

최 중
연구보고서

톱밥발효배지에 의한 표고버섯 재배

Composting of Sawdust Substrate for Growing
Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*)

연구기관

한국배지주식회사

단국대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “툰밥 배지 발효에 의한 표고버섯 재배” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 12월 일

주관연구기관명: 한국배지 주식회사

총괄연구책임자: 심 문 수

세부책임자: 권 혁 구

협동연구기관명: 단국대학교

협동연구책임자: 김 재 현

요 약 문

I. 제 목

톱밥 배지 발효에 의한 표고버섯 재배

II. 연구개발의 목적 및 중요성

표고버섯은 오래 전부터 식품과 의약품으로 이용되어 왔다. 그러나 최근까지 원목재배와 같은 원시적인 재배에 의존하고 있다. 그 대안으로 고압살균에 의한 무균적인 봉지재배 방법이 개발되었다. 그러나 고압살균에 의한 무균조작 방법은 양송이 버섯재배와 같은 대규모 시설로 전환되기 위해서는 장비와 배지제조과정이 적합하지 못하면 무균조작에 따른 시설 비용이 많이 소요되는 단점이 있어 우리나라에서는 아직 널리 보급되지 않고 있다.

그러므로 표고버섯을 대규모배양을 위해서는 배지를 발효하는 것이 필요하다. 현재 세계적으로 톱밥 배지를 발효하여 표고버섯을 재배하는 기술은 개발되어 있지 않다. 표고버섯 발효배지에 대한 연구가 전무한 실정이기 때문에 배지 재료의 선정과 발효조건 그리고 시간등 다양한 기초연구가 이루어 져야 할 것이다. 이에 따라 이 연구에서는 배지를 발효하여 표고버섯 균사를 성장시키고 그 자실체를 얻는데 목적이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 톱밥을 발효하여 표고버섯을 재배하고자 하는 것으로 발효과정에서의 미생물의 분포와 발효 시간에 따른 미생물의 천이를 조사한다. 온도와 pH는 미생물 성장에 미치는 중요한 요인으로 작용을 하므로 온도와 pH를 인위적으로 변화시켜 미생물의 변화를 비교 조사한다. 이러한 자료를 바탕으로 발효에 미치는 중요한 요인을 찾아내어 참나무 톱밥을 이용한 발효 조건의 기초 자료로 이용한다.

버섯 배지의 발효에 관여하는 미생물은 세균부터 진균까지 다양하며 시간과 온도에 따라 미생물 천이가 이루어지는 것으로 알려졌다. 그 중 방선균이

발효에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 방선균을 분리하여 그 특성을 밝히고자 한다

느타리버섯과 마찬가지로 표고버섯도 배지의 질소원 함량이 낮아야 자라는 공통된 성질을 가지고 있다. 그러므로 표고버섯 배지를 발효하기 위해 참나무 톱밥을 주재료로 사용하여 발효온도와 pH 그리고 발효 시간을 정한다. 필요시 미생물이 쉽게 분해 할 수 있는 셀룰로스가 풍부한 보조 재료(옥수수 속대, 벧짚 그리고 폐면등)를 첨가하여 발효의 최적 조건을 알아낸다.

톱밥 발효 배지에서 표고 균사 성장에 미치는 요인을 조사하여 균사체 성장의 최적 조건을 찾는다. 그리고 국내에 등록 표고버섯 품종과 외국 품종을 발효배지에 접종하여 균사성장과 자실체 생산이 좋은 품종을 선발한다. 자실체 생산을 유도하는 배양 기간과 자실체 생산량을 증가시키는 요인을 조사한다.

구 분	주요개발내용 및 범위
발효에 관여하는 미생물의 분리 및 특성	발효에 관여하는 미생물의 분포와 시간과 온도 따른 천이를 조사. 방선균의 분리 및 특성 조사. 방선균의 동정 톱밥배지의 발효조건 규명
발효배지에서 표고 균사성장에 미치는 요인	표고 균사 성장에 미치는 요인 조사 표고버섯 품종의 발효배지에서의 성장 특성조사 자실체 발이를 위한 배양 최적 기간 조사 농가 부산물을 이용한 발효의 최적화
발효실을 이용한 large-scale 적용실험	발효실을 이용하여 미강과 같은 영양원의 첨가량을 증가시키기 위한 연구 표고버섯 수량 증가를 위한 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

