

GOVP1200202086

635.8 (19th)
L293 L

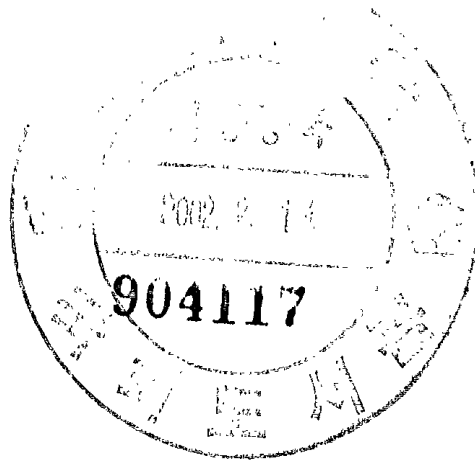
최 종
연구보고서

느타리 · 팽나무버섯 액체배양 종균의
작업능률을 위한 접종장치 개발

Development of Inoculation System for liquid-medium
culture spawn of *P. ostreatus* and *F. velutipes*

강원대학교 농업생명과학대학

농 립 부



제 출 문

농 립 부 장관 귀하

본 보고서를 “느타리·팽나무버섯 액체배양 종균의 작업
능률을 위한 접종장치 개발” 과제의 최종보고서로 제출합
니다.

2001 년 11 월 18 일

주관연구기관명 : 강 원 대 학 교

총괄연구책임자 : 성 재 모

세부연구책임자 : 신 범 수

연 구 원 : 홍성준 부 산

박기범 이원호

권장호 최영대

박재언 윤상수

요 약 문

I. 제 목

느타리·팽나무버섯 액체배양 종균의 작업능률을 위한 집종장치 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 주름버섯목(Agaricales)의 느타리과(Pleurotaceae)에 그리고 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*)은 주름버섯목(Agaricales)의 송이버섯과(Tricholomataceae)에 속하는 사물기생균인 목재부후균으로 우리 나라를 비롯한 세계 각지에 널리 분포한다. 느타리 및 팽나무버섯의 재배면적과 생산량 및 소비량은 국내·외적으로 큰 폭의 증가추세를 보이고 있고, 현재 한국의 느타리 및 팽나무버섯은 소비량의 증가와 함께 생산량도 증가하고 있는 추세이다.

식용버섯재배는 원목, 톱밥, 폐면, 볏짚 등의 다양한 부산물이 배지로서 이용되고 있으며 재배방식에 있어서도 선반과 상자를 이용한 재배와 병을 이용한 재배 등이 이용되어지고 있다. 버섯의 병재배는 재배역사가 짧고 생산량도 비교적 적지만 기계화를 통한 생력화 및 자본·기술 집약적 농업으로 연중 계획생산을 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 병재배 버섯으로는 팽나무버섯, 애느타리, 버들송이, 만가닥버섯, 목이, 잎새, 노루궁뎅이버섯, 영지버섯 등의 재배법이 개발되어 있으나 현재는 팽나무버섯이 주종을 이루고 있으며 느타리버섯에서 병재배에 적합한 품종이 개발되어 재배가 되고 있는 실정이다. 최근에는 온도 및

습도, 환기 등을 제어할 수 있는 버섯재배사의 발달과 전문화된 인력을 바탕으로 기계화 및 자동화에 의한 간편한 재배법이 증가하고 있는 실정이다.

최근의 병재배 버섯은 밀폐된 시설 내에서 버섯을 연중 무휴 재배함으로써 영양 요구성 및 생활환경이 비슷한 다른 균의 서식밀도도 누적되어 높아지게 된다. 따라서 잡균의 밀도를 최소한으로 낮추는 것이 병버섯 재배의 성공여부를 결정짓는 요인이 되고 있다. 병버섯 재배는 살균, 세척, 소독 등의 과정을 통하여 잡균을 억제하고 종균접종 및 시설 내의 환경조절을 통하여 버섯균의 빠른 증식을 도모하고 있다. 하지만 최근의 병버섯 재배의 생산성은 저하되고 있으며 이에 따른 원인 규명이 불분명한 실정이다. 현재까지의 연구로는 종균의 활력저하와 분절자의 생성, 재배사 관리소홀, 대기오염, 지구온난화, 이상기후 등 많은 문제점이 거론되고 있으며 이들 중에서 종균에서 발생된 문제점이 가장 크게 작용하는 것으로 알려져 있다. 식용버섯의 인공재배를 위해서는 종균, 배지재료, 재배시설, 재배기술이 필수적으로 요구된다. 그 중에서도 유전적으로 형질이 안정하며, 잡균에 대한 저항성이 강할 뿐만 아니라 버섯생산성이 우수한 우량종균의 확보는 최우선적으로 갖추어야 한다.

현재 가장 많이 사용되는 톱밥종균은 배양과 취급이 용이하여 일반 재배농가에도 보편화되어 있으나 군사배양과 관리, 유통과정기간에 따른 종균의 활력검증과 버섯발생 및 생산예측이 불투명하여 실제 재배농가에서 종균선택과 배양기간에 가장 민감한 부분이다. 최근 느타리와 팽나무버섯에서 액체종균이 군사배양기간을 단축하여 버섯 발생 소요일수를 단축하였고 종균의 안정성과 수량증가 등 액체종균의 우수성이 확인되었다. 또한 액체종균은 종래의 고체종균에 비하여 잡균에 대한 기질선택성이 높아짐과 아울러 잡균의 발생율도 감소하게 된다. 이런 이유

로 최근 느타리와 팽나무버섯에 대하여 액체종균을 이용한 버섯 재배가 시도되고 있으며, 본 연구에서는 식용버섯 안정생산을 위한 우량종균 확보 방법으로서 액체종균을 활용하고자 하였다.

또한 본 연구는 버섯 재배 방식이 기존의 톱밥종균과 같은 고체종균에서 액체종균을 이용하는 방식으로 변화하는 시점에서 액체종균을 버섯 재배에 효율적으로 사용할 수 있는 접종방식 및 접종기를 개발하여 버섯생산의 실효성 및 생산성 향상을 확인하고자 하였으며, 정량의 액체종균을 배지에 균일하게 접종할 수 있는 액체종균 자동접종시스템을 버섯재배농가에 적용시켜 안정적인 버섯생산을 유도하고자 하였다. 또한 톱밥종균의 문제점을 해결하고자 자동접종시스템에 적용할 액체종균의 실용화를 모색하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

느타리와 팽나무버섯에 대한 종균의 배양적 특성과 버섯형성 특성을 파악하여 액체종균의 다양한 버섯재배에 응용이 가능하고, 병재배 형태에 알맞은 종균배양시스템을 확립하고, 액체종균의 효과적인 접종을 위하여 접종기구와 재배방법에 따른 작업능률 및 균사활력이 우수한 접종장치와 접종방법을 개발하는 것으로 구체적인 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 1차년도 연구 개발 목표 및 내용

- 느타리·팽나무버섯 액체 종균의 접종 방법 및 장치 개발
 - 기존의 고체종균 접종장치 등을 조사하고 문헌연구 및 예비실험을 통하여 적절한 접종 방법을 선정한다.
 - 공기분사식, 스프레이-노즐식, 벤투리관식, injection식 등의

기구식 접종 장치를 설계하여 구성 또는 제작하여 접종 메카니즘을 규명하고 적정 작동 조건을 규명한다.

- 접종 균일도와 작업 성능을 지표로 성능평가를 실시한다.
- 느타리·팽나무버섯 액체종균의 배양체계 확립 및 농가 실증시험
 - 느타리·팽나무버섯균의 군사생육조건 조사.
 - 느타리·팽나무버섯균의 액체배양조건 조사.
 - 기구식 접종장치에 적용할 대량배양조건 조사.
 - 기구식 접종장치에 맞는 적정배지를 선발하여 버섯 형성조사.

2. 2차년도 연구 개발 목표 및 내용

- 느타리·팽나무버섯 액체 종균의 접종 방법 및 장치 개발
 - 1차년도에서 개발한 기구식 접종기 개념을 확장하여 접종기 개발을 위한 시스템을 설계하고 구성하여 보급형 액체종균 접종기를 개발한다.
 - 각종 센서와 PLC를 이용하여 제어 시스템을 구성하여 병재비용 접종장치의 자동화 시스템을 구축한다. 개발 목표 수준은 접종기계가 농가에서도 사용할 수 있도록 소규모, 저가로 개발되어야 하며 최소의 기능으로 자동화를 실현하고자 한다.
 - 접종 균일도와 작업 성능, 오작동 여부 등을 지표로 성능평가를 실시한다.
- 느타리·팽나무버섯 액체종균의 배양체계 확립 및 농가 실증시험
 - 보급형 접종장치의 적정 접종량에 의한 자실체 형성 조사.
 - 액체배양에서 야기될 수 있는 환경조사 및 문제점 조사.

- 보급형 액체종균 접종장치를 이용한 느타리·팽나무버섯의 농가 실증시험.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

○ 느타리·팽나무버섯 액체 종균의 접종 방법 및 장치 개발

- 본 연구에서는 경제성과 작업능률을 고려하여 자동화된 액체종균 접종장치를 개발하고자 시도되었다. 자동접종장치는 액체종균을 동시에 4개의 배양병에 접종할 수 있도록 제작하였으며, 자동접종 시스템은 배양병 개폐장치, 분사노즐 장치, 컨베이어 장치 등으로 구성되어 있으며 PLC로 제어되도록 제작되었다. 느타리버섯의 경우 분사량을 15ml를 분사함으로써 최대의 생산성을 얻을 수 있음을 알 수 있었으며, 적정 분사량을 분사하기 위한 작동조건은 종균탱크 압력 3.5kg/cm^2 이고 분사시간은 0.52초 일 때 목표 분사량을 분사할 수 있었다.

작업성능의 평가를 위해 4×4배열의 병재비용 상자50개를 이용하여 병의 뚜껑을 제대로 열고 닫지 못하는 경우, 분사가 안되는 경우 등의 오동작 횟수를 측정하고 작업시간을 체크하였다. 50상자 800병을 작동시킨 결과 오동작은 없었고 작업시간은 17분으로 측정되었다.

○ 느타리·팽나무버섯 액체종균의 배양체계 확립 및 농가 실증시험

- 본 연구는 액체종균과 접종장치를 이용한 병재비용 버섯 생산에 관한 연구로 느타리 및 팽나무버섯의 액체종균 배양체계 확립 및 최적의 배양 및 재배조건을 선발 버섯 재배를 수행하였다.

느타리 및 팽나무버섯의 대량 액체배양의 조건은 팽나무버섯은 접종 부피 5~6%, 통기량 1.0 vvm, 배양기간 4일 일 때, 그리고 느타리버섯

은 접종부피 4%, 통기량 1.0vvm, 배양기간 4일에서 최대 군사생장을 확인할 수 가 있었다. 액체종균 접종장치에 적합한 배지선발을 실시한 결과 팽나무버섯은 미송톱밥에서 군사체 생장이 빨랐고, 첨가제로 미강을 20% 첨가했을 때 군사생장 및 밀도가 가장 우수하게 조사되었다.

느타리버섯은 포플라 톱밥에 미강을 20% 첨가하였을 때 군사생장이 자실체 수량이 높게 조사되었다. 자동접종시스템을 이용하여 군사생장 및 자실체 생산에 대한 조사를 실시한 결과, 느타리버섯의 경우 군사생장은 접종부피 4%, 접종량 20ml에서 우수하였으며, 자실체 생산에서는 접종부피 6%, 접종량 15ml에서 수량이 높게 나타났다. 팽나무버섯은 접종부피 6%로 15ml을 접종하였을 때 군사생육이 빨랐으며, 접종부피 4-6%, 접종량 10-15ml에서 자실체 수량이 다른 조건에 비해 우수하게 나타났다.

액체종균 접종시스템을 이용 시 고체종균 접종시스템 보다 느타리버섯은 33.7%, 팽나무버섯은 32.8% 증수효과를 확인할 수 가 있었다.

2. 연구개발 활용에 대한 건의

○ 버섯품종의 유전적인 형질의 우수성은 그 생산량 증가와 더불어 병해 및 환경에 대한 저항성이 강하다. 따라서 기존의 고체종균보다 활력이 뛰어나다는 장점을 가지는 액체종균을 이용하여 식용버섯을 재배하게 됨으로서 생산성의 증가와 함께 농가의 소득증대에 기여한다.

○ 액체종균의 배양은 낮은 비용으로 종균을 자가생산 시스템의 저변확대에 기여함으로써 우량한 종균의 사용에 따른 버섯생산량의 증가에 기여한다.

○ 액체종균의 배양은 다양한 배양용기를 이용할 수 있으므로 배양용량이 적은 규모의 배양장치를 통한 종균의 자가생산 시스템의 저변확대에 기여함으로써 우량한 종균의 사용에 따른 버섯생산량의 증가에 기여한다.

○ 버섯재배 농가의 종균 자체배양 시스템을 통한 액체종균의 실용화와 기존의 종균 배양소를 통한 액체종균의 생산뿐만 아니라 액체접종원을 이용한 톱밥종균의 생산이 가능하다. 액체종균은 버섯재배용 기질에 직접적인 이용에서와 마찬가지로 톱밥종균 및 꼭립종균 보다 접종원으로서의 가치가 매우 높은 장점을 가지고 있다고 보고되고 있다. 따라서 종균 배양소에서 군사활력이 우수한 접종원의 생산에 액체배양된 군사체 현탁액을 이용한다면 기존의 접종원으로 이용하였던 톱밥종균보다 우수한 종균생산이 가능해진다.

○ 개발된 액체종균 접종장치는 대규모 버섯 재배농장 뿐 아니라 소규모 버섯재배 농가에서도 액체종균을 이용한 버섯재배가 가능케 함으로써, 버섯재배 방식에 획기적인 전환점을 이룰 수 있다.

Summary

I. Title

Development of Inoculation System for liquid-medium culture spawn of *P. ostreatus* and *F. velutipes*

II. Objectives and Importance of Research and Development

Pleurotus ostreatus and *Flammulina velutipes* belong to Pleurotaceae of Agaricales and Tricholomataceae of Agaricales respectively. They are commonly known as white rot fungus, which are obligate parasite in nature and are widely distributed worldwide as well as in Korea. The production area, production and consumption of these mushrooms have increased rapidly in recent years.

In growing mushroom, various by-products such as stump, sawdust, cotton waste and rice straw are utilized as media and various types of growing methods such as growing in shelf, in a box or in a bottle are applicable. Growing mushroom in a bottle has been started recently and is not so popular yet, but it has a strong advantage that this type of growing method can be mechanized with ease. Due to the mechanization, the mushroom industry becomes the energy-saving, capital- and technology-intensive agriculture, which result in the planing of production all the year round.

While many edible mushrooms are possible to cultivate in bottle, but *F. velutipes* is the most commonly cultivated mushroom by this method. Recently *P. ostreatus* has been grown since a species adaptable to bottle cultivation with liquid-spawn was developed. Also the simple growing method is increasingly spreading with the advance of environmental control, the mechanization and automation of processing and the specialized man power.

Since the bottle growing mushroom is grown in the confined space all year round, the habitat population is increased by accumulation of other fungi similar to mushroom in the aspect of nutrition requirement and the living environment. Therefore, the key to the success of bottle growing method is depended upon the regulation of habitat population of contaminating fungi. In the bottle growing mushroom, the series of processing such as sterilization, washing, cleaning depress the growing of contaminating fungi and the inoculation and environmental control have cultivating mushrooms superior to contaminating fungi. Although the productivity of bottle growing mushroom is decreasing recently, however, its cause has not been identified yet. According to the latest research, the decrease of activity of spawn, mismanagement of facility, contamination of environment, fluctuating atmosphere could be the possible causes. At first, above all the possible causes, spawn activity was thought to be the key factor for such a low productivity. But, substrate composition, the growing facility and the growing technology play important roles in mushroom cultivation. The most important thing

among the above mentioned factors is how we obtain the excellent spawn, which has stable genetic characteristics, strong resistivity to contaminating fungi and high productivity.

These days, the spawn type most widely used in the mushroom industry is solid type of spawn such as sawdust spawn, because solid spawn is relatively easy in growing and handling. However, it is not so easy for the farmers to determine the selection of spawn and its growing period because there are many difficulties in its mycelial growth and management, activity, generation of mushroom, unpredictable productivity due to the old age of the spawn.

Recently the superiority of liquid spawn has been confirmed not only by its stability and productivity, but also by shortening the period of mushroom cultivation. In addition to that, liquid spawn has higher resistivity to other contaminating fungi due to the fast growth resulting in the reduction of their occurrence.

Therefore, some innovative farmers started to try growing *P. ostreatus* and *F. velutipes* using liquid spawn. This research was intended to utilize liquid spawn as superior spawn for the stable production of mushroom with good quality. At the time of transition from solid to liquid spawn for the production of mushroom, this research aimed at developing the efficient method and device applicable to the inoculation of liquid spawn. The device is capable of inoculating a given amount of liquid spawn equally distributed inside the bottle and being automated to achieve this purpose. Eventually, this research will provide

cost-effective automatic inoculation system to the farmers and mushroom industry. Also, this research is intended to use liquid spawn for the practical aspects to work with the automatic inoculation system.

III. Contents and Scope of the Research

By investigating the characteristics of growth and cultivation of *P. ostreatus* and *F. velutipes*, this research has focused to establish the best spawn culture system applicable to the bottle growing method as well as to various mushroom cultivations. Also, this research has developed the method and device for the inoculation of liquid spawn. The specific contents and scopes of this research are as follows.

1. Contents and scope of R&D in the 1st year

A. Development of inoculation method and device

- An appropriate inoculation method was determined by investigating the conventional sawdust spawn inoculation system, review of the previous works and the preliminary trials.
- Mechanism for the inoculation was investigated with proper operating conditions using various methods and devices as suggested in the research part.
- The system was evaluated with a performance indices such as the equally distributed inoculation with a given amount of liquid spawn and the work performance.

B. Establishment of cultivation system using liquid spawn of *P. ostreatus* and *F. velutipes* and practice at the farm level

- The conditions of liquid culture and characteristics of cultivation of *P. ostreatus* and *F. velutipes* was investigated.
- Similarly, the conditions of mass production of liquid spawn applicable to the inoculation system was investigated and the appropriate medium was selected to conduct a series of experiments.
- Optimum amount of liquid spawn was determined by investigating the fruit body formation of mushrooms. Finally the experiment was conducted at the mushroom farm level.

2. Contents and scope of R&D in the 2nd year

A. Development of inoculation method and device

- Based on the 1st year's research, the automated inoculation system was developed for the bottle growing method.
- Using various sensors and PLC, the system could be operated automatically. Also, it was cost-effective and small-sized for the farm as well as industrial level cultivation. The automatic system was operated with minimum functions of automation.
- The system was evaluated with a performance indices such as the equally distributed inoculation with a given amount of liquid spawn, the work performance and the malfunction.

B. Establishment of cultivation system using liquid spawn of *P. ostreatus* and *F. velutipes* and practice at the farm level

- Proper medium suitable for the automatic inoculation system was developed.
- The environment survey and any consequent problems during the cultivation of liquid spawn was investigated.
- The performance of overall system was evaluated at the normal mushroom farm level.

IV. Research Results and Recommendations

1. Research results

A. Development of inoculation method and device

- This research was intended to develop the automated liquid spawn inoculation system with cost-effective and good working performance. The automated inoculation system was developed so that it could inoculate the liquid spawn on 4 bottles at once. This system consisted of the device for opening and closing the bottle lids, the device for injection nozzles, the conveyor with run/stop control available and the PLC with couple of sensors. For the best productivity of mushroom (*Pleurotus*, spp), the optimum quantity of injection per cultivation bottle was known to be 15ml from the preliminary test of growing mushrooms. In order to inoculate liquid spawn at this rate, the system should be set according to the following operating conditions: 3.5 kg/cm² of pressure inside the liquid spawn tank and 0.52 sec for injection

time. For 50 boxes of 4x4 cultivation bottles, the system performance was evaluated by the number of malfunctions, including no proper operation at opening/closing of lids and no injection of liquid spawn, and the total time for work. The number of malfunctions was not observed at all and it took 17 min to inoculate 800 bottles.

B. Establishment of cultivation system using liquid spawn of *P. ostreatus* and *F. velutipes* and practice at the farm level

- This project was committed to research on the cultivation of bottle mushroom using liquid spawn and automated inoculation system. It was conducted to select the best cultivation conditions of bottle mushroom and establishment of cultivation systems using liquid spawn of *P. ostreatus* and *F. velutipes*.

For the mass production of submerged culture, the optimal inoculum amount, aeration rate and culture period of *F. velutipes* were 5%~6% (inoculum vol./medium vol.), 1.0vvm (vol. of air/vol. of medium/min) and 4 days respectively. Also, the optimal inoculum amount, aeration rate and culture period of *P. ostreatus* were 4%, 1.0vvm and 5 days respectively.

Mycelial growth of *F. velutipes* was fastest in the pine sawdust medium, compared to oak and poplar sawdust media. Similarly, addition of 20% rice bran to pine sawdust medium showed fast as well as dense mycelial growth when compared to only pine sawdust medium. In case of *P. ostreatus*, mycelial growth and fruit body weight were observed highest in poplar(80%) + rice bran(20%)

medium.

Mycelial growth of *P. ostreatus* in 850cc P.P. bottle was highest when the inoculum rate and inoculum volume were 4% and 20ml respectively. But, fruit body weight was highest when inoculum rate and inoculum volume were 6% and 15ml respectively. Similarly, mycelial growth of *F. velutipes* in 850cc P.P. bottle was highest when inoculum rate of 6% and inoculum volume of 15ml were used. But, fruit body weight was highest when inoculum rate of 4-6% and inoculum volume of 10-15ml were used.

By using liquid spawn inoculation system, increases of 33.7% and 32.8% in fruit body weight were observed in *P. ostreatus* and *F. velutipes* respectively, when compared to traditional sawdust spawn system.

2. Research recommendations

○ This research contributes to the income of mushroom growing farmers and the increase of productivity by growing mushroom using liquid spawn, superior to the conventional solid spawn. The excellence of genetic character of mushroom species makes mushrooms productive and resistive to diseases and environment.

○ Since liquid spawn can be cultivated with low cost at normal mushroom farms, the self-production system of liquid spawn could be widely spread, which contributes to the increase of productivity.

○ Cultivating liquid spawn in various containers makes it possible growing liquid spawn in small scale, which results in the spread of growing mushrooms using liquid spawn. Excellent liquid spawn contributes to the productivity of mushroom.

○ The self-cultivating system of liquid spawn at normal mushroom farms contributes to the practical use of liquid spawn. In addition, spawn growing centers can produce liquid spawn as well as sawdust spawn using liquid spawn. It is reported that liquid spawn can be more valuable inoculating source than the traditional sawdust spawn and grain spawn. Therefore, liquid spawn growing centers can produce more excellent spawn from mycelial suspension cultivated in liquid medium rather than from the conventional sawdust spawn.

○ The developed inoculation system can be applied to small mushroom farms as well as in industry-level, which can be a turning point at mushroom growing method.

Contents

Chapter 1. Introduction	20
Chapter 2. Nozzle selection and optimum operation conditions	
2.1. Introduction	25
2.2. Experimental method	26
2.3. Results and discussion	34
2.4. Conclusions	52
Chapter 3. Development the automated liquid spawn inoculation system	
3.1. Introduction	54
3.2. Design of systems	54
3.3. Development of control algorithm	60
3.4. Evaluation of system performance	64
3.5. Results and discussion	65
3.6. Conclusions and summary	69
Chapter 4. Innovation of liquid culture spawn system of <i>P. ostreatus</i> and <i>F. velutipes</i> and its technology transfer.	
4.1 Introduction	70
4.2 Materials and methods	74
4.3 Results	85
4.4 Discussion and summary	122
Chapter 5. References	128

목 차

제 1 장 서 론	20
제 2 장 노즐 설정과 적정 작동 범위 설정	
제 1 절 서 론	25
제 2 절 재료 및 방법	26
제 3 절 결과 및 고찰	34
제 4 절 결 론	52
제 3 장 액체종균 자동접종장치 개발	
제 1 절 서 론	54
제 2 절 시스템의 설계	54
제 3 절 시스템의 제어 알고리즘	60
제 4 절 액체종균 접종시스템의 성능 평가	64
제 5 절 결과 및 고찰	65
제 6 절 결 론	69
제 4 장 느타리·팽나무버섯 액체종균의 배양체계 확립 및 농가실증재배	
제 1 절 서 론	70
제 2 절 재료 및 방법	74
제 3 절 결 과	85
제 4 절 적요 및 고찰	122
제 5 장 참 고 문 헌	128

제 1 장. 서 론

제 1 절 연구의 배경

식용버섯재배는 원목, 톱밥, 폐면, 볏짚 등의 다양한 부산물이 배지로
서 이용되고 있으며 재배방식에 있어서도 선반과 상자를 이용한 재배와
병을 이용한 재배 등이 이용되어지고 있다. 최근에는 온도 및 습도, 환
기 등을 제어할 수 있는 버섯재배사의 발달과 전문화된 인력을 바탕으
로 기계화 및 자동화에 의한 간편한 재배법이 증가하고 있는 실정이다.
하지만 최근의 버섯재배의 생산성은 매년 감소하고 있으며 이에 따른
원인 규명이 불분명한 실정이다.

현재까지의 연구로는 종균의 활력저하와 분절자의 생성, 재배사 관리
소홀, 대기오염, 지구온난화, 이상기후 등 많은 문제점이 거론되고 있
으며 이들 중에서 종균에서 발생한 문제점이 가장 크게 작용하는 것으
로 알려져 있다. 현재 가장 많이 사용되는 톱밥종균은 배양과 취급이
용이하여 일반 재배농가에도 보편화되어 있으나 군사배양과 관리, 유통
과정기간에 따른 종균의 활력검증과 버섯발생 및 생산예측이 불투명하
여 실제 재배농가에서 종균선택과 배양기간에 가장 민감한 부분이다.
최근 느타리와 팽나무버섯에서 액체종균이 군사배양기간을 단축하여 처
음 버섯 발생 소요일수를 단축하였고 종균의 안정성과 수량증가 등 액
체종균의 우수성이 확인되었다.

본 연구는 톱밥종균의 문제점을 해결하고자 느타리와 팽나무버섯균에
적합한 액체종균배양방법과 액체종균을 버섯재배에 효율적으로 사용할
수 있는 접종방식 및 접종기의 개발을 통해 버섯재배에서 일어나는 문
제점을 파악하여 그것을 버섯재배농가에 적용시켜 그 문제점을 파악함
으로 액체배양종균의 실용화 방안을 모색하는데 있다.

제 2 절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

현재 느타리를 제외한 다른 버섯에 대한 액체종균의 생산 및 종균의 효율적인 사용에 관한 연구가 미흡한 상태이다. 고체종균을 이용한 접종과정에서 오염도의 증가로 버섯 생산비의 증가에 비해 액체종균의 접종은 무균적 접종이 가능하므로 종균에 의한 버섯생산비의 감소효과가 예상된다. 또한, 고체종균의 경우 버섯재배에 나타나는 종균의 활력 및 오염정도를 확인하여 재배에 이용하기에 시간과 노동력이 요구되며, 그 원인규명에도 많은 시간이 요구된다. 이에 반해 액체종균은 균의 활력 및 오염유무를 짧은 시간 안에 확인하여 건실한 종균을 선별하여 사용할 수 있는 장점이 있다.

느타리와 팽나무버섯에 대한 액체종균을 이용하여 버섯생산 배지에 접종할 수 있는 기계적 자동화에 대한 연구가 미흡하여 작업능률의 효과적인 사용이 어려워 노동력의 절감과 접종시간의 단축 효과를 기대할 수 없었다. 따라서, 접종방법의 기계화로 적은 접종량으로도 균일한 배양과 잡균의 오염을 감소시킬 수 있고, 이로 인해 버섯생산성이 향상될 수 있는 접종방법의 개선이 필요하다.

2. 경제·산업적 측면

새로운 접종원과 재배기술을 개발하면 1회 생산기간의 단축이 가능하며, 출하시기의 조절이 용이함에 따라 연간 생산량이 증가할 뿐 더러 재배농가에서 종균의 자가생산이 가능하며 접종과정의 자동화로 인한 버섯생산비 절감 효과를 얻을 수 있으므로, 느타리·팽나무버섯 액체종균의 생산 및 접종기의 개발이 필요하다. 이러한 연구 결과는 다양한 버섯재배에도 응용이 가능하고 그로 인한 효과적인 버섯재배가 가능해

지기 때문이다.

3. 사회·문화적 측면

고품질의 버섯생산으로 국민의 식생활과 건강증진에도 일조를 할 수 있다.

4. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

느타리의 액체종균 생산에 대한 연구는 농업적인 배지와 배양기의 형태 및 특성과 균학적인 특성은 이미 연구되어 있으며, 팽나무버섯은 액체종균을 이용한 버섯재배 및 기계화를 도입하여 재배를 실시하고 있는 실정이다. 하지만 생산이 완료된 종균의 접종과정의 자동화 및 접종기계에 대한 연구는 학문적 연구가 초기단계이고, 이에 따른 실용화에 대한 전문적인 연구는 아직까지도 미진한 단계이다.

5. 현재 기술상태의 취약성

현재 액체종균을 이용한 버섯 재배가 점차 증가하는 추세이나 액체종균 전용의 접종기는 없고 일부에서 고체종균접종용 기계를 개조하여 사용하고 있으나 성능도 검증되지 않았을 뿐더러 접종장치가 고가이기 때문에 보급률이 낮은 편이다. 따라서, 본 연구에서는 병재배 방식에 적합한 액체종균 접종시스템을 제안하고 일련의 실험을 통하여 알맞은 시스템을 구성하고 이를 작동시키기 위한 최적의 작동조건을 결정하고자 한다. 개발 목표는 버섯의 종류에 따라 요구되는 1회 접종량의 정량 분사와 생육 배지에 균일하게 접종될 수 있도록 하는 것이다.

또한 현재 버섯류의 대부분은 담자균문으로 액체종균에 대한 연구가 미흡하고 생산한 버섯에 대한 액체종균의 형상과 배양특성이 달라 일률

적으로 종균생산방법으로 종균의 생산에는 부적합하다. 그러므로 각각의 버섯에 대한 알맞은 특성조사가 선행되어야 한다.

제 3 절 연구의 목적

본 연구는 액체종균을 이용한 식용버섯 재배의 체계를 확립하여 높은 수확량을 확보하여 농가소득에 이바지 하고자 시도되었다. 구체적인 연구 목적은 느타리와 팽나무버섯에 대한 종균의 배양적 특성과 재배적 특성을 파악하여 액체종균이 다양한 버섯재배에 응용이 가능하도록 하고, 액체종균의 효과적인 접종을 위하여 접종기구와 재배방법에 따른 작업능률 및 균사활력이 우수한 접종방법과 접종장치를 개발하는 것이다.

제 4 절 연구 개발 내용 및 범위

1. 1차년도 연구 개발 목표 및 내용

- 느타리·팽나무버섯 액체 종균의 접종 방법 및 장치 개발
 - 기존의 고체종균 접종장치 등을 조사하고 문헌연구 및 예비실험을 통하여 적절한 접종 방법을 선정한다.
 - 공기분사식, 스프레이-노즐식, 벤츄리관식, injection식 등의 기구식 접종 장치를 설계하여 구성 또는 제작하여 접종 메카니즘을 규명하고 적정 작동 조건을 규명한다.
 - 접종 균일도와 작업 성능을 지표로 성능평가를 실시한다.

- 느타리·팽나무버섯 액체종균의 배양체계 확립 및 농가 실증시험
 - 느타리·팽나무버섯균의 배지 조건과 액체배양 특성 조사.
 - 기구식 접종장치에 맞는 대량배양에 조건 규명.

- 기구식 접종장치에 맞는 적정 배지 선발을 선발하여 접종실험을 실시한다.

