖鑑. 裕豊出版社. 서울.
100. 金洪基, 孔在烈. 1993. 微生物工學(基礎와 應用). 圖書出版 東和技術. 서울.

101. 朴榮在. 1991. 영지·표고·느타리·양송이. 内外出版社. 서울.
102. 박완희, 이호득. 1991. 원색도감 한국의 버섯. (주)교학사. 서울.
103. 박용환, 장학길, 고승주. 1977. 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 재배에 있어서 배지량 및 종균재식량이 자실체 수량에 미치는 영향. 한근지 5 : 1-5.
104. 農村振興廳. 1993. 品種解說(園藝作物, 버섯류, 蠶桑). 박영선 편집. pp. 368-389.
105. 신범수. 1994. 최신버섯재배기술과 경영. 五星出版社. 서울
106. 劉英福. 1991. 품종해설 및 신품종관리. 느타리버섯. 새농민기술대학 '91교육자료 No. 53 : 57-75. 농업협동조합전문대학.
107. 劉英福. 1992. 품종해설 및 신품종관리. 느타리버섯. 새농민기술대학 교육교재 No. 61 : 59-79. 농업협동조합전문대학.
108. 유재복. 1990. 중보 실용 버섯재배. 선진문화사. 102.
109. 衣川堅二郎. 1988.きのこの實驗法(培養を主として),きのこの生物學シリーズ2, pp. 119-126. 築地書館株式會社. 東京.
110. 李址烈. 1988. 原色韓國버섯圖鑑. 圖書出版 아카데미. 서울.
111. 산림청. 1993(제 23호). 임업통계연보, IV. 임업생산 및 공급, 1.임산물 생산량, 버섯.
112. 青島 清雄, 椿 啓介, 三浦宏一郎. 1983. 菌類研究法, 1.4 純粹培養. 共立出版株式會社. 東京