연구개발 결과

발효배지에서 고온성 미생물 두 종을 분리하여 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2로 명명하였다. 방선균인 *Thermobifida cellulolytica* DK-2가 자라기 위해서는 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1가 우선 적으로 먼저 성장하고 난 후 *Thermobifida cellulolytica* DK-2가 이 균을 분해하여 성장하는 것으로 나타났다. 따라서 *Thermobifida cellulolytica* DK-2는 합성배지에서 성장하지 못하였다. 성장 특성은 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1인 경우 성장온도가 40-50°C 로 비교적 넓은 범위이며 pH는 6-8이었다. *Thermobifida cellulolytica* DK-2는 각각 50-55°C, pH 8-9이다. 발효과정이 진행됨에 따라 저온에서 고온으로 그리고 낮은 pH에서 높은 pH로 변화하므로 분리 균주들의 이러한 특징은 발효가 진행되는 순서와 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다.

배지재료로 톱밥만으로는 미생물이 성장하기에 적합하지 못하므로 미생물이 분해하기 쉬운 셀룰로스가 풍부한 폐면을 첨가하였다. 톱밥보다 폐면에 고온성 미생물이 390배정도 더 많은 것으로 나타나 고온성 미생물의 공급원으로도 사용되었다. 톱밥과 폐면의 비율은 8:2 비율이 표고 균사 성장에 적합하였다. 배지의 총 중온성 미생물의 수는 1200-1700배까지 증가 하다가 감소하여 발효가 끝나는 시점에서는 발효초기의 수로 감소하였다. 고온성 미생물의 총수는 발효가 끝나는 시점에서 400-1200배까지 증가하였다. 미생물의 총수는 배지내의 톱밥함량에 의해 결정되는데 중온성 미생물의 총수는 배지재료에 크게 영향을 받지 않았으나 고온성 미생물인 경우 톱밥의 비율이 증가할수록 감소하였다.

배지에 부족된 질소원을 보완하기 위해 무기질소원을 첨가한 결과, ammonium nitrate, ammonium sulfate 그리고 urea첨가를 첨가한 경우 ammonium nitrate에서 균사성장이 좋았다. ammonium nitrate의 농도는 2g/l에서 가장 좋았고 농도가 증가할수록 균사성장을 억제하였다. 또한 미량원소로 phosphate를 첨가하면 오히려 균사성장을 억제하였다. 유기질소원으로 미강을 첨가 첨가하였다. 3% 농도로 증가 시켰을 경우 미강의 첨가가 증가할수록 균사성장이

빠르고 과 균사밀도가 높았다. 그러므로 배지를 발효하기 위해 무기질소원 보다는 유기질소원으로 미강을 첨가하는 것이 좋았다. 유기질소원으로 밀기운을 첨가한 경우에도 같은 결과를 나타냈다. 구입이 용이하고 농가부산물을 이용한다는 취지에서 유기질소원으로 미강을 선택하였다.

대규모 배지를 발효하기 위해 발효실을 제작하였다. 배지의 자체 발열을 이용하여 50℃ 고온발효를 유도하였다. 톱밥과 폐면만으로는 50℃를 유지하지 못하였고 미강의 첨가가 필요하였다. 미강의 첨가량이 증가할수록 발효온도가 상승하였다. 그러나 발효기간 동안 50℃를 유지하지 못하였다. 톱밥의 입자를 작은 것으로 하였을 때 50℃ 온도를 유지 할 수 있었다. 이러한 결과는 미생물이 톱밥을 이용할 수 있는 표면적을 넓힘으로서 미생물 성장이 촉진되는 것으로 보인다. 그러므로 고온발효를 위해서는 유기물 영양원으로 미강을 첨가해야 하지만 톱밥의 입자도 작게 하여 미생물 이용이 용이하게 하는 것이 중요한 것으로 보인다.