2. 2차년도 연구 개발 목표 및 내용

- 느타리·팽나무버섯 액체 종균의 접종 방법 및 장치 개발
 - 1차년도에서 개발한 기구식 접종기 개념을 확장하여 접종기 개발을 위한 시스템을 설계하고 구성하여 보급형 액체종균 접종기를 개발한다.
 - 각종 센서와 PLC를 이용하여 제어 시스템을 구성하여 병재비용 접종장치의 자동화 시스템을 구축한다. 개발 목표 수준은 접종기계가 농가에서도 사용할 수 있도록 소규모, 저가로 개발되어야 하며 최소의 기능으로 자동화를 실현하고자 한다.
 - 접종 균일도와 작업 성능, 오작동 여부 등을 지표로 성능평가를 실시한다.
- 느타리·팽나무버섯 액체종균의 배양체계 확립 및 농가 실증시험
 - 접종방법에 대한 자동화 시스템에 적합한 배지를 개발.
 - 기구식 접종장치에 맞는 적정 접종량에 의한 버섯형성 조사.
 - 보급형 액체종균 접종장치에 맞는 액체종균 배양하여 액체배양에서 야기될 수 있는 환경조사 및 문제점을 점검한다.
 - 느타리·팽나무버섯 형성을 위한 농가 실증시험을 실시한다.

제 2 장. 접종시스템 및 노즐 선정과 적정 작동범위 설정

제 1 절 서론

액체종균을 접종하기 위해선 종균과 함께 배양액도 분사되어야 한다. 종균은 균사의 덩어리로 배양액 속을 부유하며 자라는데, 일반적으로 종균덩어리는 딱딱하지 않고 무르지만 균사가 서로 엉켜있어 쉽게 분리되지도 않고, 또한 노즐이나 유체 압력 조절기, 솔레노이드 밸브 등의 작은 틈새에 끼어 분사 통로가 차단되는 등 기기의 오작동을 불러오기도 한다. 이러한 액체종균을 분사 방식으로 접종하기 위해선 이물질들을 포함한 유체를 분사할 수 있는 적정 구경 및 형태의 노즐이 선별되어야 하고 분사 펌프 등 부수 장치도 필요하다.

현재 액체종균을 이용한 버섯 재배가 점차 증가하는 추세이나 액체종균 전용의 접종기는 없고 일부에서 고체종균접종용 기계를 개조하여 사용하고 있으나 성능도 검증되지 않았을 뿐더러 접종장치가 고가이기 때문에 보급률이 낮은 편이다. 따라서, 본 연구에서는 병재배방식에 적합한 액체종균 접종시스템을 제안하고 일련의 실험을 통하여 알맞은 시스템을 구성하고 이를 작동시키기 위한 최적의 작동조건을 결정하고자 한다. 개발 목표는 버섯의 종류에 따라 요구되는 1회 접종량의 정량 분사와 생육 배지에 균일하게 접종될 수 있도록 하는 것이다.

액체종균과 같은 이물질이 함유된 액체를 분사하는데 적합한 것으로 판단되는 2가지 시스템을 비교하고 또한 개발목표를 달성할 수 있는 노즐을 선정하고 그에 따라 작동 조건을 결정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 액체종균접종장치의 제안

가. 펌프-노즐식

펌프-노즐식은 공압으로 작동하는 diaphragm pump로 액체종균을 펌핑하여 이류체 노즐을 통하여 분사되도록 하였으며, 일정한 분사량을 유지하기 위하여 분사되지 않고 노즐에 남아 있는 액체종균은 종균탱크로 순환된다. 탱크로 돌아가는 쪽의 압력조절기를 이용하여 분사압력을 일정하게 유지할 수 있도록 하였다. 탱크는 10 kg/cm²의 압력을 견딜 수 있도록 제작하였으며, 상부 뚜껑에는 각종 배관과 압력계 등을 설치할 수 있도록 하였으며, 과압력이 걸렸을 때 압력을 제거하는 안전핀, 소형 모터에 의해 구동되는 교반기를 설치하여 접종되는 동안 액체종균을 교반할 수 있도록 하였다. 상부 뚜껑은 탈·부착이 용이하도록 볼트로 체결할 수 있도록 설계하였다. 공기압축기에는 수분과 기름을 제거하는 공기필터를 장착하여 펌프를 구동하고, 이류체노즐(twin fluid nozzle, 6552-1/8 JAC)을 작동하도록 하였다. 이류체노즐의 on-off는 공압 방향제어 밸브를 솔레노이드로 조작하여 작동하게 하였으며 이 솔레노이드 밸브는 PLC(Master-10s, LG, KOREA)에 의해 제어된다.

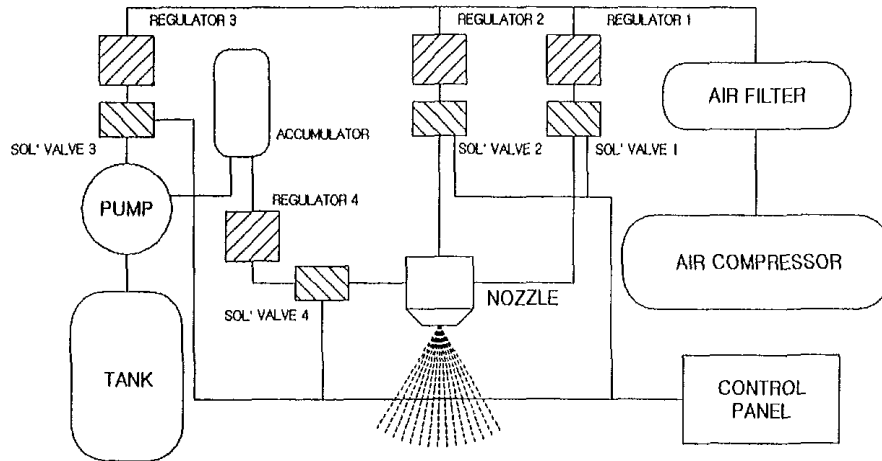


그림 2-1 펌프식 액체중균접종장치의 구성도

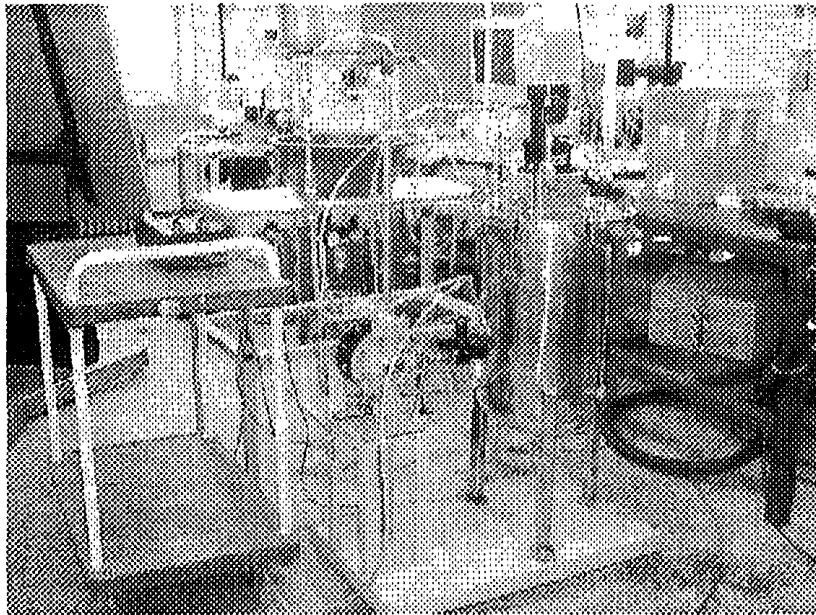


그림 2-2 접종실험 장치의 외관도.

나. 공기가압식

1) 이류체 노즐식

공기가압-이류체 노즐식은 종균탱크에 공기를 주입함으로써 발생하는 압력을 이용하여 분사하는 방식으로 이류체 노즐을 이용하여 공기와 함께 분사하는 방식이다. 종균탱크는 펌프식 시스템에서의 탱크를 배관만 달리하여 사용할 수 있도록 하였다. 공기압축기로부터 탱크로 공급되는 공기는 레귤레이터에 의해 조절되며, 또 다른 공기배관을 설치하여 이류체노즐(ST-6, FUSO SEIKI, JAPAN)을 작동하도록 하였다.

2) 일반노즐식

공기가압-일반노즐식은 공기가압-이류체 노즐식과 같은 형식이나, 고가의 이류체 노즐 대신에 일반형 노즐(KB1/4GGAX-7; Teejet TGSS10, Spraying Systems Co, KOREA)을 사용한다. 노즐 on/off는 처음에 솔레노이드 밸브를 사용하였으나 군사에 의해 솔레노이드 밸브가 완전히 닫히지 못하는 경우가 발생하여 공압으로 작동하는 밸브를 사용하였다. 공압 밸브의 on/off는 PLC에 의해 제어된다.

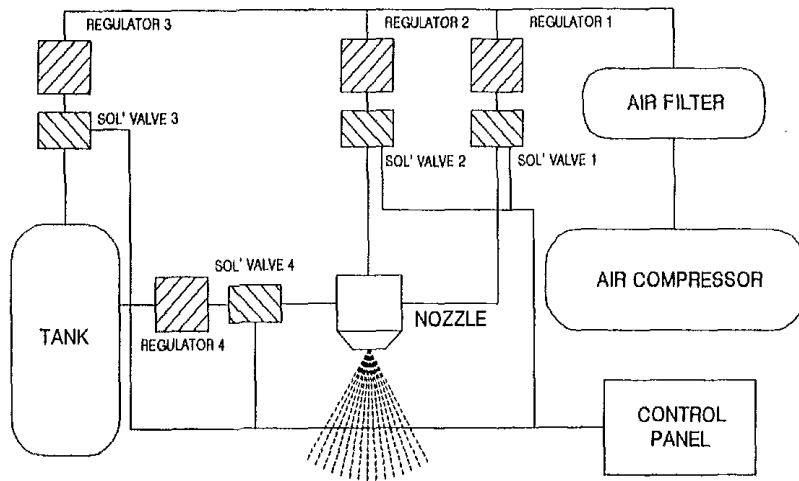


그림 2-3 공기가압-이류체노즐 방식의 액체종균 접종장치.

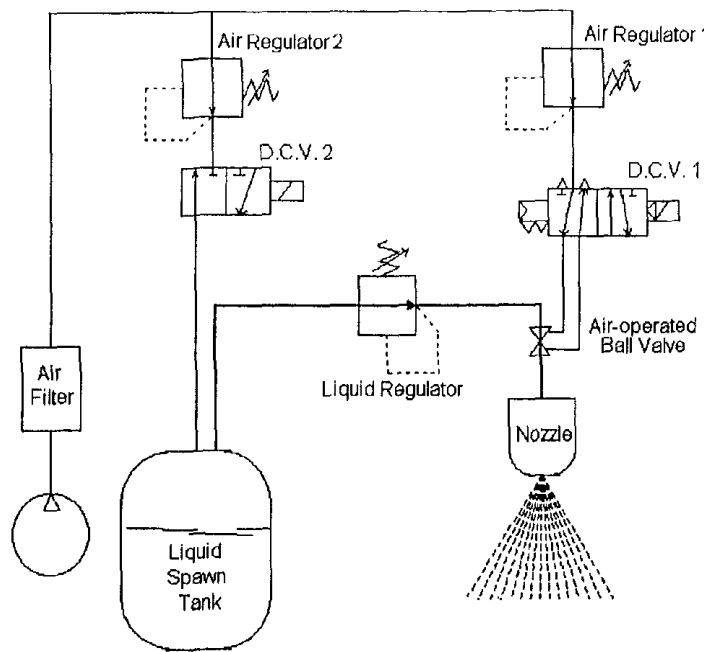


그림 2-4 공기가압-일반노즐 방식의 액체종균 접종장치.

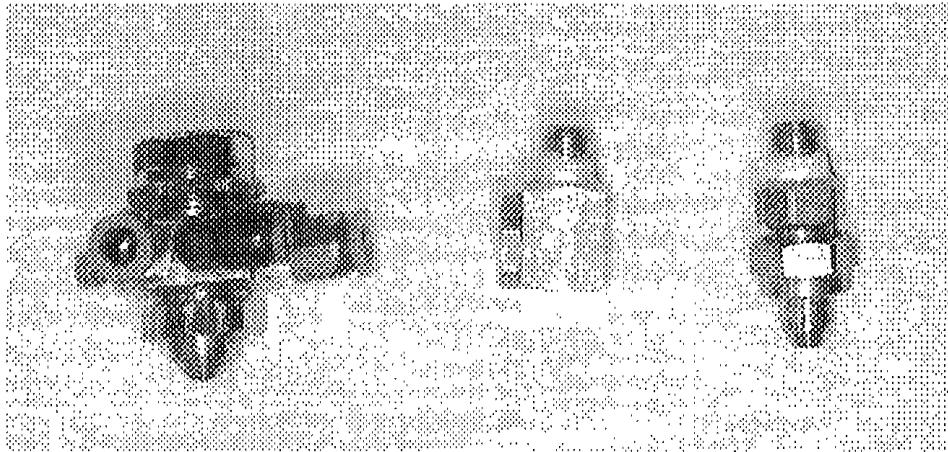


그림 2-5 종균접종실험장치에 사용된 노즐
(좌로부터 이류체, 일류체(I), 일류체(II)).

2. 성능평가를 위한 실험방법

개발 목표를 달성하기 위하여 액체종균 접종장치의 선정, 노즐의 선정과 작동 인자 및 그 수준을 결정하기 위하여 순차적으로 일련의 실험을 수행하였다. 첫째, 시스템을 구성한 후 배양된 액체종균을 사용하여 다양한 작동 조건에서 시스템의 노즐부, 솔레노이드 밸브, 압력조절기, 배관 등에서의 막힘 여부를 조사하였다. 둘째, 공기가압식 접종장치에서 세 가지 종류의 노즐을 선발하여 물을 사용하여 1회 접종량(분사량)과 접종균일도를 지표로 설정하여 성능평가를 하여 최적의 시스템을 선발하였다. 셋째, 선발된 시스템에 대하여 목표접종량에 따른 여러 작동 인자의 수준을 결정하기 위하여 액체종균을 사용하여 각 작동조건에서 1회 접종량을 측정하였다. 여기서 얻은 데이터를 이용하여 액체종균을 접종하기 위한 접종장치의 작동 조건을 제시하였다. 이때 분사량을 이용하여 물분사시와 액체종균 분사시의 차이를 규명하였다.

가. 시스템의 작동 상태 - 막힘 여부

제안된 펌프식과 공기가압식 및 장착된 노즐에 따라 시스템의 작동 상태를 파악하였다.

나. 점종균일도

제한된 면적의 배지에 얼마나 종균이 균일하게 점종되는 지를 조사하였다. 실험은 공기가압식 점종장치에 3종류의 노즐을 교체 장착하며 수행하였다.

1) 이미지를 이용한 분사각도 측정

각 노즐의 분사 각은 물에 흰색 물감을 섞어 분사된 입자들이 배경과 확실히 구분되도록 한 다음 영상처리장치로 측정하였다. 영상처리장치는 칼라 CCD 카메라(CV-M70 U.S.A.), 프레임 그래버 (FlashBus MVPro, INTEGRAL TECHNOLOGIES, INC. U.S.A.)와 컴퓨터로 구성되어 있으며 조명은 2752LX로 3파장 램프 2개를 사용하였다. 영상처리 전용 소프트웨어인 Image Pro v. 3.0 (MEDIA CYBERNETIC, U.S.A.)을 이용하여 분부각을 측정하였다. 분사되는 순간 영상을 획득하여 노즐로부터 하단 방향으로 6cm, 8cm, 10cm 떨어진 위치에서 분사되는 유체의 폭을 측정하여 분사 각으로 환산하였다. 일류체노즐에서는 압력(4 수준 ; 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 kg/cm²), 이류체 노즐에서는 니들밸브의 열림 정도(7수준)를 변화시키며 분사각을 측정하였다.

2) 동심원 병을 이용한 분사 균일도 측정

노즐에서 분사된 물 또는 액체종균이 점종표면에 얼마나 균일하게 분사되는 지 측정하기 위하여 간단한 실험도구를 제작하였다. 실험도구는 플라스틱 병을 이용하여 4cm, 7cm, 10cm의 직경을 갖는 원형통을 만든

후 노즐 직 하단에 설치하였다. 직경 4cm의 병은 접종표면의 중심부(중심점부터 반경 2cm의 면적)를 나타낸 것이고, 직경 7cm는 중간부, 직경 10cm는 외곽부를 나타낸 것이다. 실험은 동일 조건에서 3개의 원통을 바꾸어가며 분사되는 양을 측정하여 접종표면에 얼마나 고루 분포되는지를 나타내었다. 이때 10cm의 원형통은 4cm와 7cm의 분사량을 모두 포함하고 7cm역시 4cm의 원형통에 분사된 양을 포함하게 된다.

이류체노즐을 이용한 분사량 및 균일도 실험은 예비실험을 바탕으로 표 2-1에서와 같은 수준에서 실험 조건을 설정한 후 5회 반복하였다.

표 2-1 공기가압식-이류체노즐의 실험 요인 및 수준

실험요인	수준
니들밸브 열림정도	20, 25, 30, 35
니들밸브 열림시간 (분사시간, 초)	0.5, 1.0, 1.5
공기분사압(kgf/cm ²)	0.5, 1.0, 1.5
액체분사압(kgf/cm ²)	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2
노즐 설치 높이(cm)	6, 8, 10

일류체노즐은 이류체노즐에 비해 분사량 및 균일도에 영향을 줄 수 있는 인자가 적고 조작도 간편하다. 균일도 실험은 표 2-2와 같은 수준에서 5회 반복하여 실시하였다. 일류체노즐은 두 가지 종류가 사용되었으며 그림 2-5에서 나타낸 바와 같이 각각 일류체노즐(I) 과 일류체노즐(II)로 표시하였다.

표 2-2 공기가압식-일류체노즐의 실험 요인 및 수준

실험요인	수준
분사시간(초)	0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5
액체분사압(kgf/cm ²)	0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2
노즐 설치 높이(cm)	6, 8, 10

다. 점종량

물을 이용한 1회 점종량 측정은 점종 균일도 실험과 같은 조건에서 균일도 측정실험과 동시에 이루어졌다.

라. 적정 시스템 및 노즐 선정 후 액체종균을 이용한 성능 실험

위의 실험에서 얻어진 데이터를 통해서 액체종균을 점종하기에 가장 적합한 노즐 하나를 선택하여 실제 종균을 사용해 분사 실험을 하였다. 실험에 사용된 종균은 팽나무버섯과 느타리버섯(농기2-1호)으로 배양액에 비례한 원균 점종량을 기준으로 2~10%까지 5단계, 배양일수 2일과 4일로 나누어 2단계 등 총 10종류의 액체종균 샘플로 실험을 실시하였다. 시스템의 작동조건은 표 2-3과 같은 수준에서 3회 반복 실험하였다.

표 2-3 공기가압식-일류체노즐(II)의 실험 요인 및 수준

실험요인	수준
분사시간(초)	0.3, 0.6, 0.9
액체분사압(kgf/cm ²)	0.4, 0.6, 0.8, 1.0

실험결과는 물을 이용한 분사량 실험과 비교하여 액체종균 분사할 때 그 차이점을 규명하였고 SAS분석을 통하여 달리 배양된 액체종균에 따라 각 시스템의 작동조건에서 분사량에 차이가 있는지 알아보았다.

제3절 결과 및 고찰

1. 시스템의 작동상태에 따른 접종시스템의 선정

제안된 펌프식 접종장치나 공기가압식 접종장치에서 기본적인 성능실험을 수행한 결과 대부분의 경우에 막히는 경향은 나타나지 않았다. 그러나, 펌프식 접종장치에서 액체종균의 흐름을 조절하기 위해 솔레노이드 밸브를 설치하였으나 밸브 간극이 너무 작아 종균 덩어리가 부서지지 못하고 걸려 누적되는 현상이 발생되어 공압 밸브로 교체하였다. 저압에서는 펌프의 맥동현상이 심해 탱크로 돌아오는 쪽에서 압력을 제어하기가 어려워 균일한 분사량을 얻을 수 없었다. 맥동을 줄이기 위하여 accumulator를 제작하여 시스템에 추가하였다. 공압펌프를 통과할 때는 종균이 부서지는 현상은 없었으나 압력조절기를 통과한 후 심하게 부서지는 현상을 보였다. 펌프식의 경우 고압용 탱크가 필요 없고 또한 적정한 압력 이상에서는 접종관의 압력을 일정하게 유지하기가 용이하나 공압펌프 자체를 분해, 조립하기가 불가능해 살균할 수 없는 문제가 발견되어 근본적으로 접종장치로서 채택할 수가 없었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 기어 펌프의 채택을 검토하였으나 본 접종장치에서 요

구되는 용량의 기어펌프는 별도의 개발, 제작이 요구되어 향후의 연구 과제로 남겼다. 기어펌프는 전기모터에 의해서 구동되는데 펌프만 분리하여 살균이 가능할 것으로 판단된다.

따라서, 본 연구에서는 접종장치의 개발 방향을 공기가압식으로 선정하였다.

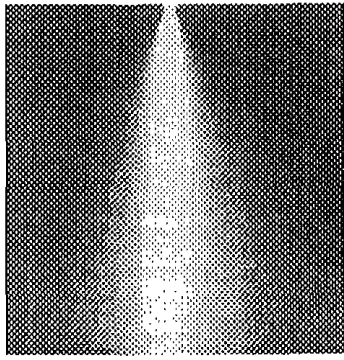
2. 공기가압식 접종장치에서의 성능 실험

공기가압식 접종장치에 3가지 노즐을 교체 장착하여 접종균일도와 정량 접종 등의 성능 평가 결과는 다음과 같다.

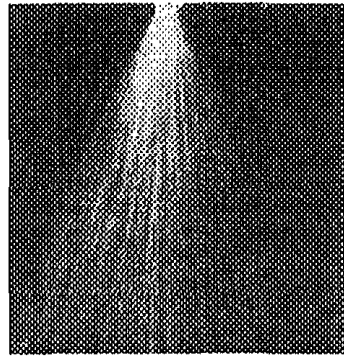
가. 접종 균일도

1) 이미지를 이용한 분사각 측정

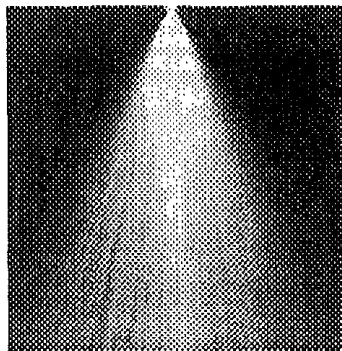
그림 2-6은 각 노즐에서의 분사상태를 보여 준 것이고 표 2-4는 일류체노즐(I)을 사용하였을 때 분사각을 측정한 결과이다. 일류체 노즐(I)의 경우 분사형태가 원형을 이루지 못하고 타원형을 이루고 있고 분사량도 노즐의 앞쪽으로 많이 치우치는 것으로 나타났다. 이는 노즐의 입구와 출구가 90°로 꺾여 있어 분사압력에 의해 노즐의 전면부와 후면부의 분사각과 분사량의 차이를 보이는 것으로 판단된다. 분사 각도는 압력 증가에 비례하지 않고 0.8kgf/cm²에서 가장 좁은 각을 보였고 이후로 각이 넓어짐을 볼 수 있다. 또한 측정 높이에 따라 분사각이 일정치 않은 것은 분사 형태가 원형이 아니고 노즐에 벤이 없어서 분사형태를 일정하게 잡아주지 못하기 때문으로 판단된다.



(a) 이류체노즐



(b) 일류체노즐(I)



(c) 일류체노즐(II)

그림 2-6 각 노즐별 분사 상태.

표 2-4 일류체노즐(I)의 압력과 측정높이별 분사각

측정높이 \ 압력	0.6 kgf/cm ²	0.8 kgf/cm ²	1.0 kgf/cm ²	1.2 kgf/cm ²
6cm	86.68	73.09	82.95	89.62
8cm	92.42	79.05	87.31	93.45
10cm	96.50	84.02	91.96	95.97

표 2-5는 노즐 내에 벤이 있고 유입구와 출구가 직선형인 일류체 노즐(II)을 사용한 결과이다. 원형분사를 하고 분사형태가 압력에 크게 영향을 받지 않는 것으로 판단되며 높이에 따라서도 큰 영향을 받지 않는 것으로 판단된다. 일류체노즐(II)의 경우 노즐 내에 유체를 유도할 수 있는 벤이 있어 분사입자 및 분사형태를 고르게 하여 높이별, 압력별 분사각에 큰 차이를 보이지 않게 하는 것으로 사료된다. 일류체 노즐의 경우 벤의 크기가 압력조절기를 통과하여 잘게 부서진 버섯종균을 통과시킬 수 있는 정도 내에서 필요한 것으로 판단된다.

표 2-5 일류체노즐(II)의 압력과 높이별 분사각

측정높이 \ 압력	0.6 kgf/cm ²	0.8 kgf/cm ²	1.0 kgf/cm ²	1.2 kgf/cm ²
6cm	88.73	89.19	87.22	88.12
8cm	88.13	88.91	86.37	87.48
10cm	87.23	88.08	85.84	87.35

이류체노즐의 분사각을 측정할 때 분사압은 0.6kgf/cm²이었으며 높이 10cm에서 측정하였다. 표 2-7에서와 같이, 분사각이 니들밸브의 열림 정도에 따라 점차 증가하다 40이상에서는 감소하였는데 40이상에서는 needle이 거의 완전히 열린 상태여서 분사가 직선형태를 나타내었다. 이류체의 경우 일류체 노즐보다 상당히 미립자의 분사입자를 만들 수 있었고 분사형태나 분사입자의 크기에서 일류체노즐보다 좋은 것으로 판단된다. 하지만 유체와 함께 분사되는 공기의 압력이 낮으면 needle을 빠져 나온 유체를 일정한 각도 이상으로 퍼뜨리지 못하고 또한 공기압이 높을 경우 분사입자가 미립화되고 배양병의 툽밥 또는 기타배지를

날려 접종장치 또는 뒤의 배양병에 떨어져 다른 균의 오염 및 접종상태를 안 좋게 하는 경우가 생길 것으로 예상되었다.

표 2-6 이류체노즐의 니들 열림 정도에 따른 분사각

니들벨브 열림정도	15	20	25	30	35	40	45
각도	47.89	52.26	55.40	53.73	59.44	57.73	57.85

2) 동심원통을 이용한 접종균일도 측정

가) 이류체 노즐

접종표면으로부터 6cm 높이에 노즐을 설치한 경우 접종표면에서 측정 한 분사입자의 분포를 분석한 결과, 이 높이에서는 노즐의 분사각을 고려할 때 분사되는 입자는 모두 직경 6~7cm 이내에 들어오므로, 직경 4cm 및 직경 7cm의 원통에 대하여만 측정하였다. 여기서 이류체노즐의 공기분사압은 1.0 kgf/cm²으로 고정한 상태이었다. 측정된 값은 각 원통 별로 큰 차이가 없는 것으로 보이나 이는 각각의 원통이 그보다 작은 원통의 분사량을 포함하고 있어 실제로 직경 4cm이상 7cm미만의 구간에 떨어지는 분사량은 매우 극소량이다. 4cm이하의 분사량이 저압에서는 전체 분사량의 96%정도이고 고압에서는 89%를 차지한다. 배양병 증양의 천공에 6:4정도로 주변보다 많은 양의 종균이 접종되면 좋으나 이류체 노즐의 경우 80%이상이 천공에 분사될 것으로 생각되며 공기 분사압을 높일 경우 배양병의 배지가 부서져 날리고 분사유체가 미립화되어 액체 종균 접종이 어려울 것으로 사료된다.

노즐의 설치 높이를 8cm로 하고 이류체노즐의 공기 유입구로의 공기분

사압을 몇 단계로 나누어 실험한 결과, 공기분사압이 증가함에 따라 원통별 분사량이 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 이류체 노즐에서 한 쪽 유체의 압력이 증가함에 따라 그것의 유량이 증가하여 상대적으로 다른 쪽의 유량을 감소하기 때문으로 판단된다.

노즐의 설치 높이 10cm에서 측정된 값은 노즐의 높이가 변함에 따라 각 원통에 분사되는 분사량도 변하였다. 따라서 분사 균일도에는 노즐의 높이와 공기 분사압이 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

그림 2-7은 노즐 설치 높이 10cm, 공기 압력 1.0kgf/cm², 니들밸브 열림정도 '35' 분사시간 1.5초에서 집중표면의 각 직경내의 면적 당 분사량을 나타낸 것이다. 다른 수준에서도 같은 모양의 그래프를 나타낸다. 4cm~7cm사이의 분사량은 압력이 낮고 공기 분사압이 높을수록 많았다. 병을 집중할 때에는 종균 분사압을 상대적으로 높이고 공기 분사압을 낮추는 것이 유리할 것으로 사료되나 분사노즐의 위치가 배양병 위의 3cm에 있으므로 배양병의 천공으로의 분사량은 더욱 많아질 것으로 예상되고 분사 균일도를 높이기 위해 분사 공기압을 높일 경우 베지의 날림이나 액체종균이 미립화되어 집중 성공률이 떨어질 것으로 판단된다. 균상 집중시에는 분사압을 낮게 하고 공기 분사압을 크게 하여 분사 전면적에 균일하게 집중하는 것이 유리할 것을 생각되나 분사압이 낮을 경우 분사량도 같이 낮아져 균사 및 상자 재배할 때 집중시간이 많이 걸릴 것으로 판단된다. 따라서 이류체노즐을 이용하여 병재배용 용기에 집중하기는 힘들 것으로 판단된다.

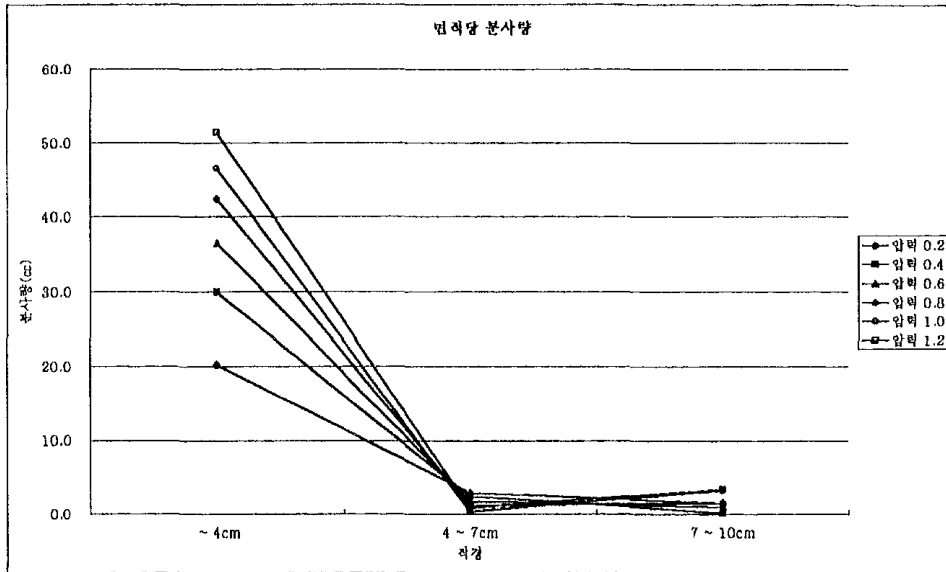


그림 2-7 이류체노즐의 직경별 면적 당 분사량(ml).

나) 일류체노즐(I)

일류체노즐(I)에 대하여 높이별, 압력별, 분사시간에 따른 분사량 및 균일도 측정을 한 결과, 이류체에 비하여 분사 입자도 굵고 전체적으로 균일하게 분사됨을 알 수 있었다. 4cm미만의 분사량이 전체 분사량의 53%정도를 차지하고 있고 분사압력이 높을수록 더욱 줄어드는 경향을 보이고 있다. 고압으로 분사할 때 액체종균이 미처 천공 속으로 들어가지 못하고 공기막을 형성하여 배양병 밖으로 넘치는 현상이 있었다.

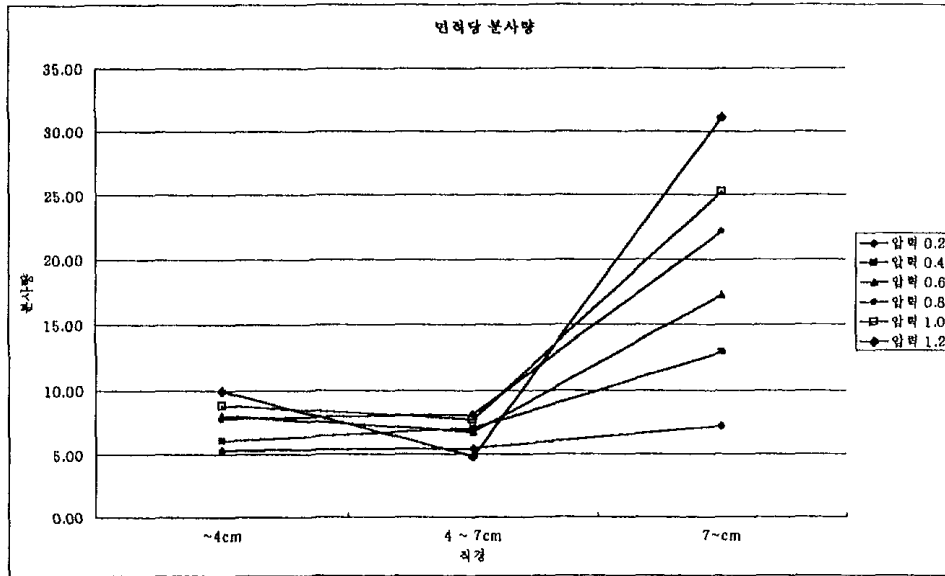


그림 2-8 일류체노즐(I)의 직경별 면적 당 분사량(ml).

그림 2-8은 높이 10cm, 분사시간 0.9초에서 각 직경내의 면적 당 분사량을 나타낸 것이다. 이류체 노즐에 비해 균일하게 분사됨을 알 수 있었고 이류체 노즐 실험과는 정반대로 ~7cm이하에서 분사량이 ~7cm이상에서의 분사량보다 작았고 또한 분사 각도도 이류체에 비해 2배정도 컸다. 이류체 노즐의 경우 분사각이나 분사 입자의 크기를 분사 공기압과 니들밸브의 열림정도로 조절하는데 분사된 공기가 서로 충돌 상쇄하여 분사각이 작아지고 분사입자가 미립화되어 4cm는 이상의 분사량이 적었고 반면 일류체 노즐의 경우 분사각과 분사입자의 크기를 분사압과 노즐의 구경으로 조절하여 분사입자간 간섭이 적어 분사각이 커져 실험 장치로 쓰인 원통의 벽에 맞고 떨어져 7cm이상의 분사량이 많아진 것으로 판단된다. 또한 벤이 없어 분사형태가 일정하지 않고 유체의 유입방향에 따라 타원형을 이루고 분사량도 달라짐을 확인할 수 있었다. 이 노즐을 사용하게 된다면 병 접종보다는 균상이나 상자 접종에 유리 할 것으로 사료된다.

다) 일류체노즐(II)

일류체노즐(II)은 노즐 내에 벤이 있는 노즐로서 전체 분사량에서는 일류체노즐(I)에 비하여 약 16.6%정도 많이 분사되었다. 또한 반복실험을 통해서 일류체노즐(I)(표준편차 0.97)보다 일류체노즐(II)(표준편차 0.12)에서 1회 분사량이 균일하게 나옴을 알 수 있었다. 4cm미만의 분사량은 전체 분사량의 52%정도이며 분사압이 높아질수록 비는 낮아져 일류체노즐(I)보다 20%정도 분사균일도가 좋은 것으로 판단된다. 실험은 일류체노즐(I)의 실험을 바탕으로 분사 시간의 실험 수준을 3수준으로 낮추고 실험하였다.

그림 2-9는 높이 10cm, 분사시간 0.9초에서 각 직경내의 면적 당 분사량을 나타낸 것이다. 일류체노즐(I)과 비슷한 그래프의 형태를 보여주고 있다. 다른 노즐에 비해 균일한 분사량 분포를 보여주고 있으며 특히 저압에서는 이류체 노즐의 특징을 보여주며 고압에서는 일류체노즐(I)의 특징을 보여주고 있다. 또한 분사형태도 고르게 나타나고 분사각이나 1회 분사량 측정 실험에서 일류체노즐(I)이나 이류체노즐에 비해 분사각이 일정하고 분사량이 일정하다는 것을 알 수 있었다. 또한 유체의 유입방향에 관계없이 일정한 분사형태를 나타내고 노즐의 전후좌우로도 고른 분사량을 보이고 있어 일류체 노즐에서 벤이 분사균일도나 분사형태에 미치는 영향이 크다는 것을 알 수 있었다.

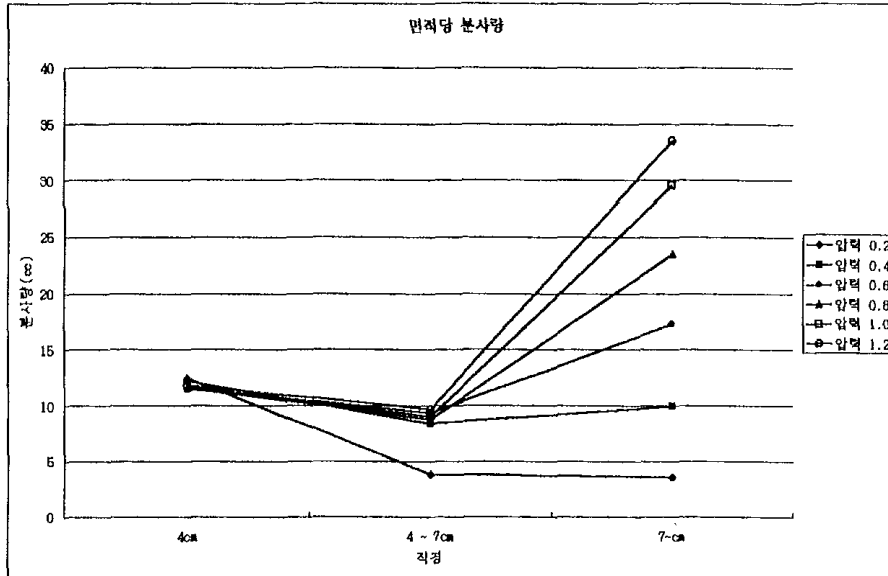


그림 2-9 일류체노즐(II)의 직경별 면적 당 분사량(ml).

따라서 일류체노즐(II)을 선정하여 병 또는 상자, 균상 배지에 액체
종균 접종을 하는 것이 가장 안정적이라고 사료된다.

3. 액체종균을 이용한 성능실험과 작동 요건 설정

가. 팽나무버섯

액체종균을 이용한 실험은 공기가압식-일류체노즐(II)로 시스템을 구
성하여 실험하였다. 실험수준은 물을 이용한 실험의 결과를 바탕으로
가급적 실험수준을 줄여서 수행하였다. 표 2-7은 원균 접종량에 따른
팽나무종균 1회 분사량을 나타낸 것이다.

표 2-7 팽나무버섯종균 접종량별 분사량(ml)

배양일	분사압력 (kg/cm ²)	분사시간 (초)	원균 접종량				
			2%	4%	6%	8%	10%
			분사량	분사량	분사량	분사량	분사량
2일	0.4	0.3	12.93	11.47	13.20	9.53	11.67
		0.6	21.13	21.87	21.47	16.87	21.73
		0.9	30.13	30.73	29.00	25.33	28.53
	0.6	0.3	14.87	14.27	14.07	13.13	14.13
		0.6	26.67	25.53	26.07	25.40	26.07
		0.9	37.73	37.67	38.93	37.80	39.40
	0.8	0.3	16.40	-	16.07	13.13	16.53
		0.6	30.20	-	29.20	25.40	29.67
		0.9	43.93	46.00	44.00	37.80	46.87
	1.0	0.3	17.53	-	18.20	14.47	18.20
		0.6	33.67	-	34.13	28.07	33.53
		0.9	48.93	-	49.80	42.93	51.33
4일	0.4	0.3	11.40	-	11.47	10.53	10.33
		0.6	18.93	-	19.53	22.07	17.93
		0.9	30.20	-	28.93	29.80	30.93
	0.6	0.3	15.20	-	13.80	11.80	13.93
		0.6	21.20	-	25.33	23.07	24.73
		0.9	35.53	-	38.07	36.00	35.60
	0.8	0.3	16.67	-	16.13	15.67	15.33
		0.6	30.33	-	30.00	30.47	30.40
		0.9	45.67	-	43.20	44.27	44.27
	1.0	0.3	18.07	-	17.73	16.67	17.53
		0.6	33.87	-	33.07	32.07	33.13
		0.9	50.92	-	48.73	48.00	49.80

종균 접종량별로 분사량의 차이가 있는지를 알아보기 위해 SAS의 PROC GLM을 이용해 Turkey's Studentized range test를 실행하여 다중분산분석을 하였다. PROC GLM을 사용한 이유는 ANOVA의 절차를 포함하며 실험 수준별로 빠진 데이터가 있어 자료가 불균형을 이루고 다중비교를 할 수 있어 사용하게 되었다. 표 2-8은 그 결과 값을 나타낸 것으로 유의 수준 $\alpha=0.05$ 에서 P값이 0.9987이므로 접종량별로 분사량에 차이가 없

다는 가설을 기각하지 못하여 가설을 증명함을 나타내주고 있다. 따라서 원균 접종량별로 분사량의 차이가 없다고 할 수 있다.

표 2-8 SAS 분석 결과1

The SAS System					2
General Linear Models Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	F Value	Pr > F	
Model	8	132.80681922	0.11	0.9987	
Error	94	13844.34142738			
Corrected Total	102	13977.14824660			
	R-Square	C.V.	Y Mean		
	0.009502	44.93762	27.0061165		
Source	DF	Type I SS	F Value	Pr > F	
A	8	132.80681922	0.11	0.9987	
Source	DF	Type III SS	F Value	Pr > F	
A	8	132.80681922	0.11	0.9987	

또한 표 2-9는 물과 액체종균의 분사량에 차이가 있는지를 알아보기 위해 위와 동일한 분석법으로 분석한 결과로 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 P값이 0.9216이므로 물과 액체종균의 분사량에 차이가 없다는 가설을 기각하지 못하여 물을 사용했을 때와 액체종균을 사용했을 때의 분사량에 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

표 2-9 SAS 분석 결과2

The SAS System					2
General Linear Models Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	F Value	Pr > F	
Model	3	75.64626823	0.16	0.9216	
Error	44	6863.90950625			
Corrected Total	47	6939.55577448			
	R-Square	C.V.	Y Mean		
	0.010901	45.13594	27.6717708		
Source	DF	Type I SS	F Value	Pr > F	
A	3	75.64626823	0.16	0.9216	
Source	DF	Type III SS	F Value	Pr > F	
A	3	75.64626823	0.16	0.9216	

적정 접종량을 분사하기 위한 분사조건을 찾기 위해 SAS의 PROC RSREG를 이용하여 반응표면분석법으로 회귀방정식 구하였다. 이미 SAS을 이용하여 원균 접종량별로 분사량에 영향을 주지 않는다는 것을 이용하여 회귀방정식을 구하는데 필요한 데이터는 원균 접종량에 상관없이 전체 데이터를 이용하여 구하였다. 다음은 팽나무버섯의 분사압력 x_1 과 분사시간 x_2 를 변수로 하는 분사량 y 에 관한 회귀식 (1)과 3차원 그래프(그림 2-10)로 회귀식의 R^2 값은 0.9776이다.

$$y = -1.37 + 16.71 x_1 + 10.6 x_2 - 13.24 x_1^2 + 4.37 x_2^2 + 37.84 x_1 x_2 \dots\dots(1)$$

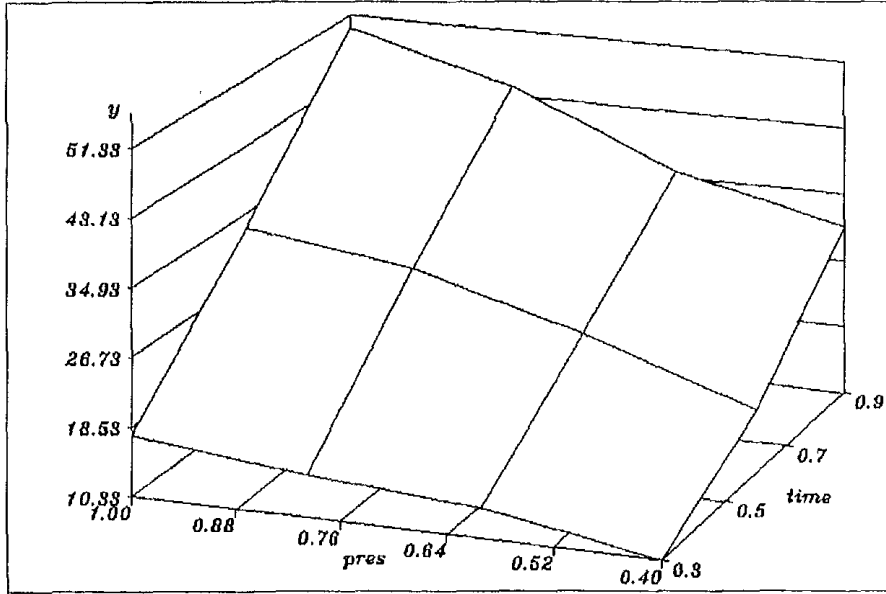


그림 2-10 팽나무버섯의 반응표면그래프.

위의 회귀식을 이용하여 표 2-10과 같은 접종장치의 작동조건을 결정할 수 있게 되었다.

표 2-10 팽나무버섯의 분사량별 분사조건

분사량	10cc	15cc	20cc	25cc	30cc
분사압력(kgf/cm ²)	0.45	0.55	0.45	0.65	0.75
분사시간(초)	0.23	0.34	0.55	0.56	0.63

나. 느타리버섯

표 2-11은 느타리버섯에 대한 액체종균 분사량을 나타낸 표이다. 표에서 열은 회색바탕의 데이터와 흰바탕의 갖는 데이터는 서로 배양액의 조성이 틀린 것으로 여기서는 흰바탕의 데이터를 기준으로 분석하여 실험하였다.

표 2-11 팽나무버섯종균 접종량별 분사량

배양일	분사압력 (kgf/cm ²)	분사시간 (초)	원균 접종량				
			2%	4%	6%	8%	10%
			분사량	분사량	분사량	분사량	분사량
2일	0.4	0.3	9.00	9.47	13.53	13.33	10.73
		0.6	21.00	18.07	25.47	24.53	19.80
		0.9	31.93	28.07	34.47	33.93	27.33
	0.6	0.3	13.73	11.13	16.73	15.33	12.73
		0.6	26.47	22.13	29.73	27.87	24.80
		0.9	39.33	33.00	41.80	39.47	36.47
	0.8	0.3	17.13	13.00	19.40	16.00	15.27
		0.6	32.27	26.40	34.47	33.47	29.73
		0.9	43.47	41.60	48.40	47.73	44.33
	1.0	0.3	18.07	15.20	20.87	20.07	17.27
		0.6	34.47	31.87	38.60	35.93	33.67
		0.9	46.47	47.93	55.67	52.42	49.53
4일	0.4	0.3	-	10.73	14.27	9.47	-
		0.6	-	19.73	26.27	17.53	-
		0.9	-	27.80	37.93	25.53	-
	0.6	0.3	-	13.27	17.93	7.13	-
		0.6	-	25.47	30.60	20.60	-
		0.9	-	36.53	43.20	30.60	-
	0.8	0.3	-	15.13	19.40	13.73	-
		0.6	-	29.33	34.93	26.87	-
		0.9	-	43.33	50.00	39.53	-
	1.0	0.3	-	16.73	21.67	14.53	-
		0.6	-	33.53	39.47	27.27	-
		0.9	-	48.93	55.42	42.67	-

적정 분사량을 분사하기 위한 분사조건을 찾기 위해 팽나무버섯과 마찬가지로 SAS의 PROC RSREG를 이용해 반응표면분석법으로 회귀방정식을 구할 수 있었다.

원균 접종량별, 배양일수별로 분사량의 차이가 있는지를 알아보기 위해 SAS의 PROC GLM을 이용해 Turkey의 Studentized range test를 실행하여 다중분산분석을 하였다. 표 2-12는 그 결과 값을 나타낸 것으로 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 P값이 0.8733이므로 종균 접종량별로 분사량에 차이가 없다는 가설을 기각하지 못하여 가설을 증명함을 나타내주고 있다. 따라서 각 원균 접종량별로 분사량의 차이가 없다고 할 수 있다.

표 2-12 SAS 분석 결과3

The SAS System					2
General Linear Models Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	F Value	Pr > F	
Model	4	177.58755667	0.31	0.8733	
Error	55	8003.08788333			
Corrected Total	59	8180.67544000			
	R-Square	C. V.	Y Mean		
	0.021708	46.72961	25.8140000		
Source	DF	Type I SS	F Value	Pr > F	
A	4	177.58755667	0.31	0.8733	
Source	DF	Type III SS	F Value	Pr > F	
A	4	177.58755667	0.31	0.8733	
The SAS System					3
General Linear Models Procedure					
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: Y					
NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.					
Alpha= 0.05 df= 55 MSE= 145.5107					
Critical Value of Studentized Range= 3.989					
Minimum Significant Difference= 13.889					
Means with the same letter are not significantly different.					
Tukey Grouping	Mean	N	A		
Λ	27.778	12	1		
Λ	26.805	12	3		
Λ	26.709	12	4		
Λ	24.823	12	2		
Λ	22.955	12	5		

원균 접종량별로 분사량에 영향을 주지 않는다는 SAS분석 결과를 이용하여 회귀방정식을 구하는데 필요한 데이터는 접종량에 상관없이 전체 데이터를 이용하여 구하였다.

다음은 느타리(농기2-1호)의 분사압력 χ_1 과 분사시간 χ_2 를 변수로 하는 분사량 y 에 관한 회귀식 (2)과 3차원 그래프이다(그림 2-11). 회귀식의 R^2 값은 0.9682이다.

$$y = -4.84 + 12.81 x_1 + 22.27 x_2 - 8.4 x_1^2 - 3.94 x_2^2 + 34.58 x_1 x_2 \dots\dots(2)$$

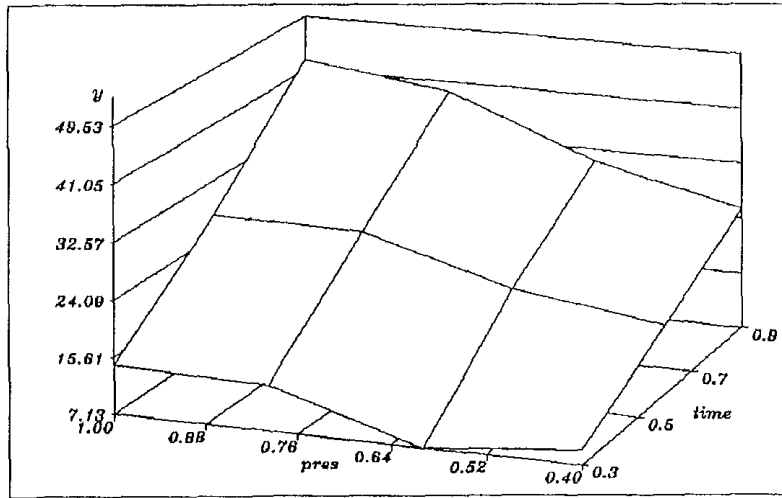


그림 2-11 느타리버섯의 반응표면그래프.

위의 회귀식을 이용하여 표 2-13과 같은 작동조건을 결정할 수 있게 되었다.

표 2-13 느타리버섯의 분사량별 분사조건

분사량	10cc	15cc	20cc	25cc	30cc
분사압력(kgf/cm ²)	0.4	0.5	0.6	0.75	0.65
분사시간(second)	0.43	0.5	0.68	0.56	0.74

제 4 절 결론

펌프식과 공기가압식의 점종시스템을 제안하여 성능평가를 실시한 결과 펌프식의 경우 맥동현상이나 특히 저압에서 균일한 분사량을 확보하지 못하고 시스템의 살균 처리도 문제점으로 대두되어 공기가압식 방식이 적합한 것으로 나타났다.

공기 가압방식의 시스템에 일류체노즐 2종과 이류체노즐 1종을 사용하여 성능을 비교하였다. 이류체 노즐의 경우 분사시 공기압으로 분사각 및 분사입자의 크기를 결정할 수 있고 니들밸브의 열림 정도를 조절하므로 분사량도 조절할 수 있었다. 그러나 분사할 때 공기를 같이 분사하기 때문에 노즐 자체가 복잡하고 분사공기압을 조절하여도 분사입자는 일류체에 비해 상당히 작고 일부는 부유하는 것을 확인할 수 있었고 공기분사압이 클 경우 배양병의 배지가 날리는 것을 관측하였다. 또한 분사구의 한가운데 니들밸브가 있기 때문에 니들밸브가 정확하게 분사구의 가운데 있지 않으면 분사가 한 방향으로 쏠리는 것을 관측하였다. 이류체 노즐은 복잡하고 정밀한 분사구조로 인해 일반 농가에서 쓰는 점종장치에는 불리한 점이 많아 노즐선택에서 제외되었다.

일류체 노즐은 두 종이 사용되었는데 노즐내 벤의 유·무로 구별될 수 있다. 벤이 없는 일류체노즐(I)은 분사각 실험에서 분사형태가 일정치 않고 타원형을 이루는 것을 관측할 수 있었고 압력에 따라 분사각이 틀리다는 것을 알 수 있었다. 분사균일도 실험에서 컵직경별 분사량은 이류체에 비해 고르게 나왔지만 분사가 병의 외벽에 집중됨을 알 수 있었다. 이류체에 비해 분사구조도 간단하고 사용도 간편하지만 분사형태가 일정치 않고 균일한 분사가 어렵다고 판단되어 일류체노즐(I)도 제외되었다.

일류체노즐(II)은 노즐내 벤이 있는 타입으로 분사시 유체가 벤의 유

도를 받는다. 분사각에서 다른 노즐에 보다 안정적이고 넓은 각을 나타내었다. 균일도 실험에서도 저압에서는 이류체 노즐의 특성이 고압에서는 일류체노즐(I)의 특성이 나타났고 분사량이 상대적으로 고르게 나타났다. 병의 외벽에 분사되는 양이 많아 우려를 했지만 후에 실증실험에서 분사직 후 종균이 배지표면에 부착되며 막을 형성해 나머지 액체종균은 흘러서 배지의 천공으로 흐르는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 일류체노즐(II)이 액체종균 접종장치에 가장 적당하다고 판단되었다.

액체종균을 이용하여 분사압과 분사시간 등의 작동조건을 달리하였을 때의 분사량을 측정하여 회귀방정식을 구하여 원하는 접종량을 분사하기 위한 시스템의 작동조건을 결정하였다.

제 3 장. 액체종균 자동접종장치 개발

제 1 절 서론

병을 이용한 버섯 재배는 뚜껑이 달린 플라스틱 병에 생육용 배지를 넣고 뚜껑을 닫은 상태로 살균을 한 후 접종실로 옮겨 종균을 접종하여 생육시키는 방식이다. 이때, 종균을 접종하기 위해서는 뚜껑을 열어야 하며 접종이 완료된 후에는 신속하게 뚜껑을 닫아 주변의 잡균으로부터의 오염을 최소화해야만 원활한 생육을 보장할 수 있다. 또한 접종이 완료된 버섯은 생육시 외부의 공기를 흡입해야 하는데 뚜껑에 설치된 필터로만 흡입 공기가 여과되어야 하므로 뚜껑은 병에 딱 낀 상태로 제작되어 있다. 병은 플라스틱 상자에 4×4 의 형태로 배열되어 있는데 인력으로 하나씩 뚜껑을 열고 닫고 하는 것은 불가능한 일이며 또한 일정량의 액체를 배지표면에 골고루 뿌려주기도 불가능하므로 절대적으로 자동화가 필요한 작업이다.

따라서, 본 연구에서는 제 2 장에서 선정된 노즐 시스템을 적용하여 한번에 4개의 병에 접종할 수 있는 실용적인 액체종균접종 전용장치를 개발하고자 하였다. 이것은 병이 16개가 담긴 상자를 컨베이어를 이용하여 이동시키며 병 뚜껑을 열고, 액체종균을 접종한 후, 병 뚜껑을 닫게 함으로써 경제성과 조작성의 간편성을 고려하고, 최소한의 공간에서 사용 가능하도록 설계되었다.

제 2 절 시스템의 설계

4구용 액체종균 접종 시스템은 크게 접종부와 배양병 이송부로 나눌 수 있고 접종부는 배양병을 고정하는 장치, 뚜껑을 고정하는 장치와 뚜

경을 여는 장치, 노즐 이송장치로 구성하였고 배양병 이송부는 3상모터 (1/4HP-4P, 일흥기전, KOREA), 인버터(SF-320, 에스엠싸이크로 코리아 (주), KOREA)와 클러치/브레이크, 1:60 감속기(SY-WU-40, 삼양감속기, KOREA)로 구성되었다. 시스템의 제어는 PLC(Master-k10s, LG, KOREA)를 이용하였고 접종부를 작동시키는 공압 실린더를 작동시키기 위해 공기 압축기와 공압 실린더를 작동시키는 솔레노이드 밸브를 장착한 MANIFOLD(MCK310-08-10, 삼한콘트롤스(주), KOREA)를 부착하였다.

그림 3-1은 접종부의 배양병을 고정하는 장치의 설계도이다. 배양병 고정장치는 배양병이 이송될 때는 위로 올라가 있고 광센서에 의해 이송이 정지되었을 때는 정지 즉시 병을 고정해야 하므로 변위는 크지 않아도 된다. 고정장치의 양 끝단에는 스트로크가 10mm인 공압실린더 (SCD-L-20-10-TOS-D, 삼한콘트롤스(주), KOREA)를 쌍으로 부착하여 상하로 움직이도록 하였고 실린더의 상하에 위치측정용 무접점스위치 (TOS, 삼한콘트롤스(주), KOREA)를 부착하여 실린더의 위치를 제어기인 PLC로 전송하여 제어를 가능케 하였다.

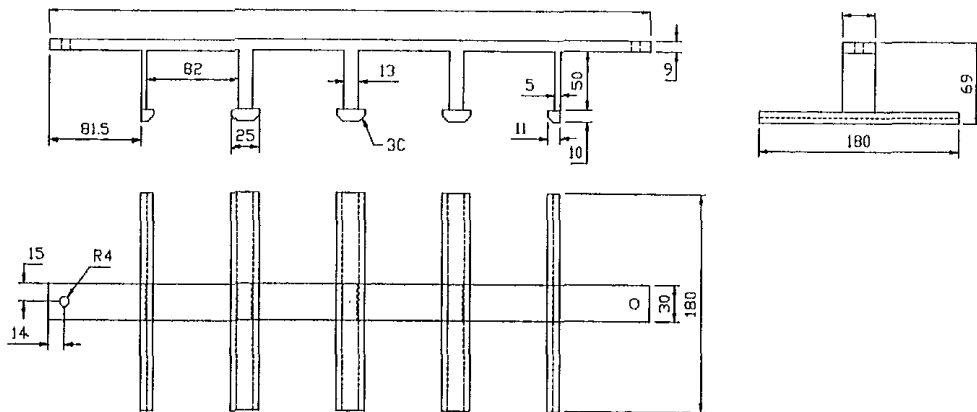


그림 3-1 배양병 고정장치.

그림 3-2는 배양병 뚜껑을 고정하는 장치의 설계도이다. 병뚜껑 고정 장치는 병뚜껑열기 장치에 부착되어 작동하며 병을 고정한 후 작동한다. 배양병 이송 중에는 병뚜껑이 걸리지 않도록 위로 올라가 병뚜껑 열기 장치에 붙어있고 배양병이 정지하여 고정되면 내려와 병을 열기 전에 뚜껑을 고정하는 역할을 한다. 병뚜껑 열기 장치와 배양병 뚜껑 사이에 공간을 최소화하기 위해 변위를 최소로 하였고 협소한 병뚜껑 열기 장치에 장착되므로 초소형의 공압실린더(SCD-L-20-5-TOS-D, 삼한콘트롤스(주), KOREA)를 4개 사용하였다. 실린더의 행정은 5mm이고 실린더의 상하에 위치제어용 무접점스위치(TOS, 삼한콘트롤스(주), KOREA)를 사용하여 장치의 위치를 PLC로 보내어 제어를 하였다.

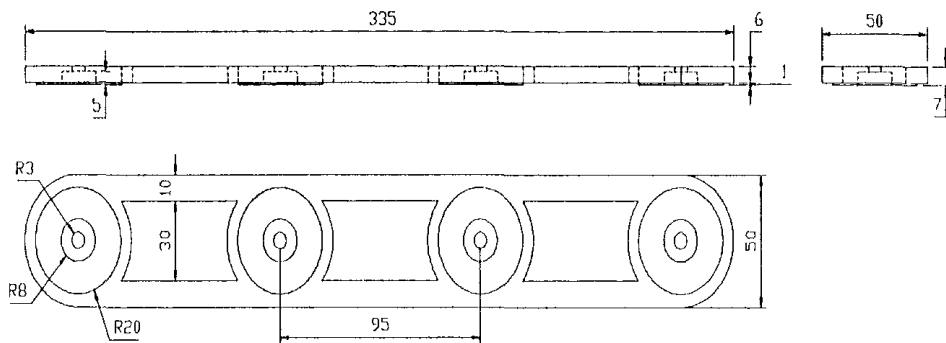


그림 3-2. 배양병 뚜껑 고정장치.

그림 3-3은 병뚜껑 열기 장치의 설계도이다. 병이 고정되고 병뚜껑이 고정되면 작동을 하고 배양병 이송할 때 아래로 내려와 장치의 'T'와 'L'형태의 구조물과 상부 밀면에 장착되는 병뚜껑 고정장치 사이로 배

양병이 이송된다. 작동할 때 병뚜껑 고정장치의 신호를 받아 위로 올라가며 병뚜껑을 열게된다. 병고정장치와 같이 양끝단에 공압실린더(CMK2-C-LB-20-130-R0-D, 삼한콘트롤스(주), KOREA)로 본체에 고정되며 실린더의 양끝에는 에어 쿠션이 달려있어서 상하로 운동할 때 충격과 소음을 줄였고, 다른 실린더와 마찬가지로 위치제어용 무접점스위치(R0, 삼한콘트롤스(주), KOREA)를 달아 실린더의 위치를 PLC로 보내 제어를 하였다.

병뚜껑 열기장치가 병뚜껑을 완전히 열고 최상단에 도달하면 노즐 이송용 공압실린더(CMK2-LB-20-50-R0-D, 삼한콘트롤스(주), KOREA)가 작동하며 이송이 완료되면 분사가 이루어진다. 이 역시 위치제어용 무접점스위치(R0, 삼한콘트롤스(주), KOREA)를 사용하여 PLC로 제어가 가능케 하였다.

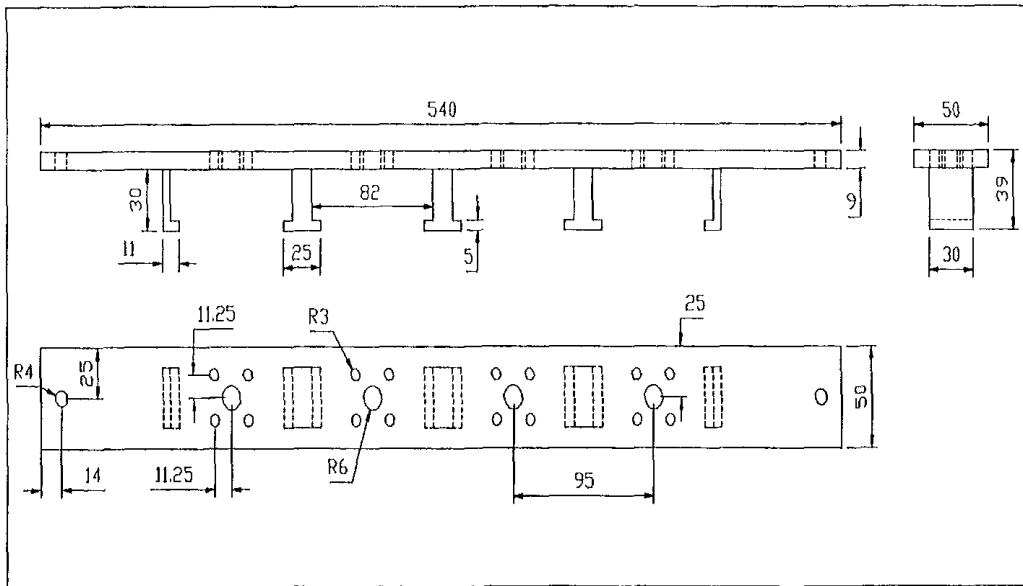


그림 3-3 배양병 뚜껑 열기장치.