톱밥의 선택의 중요성은 입자의 크기뿐만 아니라 톱밥을 만들기 위한 사용되는 원목의 상태도 중요한 것으로 나타났다. 원목의 벌채시기가 나무가 성장하는 시기의 것은 발효가 되지 않으며 반드시 나무가 가을 이 후 성장이 정지된 시기의 원목을 사용하여야 한다. 이는 원목재배에서와 같이 표고버섯을 재배하기 위해서 사용되는 나무의 벌채시기가 늦가을 이후에 이루어지듯이 톱밥을 발효하기 위해서도 늦가을 이 후에 벌채된 원목으로 톱밥을 만들어야 한다. 발효실에서의 톱밥배지 발효실험은 3가지 방법으로 실시하였다. ① 50℃ 온도 설정하여 자체 발열로 고온 발효한 경우 ② 야외발효 후 발효실에서 50℃ 고온발효한 경우 ③ 30℃ 중온발효를 유도한 후 50℃ 고온 발효한 경우이다. 1과 2번 방법으로 발효하면 표고균사가 3-5일 정도 성장 한 후 균사성장을 멈추고 사멸하여 푸른 곰팡이의 오염이 되었다. 중온발효 후 고온발효를 한 3번의 경우만이 표고균사가 사멸되지 않고 성장 할 수 있었다. 그러므로 중온발효과정은 톱밥배지를 만드는데 가장 중요한 단계임을 알 수 있다. 발효과정은 48시간 중온발효하는 것이 최적이었으며 65℃에서 2시간이상 살균하는 것은 오히려 배지에서 균사성장 억제 부분이 많이 발생하였다. 또한 고온발효과정에서 뒤집기를 하는 것은 균사성장억제 부분이 많이 발생시키는 요인으로 작용하였다.

100일간의 균사 배양기간이 끝나면 자실체 형성을 위한 발이를 할 수 있었

다. 이는 고압살균에 의한 봉지재배보다 군사배양기간을 약 60일 정도 단축하는 효과를 가져왔다. 비율이 8:2의 톱밥: 폐면에 미강의 첨가량이 증가할수록 자실체 수량은 증가하여 미강 함량이 자실체 수량을 증가시키는 요인으로 작용하였다. 12% 미강을 첨가하여 만든 배지에서 푸른곰팡이의 부분오염이 발생하였지만 군사성장 동안에 점차 사멸하여 그 자리에 표고균사가 다시 성장하였다. 그러나 아직까지 푸른곰팡이등의 부분적인 오염을 방지하지 못하였지만 추후의 연구에 의해 오염에 대한 문제점이 해결될 것으로 보인다. 배양한 1차 수확 표고버섯의 수량은 372g 이고 2차 수확은 363g, 그리고 3차 수확은 214g으로 3kg 배지 무게에서 총 949g을 수확하여 수율이 31%가 되었다. 표고버섯 자실체의 86%가 배지 윗면에서 재배되기 때문에 버섯의 형태가 변형되지 않고 원형 그대로 유지되기 때문에 모양에 의한 상품성이 다른 재배방법보다 뛰어났다.

이상과 같이 톱밥발효에 의해 표고버섯을 재배할 수 있음을 증명하였다. 또한 표고버섯 발생량도 고압살균에 의한 톱밥재배와 비슷한 생산성을 나타내고 있으며 미강 첨가량의 증가에 의해 표고버섯 발생량도 증가시킬 수 있을 것이다. 부분적 오염이기는 하지만 푸른곰팡이의 발생원인을 알아내어 푸른곰팡이 발생을 방지 한다면 발효에 의한 재배방식은 대량생산과 낮은 생산비용으로 인하여 표고버섯을 재배하는 새로운 방법이 될 것이다.

배지재료조건과 발효단계는 다음과 같다.

배지재료 조건

- ① 생나무가 아닌 마른 참나무류 톱밥 이어야함
- ② 톱밥의 입자는 2mm 이하의 톱밥이 50% 이상 이어야함

발효 단계

- ① 8:2(w/w) 비율의 톱밥: 폐면의 배지에 미강을 첨가한 후 발효실에 입상
- ② 발효실 온도, 25-33℃ 유지하여 2일간 발효
- ③ 2일 후 발효실 온도 65℃에서 2시간 저온살균
- ④ 살균 후 45-53℃에서 5일간 발효
- ⑤ 배지의 온도를 실온까지 내려가면 표고종균과 혼합접종

활용에 대한 건의

튕밥을 발효하여 표고버섯을 재배하는 방법은 전 세계적으로 아직까지 개발되지 못한 방법이다. 발효에 의한 표고버섯재배는 양송이 버섯처럼 재배방법을 대규모로 공업화할 수 있는 방법으로 기존의 표고버섯 재배법을 대체할 수 있는 방법이라 할 수 있다. 또한 표고버섯 재배분야에서 세계적으로 기술적 우의를 차지 할 수 있는 시금석이 되었다. 발효에 의한 방법이 투자비와 생산비의 절감이 될 것으로 예상한 것 이외에 배양기간의 단축과 품질의 향상 등 부수적인 장점을 알아내었다.