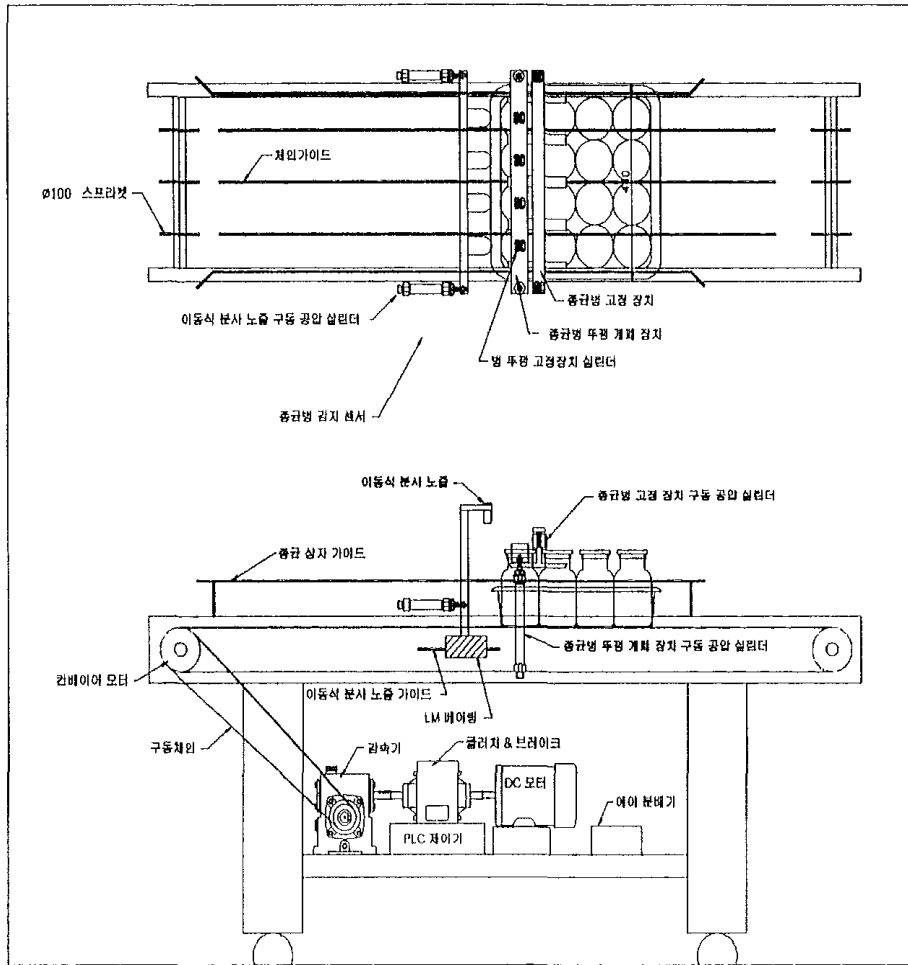


그림 3-4 액체종균 자동 접종장치 구성도.

그림 3-4는 4구용 액체종균 접종장치의 설계도로 접종부 하부에는 배양병 이송부가 장치되어 있다. 배양병 이송부는 3상 모터와 클러치, 브레이크, 감속기로 구성되었으며 #50의 체인으로 동력을 컨베이어에 전달한다. 컨베이어의 속도 조절은 모터에 부착된 인버터에 의해 조절할 수 있도록 하였다. 또한 동일면상에 제어기인 PLC를 장착하고 공압실린더를 제어하는 솔레노이드밸브 블록을 설치하여 공간을 최대한으로 살렸다. 그림 3-5와 그림 3-6은 개발된 병제배용 액체 종균 접종장치의 사시도와 외관도이다.

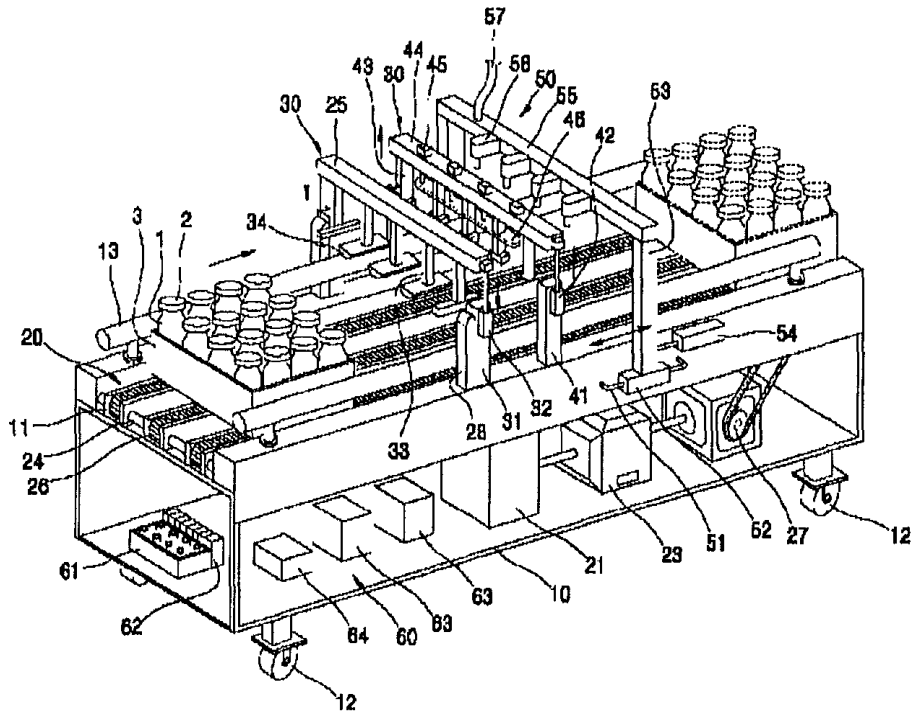


그림 3-5 액체종균 자동 접종장치의 사시도.

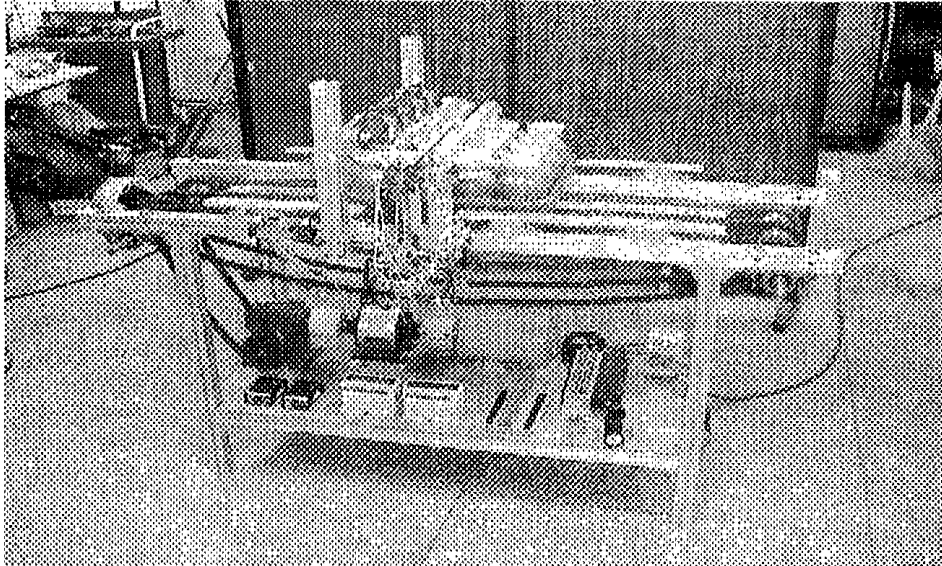


그림 3-6 액체종균 자동 접종장치의 외관.

제 3 절 시스템의 제어 알고리즘

1. 센서 및 조작기

가. PLC

액체종균 접종장치의 제어는 경제성과 편리성을 갖춘 PLC (Master-k10s, LG, KOREA)를 이용하였다. 8점의 입력과 6점의 릴레이 출력 접점을 갖는 기본 유닛과 6점의 입력과 4점의 출력을 갖는 증설유닛으로 구성되어있고 RS232C를 내장하고 있어 PLC와 컴퓨터간에 통신을 할 수 있다. PLC는 PLC제어 프로그램(WIN-KGL, LG, KOREA)을 사용하였다.

PLC 자체의 전원이외에 24V, 0.6A의 파워서플라이(VSF-15-24, FINE Suntronix, KOREA) 2대를 사용하였고, 220V용 압축공기분배기의 슬레노이드 밸브들을 작동시키기 위해 별도의 릴레이 회로를 구성하였다.

나. 이송 컨베이어 위치제어 센서

액체종균을 배양병의 배지 표면에 전체적으로 균등하게 분사하기 위해서는 이송 컨베이어상의 배양병을 노즐의 바로 밑에 오도록 제어하는 것이 중요하다. 노즐의 높이가 분사각도를 통해서 얻어진 것이기 때문에 중앙에 오지 않는다면 배양병 밖으로 분사되기 때문이다. 먼저 배양병을 감지하여 일정한 위치에서 이송 컨베이어를 정지시키기 위하여, 통과형 근적외선 광센서(CX-21, SUNX, JAPAN)를 사용하여 4×4 배열로 되어 있는 첫 번째 배양병의 어깨부분을 감지하여 감지 즉시 컨베이어를 정지시키고 일련의 과정의 액체종균을 접종하였다. 직접반사형이나 간접반사형의 센서에 비해 통과형 센서는 빔폭도 반사형에 비해 작고 반사형의 경우 배양병의 곡면부분에 빔이 반사되어 수광부로 들어오지 않고 반사·산란되어 배양병을 정확한 위치에 정지시키지 못하는 위험

도 있으나 통과형의 경우 발광부와 수광부를 따로 설치해 빔의 반사로 인해 병을 감지하지 못하는 경우가 적으며 정밀한 광섬유 레이저 센서에 비해 경제적인 면도 있다.

다. 공압실린더 위치제어 릴레이 스위치

공압실린더의 위치신호 입력은 접종장치의 동작단계에서 다음단계의 동작을 유발시키는 신호로 이용된다. 또한 쌍으로 사용되는 실린더의 오작동으로 인한 카킹현상을 감지해 실린더 및 구성장치의 안정성을 도모할 수 있다.

위치제어용 무접점 릴레이 스위치는 CMK2시리즈에는 밴드 부착형의 R0형, SCD시리즈에는 홈부착형 TOH형 스위치를 사용하였고 두 종류 모두 피스톤 부에 설치된 영구자석의 자계변화를 이용해 작동한다.

2. 제어 알고리즘

프로그램은 크게 모터 제어부와 접종부로 두 부분으로 나눌 수 있다. 모터 제어부는 광센서를 이용하여 컨베이어 벨트를 이송 또는 정지시키는 지시를 내린다. 접종부는 모터제어부에 의해 컨베이어가 정지하면 접종부의 공압실린더로 신호를 보내어 일련의 과정을 실행케 한다.

먼저 시작 버튼의 신호가 모터 제어부로 전달되면 브레이크가 떨어지고 클러치가 붙어서 160PRM으로 회전하는 모터로부터 회전력이 컨베이어로 전달된다. 전진하는 배양병 상자가 광센서에 감지되는 즉시 병고정 실린더로 신호가 보내져 배양병을 고정시키고 병고정 실린더의 하부에 있는 실린더 위치제어 릴레이 스위치에 의해 다음단계인 뚜껑고정 실린더가 작동한다. 뚜껑고정실린더는 병열림 실린더가 작동하지 않는 이상 뚜껑고정실린더의 하부 스위치가 작동하지 않기 때문에 뚜껑고정

실린더의 상부 스위치가 OFF되는 신호를 받아 0.2초시간 지연 후 병렬림 실린더가 작동하게 된다. 병렬림 실린더의 상부 스위치가 ON되면 노즐이송 실린더가 작동하여 전진하고 노즐이송실린더의 전면에 있는 스위치가 ON되면 분사가 시작된다. 분사시간은 노트북 컴퓨터의 제어 프로그램을 이용하여 1/100초까지 제어가 가능하다. 시간지연 명령에 의해 분사가 완료되면 내부 릴레이에 의해 실린더를 제어하는 모든 입력 신호가 단절된다. 실린더는 자기유지 출력으로 유지되며 리셋신호에 의해 OFF된다. 분사 후 내부 릴레이가 ON되면 노즐이송 실린더가 후퇴하며 동시에 병렬림 실린더가 하강하여 배양병의 뚜껑을 닫게 된다. 병렬림 실린더가 완전히 내려와 하부의 스위치가 ON되면 뚜껑고정 실린더가 OFF되고 병고정실린더가 OFF된다. 병고정 실린더의 상부 스위치가 ON되면 다시 모터제어부의 브레이크가 OFF되고 클러치가 ON되어 컨베이어가 전진하게 된다. 프로그램은 시작 버튼이 OFF될 때까지 반복하게 된다.

그림 3-7은 프로그램의 흐름도를 나타낸 것이고 그림 3-8은 윈도우용 PLC 제어프로그램으로 자동 접종 프로그램을 작성한 것이다.

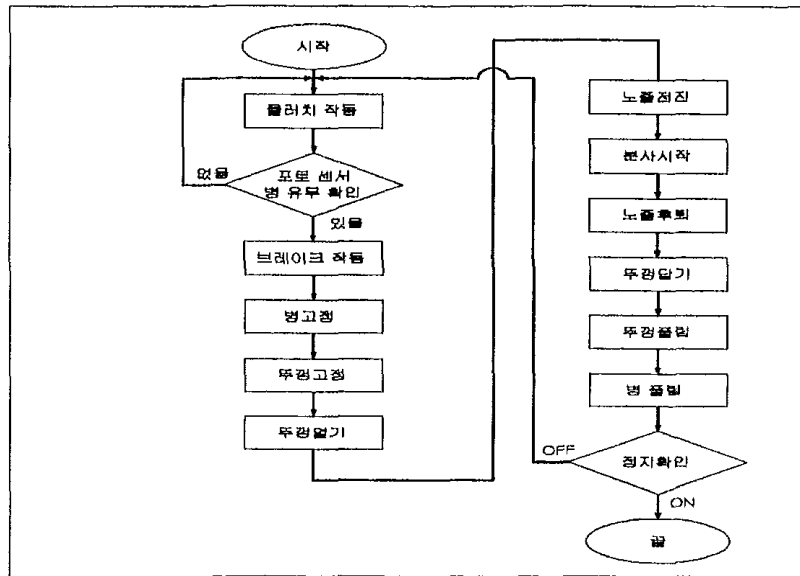


그림 3-7 PLC 프로그램 흐름도.

0	P0000	P0011				P0040	
1							
3	P0001	M001				P0011	
4							
5	P0011	P0002					
6							
9	P0001				SET	M001	
10							
11	P0011	P0004	M001			SET	P0005
12							
15	P0004	P0005	M001		TOR	T001	T0004
16							
21	T0001				SET	P0010	
22							
24	P0010	P0009	M001		SET	P0016	
25							
27	P0010	P0009	M001		SET	P0017	
28							
31	P0016	M001			TOR	T000	T0004
32							
36	P0017					RST	P0014
37							
38							
39							
42	T0001						
43					SET	P0017	
44					SET	M001	
47	P0016	M001			SET	P0016	
48							
49	P0017	M001			SET	P0016	
50							
53	P0004	M001			SET	P0012	
54							
59						END	

그림 3-8 PLC 프로그램.

제 4 절 액체종균 접종시스템의 성능 평가

1. 실험 방법

액체종균 접종장치의 성능을 평가하기 위해 4구 노즐의 정량분사 여부, 접종시스템의 오동작횟수, 시간당 처리능력, 수작업과의 비교 등을 평가기준으로 삼아 3회 반복 실험하였다. 먼저, 4구 노즐의 정량분사 여부를 체크하기 위해 분사압과 분사량을 측정하였다.

종균탱크에의 압력을 가하여 분사시 각 노즐에 걸리는 압력을 측정하기 위하여 배관에 압력 게이지(P-250, Green Sensor, KOREA)를 부착하여 Data Acquisition System(DaqBook, IOtech, USA)으로 데이터를 받아 분사할 때 종균탱크의 압력과 분사노즐에서의 압력, 분사량을 측정하여 노즐 개개마다 압력조절기를 부착하지 않고 종균탱크의 압력을 이용하여 분사량을 조절하는 것을 목적으로 실험하였다.

접종장치의 오작동 횟수를 측정하기 위해 실험실내에서 접종이 안된 배양병 5상자를 이용하여 순환식으로 실험하였다. 액체종균 대신 물을 이용하여 분사하였고 평가는 배양병이 정해진 위치에 정확히 정지하는 것, 병뚜껑이 열릴 때 열지 못하는 것이 있는지, 분사후 뚜껑을 제대로 모두 닫는지, 뚜껑을 닫은 후 다음 병까지 제대로 이동하는지 등을 평가의 대상으로 잡고 모두 50상자, 800에 대하여 측정하였고 동시에 작업시간을 체크하였다.

4구용 접종장치를 실험하기에 충분한 압력을 가하기 위한 액체종균을 담은 액체종균 배양통을 새로 제작하였다. 20ℓ 용량을 갖고 5kg/cm²의 압력을 견딜 수 있고 기존의 배양병보다 용기 내로 통하는 관의 개수를 줄여 2개를 넣어 배양병의 입구크기를 줄였다. 그림 3-9는 새로 제작한 종균배양통의 사진이다.

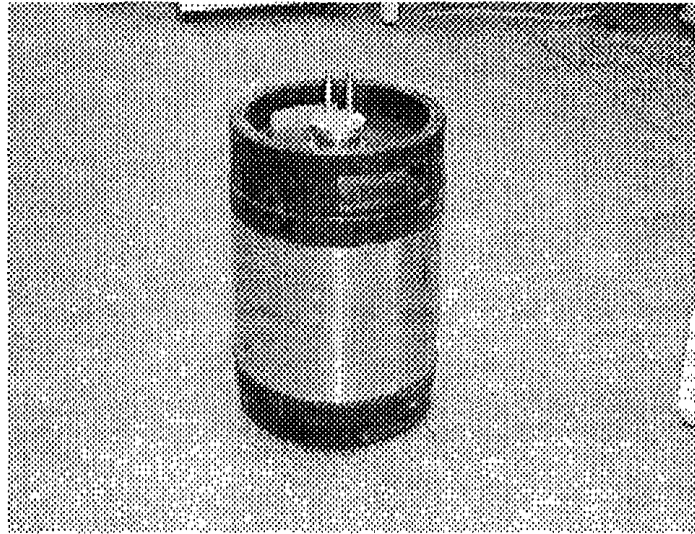


그림 3-9 고압용 액체종균병.

제 5 절 결과 및 고찰

4구 노즐의 분사균일도를 알아보기 위한 실험의 결과로, 표 3-1은 각 노즐별로 분사압력을 나타낸 것이고 표 3-2는 분사시간에 대한 1회 분사량을 나타낸 것이다.

각 노즐별로 분사량의 차이가 있는지를 알아보기 위해 SAS의 PROC GLM을 이용해 Tukey의 Studentized range test를 실행하여 다중분산분석을 하였다. 표 3-3은 그 결과 값을 나타낸 것으로 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 P값이 0.9815이므로 각 노즐별로 분사량에 차이가 없다는 가설을 기각하지 못하여 가설을 증명함을 나타내주고 있다. 따라서 각 노즐의 분사량의 차이가 없다고 할 수 있다.

표 3-1 노즐별 분사압력 (kg/cm²)

탱크압력 (kg/cm ²)	분사시간 (초)	노즐 #1	노즐 #2	노즐 #3	노즐 #4
3	0.3	0.12009	0.13644	0.12989	0.12652
	0.6	0.11675	0.13333	0.12682	0.12368
	0.9	0.11613	0.13030	0.12502	0.12322
4	0.3	0.15958	0.18136	0.17311	0.17174
	0.6	0.15510	0.17362	0.16496	0.16627
	0.9	0.15443	0.17269	0.16627	0.16444
5	0.3	0.20707	0.23728	0.22432	0.22028
	0.6	0.20353	0.22946	0.21798	0.21586
	0.9	0.20348	0.22804	0.21519	0.21578

표 3-2 노즐별 분사량(ml)

탱크압력 (kg/cm ²)	분사시간 (초)	노즐 #1	노즐 #2	노즐 #3	노즐 #4
3	0.3	8.33	9.20	8.40	8.73
	0.6	15.60	16.87	15.60	16.33
	0.9	22.33	24.20	22.60	23.67
4	0.3	9.60	10.60	9.60	10.00
	0.6	17.47	19.00	17.73	18.33
	0.9	26.00	27.60	25.93	27.00
5	0.3	10.67	10.93	10.67	11.07
	0.6	20.00	21.27	20.00	20.87
	0.9	29.60	31.20	29.40	30.73

표 3-3 SAS 분석 결과

The SAS System					2
General Linear Models Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	F Value	Pr > F	
Model	3	10.02838611	0.06	0.9815	
Error	32	1857.37944444			
Corrected Total	35	1867.40783056			
	R-Square	C.V.	Y Mean		
	0.005370	41.73751	18.2536111		
Source	DF	Type I SS	F Value	Pr > F	
A	3	10.02838611	0.06	0.9815	
Source	DF	Type III SS	F Value	Pr > F	
A	3	10.02838611	0.06	0.9815	
The SAS System					3
General Linear Models Procedure					
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: Y					
NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.					
Alpha= 0.05 df= 32 MSE= 58.04311					
Critical Value of Studentized Range= 3.832					
Minimum Significant Difference= 9.7305					
Means with the same letter are not significantly different.					
Tukey Grouping	Mean	N	A		
A	18.986	9	2		
A	18.526	9	4		
A	17.770	9	3		
A	17.733	9	1		

다음으로 접종기의 작업성능을 평가를 하였다. 4×4배열의 배양병 상자5개를 이용하여 순환식으로 실험하여 총 50상자, 800병을 실험하였다. 병 한 개를 여는데 필요한 힘을 로드셀(DBBP-100, BONGSIN, KOREA)

이 부착된 디지털 인디케이터(BS-4100A, BONGSIN, KOREA)로 측정하였다. 병뚜껑을 여는데 필요한 힘은 병마다 차이가 커서 사용을 하지 않은 새 제품의 경우 4.01kgf, 기존에 사용하던 배양병의 경우 1~2.7kgf 정도로 일정기간을 사용하면 배양병의 밀폐에 문제가 있는 것으로 판단되었고 실험은 새 제품과 기존에 사용하던 배양병을 섞어서 실험하였다.

실험 중 오동작횟수는 '0'회로 기기의 오동작으로 인한 접종장치의 정지는 없었고 작업시간은 17분이 소요되었으나 새 제품이 2개 이상 섞인 열에서는 뚜껑을 열고 뚜껑을 닫는데 공기압이 부족한 듯 보였고 에어 쿠션형을 사용한 배양병 뚜껑열기 실린더의 경우 뚜껑을 닫을 때에 쿠션이 작용하여 닫기 직전의 속도가 매우 느리고 충분한 힘으로 닫지 못하는 것을 확인하였다. 소음과 진동은 주로 실린더가 상승할 때 일어나므로 후에 실린더를 다시 제작하여 실린더의 헤드부분에만 에어 쿠션을 설치하는 것이 적절하다고 사료된다. 또한 노즐 이송실린더의 경우에도 전진할 때에 소음과 진동이 많이 발생하므로 실린더의 헤드부분에 에어 쿠션을 설치하는 것이 바람직하다고 사료된다.

다음은 분사량에 대한 회귀식을 SAS의 반응표면분석을 이용하여 구한 것이다. 아래의 식을 이용하여 작동 조건 (표 3-4)을 구할 수 있었다. 회귀식의 R²값은 0.9937이다.

$$y = 2.36 - 0.34 x_1 + 11.96 x_2 + 0.02 x_1^2 - 0.04 x_2^2 + 4.05 x_1 x_2$$

여기서 X₁은 분사압력, X₂는 분사시간이고 y는 분사량이다.

느타리버섯의 경우, 1회 분사량 15ml를 분사함으로써 최대의 생산성을 얻을 수 있다고 알려져 있다. 본 실험에서는 평균 탱크압력이 3.5 kgf/cm²이고 분사시간은 0.52 초일 때 목표분사량 15ml를 분사할 수 있었다.

표 3-4 액체종균 접종장치의 분사량별 분사조건

분사량	10cc	15cc	20cc	25cc	30cc
탱크압력(kgf/cm ²)	3.5	3.5	3.5	4.2	4.0
분사시간(초)	0.33	0.52	0.71	0.82	1.02

제 6 절 결론

액체종균 접종장치 개발의 마지막 단계로 노즐 4개를 장착한 4구용 액체종균 접종장치를 구성하였다. 장치는 대부분 공기 압축기의 압축공기를 이용하도록 하여 장치를 단순화하였으며 배양병 고정장치, 배양병 뚜껑 고정장치 등을 설계·제작하였다. 또한 이것들을 제어하기 위해 PLC를 이용하여 제어 프로그램을 작성하였으며 이를 이용해 4구용 접종장치를 평가하였다. 분사균일도를 알아보기 위해 느타리 종균을 이용해 분사실험을 한 후 SAS분석을 하여 각 노즐별로 분사량에 차이가 없음을 알았고 4×4배열의 배양병 상자 50상자, 800병을 이용해 접종장치의 오작동률과 작업시간 등을 측정하여 오작동률은 0%, 작업소요시간은 17분으로 측정되었다. 분사조건을 결정하기 위한 기초실험에서 결정된 분사량을 분사하기 위해 느타리 액체종균으로 분사량 실험을 하였고 SAS의 반응표면분석을 통해 회귀식을 구하고 목표 분사량을 분사하기 위한 작동 조건을 구할 수 있게 하였다.

제 4 장. 느타리·팽나무버섯 액체종균의 배양체계 확립 및 농가실증 재배

제 1 절 서 론

느타리(*Pleurotus ostreatus*)는 주름버섯목(Agaricales)의 느타리과(Pleurotaceae)에 그리고 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*)은 주름버섯목(Agaricales)의 송이버섯과(Tricholomataceae)에 속하는 사물기생균으로 우리 나라를 비롯한 세계 각지에 널리 분포한다(Lee, 1990). 느타리는 Lovastatin이라는 물질을 생산하여 콜레스테롤의 생성을 저해성 인병 예방을 하며, 팽나무버섯은 Flammulin, Lectin을 생산하여 항암효과를 나타낸다. 이런 의학적 가치와 단백질, 탄수화물, 지방, 무기물, 섬유소, 비타민 등이 풍부한 영양학적으로 가치가 높아 느타리와 팽나무버섯은 사람들에게 기호성이 우수한 버섯으로 그 수요가 증가 추세에 있다(Kiies *et al.*, 2000). 버섯의 병재배는 재배역사가 짧고 생산량도 비교적 적지만 기계화를 통한 생력화 및 자본·기술 집약적 농업으로 연중 계획생산을 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 병재배 버섯으로는 팽나무버섯, 애느타리, 버들송이, 만가닥버섯, 목이, 잎새, 노루궁뎅이버섯, 영지버섯 등의 재배법이 개발되어 있으나 현재는 팽나무버섯이 주종을 이루고 있다(차, 1995).

팽나무버섯의 인공적인 재배는 1899년 일본에서 감나무 원목을 이용하여 자연기상 조건하에서 재배가 시작된 이래, 포자 접종방법, 톱밥을 이용한 상자재배법 등을 거쳐 1960년 이후부터는 온도, 습도, 광 등을 인공적으로 조절한 실내에서 톱밥과 미강을 기질로 하여 polypropylene bottle에 담아 멸균 후 배양, 발이, 억제 및 생육과정을 거쳐 재배를

실시하였다(Chang *et al.*, 1989). 팽나무버섯은 1991년의 345M/T 생산(차, 1995)에서 1992년 농업기술연구소에서 팽나무버섯 자동화 병재배 시설을 보급하면서 생산량은 급격히 증가하여 96년에는 100여 개 농장에서 연간 6,000M/T 정도로 생산되었으며(정, 1997), 98년 말 170여 개 농장에서 매일 75만병이 재배되어 약 75M/T(연간 23,000M/T)의 생산체계를 갖추게 되었다(정, 1999).

느타리의 인공재배 방식은 Flack(1917)에 의해 원목을 이용하여 재배하는 방법으로 시작되었으며, Block 등(1958)에 의해 톱밥을 이용한 재배가 시도되었다. 국내에서 느타리는 벚짚과 폐면을 이용한 재배방법이 개발되어(유, 1990) 현재 널리 보편화되어 생산이 되고 있다. 이러한 재배는 인력이 많이 소모되어 생산원가가 상승하고 농약 잔유물에 의한 영향이 있을 것으로 생각되며, 특히 Open system의 재배방식을 이용하기 때문에 자동화 및 오염의 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 Polypropylene bottle & bag 을 이용한 Close system을 도입하여 재배함으로써 오염을 극소화시킴과 동시에 자동화시스템을 이용한 재배를 가능하게 하고 있다.

식용버섯의 인공재배를 위해서는 종균, 배지재료, 재배시설, 재배기술이 필수적으로 요구된다(Zadrzil, 1974). 그 중에서도 유전적으로 형질이 안정하며, 잡균에 대한 저항성이 강할 뿐만 아니라 버섯생산성이 우수한 우량종균의 확보는 최우선적으로 갖추어야 한다(Goltapeh *et al.*, 1989). 이러한 필요조건을 충족시킬 수 있는 새로운 형태의 종균으로 균사체 현탁액인 액체종균(liquid spawn)을 버섯 재배 시 종균으로 이용할 수 있음을 Humfeld(1948)와 Shiio *et al.*, (1974)이 제안하였다. 국내에서는 정(1999)이 *F. velutipes*를 이용하여 액체종균 제조 및 재배에 대하여 보고하였으며, Sung *et al.*, (1999)은 *P. ostreatus*의 액체배양 성장조건을 구명하여 보고하였다.

Humfeld(1948)는 fermenter에서의 배양공정, 통기 및 교반 방법에 대해서 보고하였으며, Kirchhoff *et al.*, (1991)은 10 l의 발효조에서 액량 5 l로 3~5일 배양하였을 때 리터당 pellet은 5000~6000개, 건중량으로 리터당 350mg이 생산되어 이것을 버섯재배 종균으로 이용하였다고 보고하였다. Shio(1974)는 팡이버섯균을 40 l 발효조에서 배양하였고, Song(1987)은 배양액량 1.2 l의 기포탑 발효조를 이용하여 액체종균을 생산하였다. Yang(1989)은 10 l와 5~7천 리터의 발효조에서 단지 2~3일 배양함으로써 액체종균의 생산이 가능하다고 보고하였다. Byun(2000)은 airlift fermenter 배양에서 균사체량은 stirred fermenter배양과 비슷하였으나 생산량을 높이기 위해서는 pellet의 크기를 일정하게 유지하면서 배양할 수 있는 배양조건이 필요하며 pellet의 크기가 다름으로 인하여 산소전달에 영향을 받을 수 있으며 이 차이가 생산성에 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라, airlift fermenter에서는 균사체의 손상이 적으므로 상대적으로 생산성이 높다고 하였다.