그러나 최초의 연구이기에 아직도 해결하여야 할 과제가 남아 있다. 즉, 푸른 곰팡이와 같은 오염을 감소시키는 연구, 실험에 사용된 배양용기가 가장 적합한 것인가, 중온발효와 고온발효를 동시에 수행하는 발효실의 최적화문제, 배지제조와 뒤집기 그리고 종균접종의 기계화등 과제가 남아 있다. 이는 새로운 재배 방법이기 때문에 당연히 수행되어야 하는 차후의 과제이다. 또한 자실체 수량을 보다 증가시키기 위한 연구가 남아 있다. 현재 12% 까지 미강을 첨가하였지만 그 이상의 미강을 첨가하여 충분히 자실체 수량을 증가시킬 수 있을 것으로 보인다. 그러면 현재의 고압살균에 의한 봉지재배법 보다 수율을 높일 수 있을 것이다. 이와 같이 추가의 연구가 수행된다면 국내에서 바로 산업화 할 수 있으며 선진국등에 특허를 출원하여 기술에 수출이 가능할 것으로 보인다.

SUMMARY

Composting of sawdust substrate for growing shiitake mushroom (*Lentinus edodes*)

The present research is directed to a method of composting sawdust substrate on which shiitake mushroom, can be grown. Cultivation of shiitake has remained in a primitive state until recently. shiitake have been grown on logs. Growth of shiitake on logs typically requires one years until the first crop of fruiting body is produced.

One method has been found to expedite the growth of shiitake in plastic bags on sterilized sawdust. Cultivation on heat treated sawdust is different than logs, due to its particulate nature. this results in high yields in a shorter period of time. Unfortunately however, this aseptic method is ill suited to the established equipment and procedures employed by large scale. therefore, there is a need for a method of growing shiitake mushrooms as procedures of white mushroom.

It is an object of the research to provide a composting of sawdust substrate for growing shiitake mushroom. Composting is a self-heating, aerobic, solid-phase, biodegradative process of organic-waste materials. During the thermogenic phase of the composting process, the temperature usually rises to a high level (65 to 80°C) for a certain period of time. In accordance with foregoing objects, oak sawdust, cotton waste and rice bran were provided a nutrient substrate composition.

Two mesophilic microorganisms were isolated from thermogenic composts at temperatures between 50 and 55°C. The DNAs coding for the 16S rRNAs (16S rDNAs) showed that heterotrophic, gram-positive, rod-shaped, non-sporeforming, thermophilic bacteria strain isolated from

composts was closely related to *Pseudoxanthomonas* sp. and Actinomycetes strain isolated from composts was closely related to *Thermobifida cellulolytica*. The newly isolated *T. cellulolytica* strain was probably related to growth of *Pseudoxanthomonas* sp. Our study suggests that *Pseudoxanthomonas* sp. strain play an important role as well as *Thermobifida cellulolytica* in organic-matter degradation during the thermogenic phase of the composting process.

It is necessary to create selective substrates which support the growth of shiitake mushroom and suppress the weed mold like green fungi.

All experiment were performed with oak sawdust and cotton waste, which were fermented in beaker by small-scale or in compost tunnel by large scale facility The component ratios of compost mixture were tested from a broad range. In a preferred formation, ratios of sawdust and cotton waste in the compost mixture were 8 : 2 by dry weight basis.

In influence of inorganic nitrogen source, the ammonium nitrate in the medium complex was accelerated in spawn running but, the mycelium of shiitake was repressed when the supplement of ammonium nitrate was increased in the medium complex. In order to increase mycelium of shiitake as the nitrogen source is increased in the medium complex. The rice bran was selected as nitrogen supplement. the rice bran was comprised from 3- 12% by weight. The increase of rice bran was increased in spawn running of shiitake mushroom.

For large-scale experiments, the compost tunnel was used to fermentation process. The materials of medium complex were blended together to form a compost mixture which is wetted and assembled into piles for aerobic digestion. the mixture was wetted to a moisture content about 80-85%.

The process of composting for mycerial growth of shiitake was proceeded two phase. At first, The compost mixture was aerobically fermented at an ambient temperature range between about 25°C to 33°C in

a compost tunnel. This period was digested by endogenous microorganisms. After 2 days, the compost mixture was pasteurized at a temperature of 65°C for two hours. At second, the compost mixture can then be cooled to mesothermic temperature, is between about 45°C-53°C. Keeping the compost at such mesothermic conditions for four days allowed degradation of the compost by thermophilic microorganisms. The compost was then be further cooled to ambient temperature, generally between about 20°C- 30°C. The spawn of shiitake mushroom was added to the compost. The trays were filled after mixing of spawn with the compost.

Since An important feature of the research is not required aseptic techniques and apparatus. the mushroom did not need Growing aseptically in plastic bags on sterilized substrate. In sawdust: cotton waste (8:2w/w) substrate, the yield of fruit bodies were increased when supplement of rice bran increased. In compost mixture with supplement of 12% rice bran, the first harvest of shiitake mushrooms were obtained after about 100 days. The fruiting was achieved 949g yield per block at production period. 87% of total fruiting bodies were harvested from upper phase of blocks. the fruiting body was taken good shape as a round cap and a straight stem.

CONTENTS

Chapter 1. Comprehensive description of research	16
Section 1. Scope of study	16
Section 2. Objective and content of research	19
Section 3. present status of related technic	22
Chapter 2. Introduction	25
Chapter 3. Contents and results of research	29
Section 1. The characteristic of microorganisms in relation to composting of sawdust	29
1. Methods of Research	29
§. Preparation of sawdust substrate	29
§. Measurement of biomass in the composted medium	29
§. Measurement of pH in the composted medium	29
§. Isolation of mesophilic microorganisms from thermogenic compost	29
§. The 16S rDNA analysis	29
2. Results and discussion	32
§. The microbial assay in various substrate	32
§. The microbial biomass in the processing of the compost	34
§. The isolation of thermophilic bacteria from compost	38
§. The analysis of 16s rDNA sequence	40
§. Culture medium of <i>Thermobifida cellulolytica</i> DK-2	43
§. pH effect of growth condition	43
§. Temperature effect of growth condition	45
Section 2. Factors of mycerial growth of shiitake in composted sawdust	46
1. Methods of Research	46
§. Production of shiitake mushroom spawn	46
§. Mycerial growth of shiitake in composted medium	46
§. Effect of <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. DK-1 and <i>Thermobifida cellulolytica</i>	

DK-2 in the process of compost	47
§. Inoculation of shiitake spawn	48
§. Cultivation method	48
§. Observation of contamination	48
§. Isolation of mutant	48
2. Results and discussion	49
§. Compost of sawdust substrate	49
§. Effect of inorganic nitrogen source	52
§. Effect of organic nitrogen source	60
§. Effect of <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. DK-1 and <i>Thermobifida cellulolytica</i>	
DK-2 in the process of compost	66
§. Observation of contamination in composted medium	67
§. Process of cultivation	68
§. Isolation of mutant	76
Section 3. Composting in the compost tunnel	80
I. Condition-thermophilic composting	80
1. Methods of Research	80
§. Preparation of sawdust medium	80
§. Condition of compost	80
§. Inoculation of spawn	80
§. Cultivation	81
2. Results and discussion	82
§. Structure of the compost tunnel	82
§. Compost system	82
§. Condition of composting in the compost tunnel	87
§. Condition of compost	94
§. Condition of water in the composting	95
§. Condition of raw and dried sawdust in the composting	96
§. Condition of dried sawdust in the compost	99
II Condition- thermophilic composting after outdoor composting	101

§. 8:2 medium	101
§. 100% sawdust medium	107
III. Condition-thermophilic composting after mesophilic composting	113
1. Methods of Research	113
§.Medium preparation	113
§. Pasteurization	113
§. Inoculation	113
2. Results and discussion	114
§. Compost procedure	114
§. Length of compost run	117
§. Pasteurization	117
§. Turning of compost	119
§. Inoculation	121
§. Cultivation	122
§. Pinning	123
§. Fruiting and harvesting	123
Chapter 4. Achievement of study and contribution	132
Chapter 5. Literature cited	136

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	16
1절 연구개발의 필요성	16
2절 연구개발의 목적 및 범위	19
3절. 국내·외 관련기술의 현황	22
제 2 장 서론	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	29
1절 톱밥발효배지에 관여하는 미생물	29
1. 연구내용 및 방법	29
가. 톱밥발효 배지의 제조	29
나. 발효배지에서의 미생물 수 측정	29
다. 발효배지의 pH 측정	29
라. 발효에 관여하는 고온성 미생물의 분리	29
마. 분리균의 16srDNA 염기서열분석	29
2. 연구결과	32
가. 배지재료별 미생물 수의 측정	32
나. 배지 발효과정에서의 미생물 성장	34
다. 발효에 관여하는 고온성 미생물 분리	38
라. 16S rDNA 염기서열 분석	40
마. Thermobifida cellulolytica DK-2의 증식배지	43
바. pH에 따른 고온성 미생물의 성장특성	43
사. 성장온도에 따른 고온성 미생물의 성장특성	45
2절 톱밥 발효배지에서 표고균사성장에 미치는 요인	46
1. 연구 내용 및 방법	46
가. 표고버섯 접종용 균주제작	46
나. 발효배지에 의한 표고균사성장	46
다. 분리된 Pseudoxanthomonas sp. DK-1와 Thermobifida cellulolytica DK-2이 발효에 미치는 영향	47
라. 표고균사 접종	48