최근의 병재배 버섯은 밀폐된 시설 내에서 버섯을 연중 무휴 재배함으로써 영양요구성 및 생활환경이 비슷한 다른 균의 서식밀도도 누적되어 높아지게 된다. 따라서 잡균의 밀도를 최소한으로 낮추는 것이 병버섯 재배의 성공여부를 결정짓는 요인이 되고 있다. 병버섯 재배는 살균, 세척, 소독 등의 과정을 통하여 잡균을 억제하고 종균접종 및 시설내의 환경조절을 통하여 버섯균의 우점을 도모하고 있다. 즉, 버섯균의 우점은 종균의 활력, 배지의 성분, 배양실의 적절한 온·습도, 환기관리 등에 의하여 좌우된다.

버섯재배에 영향을 미치는 여러 가지 환경요인 중 종균의 활력은 중요한 문제라고 생각되므로 우량종균의 확보를 위한 노력이 필요하다(정, 1999). 현재 가장 많이 사용되는 톱밥종균은 배양과 취급이 용이하여 일반 재배농가에도 보편화되어 있으나 균사 배양과 관리, 유통과정기간

에 따른 종균의 활력검증과 버섯의 발생 및 생산 예측이 불투명하여 실제 재배농가에서 어려움을 많이 겪고 있는 실정이다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근 느타리와 팽나무버섯에 대하여 액체종균을 이용한 버섯 재배가 시도되고 있다(Ryu *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999). 따라서 병재배 버섯 안정생산을 위한 우량종균 확보 방법으로서 액체종균을 활용하고자 한다.

본 연구는 병버섯 재배 방식이 기존의 톱밥종균과 같은 고체종균에서 액체종균을 이용하는 방식으로 변화하는 시점에서 액체종균을 버섯재배에 효율적으로 사용할 수 있는 접종방식 및 접종기를 이용하여 버섯생산의 실효성 및 생산성 향상을 확인하고자 하였으며, 정량의 액체종균을 배지에 균일하게 접종할 수 있는 접종시스템에 적용시킬 수 있는 배양장치와 액체종균 대량배양방법에 관한 연구를 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 느타리·팽나무버섯균의 군사생육 조건 조사

가. 공시균주

본 실험에 사용된 균주는 농촌진흥청에서 품종을 육종·보급하여 농가에서 재배되고 있는 느타리버섯(*Pleurotus* spp.) 농기 2-1(P-001), 원형느타리 2호(P-002) 2품종과 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*) 팽이 2호(F-002) 1품종을 공시균주로 사용하였다. 공시균주는 표 1에 있는 PDA배지에 접종하여 15일 마다 계대배양하면서 접종원으로 사용하였다.

나. 배양 방법 및 생육측정

Petri-dish(Ø 8.7cm)상에서의 배양실험을 위한 배지조제는 121℃에서 20분간 가압살균 후 미리 살균된 petri-dish(Ø 8.7cm)에 15~20ml씩 분주하여 배지를 조제하였으며, 선 배양된 공시균주들의 균총의 선단을 내경 5mm의 cork borer로 취하여 petri-dish(Ø 8.7cm)의 중앙에 접종하여 실험을 실시하였다. 접종 후 25±1℃의 항온배양기에서 배양하였으며(온도실험 제외), 배지의 초기 pH는 자연 pH(pH 6.0~pH 7.0)로 배지를 조제하였다(pH 실험 제외).

Petri-dish배양에서의 군사체 생육측정은 petri-dish에서 일정기간 배양 후 접종된 군사절편의 중심을 직교하는 수직선과 수평선을 petri dish의 밑면에 그린 다음 각각의 직경을 평균하여 균총의 신장직경을 조사하였으며, mm/days로 나타내었다.

다. 생리적 특성조사

1) 기본배지 선발 - 기본배지 선발을 위해서 표 1-1, 1-2의 조성을 갖는 배지를 조제하여 선발실험을 실시하였다.

2) 온도 및 초기 pH의 영향 - 느타리균과 팽나무버섯균의 군사생육에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 기본배지로 선발된 평판배지 상에서 느타리균의 경우 5~35℃, 팽나무버섯균의 경우 5~30℃의 온도범위에서 5℃ 간격으로 조절된 항온기에서 균총의 신장직경을 조사하였다. 또한 초기 pH가 군사생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1N HCl과 0.1N NaOH으로 느타리균의 경우 pH 4.0~8.0으로 팽나무버섯균은 pH 4.0~10.0까지 0.5 간격으로 pH meter를 이용하여 pH를 조절하여 배지를 조제하였다.

3) 영양원 선발 - 군사생육에 미치는 탄소원, 질소원 및 무기염류 등의 영양원을 조사하기 위하여 기본배지에서 각 영양원의 종류를 달리하여 실험하였다. 탄소원은 3%(w/v), 질소원은 0.3%(w/v), 무기염류는 0.1%(w/v)씩 각각 첨가하여 영양원 선발실험을 실시하였다.

표 1-1. 기본배지 선발을 위한 배지 조성표(pH 6.0)

Nutritional reagents	medium(g/ℓ)										
	PDA*	MCM	MM	YMA	MYA	SDAY	HMA	CDA	BMA	MPD	PSA
Potato	200										200
Dextrose	20	20		10		20	20			10	
Sucrose								30			20
Yellow sugar									30		
Malt extract			20	3	20						
Yeast extract		2		3	2	5	3		3		
Peptone		2		5		5				5	
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.5						0.5	1	0.5	
KH ₂ PO ₄		0.46							1	1	
K ₂ HPO ₄		1						1			
KCl								0.5			
NaNO ₃								3			
FeSO ₄ · 7H ₂ O								0.01			
Ebiose							5				
Hyponex							3				
Agar	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

표 1-2. 기본배지 선발을 위한 배지 조성표(pH 6.0)

Nutritional reagents	medium(g/ ℓ)					
	Hader	Hasimoto	Torev	Czapek	Lilly	Park
Starch						15
Sucrose				30		
Glucose	20	20	20		10	
Yeast extract	0.5					
Peptone		2				
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5
KH ₂ PO ₄	1	0.5	1		1	8.138
K ₂ HPO ₄				1		1.548
KCl	0.5			0.5		
NaNO ₃				2		
NH ₄ NO ₃			2			
FeSO ₄ · 7H ₂ O						0.02
CaCl ₂		0.1				
ZnCl ₂					0.2mg	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O			0.001			0.03
Thiamine HCl						
Thiamine hydrochloride		100μg				
FeCl ₃ · 6H ₂ O				0.01mg	0.2mg	
MnCl ₂ · 4H ₂ O					0.1mg	
MnSO ₄ · 7H ₂ O						0.02
Asparagine	0.65				2	
Ammonium tartrate						3.06
Arginine						3.484
CaCO ₃						0.314
Agar	20	20	20	20	20	20

Park배지-Park *et al.*, (1995), Hader배지-Hader *et al.*, (1986),
 Hasimoto배지-Hasimoto *et al.*, (1974), Torev배지-Torev(1968).

2. 느타리 및 팽나무버섯균의 삼각플라스크 배양 환경조건 조사

가. 삼각플라스크 배양 및 생육측정

각 공시균주들의 기본배지로 선발된 배지를 이용하여 250ml 삼각플라스크에 50~150ml 배양액을 분주하여 silicon plug를 채운 후 121℃, 15psi(1.2kg/cm²)에서 20분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, Petri-dish에 배양된 균총의 선단을 내경 5mm의 cork borer로 취하여 삼각플라스크배양의 접종원으로 사용하였다. 기본배지로 선발된 배지를 사용하였다. 접종 후 shaker incubator에서 느타리균은 25℃, 125rpm으로 팽나무버섯균은 21℃, 125rpm으로 7일간 진탕배양하였다. 삼각플라스크에서의 생육측정은 filter paper(Whatman No.2)에 여과시킨 후 80℃의 dry oven에서 항량·건조하여 균사체의 건조중량을 측정하였다.

나. 환경조건조사

각 공시균주들의 균사체 생산에 미치는 접종량의 영향을 조사하기 위하여 배양액량 100ml의 250ml 삼각플라스크에 균사절편(내경 5mm)의 접종량을 1~5개씩 1개 간격으로 달리하여 실험을 실시하였다. 그리고 250ml의 일반 삼각플라스크와 진탕 플라스크에서 플라스크의 형태 및 배양액량이 느타리의 건조 균사체 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 배양기간에 따른 균체량 조사를 위해 배양중인 플라스크를 1일 간격으로 회수하여 균체량을 조사하였다.

3. 접종장치의 자동화 시스템에 적용할 액체종균 배양장치 제작 가. 배양장치제작

본 실험에서는 자동접종기의 자동화 시스템에 적용할 수 있으며, 또한 미생물반응기로서 공시균들의 배양학적 특성에 맞는 발효조를 제작하는데 그 주안점을 두었다. 자동접종기의 자동화 시스템은 액체종균의 분출을 위하여 배양기내로 주입되는 공기압이 매우 높기 때문에 배양용기의 소재 및 배양기와 연결된 기본라인은 고압에 의한 물리적 충격을 이겨낼 수 있는 소재이어야 하며 이와 동시에 배양기의 무균성 확보를 위해 고온증기 살균에 견딜 수 있어야 한다. 또한 온도제어가 용이하여야 하며 배양액의 혼합특성이 좋아야 한다. 본 실험의 공시균들은 호기성 균이므로 낮은 동력비로서 높은 산소공급속도를 나타낼 수 있는 구조를 가져야 한다. 배양장치는 경제성과 작업능률을 고려하여 제작하였다.

나. 분사량별 균체량 조사

분사량에 의한 균체량 조사를 위해 일류체 노즐을 통해 분사된 종균을 채취하여 filter paper(Whatman No.2)에 여과시킨 후 80℃의 dry oven에서 항량·건조하여 균체량을 측정하였다.

4. 자동접종장치의 자동화 시스템에 적합한 대량 액체종균 배양조건

가. 대량 액체배지 선발 및 자동접종장치의 기능 검정

공시균주의 영양원선발 실험에서 선발된 탄소원, 질소원, 무기염류 등을 기초로 하여 대량액체배양의 배지로 선발하였으며, 선발된 배지로 대량배양을 실시하여 자동접종기의 기능점검 및 선발된 액체배지의 실

효성 확인을 실시하였다. 자동접종기를 통해 850ml P.P. 병에 10ml를 접종하였고, 인공 액체종균 접종을 통해 850ml P.P. 병에 10ml 접종하였다. 접종 후 18℃에서 20일 배양 후 균사의 생장, 균사의 활력, 균사의 절단현상으로 인한 균사의 퇴화 등을 확인하였다.

나. 대량배양 및 생육측정

액체종균 자동접종시스템에 적합한 배양장치를 이용하여 121℃, 15psi(1.2kg/cm²)에서 90분간 가압 살균하여 배지를 조제하였다. 대량배양의 접종원은 배양액량 100ml의 250ml 삼각플라스크에서 직경 5mm 균사절편을 5개 접종하여 느타리는 25℃, 125rpm, 그리고 팽나무버섯의 경우는 21℃, 125rpm으로 7일 동안 배양하였으며, 균사체의 생육형이 pellet 형태를 나타내기 때문에 homogenizer를 이용하여 균질화를 시켜 대량배양의 접종원으로 사용하였다. 접종 후 air-filter를 통해 제공된 공기로 통기를 실시하였으며, 온도 23±2℃인 배양실에서 배양하였다. 대량배양에서의 생육측정은 배양된 배양액을 100mesh의 체로 균사체와 배양액을 분리하였으며, 80℃의 dry oven에서 항량·건조하여 건조중량을 측정하였다.

다. 배양조건 조사

액체종균 대량배양시 접종부피에 따른 영향을 확인하기 위하여 접종부피를 1~10%로 조절하고 통기량(vvm: volume per volume & minutes)은 느타리 0.5vvm, 팽나무버섯은 1vvm으로 접종량 실험을 실시하였다. 통기량 실험에서는 접종부피 5%에서 통기량을 0.5~2.5vvm으로 조정하여 대량배양할 때 균사체 생산에 미치는 통기량의 영향을 조사하였다. 또한 배양기간에 따른 공시균주의 생육을 알아보기 위하여 접종부피 5%로

1일~10일 까지 배양하여 1일 간격으로 배양중인 배양기를 회수하여 균체량을 조사하였다.

5. 액체종균 자동접종장치를 이용한 자실체 형성 실험

가. 접종방법에 대한 자동화 시스템에 적합한 배지 선발

자동화 시스템에 적합한 배지 선발은 우선 기계화 및 자동화가 가능하여야 하며 기존의 시설을 유지할 수 있는 접종방법을 선택해야 한다.

1) 팽나무버섯 - 액체종균 자동접종기를 통한 팽나무버섯의 재배할 때 톱밥수종 및 첨가재료에 따른 배양적 특성을 조사하기 위하여 팽나무버섯의 경우는 톱밥수종을 Oak, Poplar, Pine 등 3종을 사용하였으며 첨가재료는 톱밥에 미강과 밀기울을 10, 20 및 30%씩 각각 균일하게 혼합한 다음 배지의 수분함량이 65%가 되게 조절하였다. 조제된 배지는 $\text{Ø}3.0 \times 20.0$ cm 인 시험관에 50g씩 충전하여 silicon plug로 면전을 하고 121°C , 15psi($1.2\text{kg}/\text{cm}^2$) 고압살균기에서 40분간 살균하여 자동접종기를 통하여 10ml씩 접종을 하였다. 접종한 다음 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 배양실에서 20일간 배양하여 균사생장 및 균사밀도를 측정하였다.

2) 느타리버섯 - 배지조제시 Oak, Poplar 2종의 톱밥과 미강의 첨가량을 달리하여 수분함량 65%가 되게 조절하여 850ml P.P. 병에 540g씩 충전하여 121°C , 15psi($1.2\text{kg}/\text{cm}^2$) 고압살균기에서 90분간 살균하여 자동접종기를 통하여 10ml, 15ml, 20ml씩 접종하여 균사 생장 및 자실체를 발생시켜 수량을 조사하였다.

나. 자동접종시스템을 이용한 자실체 생산에서 접종량에 의한 영향

1) 배지의 조제 - 자동접종시스템에 적합한 배지로 느타리는 Poplar 톱밥에 미강을 20% 첨가하였고, 팽나무버섯의 경우는 미송에 미강을 20% 첨가하여 내열성 850ml P.P. 병에 수분 65%가 되게 자동입병기로 입병, 증진 후 121℃, 15psi(1.2kg/cm²) 고압살균기에서 90분간 살균 후에 냉실에서 냉각시켜 접종 준비를 하였다.

2) 액체종균의 배양 - 액체종균의 배양은 자동접종기에 적합한 배양장치를 이용하여 배양액에 비례한 원균 접종량을 기준으로 2%, 4%, 6%, 8%, 10%로 접종을 한 후 0.5vvm으로 4일간 23±2℃에서 배양하여 자동접종기의 액체종균으로 사용하였다.

3) 자동접종장치를 통한 접종 - 자동접종시스템에서 액체종균 배양장치로 연결되는 모든 라인(air-line, spawn-line)과 액체종균이 분사되어지는 노즐을 접종에 앞서 121℃, 15psi(1.2kg/cm²) 고압살균기에서 2시간 가량 살균하여 무균화 시켰다. 그 후 접종실(무균실)에서 액체종균이 들어있는 배양장치를 자동접종기에 연결하고 계산되어진 분사압과 분사시간을 제어하여 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml을 톱밥배지에 접종하였다.

4) 배양 및 자실체 수량조사 - P.P. 병에서의 균사배양 및 자실체의 생산은 그림 1. 에 따라 실시하여 균사생장 및 자실체를 조사하였다. 자실체 수량 조사는 P.P. 병당 생산되어진 총무게(g), 경장(mm), 갓경(mm), 유효경수(개)를 조사하여 액체종균 자동접종기에 적합한 배양비율 및 적정 접종량을 확인하였다. 그리고 느타리 및 팽나무버섯의 자실체 형성할 때 1주기만을 수확하여 수량조사를 실시하였다.

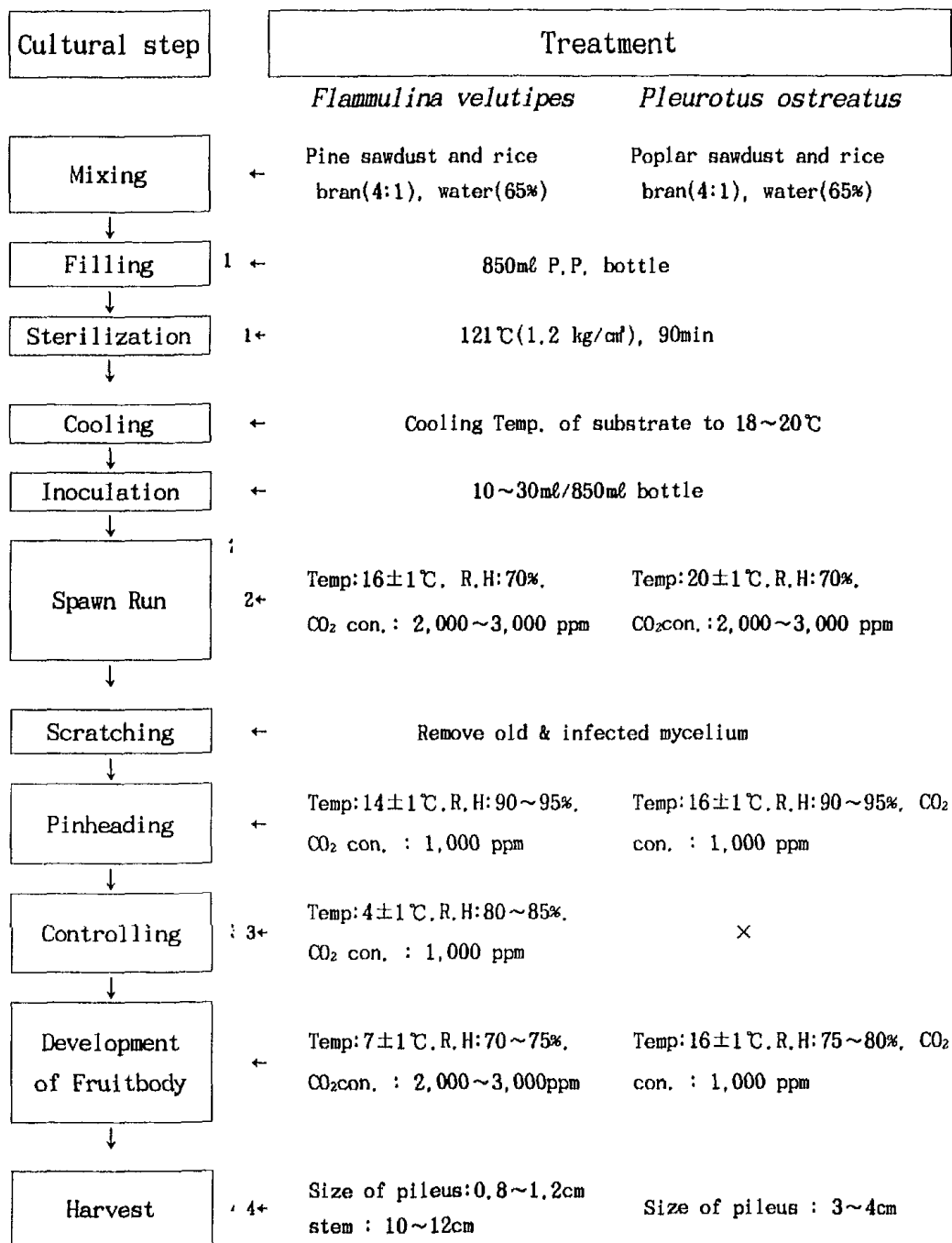


그림 1. 느타리 및 팽나무버섯의 재배과정.

*Cultivation process - 1 : Spawn making step, 2 : Mycelial growing step,
3 : Cultivation step and 4 : Harvesting step.

다. 느타리·팽나무버섯 생산을 위한 실증시험

농가에서 액체종균 자동접종시스템과 고체종균 자동시스템을 이용하여 자실체 생산 비교 실증시험을 수행하였다. 농가는 춘천근교에서 고체종균 자동접종기를 이용하여 팽나무버섯 재배를 하는 농가와 강원도 농업기술원 특화작목개발시험장 버섯 재배사를 선정하였다. 농가 실증은 4×4배열의 병재배용 port(16bottles)를 자동접종장치에 적용하여 사용하였다. 고체종균의 경우는 10~15g 씩 접종을 하였으며, 액체종균은 적정접종량을 접종하여 두 접종시스템의 차이를 조사하였다. 두 가지 시스템의 자실체 수량조사는 1 port(16bottles)에서 수확되는 전체량을 기준으로 수량을 조사하였다. 유효경수는 pp병 1병을 기준으로 하여 평균을 내었고, 갯경과 경장은 한 개체를 기준으로 하여 평균을 내었다. 자실체의 총무게는 1 port(16 bottle)를 기준으로 수량조사를 실시하였다. 느타리 및 팽나무버섯의 자실체 수량조사시 1주기에 형성된 자실체만을 수확하여 수량조사를 실시하였다.

제3절 결 과

1. 느타리·팽나무버섯균의 균사생육 조건 조사

가. 기본배지 선발

느타리 및 팽나무버섯균의 기본 배지선발 결과 팽이 2호(F-002)의 경우 Czapek배지, BM배지, MCM배지에서 균사의 생장 및 밀도가 우수하였고, 느타리버섯[농기2-1호(P-001), 원형느타리 2호(P-002)]에서는 PDA배지, BM배지, SDAY배지에서 높은 생장을 확인할 수 가 있었다. 위의 결과로 공시균주들의 기본배지로 BM배지를 선발하여 기본생리 실험에 사용하였다(표 2).

나. 생리적 특성조사

1) 팽나무버섯

가) 온도 및 초기 pH의 영향 - 팽나무버섯의 균사배양 최적온도를 조사하기 위하여 BM배지와 HM배지에 균총 5mm를 접종한 후 5℃부터 30℃까지 각 5℃범위로 실험을 실시하였다. 실험한 결과 HM, BM모두 20℃에서 가장 우수한 생장을 나타냈다(그림. 2). 또한 균사체 생육에 미치는 초기 pH의 영향을 조사한 결과, 팽이 2호(F-002)의 최적 pH는 6.0에서 7.5 사이로 나타났다(그림. 3).

표 2. 느타리 및 팽나무버섯의 기본배지 선발

Media	Colony diameter(mm/10days)			Mycelial density		
	F-002	P-001	P-002	F-002	P-001	P-002
Park	66.1	71.9	81.6	++	+	++
Czapek	81.1	83.1	80.4	+++	++	++
Lilly	70.9	72.5	76.2	++	+	+
PDA	78.3	84.0	82.3	++	+++	+++
Hader	80.8	46.0	75.7	+++	+	++
Hasimoto	76.8	41.4	71.6	++	+	++
Torev	42.2	57.7	68.2	++	+	+
BM	82.3	83.6	82.7	+++	+++	+++
MM	79.6	57.2	75.6	+	+	+
MPD	67.2	58.4	68.1	++	+	++
YMA	63.4	77.6	73.8	++	+++	+++
MYA	70.2	83.2	82.6	+++	++	++
SDAY	66.7	69.8	81.4	+++	+++	+++
HM	67.2	72.4	81.0	+++	++	++
CDA	78.2	52.3	74.6	+	+	+
MCM	81.1	73.1	74.1	+++	++	++
PSA	75.6	58.6	66.1	++	+	+

+ : thin, ++ : moderate, +++ : compact.

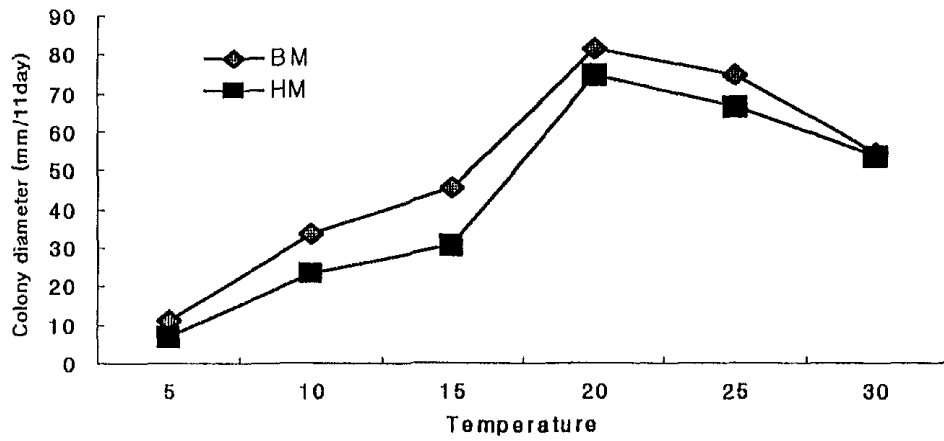


그림 2. 팽나무버섯(팽이 2호)의 배양온도에 따른 균사생장에 미치는 영향.

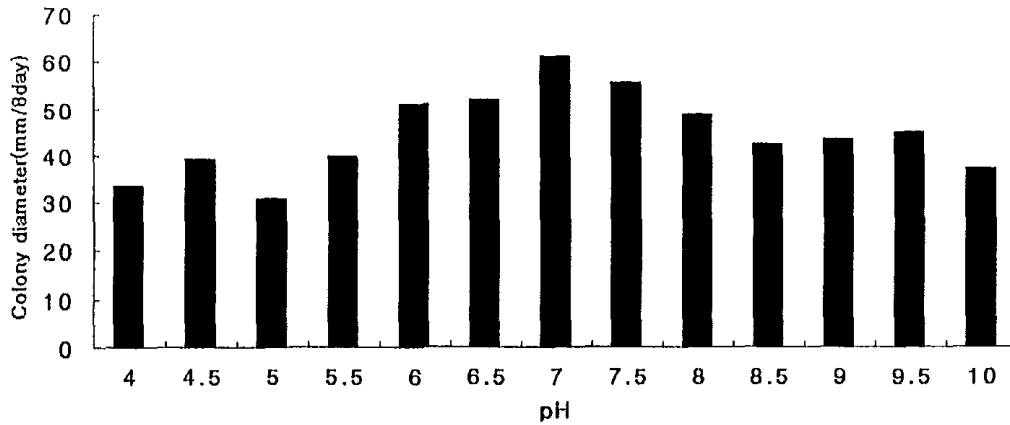


그림 3. 초기 pH가 팽나무버섯(팽이 2호)의 균사생장에 미치는 효과.

나) 영양원 선발 - 액체종균의 대량배양할 때 농업용으로 사용될 수 있는 최적 탄소원, 질소원 및 무기염류 선발실험을 위하여 BM 배지를 기본배지로 하여 조사를 실시하였다. 탄소원 선발을 위해 탄소원을 달리 했을 때의 균사생육을 조사한 결과 monosaccharide인 glucose에서 보다 polysaccharide 인 yellow sugar와 potato starch에서 양호한 생장을 나타냈다(그림 4). 탄소원 조사에서 선발된 yellow sugar와 potato starch를 가지고 질소원 실험을 실시하였다. 질소원을 달리한 후 균사의 생장을 조사하였다. 실험결과 soybean flour, Yeast extract에서 생장이 우수하게 나타났다(그림 5). 무기염류의 첨가가 균사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지(BM)에 CaCl_2 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 및 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 0.1%(w/v) 및 0.5%(w/v)씩 첨가하여 배양한 결과 대조구에 비해 무기염류 첨가의 영향이 미비하며 CaCl_2 , 0.1%와 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0.05%(w/v)씩 첨가한 배지에서 조금 우수한 생장을 나타냈다(표 3).

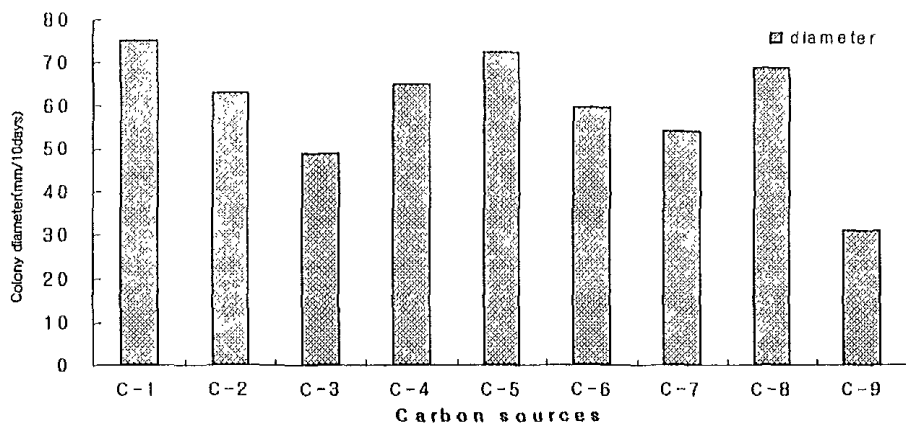


그림 4. 탄소원에 따른 팽나무버섯(팽이 2호)의 균사생장 영향.

C-1 : Yellow Sugar, C-2 : Corn flour, C-3 : Corn starch, C-4 : Glucose, C-5 : Potato starch, C-6 : wheat flour, C-7 : starch, C-8 : saccharose and C-9 : skim milk powder.

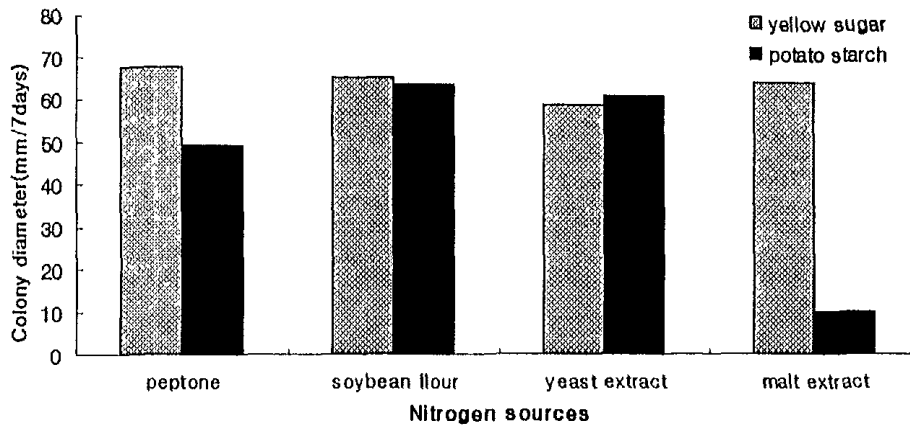


그림 5. 질소원에 따른 팽나무버섯의 균사생장 영향.

표 3. 팽나무버섯균의 균사생장에 대한 무기염류의 영향.

Mineral sources	colony diameter (mm/8days)	mycelial density
Control(not add mineral salts)	64.1	+++
CaCl ₂ , 0.1%	68.0	+++
CaSO ₄ · 2H ₂ O 0.1%	54.6	++
KH ₂ PO ₄ 0.1%	59.4	+++
MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.1%	64.6	+++
KH ₂ PO ₄ 0.1% + MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.1%	64.2	+++
KH ₂ PO ₄ 0.05% + MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05%	68.5	+++

Medium contents : Yellow sugar 3%, Yeast extract 0.3%, each mineral salts.

2) 느타리버섯

가) 온도 및 초기 pH의 영향 - 느타리버섯 2 품종에 대한 생육 최적온도 조사결과 농기2-1호(P-001)는 30℃, 원형느타리 2호(P-002)는 25℃에서 생육이 좋게 나타났다(그림 6). 원형느타리 2호는 저온성으로 육종되어진 품종이기 때문에 생육온도가 농기 2-1호 보다 낮은 것으로 사료되어진다.

균사체 생육에 미치는 초기 pH를 조사해 본 결과 약산성인 pH 6.0 ~ pH 7.0에서 균사생육이 가장 우수하였다(그림 7).

나) 영양원 선발 - 느타리버섯균의 생육에 적합한 탄소원을 선발하기 위하여 glucose를 비롯한 6종의 탄소원을 실험한 결과, 2 품종 모두 Yellow sugar, Wheat flour에서 양호한 생육을 나타내었다(표 4).