마. 균사 배양	48
바. 오염관찰	48
사. 발효배지에 적합한 품종 개발	48
2. 연구결과	49
가. 배지의 발효	49
나. 무기 질소원 첨가 효과	52
다. 유기질소원으로 미강 첨가 효과	60
라. 분리된 <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. DK-1와 <i>Thermobifida cellulolytica</i> DK-2이 발효에 미치는 영향	66
마. 발효 후 푸른곰팡이의 오염 측정	67
바. 배양 과정	68
사. 발효배지에 적합한 품종 개발	76
3절 발효실을 이용한 발효	80
I. 발효실 온도 50℃ 설정인 경우	80
1. 연구방법 및 내용	80
가. 배지의 제조	80
나. 배지의 발효조건	80
다.중균접종	80
라. 배양	81
2. 연구결과	82
가. 발효실의 구조	82
나. 발효시설	82
다. 발효실에서 배지발효를 위한 조건	87
라. 발효 조건에 따른 표고균사성장	94
마. 물에 의한 발효 배지 조건	95
바. 톱밥 별채시기에 따른 발효배지 조건	96
사. 마른나무로 만든 톱밥의 발효배지 조건	99
II. 야외 퇴적 후 발효실에서 고온 발효한 경우	101
가. 8:2 배지	101
나. 100% 톱밥배지	107

Ⅲ. 발효실에서 증은발효 후 고은 발효한 경우	113
1. 연구방법 및 내용	113
가. 배지제조	113
나. 살균 조건	113
다. 접종	113
2. 연구결과	114
가. 발효과정	114
나. 발효시간	117
다. 살균 조건	117
라. 배지 뒤집기	119
마. 접종	121
바. 배양	122
사. 발이 유도	123
자. 표고버섯 발생과 수확	123
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	132
제 5 장 참고문헌	136

제 1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

현재 세계적으로 소비되는 버섯은 양송이, 느타리 그리고 표고버섯이라 할 수 있으며 발효에 의해 재배되는 양송이의 경우 버섯재배기술 선진국인 네덜란드, 일본, 독일, 미국 등에서는 이에 관한 연구가 오래 전부터 이루어져 양송이 터널재배 시스템에 대한 시설, 장비 재료 등을 개발하여 안정 양산체계를 유지하고 있으며 공조시스템도 매우 놀랄 정도로 발전하고 있는 실정이다. 그러나 우리나라를 비롯하여 세계적으로 표고버섯은 원목을 이용한 재배가 주종을 이루고 있으며 최근에는 참나무 톱밥을 배지 재료로 하여 고압 살균을 이용한 무균 조건에서 표고버섯을 생산하려는 시도가 이루어지고 있다.

표고톱밥재배는 원목재배에 비하여 활엽수자원을 거의 100% 이용 할 수 있으며, 재배기간이 대단히 짧아 자금회전이 빠르고, 재배과정의 많은 부분이 기계화 할 수 있고, 톱밥재료에 대한 버섯 수확량도 원목의 2-3배 이상으로 표고 원목재배의 단점을 보완 할 수 있는 장점도 갖고 있다. 현재 일본, 중국, 대만 등에서는 이 재배방법으로 많은 량의 표고를 생산하고 있다. 우리나라에서도 80년대부터 본격적으로 표고 톱밥재배연구에 착수하여 재배품종의 개발, 톱밥배지의 다양화, 배양조건 및 버섯의 발생방법 등을 구명하여 왔으며 1993년 임업연구원에서 표고톱밥재배기술 개발에 성공하였고 지금도 표고톱밥재배 생산성향상을 위한 연구가 활발하게 진척되고 있다. 그러나 높은 투자비와 무균 조작으로 인한 대량 생산의 한계로 인하여 널리 보급되지 않고 있지 않는 문제를 가지고 있다.