질소원선발 실험을 위해서 탄소원은 Yellow sugar로 고정하고 질소원을 달리하여 실험한 결과 Soybean flour와 Yeast extract에서 우수한 균사생육을 나타내었다(표 5).

농기2-1호와 원형느타리 2호의 무기염류의 이용성을 조사하고자 Yellow sugar와 Yeast extract를 10 : 1의 비율로 첨가한 후 무기염류선발실험을 한 결과 첨가효과가 뚜렷이 나타나지 않았다(표 6).

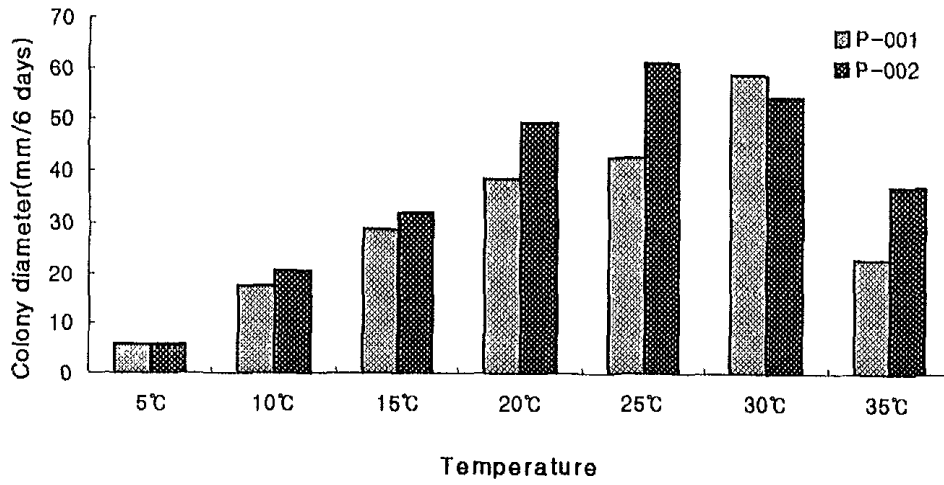


그림 6. 배양온도가 느타리버섯균의 균사생장에 미치는 영향.

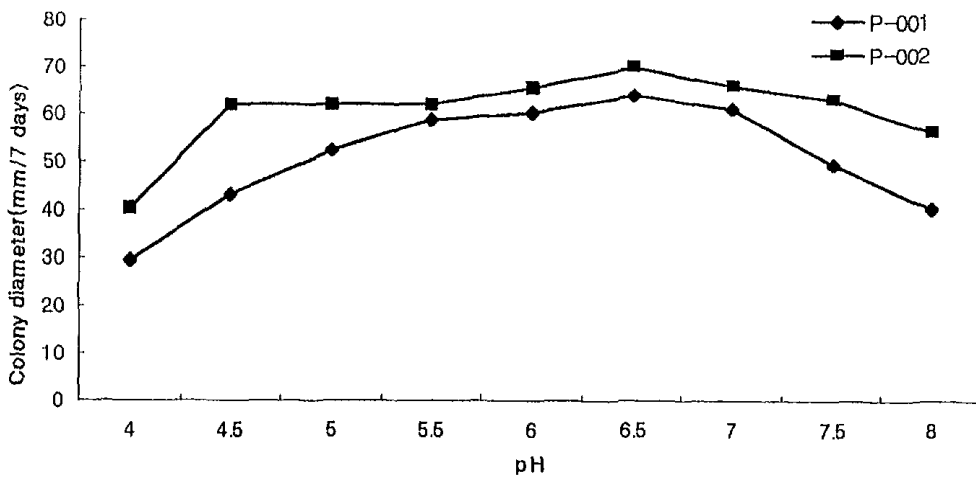


그림 7. 초기pH가 느타리버섯균의 균사생장에 미치는 영향.

표 4. 탄소원에 따른 느타리버섯균의 균사생장 영향

Carbon sources	Colony diameter (mm/7 days)		Mycelial density	
	P-001	P-002	P-001	P-002
Yellow sugar	74.7	78.1	+++	+++
Corn flour	72.6	79.2	++	++
Corn starch	65.2	67.8	++	++
Glucose	42.6	48.9	++	++
Potato starch	66.5	68.7	+++	+++
Wheat flour	73.8	77.1	+++	+++

+ : thin, ++ : moderate, +++ : compact.

표 5. 질소원에 따른 느타리버섯균의 균사생장 영향.

Nitrogen sources	Colony diameter (mm/7 days)		Mycelial density	
	P-001	P-002	P-001	P-002
Peptone	67.6	70.7	++	++
Soybean flour	70.6	78.6	+++	+++
Yeast extract	69.2	75.7	+++	+++
Malt extract	46.3	49.2	++	++

+ : thin, ++ : moderate, +++ : compact.

표 6. 느타리버섯균의 군사생장에 대한 무기염류 영향

Mineral sources	Colony diameter(mm/6days) mycelial density			
	P-001	P-002	P-001	P-002
Control(not add mineral salts)	57.1	68.8	+++	+++
CaCl ₂ 0.1%	54.0	70.0	++	++
CaSO ₄ · 2H ₂ O 0.1%	52.5	70.3	++	++
KH ₂ PO ₄ 0.1%	48.8	66.3	+++	+++
MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.1%	53.3	69.5	+++	+++
KH ₂ PO ₄ 0.1% + MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.1%	58.3	70.8	+++	+++
KH ₂ PO ₄ 0.05% + MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05%	57.5	70.6	+++	+++

Medium contents : Yellow sugar 3%, Yeast extract 0.3%, each mineral salts. + : thin, ++ : moderate, +++ : compact

2. 느타리 · 팽나무버섯균의 삼각플라스크 배양의 환경조건 조사

가. 삼각플라스크(△- flask)에서의 접종원의 접종량조사

접종원의 접종량 변화에 따른 군사체 증식을 조사하기 위하여 팽이 2호(F-002)와 농기 2-1호(P-001)의 군사절편(직경 5mm)을 1~5개까지 한 개 간격으로 접종 개수를 달리하여 삼각플라스크에서 배양한 결과, 팽이 2호(F-002)는 군사절편의 접종량이 증가할수록 초기 군사체 생장은 좋지만 건조 균체량의 큰 증가는 보이지 않았다.

팽나무버섯 및 느타리버섯 두 개 공시균 모두 군사절편 3개에서 5개

절편을 접종하는 것이 삼각플라스크 배양에 적당한 것으로 나타났다(그림 8). 또한 균사의 형태가 pellet형태로 생장이 되었고 팽나무버섯이 느타리버섯보다 균체량이 높게 나타났다.

본 연구에서는 삼각플라스크에 균사절편(직경 5mm) 5개를 접종하여 느타리 및 팽나무버섯균 대량배양의 전 배양으로 사용하였다.

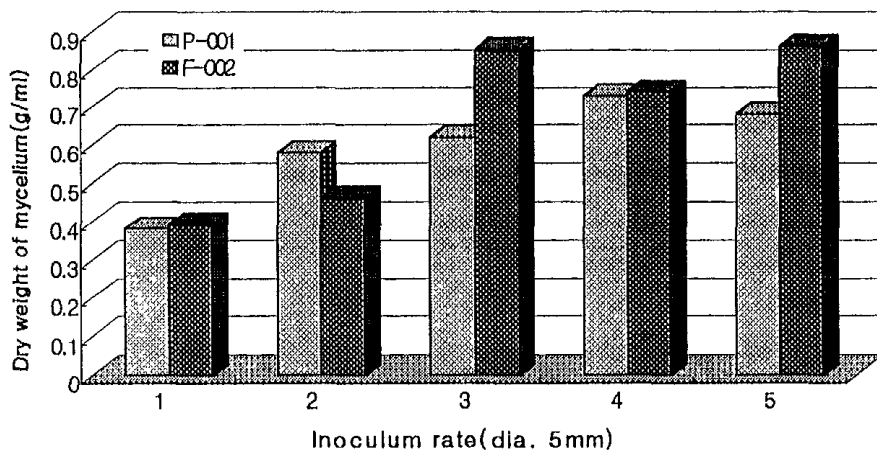


그림 8. 삼각플라스크에서 느타리(P-001) 및 팽나무버섯균(F-002)의 균사체 생산에 미치는 접종량의 영향.

나. 배양액량 및 삼각플라스크의 종류에 따른 균사의 생육조사

삼각플라스크에서 배양액량 및 플라스크형태에 따른 공시균주 균사체의 생육효과를 조사하기 위하여 플라스크 형태에 따라 배지액량을 배양 용기 부피의 20~60%로 달리하여 배양한 결과, 공시균주 모두 용기부피 250ml의 Erlenmeyer flask와 Shake flask의 배양액 100ml(용기대 배양액량의 부피비 40%)에서 생육이 우수하게 나타났다.

플라스크의 형태에 따른 공시균주의 생육 결과를 보면 Shake flask가 Erlenmeyer flask보다 건조 균체량이 높게 나타났다(그림 9, 그림 10).

따라서 본 연구에서는 250ml의 진탕배양용 삼각플라스크(Shake flask)에 배양액량을 100ml하여 느타리 및 팽나무버섯균 대량배양의 전 배양으로 사용하였다.

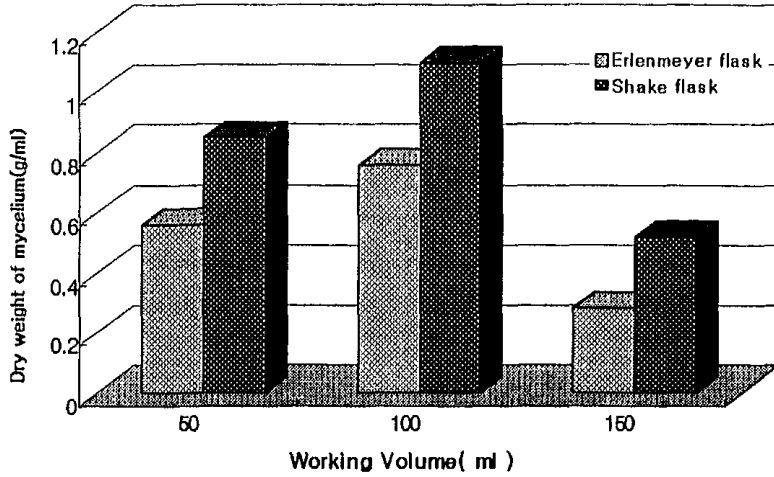


그림 9. 팽나무버섯균의 삼각플라스크 형태 및 배양액량이 균사체 생산에 미치는 영향.

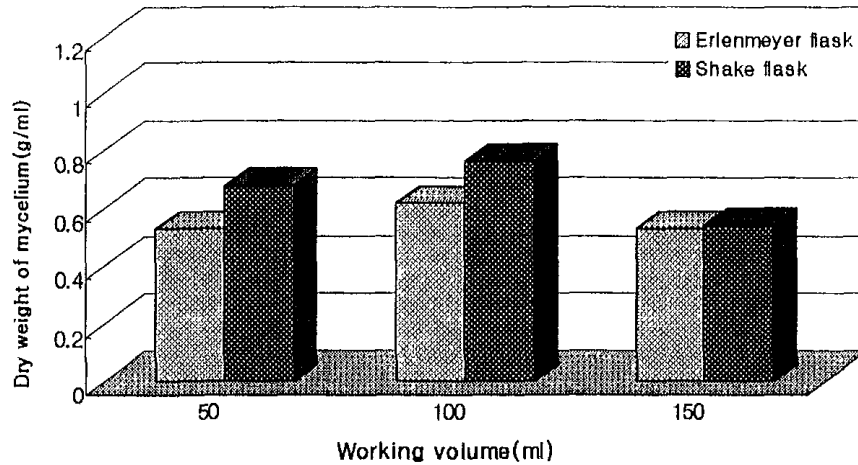


그림 10. 느타리버섯균의 삼각플라스크 형태 및 배양액량이 균사체 생산에 미치는 영향.

다. 배양기간에 따른 균사 생육조사

각 공시균주들의 삼각플라스크에서 액체배양할 때 배양기간에 따른 균사생장을 조사한 결과, 접종 후 6일 이후에는 커다란 건조균체량의 증가가 보이지 않았다. pellet형성 역시 6일 이후에는 size의 차이가 나타나지 않았다. 느타리 및 팽나무버섯균의 삼각플라스크 액체배양할 때 배양기간은 6일에서 7일이 적당할 것으로 사료된다(그림 11). 따라서 본 연구에서는 삼각플라스크 배양 시 7일간 배양하여 대량배양의 전 배양으로 사용하였다.

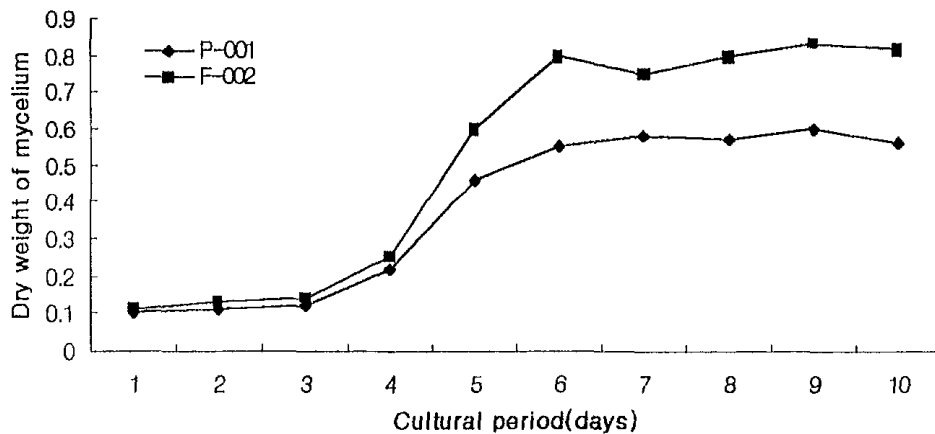


그림 11. 삼각플라스크에서 느타리(P-001) 및 팽나무버섯균(F-002)의 배양시간에 따른 영향.

3. 접종장치의 자동화 시스템에 적용할 액체종균 배양장치 제작

가. 배양장치제작

본 실험에 사용될 배양장치는 자동접종기의 자동화 시스템에 적용할 수 있으며, 또한 미생물반응기로서 공시균들의 배양학적 특성에 맞는 발효조(fermenter)이어야만 한다.

1) 배양용기의 선발 배양용기의 소재로는 자동접종기의 액체종균 분출을 위하여 배양기내로 주입되는 높은 공기압과 살균시의 고온·고압에 견딜 수 있는 스테인레스를 선발하였으며 배양할 때 내부의 배양물을 확인하기 위하여 측면에 유리로 된 관측망을 설치하였다. 배양용기의 형태는 배양기내의 균일성 확보를 위한 통기·교반에 큰 영향을 주게되는데 발효산업에 공통적으로 사용되는 교반식 발효조(stirred fermenter)는 임펠러에 의한 균사체의 손상을 가져오는데 반해 기포탑형 발효조(airlift fermenter)는 발효조의 저부에 압축공기를 보내어 산소공급을 하는 동시에 기포의 상승에 의해 액의 혼합 교반이 이루어지는 방식이다. 또한 airlift fermenter에서 배양함으로써 stirred fermenter에서 나타나는 전단응력에 의한 손상을 제거하여 더 높은 수율을 얻을 수 있으며 교반에 대한 에너지의 요구를 줄일 수 있을 뿐 아니라 점도가 높은 non-Newtonian배지(mycelial 배양액이나 생물고분자 생산)에도 적합하며, 열전달 및 물질전달이 효율적으로 운용할 수 있으며 scale-up이 용이하기도 하다. 따라서 본 실험에서는 여러 면에서 장점을 가지고 있으며 액체종균 자동접종시스템에도 적합한 기포탑형 발효조(airlift fermenter)를 선택하였으며 폭 대 높이의 비(W/H)가 1:4인 12ℓ 짜리 steel airlift fermenter 제작하여 각 공시균주의 대량 배양에 이용하였다(그림 12, 그림 13).

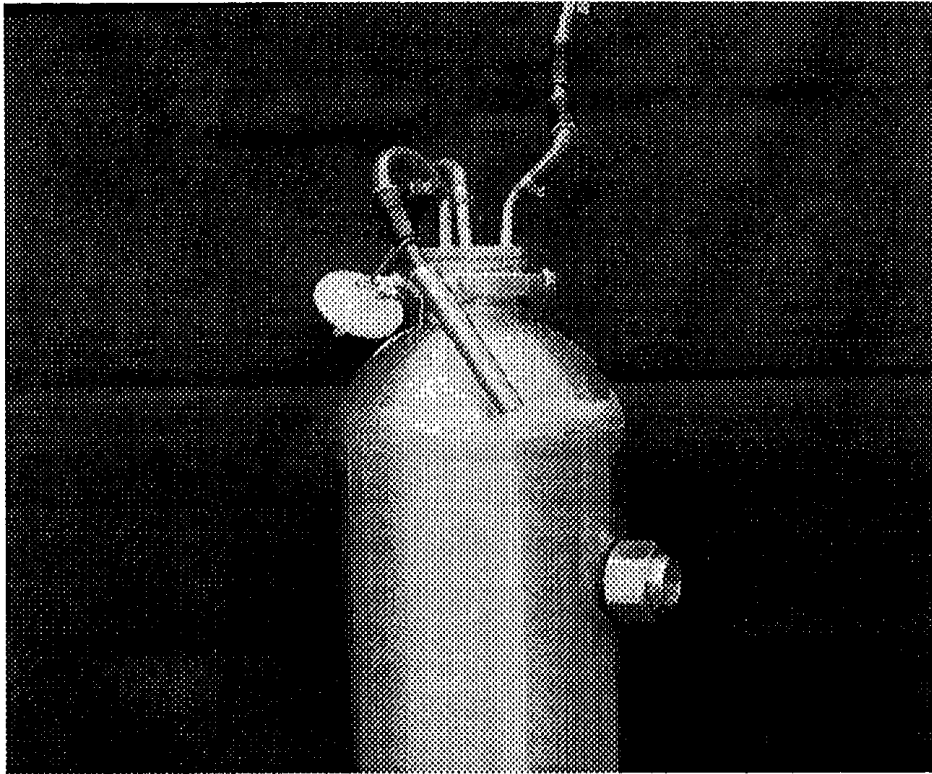


그림 12. 12L 기포탑형 발효조의 외관모습.

2) 배양라인 공시균주들은 호기성균으로 배양기간동안 산소의 공급은 필수적이다. 또한 자동접종시스템에 쉽게 연결이 가능하여야 하며 고온 및 높은 공기압에 견딜 수 있어야 한다. 액체종균의 배양 시 배양기에서 배양라인은 접종원의 접종관과 압축공기의 통기관을 겸하는 라인, 그리고 배기라인 최소 2개 라인이 필요로 하다. 자동접종장치에 연결하기 위해서는 압축공기를 공급하는 air line과 액체종균을 접종노즐로 연결하는 spawn line이 있어야만 한다. 두 가지 모두에 적용할 수 있는 라인은 배양시 접종관과 통기관을 자동접종장치에 연결시 spawn line으로 사용하여 연결하고, 배양시 배기라인을 자동접종장치에 연결시 air line으로 연결하여 배양라인을 제작하였다. 각 라인은 고온, 고

압에 견디어 낼 수 있는 air hose로 제작하였고 연결부는 Quick connect를 사용하여 자동접종장치에 부착이 되어 있는 air hose에 연결이 쉽게 하였다. air line은 8mm air hose를 spawn line은 12mm air hose를 선발하여 사용하였다(그림 13).

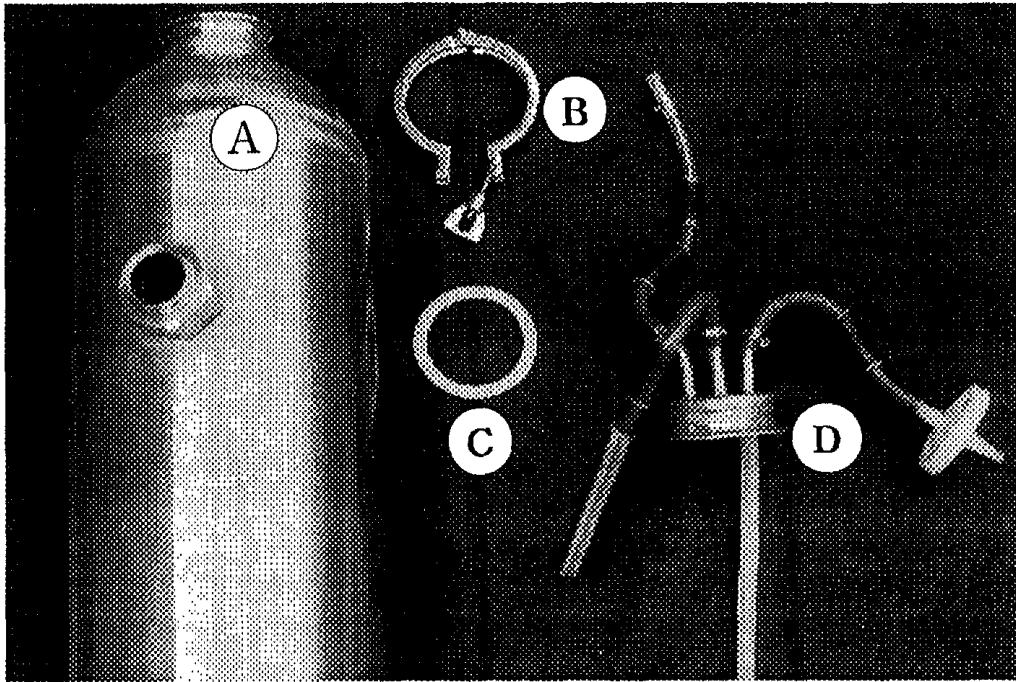


그림 13. 기포탑형 발효조의 내부 모습.

A) 본체, B) Round clamp, C) O-ring D) 배양라인.

3) 공기의 제균 및 소포체선발 배양장치에서 배양시 외부와의 공기 접촉을 차단하기 위해 각 라인 끝에는 필터를 설치하였는데 통기시에는 제균효율이 매우 높고 연결 및 취급이 간편한 Gelman science社의 Acro[®] 50(P/N 4251, Lot No.5359) 공기필터(PVA filter, 0.2 μ m)를 사용하였으며, 배기시에는 섬유층진필터(deep filter-길이 120mm의 스테인레스

관에 직경 28mm의 플라스틱 섬유구를 5~7개 충전)를 사용하였다. 또한 배양장치 내부로 산소를 공급하기 위한 통기조작으로 거품이 발생하여 배양액의 손실을 초래하는 사이펀(siphon)현상과 균사체가 사멸하는 wall growth가 일어나기 때문에 배양기에서 거품의 발생억제는 반드시 필요하다. 본 실험에서는 거품의 발생을 억제할 뿐만 아니라 식용버섯균의 생육촉진 및 에너지원으로 이용된다고 보고된 식물성 기름을 소포제로 사용하였으며(Hong *et al.*, 1992) 그 첨가량은 약 $30 \pm 10\text{mm}$ 를 첨가하였다.

나. 자동접종기의 분사량별 균체량 조사

액체종균 자동접종기의 분사압과 분사시간에 따른 분사량과의 관계를 조사하였으며 이것을 근거로 느타리 및 팽나무버섯균의 희망 분사량에 따른 균체량을 조사한 결과 분사량 증가에 따라 균체량도 일정하게 증가하는 것을 확인할 수가 있었으며 이것을 분사량과 균체량 회귀식으로 나타내었다(그림 14, 그림 15). 분사량 증가에 따라 균체량도 일정하게 증가하는 것으로 미루어 액체종균 배양기내의 배양액과 균사체가 균일하게 분포하고 있음을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 요구되는 분사량은 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml와 같이 정확한 수치화를 필요로 하기 때문에 각각의 분사량에 따른 분사압과 분사시간 그리고 균체량을 조사하였다(표 7, 표 8). 이 자료들은 액체종균 자동접종장치를 이용한 느타리 및 팽나무버섯균의 접종 실험시 분사량을 제어하여 원하는 접종량으로 실험을 수행할 수가 있었다.

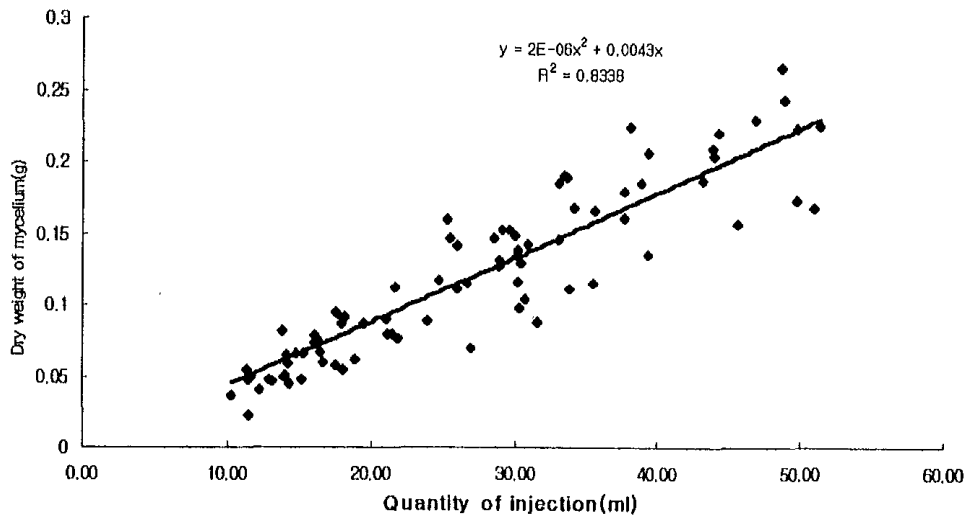


그림 14. 팽나무버섯균을 이용한 자동접종장치의 분사량과 균체량의 관계.

표 7. 팽나무버섯균에서 적정 분사량에 따른 분사압, 분사시간 및 균체량의 관계

Quantity of injection(ml)	Injection pressure(kgf/cm ²)	Time of injection(Second)	Dry weight of mycelium(g)
10	0.45	0.23	0.043
15	0.55	0.34	0.065
20	0.45	0.55	0.087
25	0.65	0.56	0.109
30	0.75	0.63	0.131

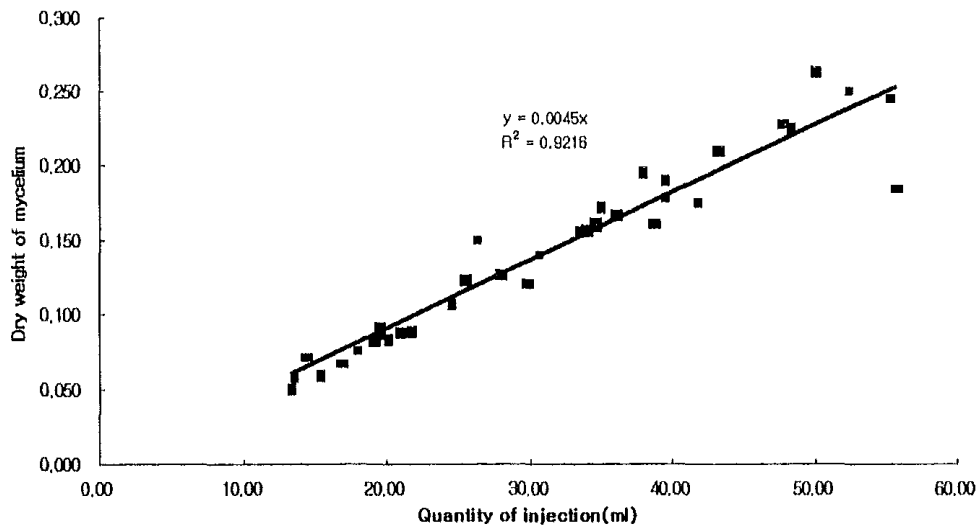


그림 15. 느타리버섯균을 이용한 자동접종장치의 분사량과 균체량의 관계.

표 8. 느타리버섯균에서 적정 분사량에 따른 분사압, 분사시간 및 균체량의 관계

Quantity of injection(ml)	Injection pressure(kgf/cm ²)	Time of injection(Second)	Dry weight of mycelium(g)
10	0.4	0.43	0.045
15	0.5	0.5	0.068
20	0.6	0.68	0.090
25	0.75	0.56	0.113
30	0.65	0.74	0.135

4. 자동접종장치의 자동화 시스템에 적합한 대량 액체종균 배양조건

가. 대량 액체배지 선발 및 자동접종장치의 기능 검정

공시균주의 영양원선발 실험에서 선발된 탄소원, 질소원, 무기염류 등을 기초로 하여 대량배양하기 위해 팡이 2호(F-002)를 이용하여 액체배지에서 탄소원 및 질소원 실험을 실시하였다. 팡나무버섯균의 영양원 실험에서 탄소원으로 선발된 yellow sugar, potato starch 와 질소원으로 선발된 soybean flour, yeast extract를 가지고 플라스크상에서 생장을 조사하였다(그림 16). 조사 결과 균체량이 potato starch, soybean flour 가 첨가된 배지에서 높게 나타났는데, 배양 중 potato starch의 성분이 녹지 않은 상태로 이물질이 생성되어 있어서 자동접종기를 통한 접종원으로서의 사용이 어려울 것으로 판단되며 yellow sugar 에 soybean flour, yeast extract를 첨가한 배지가 자동접종기에 적용할 가장 적당한 배지로 사료된다.

본 실험에서는 산업용으로 사용될 수 있는 배지의 선발을 위해 탄소원으로 yellow sugar 3%(w/v)을 질소원으로는 yeast extract 보다 soybean flour 0.3%(w/v)을 선발하였으며, 무기염류는 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 0.05%(w/v)씩 첨가하여 자동접종장치의 대량배양의 배지로 사용하였다. 자동접종시스템에 적용할 배양장치(airlift fermenter)에 위에서 선발한 배지로 공시균주를 배양하여 자동접종기를 통해 접종하였을 때 균사의 절단현상에 의한 균의 활착 및 활력저하를 검정하였다(그림 17). 그 결과 850ml P.P. 병 톱밥배지에 자동접종장치를 사용하여 접종한 P.P. 병에서 자동접종장치를 사용하지 않고 액체종균을 접종한 P.P. 병 보다 균사의 활력이 우수한 것을 확인할 수가 있었다. 자실체 형성에서도 커다란 차이가 나타나지 않았으며 접종할 때 접종량을 정확

하게 조절할 수가 있다는 장점을 가지고 있기도 하다. 즉, 자동접종장치를 통해 액체종균을 접종할 때 느타리 및 팽나무버섯 균사의 절단현상에 의한 활력저하현상이 나타나지 않았으며, 자실체 형성에도 종균의 의한 문제점은 발생하지 않았다. 위 결과 액체종균 자동접종시스템을 이용한 병재배 버섯의 생산은 충분한 가능성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다.

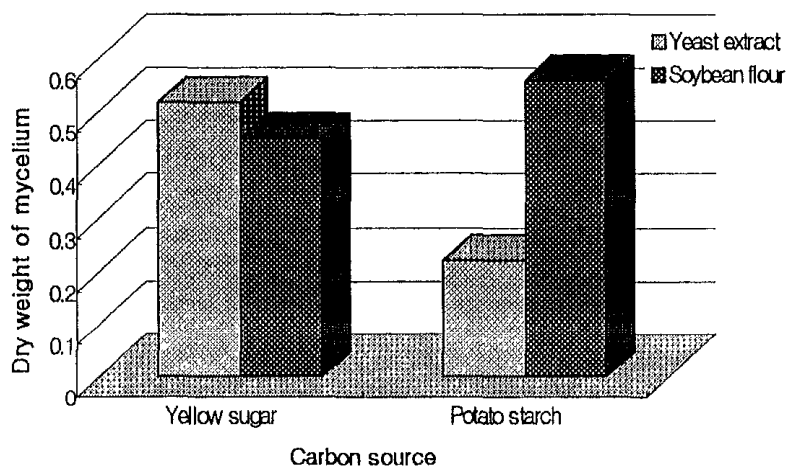


그림 16. 삼각플라스크상에서 팽나무버섯균의 탄소원과 질소원에 대한 균사생육의 영향.

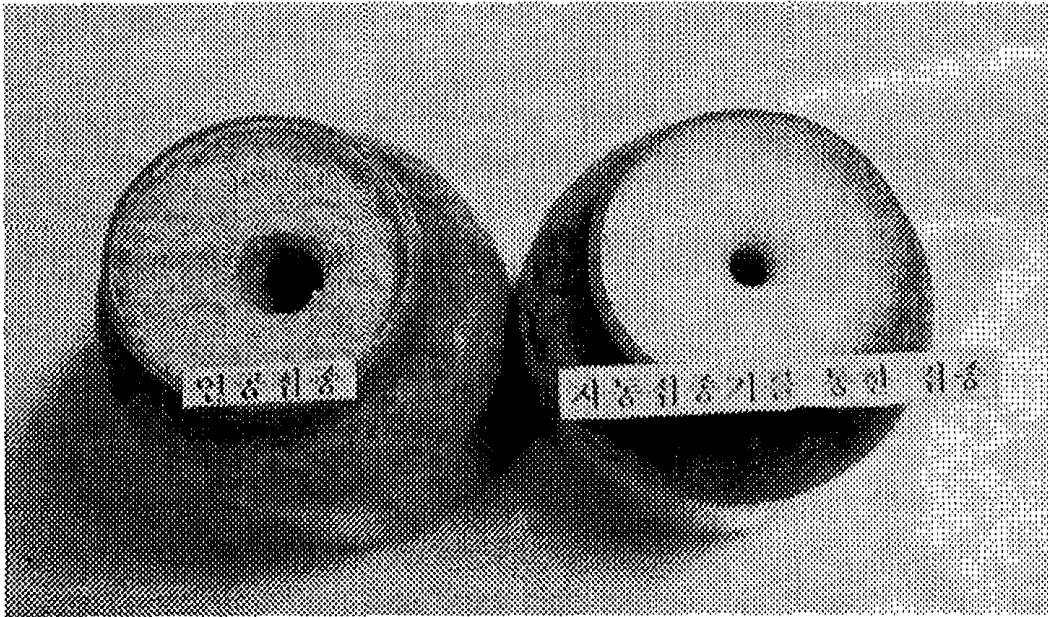


그림 17. 액체종균 자동접종기에 의한 팽나무버섯균의 균사활력의 영향.

나. 액체종균 대량배양시 접종부피에 따른 균체량 조사

대량배양시 접종부피에 따른 영향을 알아보기 위하여 공시균주의 생육을 확인하였다. 접종부피를 1~10%로 조절하고 조사한 결과 팽이 2호(F-002)는 접종부피 5%와 6% 일 때 균사체 생산이 가장 우수하게 나타났다(그림 18). 농기 2-1호(P-001)의 경우는 접종부피 4% 일 때 균체량이 우수하게 나타났는데 접종부피 4% 이상에서 더 이상의 균체량 증가는 나타나지 않았다(그림 19).

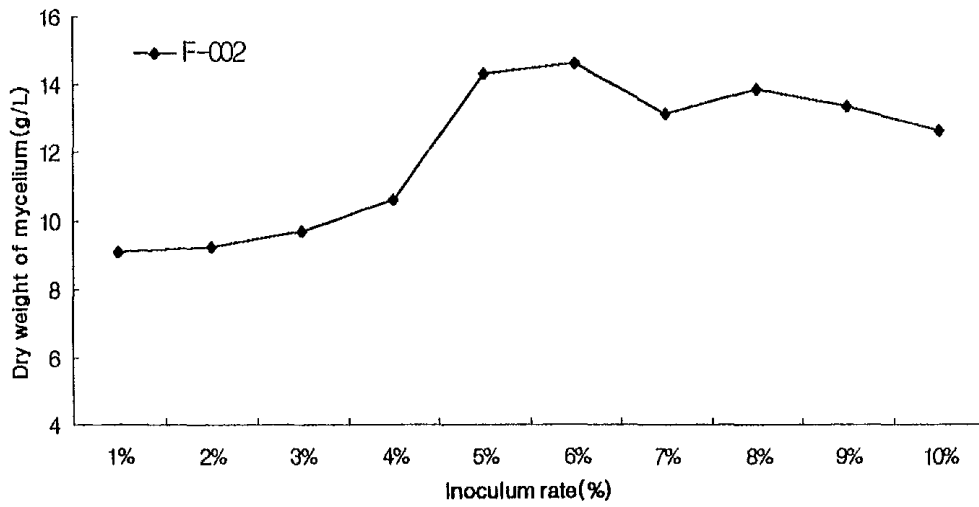


그림 18. 팽나무버섯균의 대량배양에서 접종량에 따른 균체량 변화.

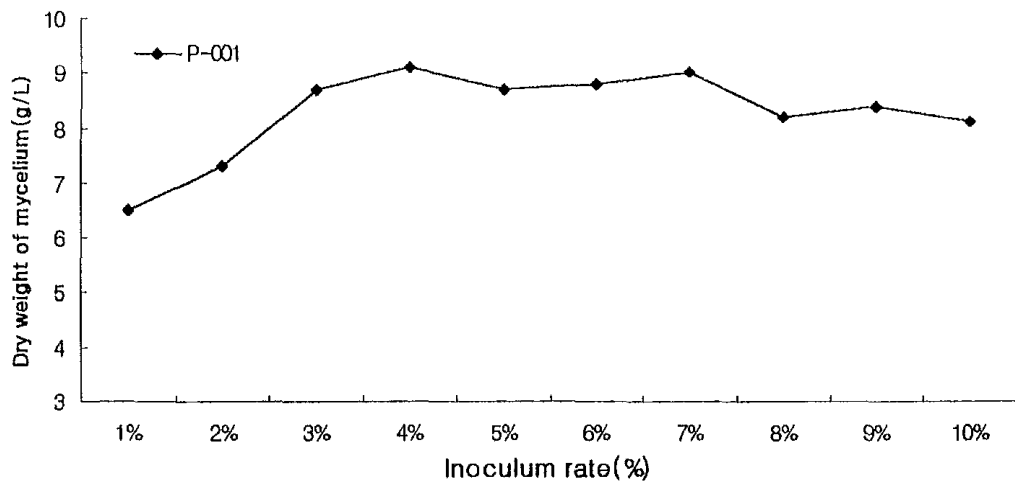


그림 19. 느타리버섯균의 대량배양에서 접종량에 따른 균체량의 변화.

다. 액체종균 대량배양시 통기량에 따른 균체량 조사

통기량 실험에서는 접종부피 5%에서 통기량을 0.5~2.5vvm으로 조정하여 대량배양시 균사체 생산에 미치는 통기량의 영향을 조사하였다. 조사 결과 느타리 및 팽나무버섯균 모두 1vvm에서 건조 균사체 생산이 높게 나타났다(그림 20, 그림 21). 하지만 본 실험의 배양장치에는 배기되는 공기중의 수분을 응축 할 수 있는 condenser를 배기 구멍에 설치하지 않았기 때문에 통기량이 증가할수록 배양기로부터 배양액의 손실이 증가함을 확인할 수가 있었다. 따라서 자동접종장치를 적용하여 자실체 형성을 위한 액체종균의 대량배양은 배양액의 혼합효과와 배양액 손실을 최소화 할 수 있는 0.5vvm으로 통기하여 이후의 실험을 수행하였다.

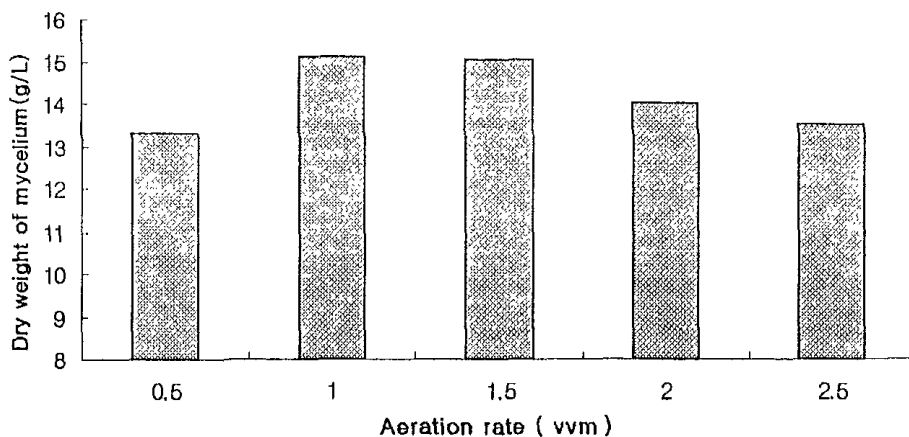


그림 20. 팽나무버섯균의 대량배양에서 통기량에 따른 균체량의 변화.

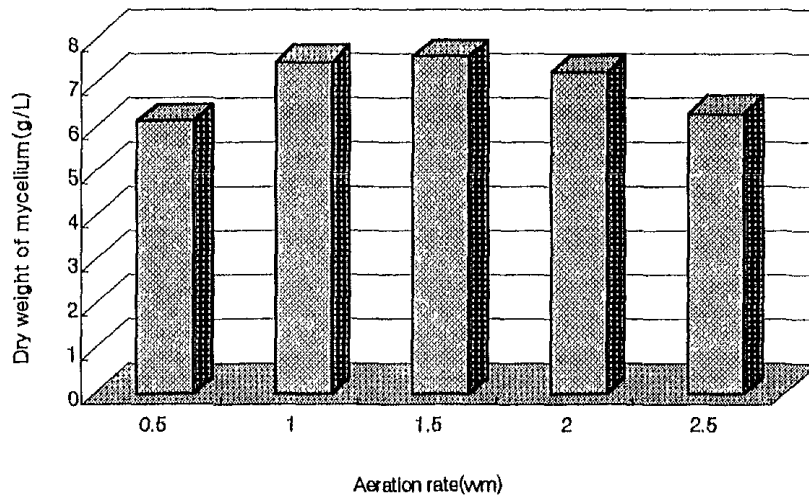


그림 21. 느타리버섯균의 대량배양에서 통기량에 따른 균체량의 변화.

라. 액체종균 대량배양시 배양일수에 따른 생육조사

접종량 5%, 통기량 1vvm(F-002), 0.5vvm(P-001)으로 1일에서 8일까지 균사의 생장을 조사해 본 결과, 농기 2-1호(P-001)의 경우 배양 5일 이후부터는 균체량의 증가가 크게 나타나지 않았고, 팽이 2호(F-002)는 배양 4일 만에 stationary phase에 도달됨을 확인할 수 있었다(그림 22).

느타리 및 팽나무버섯의 대량배양시 4일에서 5일 정도 배양하는 것이 적정할 것으로 사료되어진다.

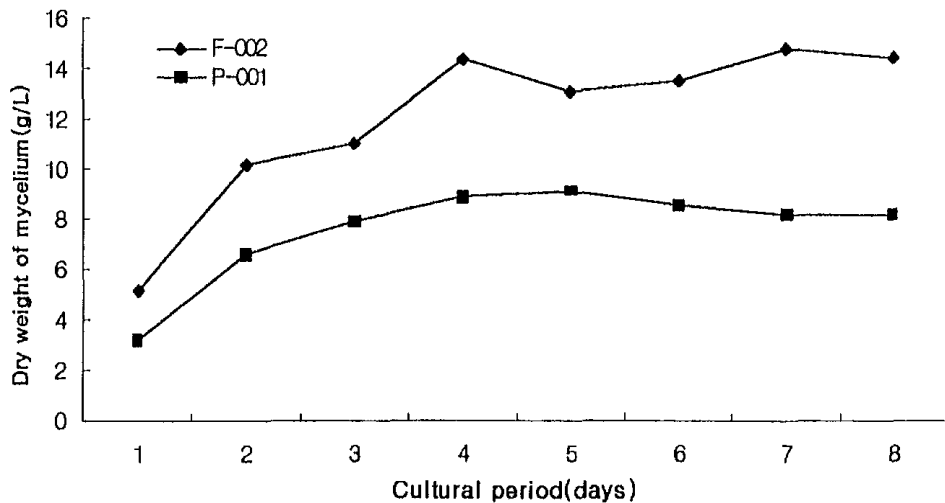


그림 22. 느타리(농기 2-1호) 및 팽나무버섯균(팽이 2호)의 대량배양에서 배양일수에 따른 균체량의 변화.

5. 액체종균 자동접종기를 이용한 자실체 형성 실험

가. 접종방법에 대한 자동화 시스템에 적합한 배지 선발

자동화 시스템에 적합한 배지 선발은 우선 기계화 및 자동화가 가능한 P.P. 병 톱밥배지를 이용하였으며, 또한 접종시스템이 경제적이기 위해서는 기존부터 사용해 오던 4×4배열의 병재배용 port(16 bottle)에 맞는 4구형 접종시스템이어야 한다.

1) 팽나무버섯 자동화시스템의 적합한 배지의 톱밥수종별 첨가제 혼합 수준에 따른 균사생장은 미강보다는 밀기울을 혼합 처리한 구에서 균사생장이 빨랐으며 균사밀도는 첨가제를 첨가하지 않은 단용구에 비하여 첨가제 혼합수준이 증가할수록 균사밀도는 양호하였으나 균사생장은 다소 지연되는 현상을 나타냈다. 톱밥수종별로 보면 미송톱밥이 포플라 톱밥이나 참나무 톱밥보다 균사생장 및 균사밀도가 높게 나타났다(표 9). 결과적으로 균사생장과 균사밀도를 고려해 본다면 미송톱밥에

미강이나 밀기울을 20% 처리하는 것이 가장 양호한 균사생육을 나타냈다. 본 실험에서는 미송톱밥에 미강을 20% 처리하여 향후 자실체 형성을 위한 배지로 사용하였다.

표 9. 팽나무버섯균의 톱밥수종별 및 첨가제에 따른 균사생장의 영향

Kinds of sawdust	Supplement	Ratios (%)	Mycelial growth (mm/20days)	Mycelial density
Oak		10	73	+
	rice bran	20	65	++
		30	66	+++
			10	71
	wheat bran	20	69	++
		30	61	+++
		10	80	+
Poplar	rice bran	20	76	++
		30	61	+++
			10	96
	wheat bran	20	71	++
		30	69	+++
			10	101
Pine	rice bran	20	95	++
		30	79	+++
			10	105
	wheat bran	20	96	++
		30	87	+++

Mycelial density : + ; low, ++ ; normal, +++ ; high.

2) 느타리버섯 느타리버섯(P-002)의 자동화시스템에 적합한 배지 선 발을 위해 Oak, Poplar 2종의 톱밥과 미강의 첨가량을 달리하여 실험한 결과, 1-medium(Poplar 80% + rice bran 20%)에서 균사 생육 및 자실체 수량이 높게 나타났다(그림 23, 그림 24). 향후 본 실험의 느타리버섯 자실체형성 실험할 때 P.P. 병의 배지는 포플라 톱밥에 미강을 20% 첨가 하여 사용하였다.

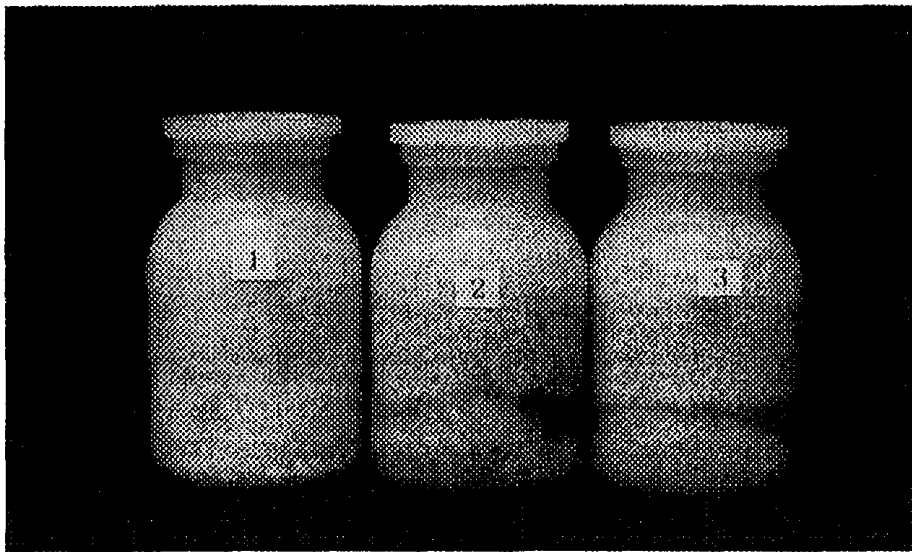


그림 23. 느타리균(원형느타리 2호)의 톱밥수종 량 및 첨가량에 따른 균사생장.

1-medium : Poplar(80%) + rice bran(20%), 2-medium : Poplar(60%) + Oak(20%) + rice bran(20%) and 3-medium : Poplar(40%) + Oak(40%) + rice bran(20%)

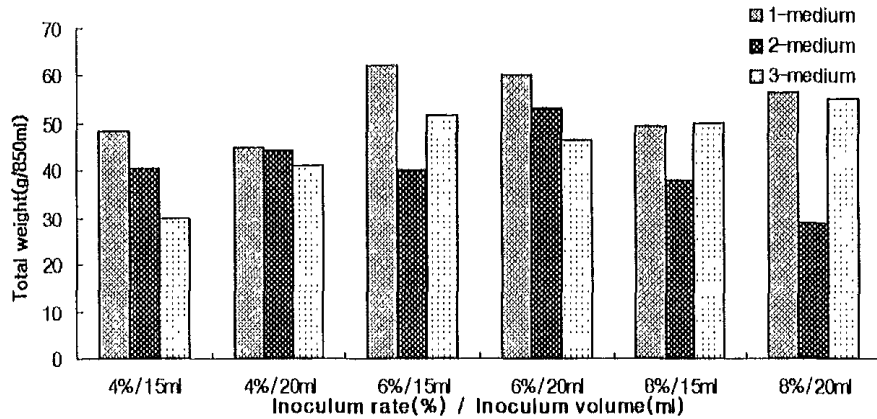


그림 24. 느타리균(원형느타리 2호)의 톱밥수종 량 및 첨가량에 따른 자실체 수량의 영향.

1-medium : Poplar(80%) + rice bran(20%), 2-medium : Poplar(60%) + Oak(20%) + rice bran(20%) and 3-medium : Poplar(40%) + Oak(40%) + rice bran(20%)

나. 자동접종시스템을 이용한 자실체 생산에서 접종량에 의한 영향

1) 느타리버섯 접종부피 2%~10%, 통기량 0.5vvm으로 4일간 대량배양을 실시하여 자동접종시스템의 액체종균으로 사용하였으며 분사량의 조절은 계산되어진 분사압과 분사시간을 적용하여 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml씩 접종하여 균사생장 및 자실체 형성을 조사하였다. 자동접종시스템에서 농기 2-1호(P-001)의 접종량에 의한 균사의 생장을 보면 접종부피 4%와 6%로 20ml를 접종하였을 때 톱밥배지에서 균사의 생장이 우수하게 나타났으며(그림 25), 자실체형성 실험에서는 농기 2-1호(P-001)와 원형느타리 2호(P-002) 두 개 공시균주 모두 접종부피 6%에서 15ml를 접종하였을 때 850ml P.P.병당 자실체 형성이 우수한 것으로 나타났다(그림 26, 그림 27). 위의 결과로 느타리버섯의 자동접종시스

템에 적용될 최적의 접종조건은 배양부피 4%~6%로 15ml~20ml를 접종하였을 때 최상의 균사생장 및 자실체 형성을 유도해 낼 수 있었다(그림 28).

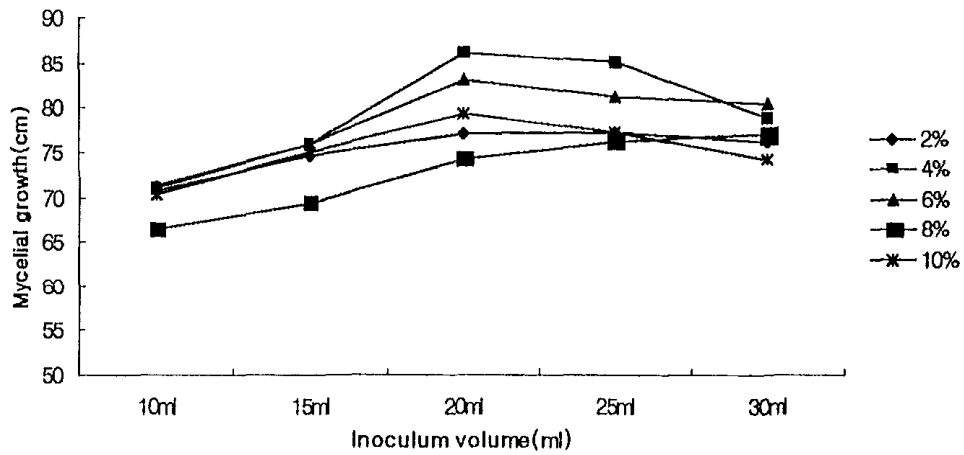


그림 25. 느타리버섯균(농기 2-1호)의 850cc병에서 접종량 및 배양부피에 따른 균사생장의 영향(접종 14일 후).

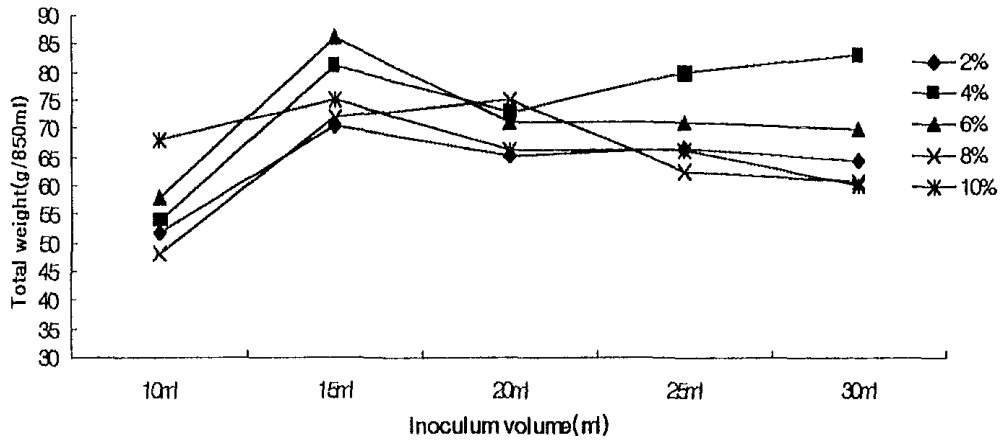


그림 26. 접종량 및 배양부피에 따른 느타리버섯균(농기 2-1호) 자실체 수량의 영향.

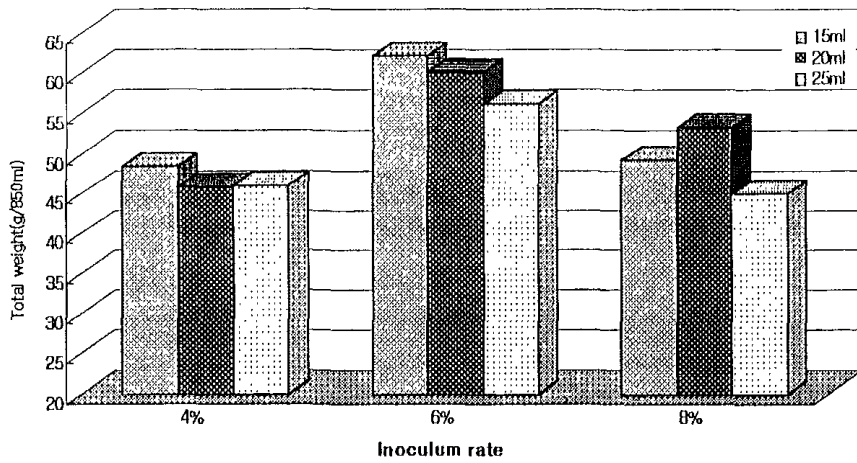


그림 27. 느타리버섯균(원형느타리 2호)의 배양부피에 따른 자실체 수량의 영향.



그림 28. 액체종균 자동접종시스템을 이용한 느타리버섯(농기 2-1호)의 자실체 형성.

나) 팽나무버섯 팽이 2호(F-002)를 접종부피 2%~10%, 통기량 0.5vvm으로 4일간 대량배양을 실시하여 자동접종시스템의 액체종균으로 사용하였으며 850ml P.P. 병에 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml로 자동접종장치를 통하여 접종한 결과 균사의 생장은 배양부피 4%~6%로 15ml를 접종하였을 때 톱밥배지에서 균사의 생장이 우수하였고(그림 29), 자실체 생산이 우수한 접종조건은 배양부피 6%로 10ml~15ml를 접종하였을 때 자실체 형성이 가장 우수하였다(그림 30). 위의 결과로 팽나무버섯의 자동접종시스템에 적용될 최적의 접종조건은 배양부피 4%~6%로 10ml~15ml를 접종하였을 때 최상의 군사생장 및 자실체 형성을 유도해 낼 수 있었다(표 10).

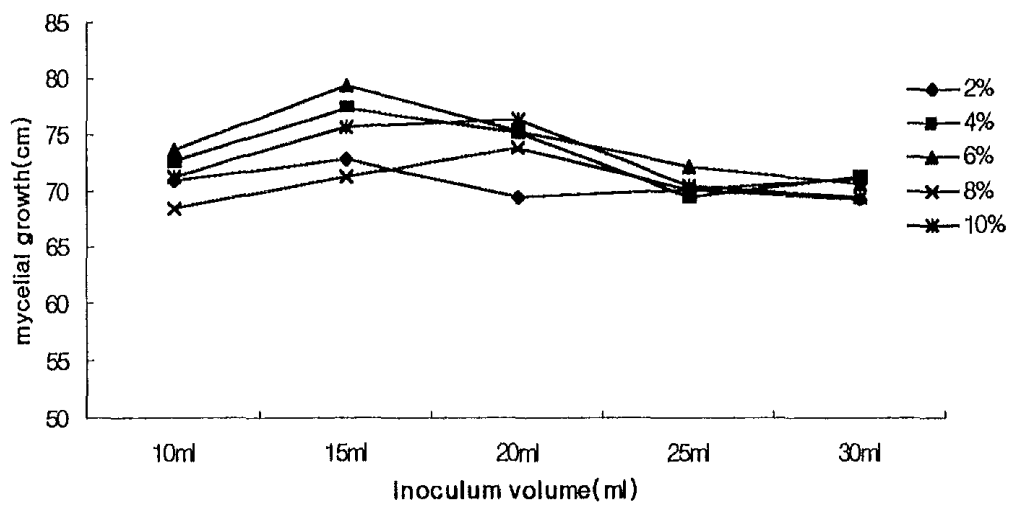


그림 29. 팽나무버섯균(팽이 2호)의 850cc병에서 접종량 및 배양부피에 따른 균사생장의 영향(접종 14일 후).

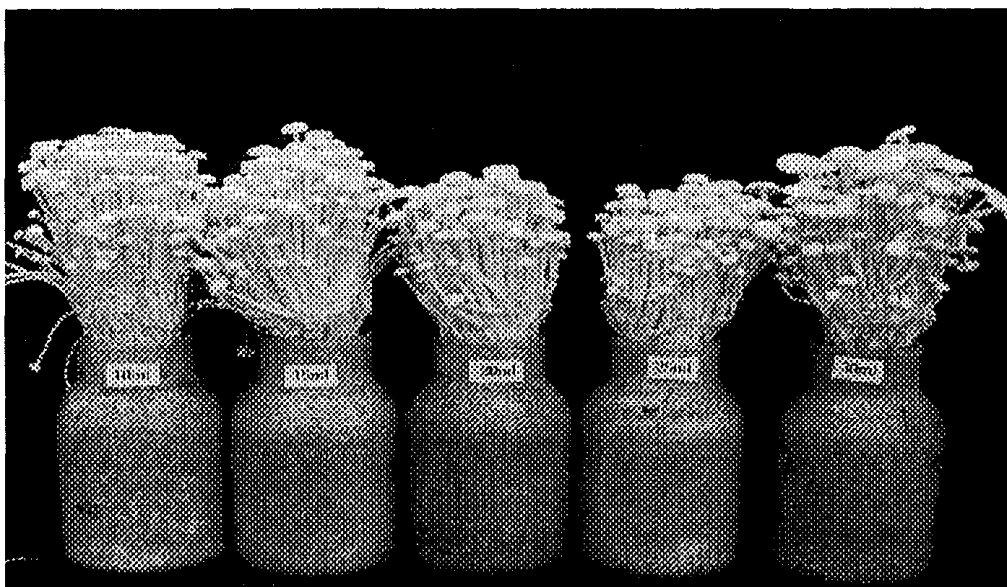


그림 30. 팽나무버섯의 접종량에 따른 자실체 형성.

표 10. 팽나무버섯의 접종량에 따른 자실체 수량의 영향

Quantity of Inoculum (mℓ/bottle)	Pileus (mm)		Stipes (mm)		Number (body)		Weight (g/850mℓ)	
10	15.1 ^a	13.7 ^b	121.5 ^a	108.2 ^b	158 ^a	180 ^b	159.13 ^a	161.15 ^b
15	14.2	14.7	108.1	126.4	173	183	159.27	177.0
20	13.1	13.7	118.2	108.1	157	205	110.38	145.54
25	12.2	14.7	117.2	114.2	143	109	113.58	93.69
30	13.1	12.2	118.1	107.1	176	178	131.03	122.19

a : Inoculum rate 4% b : Inoculum rate 6%

Pileus : Diameter of pileus, Stipes : Length of stipes, Number : Number of the fruit bodies formed(longer than 50mm) and Weight : weight of the fruit bodies formed in 850mℓP.P. bottle.

다. 느타리·팽나무버섯 생산을 위한 실증시험

농가에서 액체종균 자동접종시스템과 고체종균 접종시스템을 이용하여 각 공시균들을 접종하고 그림 1 에서와 같은 동일한 조건에서 재배하여 액체종균 자동접종시스템의 실효성에 대하여 실증 실험을 실시하였다. 고체종균의 접종량은 10g에서 15g 사이이며 액체종균의 접종은 느타리버섯은 배양부피 6% 접종량 15mℓ, 팽나무버섯은 배양부피 4% 접종량 10mℓ로 실증시험을 실시하였다. 우선 자실체 생산 비교 실증으로 팽나무버섯의 경우 고체종균을 이용하여 재배한 자실체 수량(1.92 kg/port)에 비해 액체종균 자동접종기를 이용하여 재배한 자실체 수량이 2.55 kg/port로 자실체 무게 수량 비교 32.8% 증수되었다(표 11). 또한 유효경수 및 경장이 고체종균 접종시스템보다 생장이 우수하여 경제성이 뛰어

난 것으로 확인되었다(그림 31, 32).

노타리버섯(농기 2-1호)은 고체종균 자동접종기를 이용한 자실체 수량 (0.74 kg/port)에 비해 액체종균 자동접종기로 재배한 자실체 수량이 0.99 kg/port로 자실체 무게 수량 비교 33.7% 증수되었다(표 12). 수량 조사 뿐만 아니라 작업성능의 평가를 위해 접종시간 및 오동작횟수를 조사해보았다. 고체종균을 이용한 접종기의 경우는 접종시 수시로 고체종균을 교체해야 하며, 또한 교체시간도 오래 걸리고 이런 이유로 잡균에 의한 오염이 발생 할 수도 있게된다. 하지만 액체종균 자동접종시스템은 배양기의 scale에 따라 종균 교체시기를 조절할 수가 있고, 교체시간도 수초이내에 가능하기 때문에 종균교체에 따른 오염율이 적고 작업시간(접종시간)도 단축할 수 가 있다. 고체종균을 이용한 접종장치의 경우 1000병에서 1200병을 접종하려면 4~6번 정도 종균을 교체해 주어야 하며 접종시간도 30~40분이 소요된다. 이에 반해 본 연구에서 제작한 12L 배양기는 팽나무버섯균을 접종할 경우(접종량 10ml) 배양기 한 개로 1000병(4×4배열의 병재배용 port로 62port) 에서 1200병(4×4배열의 병재배용 port로 75port)을 접종할 수가 있었으며, 접종시간은 21분에서 26분이 소요되었다. 또한 분사가 안 되는 경우, 병의 뚜껑을 제대로 열고 닫지 못하는 경우 등의 오동작은 발생하지가 않았다.