이 연구에서 개발 하고자 하는 기술은 참나무 톱밥을 발효하여 표고버섯 성장 배지로 이용하는 것이다. 톱밥을 발효시키게 되면 방선균 같은 미생물에 의해서 이용하기 어려운 톱밥 성분이 쉽게 이용될 수 있는 상태로 전환되고 버섯의 생육에 필요한 단백질과 비타민 등이 합성되는 것이다. 또한 발효 과정에서 형성된 방선균 등과 같은 미생물은 길항 작용을 하여 푸른 곰팡이 오염과 같은 외부 오염을 막는 역할을 하게 될 것이다.. 발효가 끝난 배지는 종균과 혼합되고 종균과 섞은 배지는 공간 활용도가 높고 취급이 용이한 상자에

답아 배양하게 된다.

또한 표고버섯 배지를 외국의 양송이 재배처럼 터널식 발효실에서 발효하게 된다면 대규모 생산이 가능하게 될 것이다. 발효를 통한 표고버섯재배는 고압살균기와 무균실, 무균 접종 장치등의 고가 장비가 필요하지 않아 원가가 절감되고 그에 따른 유지비가 필요하지 않을 것이며 고압살균기를 이용하여 121 ℃에서 2시간 멸균을 하기 위해서는 많은 에너지를 필요로 하는데 반해 터널식 발효를 이용하면 자체 발열을 사용하여 발효를 하기 때문에 에너지 사용이 거의 필요하지 않아 에너지를 절약할 수 있다. 원목 재배 방법 뿐 만 아니라 균상재배법은 종균을 접종하기 위해 많은 인력이 필요하며 하루에 접종할 수 있는 양이 제한되지만 발효된 배지는 기계적으로 교반기에 넣고 종균을 섞을 수 있어 접종에 필요한 인력을 줄일 수 있다.

발효를 하여 배지를 제작하게 되면 지금까지 하기 어려웠던 자동화를 상당부분 실현할 수 있을 것이다. 원목재배법은 거의 노동력이 편중된 수작업에 의해 이루어져 왔고 멸균에 의한 균상 재배법은 봉지에 배지를 채우는 것만을 자동화 할 수 있었으며 접종부터 봉지의 밀봉 그리고 멸균과정 모두가 수작업으로 이루어진다. 그러나 발효를 통해 배지를 제작하면 배지의 발효 단계와 종균을 배지와 섞고 상자에 담는 일을 기계화 할 수 있을 것이다. 표고버섯 생산에 기계화가 가능해지면 규격품으로 생산할 수 있고 인력절감이 이루어질 수 있으며 자본을 집약적으로 투자하여 시설을 현대화하는 데도 용이한 잇점을 갖게 될 것이다.

국내에서 발생하는 농업 부산물과 함께 참나무 톱밥을 발효하여 표고버섯을 재배할 수 있게 된다면 아직까지 원시적 재배단계에 머무르고 있는 표고버섯의 원목재배법을 대체 할 수 있으므로 그 파급 효과는 클 것으로 기대 되고 특히 국내 버섯 생산 기술이 중국이나 일본 등지 보다도 뒤져 있는 상태에서 이 기술로 한 차원 생산 기술을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 국내적으로 보았을 때 과도한 시설 투자가 필요하지 않고 계절에 상관없이 일정한 생산이 가능하게 되므로 원목재배의 특성상 나타나는 계절적 편중 생산에 의해 버섯 가격 급등락의 문제점도 줄일 수 있으며 또한 계획적인 생산과 대량 생산 그리고 원가 절감으로 중국산 표고버섯의 가격에서 훨씬 유리한 입장에 설 수 있을 것이다.

2. 경제.산업적 측면

버섯 재배는 원래 노동집약적 작물로서 주로 인력이 풍부한 국가에서 발달되어 왔다. 우리나라에서도 인력이 풍부하던 '60-'70년대에 양송이 재배가 크게 발전되어 왔다. 그러나 현재의 인력 사정으로서의 버섯재배가 다른 국가보다도 극히 불리한 입장에 있다. 이를 극복하는 과정에서 버섯재배는 인력 절감형 또는 기계화가 가능한 버섯만이 발달되고 노동집약형 버섯재배는 점차 쇠퇴하여지게 된다. 따라서 앞으로는 기계화가 가능한 재배버섯만이 경쟁력을 가질 수 있게 된다. 이러한 측면에서 볼 때에 우리나라의 표고버섯 생산이 아직까지 원목을 이용한 재배법이 주류를 이루고 있기 때문에 점차 사양화 되어가고 있는 추세이다. 또한 과거에 비해 점차 증가된 소비에 맞추어 필요한 참나무 원목의 수요도 그 만큼 증가하여 원목 공급 자체가 문제로 대두되기 시작하였다.