표 11. 팽나무버섯의 접종시스템에 따른 자실체 수량 비교

Inoculation system	Pileus (mm)	Stipes(mm)	Number(body)	Weight (kg/port)
Liquid spawn	13.1	121.5	168	2.55
Traditional sawdust spawn	10.8	116.0	159	1.92

Sawdust spawn (Quantity of Inoculum: 10 - 15g/bottle)

Liquid spawn (Inoculum volume: 10ml, Inoculum rate : 4%)

Pileus : Diameter of pileus. Stipes : Length of stipes. Number : Number of the fruit bodies formed (longer than 50mm) Weight : weight of the fruit bodies formed in 4×4 bottle port.

표 12. 느타리버섯(농기 2-1호)의 접종시스템에 따른 자실체 수량비교

Inoculation system	Pileus (mm)	Stipes(mm)	Number(body)	Weight (kg/port)
Liquid spawn	42.7	31.2	19	0.99
Traditional sawdust spawn	38.5	32.6	21	0.74

Sawdust spawn (Quantity of Inoculum: 10 - 15g/bottle)

Liquid spawn (Inoculum volume: 15ml, Inoculum rate : 6%)

Pileus : Diameter of pileus. Stipes : Length of stipes. Number : Number of the fruit bodies formed. Weight : weight of the fruit bodies formed in 4×4 bottle port.



그림 31. 팽나무버섯의 접종시스템에 따른 초기 자실체 발이모습.

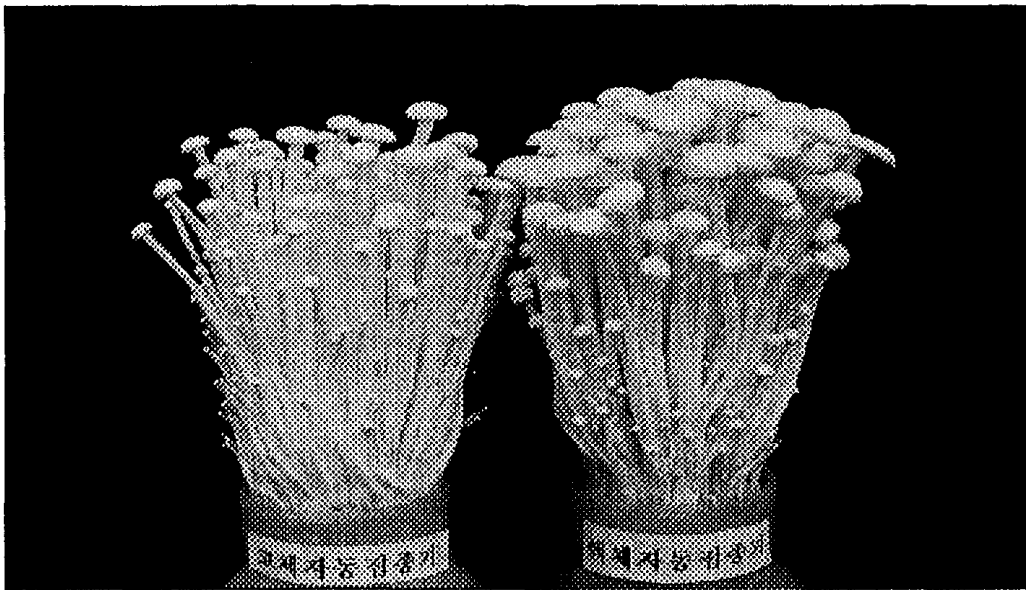


그림 32. 팽나무버섯의 접종시스템에 따른 자실체 형성 비교.

left: traditional sawdust spawn and right: liquid inoculation system

6. 액체배양에 문제되는 환경조사 및 문제점 점검

버섯의 생산과정에서 가장 큰 어려움은 외부로부터 유입되는 여러 유해 미생물의 오염과 이에 따른 병 발생이다. 톱밥종균의 경우 사용할 때 파쇄접종으로 노동력이 가중되며 오염의 위험이 높은 점 등 문제점의 개선이 요구되어 액체배양을 통한 액체종균의 사용이 시도되고 있다. 하지만 액체종균의 균사체는 액상의 배양단계에서 고체배지로의 전환과정이 필요하므로 이때 고체종균에 비해 건조에 대하여 쉽게 활력이 떨어지는 단점이 관찰되므로 균사배양시 습도유지가 필수적이다. 또한 배지표면이 종균으로 피복 되지 않고 그대로 노출되기 때문에 배양초기에는 감염하는 잡균과 동일선상에서 경쟁이 시작된다. 그러므로 균사가 배지표면에 활착 이전까지 잡균에 감염되지 않도록 하여야 하며 접종 후 균사배양과정에서 오염원을 최대한 차단함과 동시에 균사배양기간을 최대한 단축하여 오염으로 인한 실패를 최소화하여야 할 것이다. 이로 인한 배양실의 청결하게 하는 것이 필수적이라 할 수 있다.

액체종균은 원하고자 하는 버섯균이 쉽게 이용할 수 있는 배지에서 선택적으로 배양하는 과정으로 버섯균보다 증식속도나 전파력이 강한 잡균과의 경쟁에서 매우 약하므로 액체배지의 살균과 접종과정에서 무균화가 요구된다. 또한 액체종균의 제조과정 중에는 외부에 종균이 순간적으로 노출되고 배양과정에서는 통기로 인한 공기가 공급되므로 톱밥종균에 비해 제균 과정 확보가 어렵다.

액체종균의 사용 전 잡균에 대한 선별은 톱밥종균에 비해 액체종균 자체의 색깔이나 탁도 등에 의해 육안선별이 가능하지만 저밀도의 세균에 의한 감염이나 액체종균 자체의 활력검정이 쉽지 않고 특히 식용버섯균류는 고체상의 배양환경에서 보다 액체상의 생육환경에서 분절포자나 후막포자와 같은 무성생식과 핵의 단핵화가 발생할 확률이 높아짐으로

주의를 요구한다. 현재 버섯의 재배에 이용되고 있는 재배시설 및 각각의 환경조절 방법이 매우 다양함으로 액체배양에서도 각각의 재배시설에 맞게 배양방법의 다양화가 이루어져야한다. 또한 자동화 접종장치에 더 적합한 재배시설의 표준화가 이루어져야 할 것이다.

제4절 적요 및 고찰

느타리(농기 2-1호, 원형느타리 2호) 및 팽나무버섯(팽이 2호)의 배양적 특성과 자동접종장치를 이용한 자실체 생산에 관한 환경조건에 대하여 조사하였다.

팽나무버섯의 군사생육에 적합한 배지로는 Czapek배지, BM배지, MCM배지로 조사되었으며, 느타리버섯의 경우는 PDA배지, BM배지, SDAY배지에서 높은 생장을 확인할 수가 있었다. 위의 결과로 공시균주들의 기본배지로 BM배지를 선발하여 사용하였다. 생리적 특성조사로 팽나무버섯의 경우 군사생육에 적합한 온도는 20℃, 최적 pH는 6.0~7.5이고 영양원 선발로 탄소원은 polysaccharide인 yellow sugar와 potato starch, 질소원은 soybean flour, Yeast extract에서 생장이 우수하게 나타났으며, 무기염류로는 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0.05%(w/v)씩 첨가한 배지에서 조금 우수한 생장을 나타냈다.

느타리 및 팽나무버섯의 군사체 생육에 미치는 생리적 특성조사로 팽나무버섯의 경우 군사생육에 적합한 온도는 20℃, 최적 pH는 6.0~7.5이고, 느타리버섯의 생육최적온도는 농기 2-1호(P-001)는 30℃, 원형느타리 2호(P-002)는 25℃, pH는 두 개 공시균 모두 pH 6.0~7.0에서 군사생육이 우수하였다. Go *et al.*, (1984)은 여름느타리버섯과 느타리버섯의 군사생장 적온은 25~30℃이며 배지의 최적 pH는 5~6이고, Hong *et*

al., (1983)은 느타리버섯에서 균사생육 적온은 25℃, 자실체형성 적온은 20℃, pH는 6.0일 때 균사생육과 자실체 형성이 우수하다고 보고하였고, *Sung et al.*, (1999)은 균사생육적온은 30℃, 최적 pH는 6.5이라고 하여 본 실험과 일치하는 경향이였다.

느타리 및 팽나무버섯균의 삼각플라스크 배양의 환경조건 조사에서 팽나무버섯 및 느타리버섯 두개 균 모두 균사절편 3개에서 5개 절편을 접종하는 것이 삼각플라스크 배양에 적당한 것으로 나타났다. 또한 균사의 형태가 pellet형태로 생장이 되었고 팽나무버섯이 느타리버섯보다 균체량이 높게 나타났다. 배양액량 및 삼각플라스크의 종류에 따른 균사의 생육조사 결과, 공시균주 모두 용기부피 250ml의 Erlenmeyer flask와 Shake flask의 배양액 100ml(용기대 배양액량의 부피비 40%)에서 생육이 우수하게 나타났다. 플라스크의 형태에 따른 공시균주의 생육 결과를 보면 Shake flask가 Erlenmeyer flask보다 건조 균체량이 높게 나타났다. 배양기간에 따른 균사 생육조사 느타리 및 팽나무버섯균의 삼각플라스크 액체배양시 250ml의 진탕배양용 삼각플라스크(Shake flask)에 배양액량을 100ml로 균사절편(직경 5mm) 5개를 접종하여 6일에서 7일간 배양하여 대량배양의 전 배양으로 사용하였다. *Sung et al.*, (1999)은 느타리버섯의 삼각플라스크 배양에서 접종량의 증가와 건조 균체량의 증가가 비례하지 않음을 관찰하였고, 배양액량이 100ml의 shake flask에서 건조 균사체의 생산이 가장 우수하다고 하였고, *Ryu et al.*, (1998)은 팽나무버섯 액체배양시 접종 후 6-7일경에 모든 액체 배지에서 균총수가 최대치에 달했다고 하여 본 실험과 동일한 결과를 확인 할 수 가 있었다.

본 연구에 사용될 배양장치는 자동접종기의 자동화 시스템에 적용할 수 있으며, 또한 미생물반응기로서 공시균들의 배양학적 특성에 맞는 발효조(fermenter)로 제작되었으며 배양용기의 소재로는 자동접종기의

액체종균 분출을 위하여 배양기내로 주입되는 높은 공기압과 살균시의 고온·고압에 견딜 수 있는 스테인레스를 선발하였으며, 배양용기의 형태로는 액체종균 자동접종시스템에 적합한 기포탑형 발효조(airlift fermenter)를 선택하였으며 폭 대 높이의 비(W/H)가 1:4인 12ℓ 짜리 steel airlift fermenter 제작하여 각 공시균주의 대량배양에 이용하였다. 문(1997)은 느타리균의 액체종균 배양장치의 용기로 경화유리로 제작한 8L 유리병을 배양용기로 선발하였으며 배양라인은 통기라인, 배기라인, 접종라인과 배출라인 등 4개의 연결라인이 필요하다고 하였다.

본 연구에서는 배양라인은 접종원의 접종관과 압축공기의 통기관을 겸하는 라인, 그리고 배기라인 최소 2개 라인이 필요로 하다. 자동접종장치에 연결하기 위해서는 압축공기를 공급하는 air line과 액체종균을 접종노즐로 연결하는 spawn line이 있어야만 한다. 두 가지 모두에 적용할 수 있는 라인은 배양시 접종관과 통기관을 자동접종장치기에 연결시 spawn line으로 사용하여 연결하고, 배양시 배기라인을 자동접종장치에 연결시 air line으로 연결하여 배양라인을 제작하였다. 각 라인은 고온, 고압에 견디어 낼 수 있는 air hose로 제작하였고 연결부는 Quick connect를 사용하여 자동접종장치에 부착이 되어 있는 air hose에 연결이 쉽게 하였다. air line은 8mm air hose를 spawn line은 12mm air hose를 선발하여 사용하였다. 배양장치에서 배양시 외부와의 공기 접촉을 차단하기 위해 각 라인 끝에는 필터를 설치하였다.

액체종균 자동접종기의 분사압과 분사시간에 따른 분사량을 확인하여 느타리 및 팽나무버섯균의 희망 분사량에 따른 분사압과 분사시간을 결정할 수가 있었다. 또한 분사량에 따른 균체량을 조사한 결과 분사량 증가에 따라 균체량도 일정하게 증가하는 것을 확인할 수가 있었다.

자동접종기의 자동화 시스템에 적합한 대량 액체종균 배양조건으로 대량배양시 접종부피에 따른 영향을 알아본 결과 팽나무버섯은 접종부피

5%와 6% 일 때 균사체 생산이 가장 우수하게 나타났다. 느타리버섯 (P-001)의 경우는 접종부피 4% 일 때 균체량이 우수하게 나타났는데 접종부피 4% 이상에서 더 이상의 균체량 증가는 나타나지 않았다. 통기량 조사에서는 느타리 및 팽나무버섯균 모두 1vvm에서 건조 균사체 생산이 높게 나타났다. 액체종균 대량배양시 배양일수에 따른 영향을 보게 되면 느타리버섯(P-001)은 배양 5일 이후부터는 균체량의 증가가 크게 나타나지 않았고, 팽나무버섯(F-002)은 배양 4일 만에 stationary phase에 도달됨을 확인할 수 있었다. Jeong(1996)은 느타리버섯의 액체 배양시 균사체 생산은 5~10%(v/v)정도의 접종비와 27.5~30℃ 정도의 범위에서 최적의 균사체 생산을 나타내었다고 하여 본 실험과 유사한 경향을 보였다.

액체종균 자동접종기를 이용한 자실체 형성에서 접종방법에 대한 적합한 형태는 4×4배열의 병재배용 port(16 bottle)를 사용하였으며 팽나무버섯의 자동화시스템에 적합한 배지는 미송톱밥에 미강이나 밀기울을 20% 처리하는 것이 가장 양호한 군사생육을 나타냈다. Chang(1976)은 팽나무버섯의 톱밥재배에서 포플라톱밥 10에 미강을 3을 혼합한 배지에서 자실체 수량이 높았다고 하였고 Park *et al.*, (1978)은 포플라 톱밥 60%와 미강 40%로 혼합한 배지를 수분 70%로 충전 한 후 가비중 0.25g/cc로 입병 하였을 때 다수확 되었다는 보고와 본 실험과는 배지의 톱밥수종에 차이가 있었으며, 첨가제로 미강의 첨가는 본 실험과 일치하는 경향을 나타내었다. 박 등(1998)은 팽나무버섯 재배에서 미강을 40% 첨가하면 수량이 가장 높다고 보고하였는데 본 실험에서는 미강을 20% 첨가할 때 수량이 높게 나타났다. 또한 느타리버섯(P-002)의 자동화시스템에 적합한 배지는 포플라 톱밥에 미강을 20% 첨가하여 P.P병에 충전하여 사용하였을 때 자실체 수량이 가장 높게 나타났다. Park *et al.*, (1988)은 배지의 종류가 느타리버섯 자실체의 alkali 가용성단백질

과 핵산함량에 미치는 영향을 조사한 결과 톱밥배지에서 재배한 것이 함량이 가장 많았다고 하여 본 실험에서처럼 톱밥을 이용한 병재배가 느타리버섯에서 유용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Chang *et al.*, (1996)은 톱밥배지에서 느타리버섯 균사 성장할 때 생산되는 extracellular enzyme 중 protease, phenoloxidase, cellulase가 참나무 톱밥에 비해 포플라 톱밥에서 그리고 밀기울에 비해 미강에서 specific activity가 높은 경향이었다고 보고하였고, 開本(1972)과 Jhune *et al.*, (2000)에 의하면 미강을 20% 혼합하는 것이 수량이 높으며, 그 이상은 잡균의 피해가 크다고 하여 본 실험과 유사한 경향을 보여주었다.

자동접종시스템을 이용한 자실체 생산에서 느타리의 최적의 접종조건은 배양부피 4%~6%로 20ml를 접종하였을 때 최상의 균사생장을 배양부피 6%로 15ml를 접종하였을 때 850ml P.P.병당 자실체 형성이 우수한 것으로 나타났다. 팽나무버섯은 균사의 생장은 배양부피 4%~6%로 15ml를 접종하였을 때 톱밥배지에서 균사의 생장이 우수하였고, 자실체 생산이 우수한 접종조건은 배양부피 6%로 10ml~15ml를 접종하였을 때 자실체 형성이 가장 우수하였다. 정(1999)은 팽나무버섯의 액체종균의 적정 접종량을 10ml/850ml으로 제시하였는데 본 실험과 유사한 결과를 확인할 수가 있었다.

농가 실증시험으로 자실체 생산 비교 팽나무버섯의 경우 고체종균을 이용하여 재배한 자실체 수량(1.92 kg/port)에 비해 액체종균 자동접종기를 이용하여 재배한 자실체 수량이 2.55 kg/port로 자실체 무게 수량 비교 32.8% 증수되었다. 또한 유효경수 및 경장이 고체종균 접종시스템보다 생장이 우수하여 경제성이 뛰어난 것으로 확인되었다.

느타리버섯(농기 2-1호)은 고체종균 자동접종기를 이용한 자실체 수량(0.74 kg/port)에 비해 액체종균 자동접종기로 재배한 자실체 수량이

0.99 kg/port로 자실체 무게 수량 비교 33.7% 증수되었다. Ryu *et al.*, (1998)은 미강 추출액 액체종균으로 접종했을 때 톱밥종균에 비해 배양일수와 소요일수는 비슷하였고, 수량성은 3%(배지수분 55%, 15ml 접종)에서 38%(배지수분 55%, 5ml1 접종)까지 증가하였다고 보고하여 접종량이 50ml에서 자실체 수량이 높다고 보고하였는데 본 실험에서는 접종량 20ml 이상에서는 자실체 수량의 증가를 확인할 수 가 없었다.

제 5 장. 참 고 문 헌

Aschan, K. 1954. The production of fruit bodies in *Collybia velutipes*. Influence of different culture conditions. *Physiol. Plant.* 7: 571-591.

Ahn, J. h. 1992. Studies on the mycelial growth and the mass production of sporophores in *Flammulina velutipes*. Korea univ.

Azuma, T., Harada, A., Kim, D. Y., Sakuma, Y., Kojima, Y. and Miura, K. 1996. Isolation of a gene specifically expressed during fruiting body differentiation in *Flammulina velutipes*. *Mokuzai gakkaiishi.* 42(7): 688-692.

Block, S. S., Tsao, G. and Han, L. 1958. Production of mushrooms from sawdust. *J. Agric. Food. Chem.* 6: 923-927.

Byun, T. G. 1999. Selection of excellent strain for the mushroom flavor production in submerged cultures of mushroom mycelium. *건양 논총.* 1999(7): 263-270.

Byun, T. G. 2000. Effects of Bioreactor Type on 1-octen-3-ol Production in the Cultures of *Agaricus bisporus* 705 Mycelia. *건양 논총.* 2000(8): 127-133.

Chang, H. G. 1976. Influence of nutritional supplementation to the substrate on vegetative and reproductive growth of winter mushroom, *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. and chemical changes of the substrates produced during growth of the fungus. *Kor. J. Mycol.* 4(1): 31-44.

Chang, H. Y., Kim, G. P. and Cha, D. Y. 1996. Changes in activities of protease, phenoloxidase and cellulase during mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* in sawdust cultures. *Kor. J. Mycol.* 24(2): 149-154.

Cho, S. S. and Ha, T. M. 1998. Study on development of *Pleurotus ostreatus* cultural practice with Jobs tears straw and Membrancueus bunge straw. *J. Indus. Crop Sci.* 40(2): 47-51.

Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. *CRC press.*: 41-91.

Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. *CRC press.*: 120.

Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. *CRC Press Inc.* : 255-263.

Doran, P. M. 1995. Chapter 13 Reactor Engineering. In *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press. U.S.A.

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

Fraser, I. M. and Fujikawa, B. S. 1958. The growth promoting effects of several amino acids on the common cultivated mushroom, *A. bisporus*. *Mycologia*. 50: 538-549.

Garraway, M. O. and Evans, R. C. 1984. Nutrition as a basis for the study of fungi. Fungal nutrition and physiology, John Wiley and Sons Inc. U.S.A. 1-21, 71-221.

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

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.

Hader, 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.

Hammond, J. B. W. 1986. Carbon and mushroom growth. *The Mushroom J.* 165: 316-321.

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

Hong, J. S. and Kang, K. H. 1983. Fruit-body formation of *Pleurotus florida* on the synthetic medium. *Kor. J. Mycol.* 11(3): 121-128.

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.

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.

Hong, J. S., Lee, K. S. and Choi, D. S. 1981. On the mycelial growth of *Agaricus bitorquis* and *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 9(1): 19-24.

Hong, J. S. and Yoon, S. 1981. Fruit-body formation of *Flammulina velutipes* on the synthetic medium. *Kor. J. Food sci. Technol.* 13(3): 233-240.

Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium(*Agaricus compestris*) in submerged culture. *Science.* 107:373

Humfeld, H. and Sugihara, T. F. 1952. The nutrient requirements of *Agaricus campestris* grown in submerged culture. *Mycologia*. 8: 63.

Itavaara, M. 1987. Comparison of three methods to produce liquid spawn for commercial cultivation of shiitake. *Mushroom Sci.* 12(2): 309-315.

Ivanovich, B. B. 1965. *Mushroom Sci.* 6: 91.

Jeong, J. H. 1996. Optimization of Mycelia production from *Pleurotus ostreatus* by response surface methodology. 忠北農業大學校 論文集. 31(2): 601-614.

Jhune, C. S., Kim, G. P. and Shin, C. W. 2000. Effect of rice bran added at spawn-making on the cultivation of Oyster mushroom, *Pleurotus* spp. *Kor. J. Mycol.* 28(1): 1-5.

Jo, W. S., Yun, Y. S., Park, S. D. and Choi, B. S. 1995. Development of cheap substrate for fruiting of *Pleurotus ostreatus* using Paper sludge. *Kor. J. Mycol.* 23(3): 197-201.

Jong, C. C. 1997. Development of the Cheap Medium for Bottle Cultivation of *Flammulina velutipes*. 충북대학교 석사학위논문.

Kang, T. S. and Chun, B. I. 1988. Studies on the production of liquid spawn of *Pleurotus ostreatus*. The Institute of Industrial Technology Kangwon national university. 8: 13-21.

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.

Kiies, u. and Liu, Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 54 : 141-152.

Kim, D. Y. and Azuma, T. N. 1999. Cloning of a gene specifically expressed during early stage of fruiting body formation in *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Mycol.* 27(3): 187-190.

Kim, M. K. 1983. Fruit-body formation of *Flammulina velutipes* on the synthetic medium. 전북대학교 석사학위논문.

Kinugawa, K. 1993. Physiology and the breeding of *Flammulina velutipes*. Genetics and Breeding of edible Mushrooms. Chapter 5: 87-109.

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.

Kitamoto, Y. 1972. Mechanism of fruiting. *Mushrooms*(Tokyo). 4: 9-18.

Lee, H. Y., Shin, C. Y., Lee, Y. K., Chang, H. H. and Min, B. H. 1999. A short composting method by the single phase composter for the production of Oyster mushroom. *Kor. J. Mycol.* 27(1): 10-14.

Lee, S. S. 1991. The role of the rice bran employed in the traditional spawn sawdust medium. *Kor. J. Mycol.* 19: 47-53.

Lee, S. S., Kim, S. K., Lee, T. S. and Lee, M. W. 1997. Cultivation of Oyster mushrooms using the garlic peel as an agricultural by-product. *Kor. J. Mycol.* 25(4): 268-275.

Lee, T. S. 1990. The Full List of Recorded Mushrooms in Korea. *Kor. J. Mycol.* 18(4) : 239-259.

Lee, U. K., song, M. Y., Cho, D. J., Shin, W. K., Moon, B. J. and Bae, T. W. 1996. Temporal change of media microflora on the artificial cultivation of Enoki mushroom *Flammulina velutipes* by using sawdust. *Res. Bull. Inst. Agr. Reso. Dong-A Univ.* 5(1): 55-64.

Litchfield, J. H., Overback, R. C. and Davidson, R. S. 1963. Factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *Agricultural and Food Chemistry.* 11: 158-162.

Medeiros, M. B., Bento, A. V., Nunes, A. L. L. and Oliveira, s. c. 1999. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. *Bioprocess Engineering.*

21:483-487.

Morimoto, H. 1928. Nametake to shiitake no ogakuzu baiyoho(culture method of nametake and shiitake with sawdust). Sanrin(Tokyo). 551: 15-18.

Park, J. S. and Kim, S. Y. 1988. Effects of the cultivation media and growth stages on chemical components of the fruit bodies in Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Res. Rept. Rda.* 30(2): 38-46.

Park, Y. H., Chang, H. G., Go, S. J. and Cha, D. Y. 1978. Studies on the cultivation of winter mushroom *Flammulina velutipes* (Curl, ex Fr.) Sing. *농시연보.* 20: 129-134

Park, Y. H., Chang, H. G. and Ko, S. J. 1977. The effects of the quantities of the rice straw substrates and spawn on the yield of Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 5(1): 1-5.

Paul stamets. 1993. Growing Gourmet and Medicinal Mushroom. Ten speed press. 146-150.

Plunkett, B. E. 1953. Nutritional and other aspects of fruit bodies production on pure culture of *Collybia velutipes*(Crut.) Fr. *Ann. Bot(London)* 17: 193-212.

Raaska, L. 1989. The effect of homogenization on the growth of

commercially produced Shiitake(*Lentinus edodes*) spawn. *Mushroom Sci.* 12(2): 327-335.

Ryu, Y. H., Yoon, Y. S., Jo, W.S., Park, S. D., Choi, B. S. and Kim, J. K. 1998. Effect of Liquid spawn on *Flammulina velutipes* Cultivation. *Kor. J. Mycol.* 26(1) : 20-24.

Sakamoto, R., Niimi, T. and Takahashi, S. 1978. Effect of carbon and nitrogen sources on submerged culture of edible fungi. *Agri. Chem. Sci. Japan.* 52: 75.

Shiio, T., Okunishi, M. and Okumura, S. 1974. Fundamental studies on the large-scale cultivation of edible fungi. *Mushroom Sci.* 9(1) : 799-808.

Singer, R. 1986. The agaricales in modern Taxonomy. Koeltz scientific books. Federal Republic of Germany. : 981.

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.

Song, C. H., Cho, K. Y., Nair, N. G. and Vine, J. 1989. Growth stimulation and liquid synthesis in *Lentinus edodes*. *Mycologia.* 81: 514-522.

Song, C. H., Kim, J. H., Yang, B. K. and Kim, K. W. 1996. studies on the anti-complementary polysaccharides produced from submerged mycelial culture of *Pleurotus sajor-caju*. *Kor. J. Mycol.* 24(2): 104-110.

Song, C. H., Lee, C. H., Ahn, J. H., Hong, B. S. and Yang, H. C. 1995. Standardization of chemically defined medium for the production of mycelium and basidiocarps in the *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Mycol.* 23(1): 53-60.

Song, C. H., Lee, C. H., Huh, T. L., Ahn, J. H. and Yang, H. C. 1993. Development of substrates for the production of basidiocarps of *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Mycol.* 21(3): 212-216.

Sung, J. M., Moon, H. W. and Park, D. S. 1999. Growth condition of liquid culture by *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 27(1): 1-9.

Tonomura, H., Chang, S. T. and Hayes, W. A. (1978). *Flammulina velutipes* 19. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press. (London): 409-421.

Torev, A. 1968. Submerged culture of higher fungi mycelium on industrial scale. *Mushroom Sci.* 7: 585-593

Yang, Q. Y. and Jong, S. C. 1989. A quick and efficient method of making mushroom spawn. *Mushroom Sci.* 12(1): 317-324.

Yoshida, T., Taguchi, H. and Teramoto, S. 1965. Studies on submerged culture of basidiomycetes. 1. Some factors affecting the growth of Shiitake(*Lentinus edodes*). *J. Ferment. Technol.* 43: 325-334.

Yun, J. K. 1969. Studies on the artificial culture of *Collybia velutipes* (Curtex Fr.) Quel. in the sawdust media. Thesis collection of Chung Buk College. 3: 161-171.

Yun, J. K. 1996. The cultural characteristics of the Fruit body formation by two selected strains of winter mushroom(*Flammulina velutipes*) collected from Korea. *Jor. Korean For. Soc.* 85(2): 225-237

Yun, Y. S., Young, H. R., Park, S. D. and Choi, B. S. 1996. Effects of the Quantities of Substrate on the Yield of Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 24(2) : 89-92.

Zadrazil, F. 1972. The biology and cultivation of edible mushroom. Academic press Inc. P.526-527.

Zadrazil, F. 1974. The ecology on industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*. *Mushroom Sci.* 9(1) : 621-652.

김한경. 1998. 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*)의 재배적 특성과 흰곰팡이병의 병원학 및 방제. 동아대학교 박사학위논문.

김홍기. 공재열. 1993. 4-1 공업생산의 배지, 5장 발효조. 微生物工學(基礎와 應用). 圖書出版 東和技術. 서울.

권장호. 2001. Study on the development of a liquid spawn inoculation system for edible mushroom. 강원대학교 농업기계공학과 석사학위논문.

박동수. 1998. 원형느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 액체종균의 배양적 특성 및 인공재배에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문.

박명호. 1992. CWM슬러리의 선회류이류체미립화. 강원대학교 대학원 석사 학위청구논문, 강원대학교.

박용환, 장학길, 고승주, 차동열. 1998. 팽이버섯 병재배에 관한 연구. 농사시험연구논문집(농업기술편). 129-134.

성내경. 1991. PC/SAS해설-제4권 SAS/STAT 분산분석, 자유아카데미.

성재모. 1996. 버섯 경쟁력 제고 방안 세미나. 강원도.

이강영. 1999. 액체종균을 이용한 팽이버섯의 대량생산. 버섯. 3(2): 217-223.

이상선. 1991. 전통적인 버섯 배지에서 사용되는 미강의 역할. 한국균학회지. 19(1): 47-53.

유 정, 이공준, 정기태, 나종성. 1994. 느타리버섯의 배지별 Amino acid함량변화에 관한 연구. 한국균학회지. 22(4): 338-342.

유재복. 1990. 증보 실용 버섯재배. 선진문화사. 102.

장현유. 1998. 버섯. 1(1): 24-31.

정기태, 김규태, 최정식, 홍재식, 김금재. 1996. 통닭튀김 산패유를 이용한 버섯균사체의 생산. 한국균학회지. 24(4): 305-309.

정종천. 1997. Development of the Cheap Medium for Bottle Cultivation of *Flammulina velutipes*. 충북대학교 석사학위 논문.

정종천. 1999. 팽이버섯 액체종균 제조와 재배기술. 버섯. 3(2) : 159-178.

정환채, 김영배, 박용환. 1973. 느타리버섯 재배에 관한 시험. 시험연구보고. 농업기술연구소(생물부) 211-238.

지정현. 1999. 느타리 상자 재배(버섯 배지 입상·접종기 개발 및 이용에 관한 연구). 버섯. 3(1): 61-69.

조우식, 운영석, 유영현, 박선도, 최부술. 1996. 사과 가공부산물 첨가 배지가 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)의 균사생장과 자실체에 미치는 영향. 한국균학회지, 24(3): 223-227.

차동열. 1995. 병버섯 첨단재배현황과 발전방향. 「병버섯 첨단재배기술 및 시설현대화 방안에 관한 심포지움」. 경상남도농촌진흥원. pp.17~31.

北本 豊. 1991. エノキタケの生産技術.(きのこの 基礎科學と 最新技術). 豊村文化史. : 221-229.

外村弘二. 1970. ヒラゲケ びん栽培のポイソト 日本きのこ. 5(6): 43-46

開本三千男. 1972. ヒラゲケの相談(人工シメジ) 農業圖書株式會社. 126-136.

杉森恒武, 大山義部, 大道妙子. 1971. 醱酵工學雜誌. 49: 435.