또한 자연 환경 보호가 중요시되는 시대적 추세에서 원목을 대량 소비시키는 이러한 재배 방법으로는 멀지 않아 그 한계를 보일 것을 예측된다. 외국의 경우 이러한 문제가 우리 보다 일찍 발생되어 이러한 문제점을 극복하려는 움직임을 보였다. 그 대안으로써 톱밥을 고압 살균하여 무균적인 방법에 의해 봉지에 배양하는 균상(톱밥) 재배가 개발되었다.

원목 1m³을 분쇄하면 2.5m³의 톱밥을 생산된다. 이를 토대로 생산성을 비교하면 원목에서는 원목 중량의 20%인 120kg이 생산되고 톱밥을 이용한 균상재배는 400kg이 생산되어 3.3배의 높은 생산성을 가지는 것으로 알려져 있다. 톱밥을 발효하여 균상재배와 같은 수준으로 버섯을 생산한다면 원목소비량을 1/3로 줄여 자원절약에 기여할 것이다. 균상 재배법에서는 멸균기의 규모와 살균시간 그리고 무균실에서 사람이 접촉할 있는 능력에 따라 일일 생산량이 제한을 받는데 예를 들어 1인이 1일 생산할 수 있는 배지의량은 2.5kg 톱밥 배지 550개를 만들 수 있으며 1인 재배 적정규모인 10,000개를 만들기 위해서 18일이 걸린다. 그러나 표고버섯 배지를 외국의 양송이 재배처럼 터널식 발효실에서 발효하게 된다면 대규모 생산이 가능하게 될 것이다.

톱밥배지를 만들기 위한 고압살균기와 무균실, 무균 접종장치등의 고가 장비가 필요하지 않아 원가가 절감이 되고 그에 따른 유지비가 필요하지 않게 된다. 고압살균기를 이용하여 121 °C에서 멸균을 하기 위해서는 많은 에너지

를 필요로 하는데 반해 터널식 발효를 이용하면 자체 발열을 사용하여 발효를 하기 때문에 에너지 사용이 거의 필요하지 않아 에너지를 절약할 수 있는 잇점도 있다. 원목 재배 방법 뿐 만 아니라 균상재배법은 종균을 접종하기 위해 많은 인력이 필요하며 하루에 접종할 수 있는 양이 제한되지만 발효된 배지는 기계적으로 교반기에 넣고 종균을 섞을 수 있으므로 접종에 필요한 인력을 줄일 수 있다.

2절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

현재 세계적으로 배지를 발효하여 표고버섯을 재배하는 기술은 개발되어 있지 못하고 있는 실정이다. 그러나 양송이나 느타리 버섯처럼 표고버섯도 발효배지에 의해 재배될 수 있다면 기존의 재배법을 대체할 수 있는 새로운 재배법으로 자리를 잡게 될 것이다. 그러나 표고버섯 발효배지에 대한 연구가 전무한 실정이기 때문에 배지 재료의 선정과 발효조건 그리고 시간등 다양한 기초연구가 이루어 져야 할 것이다. 이에 따라 이 연구에서는 배지를 발효하여 표고버섯 균사를 오염 없이 성장 시키고 그 자실체를 얻는데 목적이 있다.

2. 연구개발의 범위

느타리와 양송이 재배를 위한 배지의 발효에서는 방선균의 존재 여부가 배지의 적합 여부를 알 수 있는 지표이다. 이러한 관점에서 기존의 재료로 발효를 하여 미생물의 분포와 발효 시간에 따른 미생물의 천이를 조사한다. 온도와 pH는 미생물 성장에 미치는 중요한 요인으로 작용을 하므로 온도와 pH를 인위적으로 변화시켜 미생물의 변화를 비교 조사한다. 이러한 자료를 바탕으로 발효에 미치는 중요한 요인을 찾아내어 참나무 톱밥을 이용한 발효 조건의 기초 자료로 이용한다.

현재 버섯재배에 행해지고 있는 느타리 재배와 양송이재배는 발효를 통해 이루어지지만 그 배지의 특성은 서로 큰 차이를 보인다. 느타리의 경우 주로 벧짚이나 폐면을 이용하고 첨가재료가 필요하지 않지만 수량을 증가하기 위해 첨가재료로 미강이 약 3% 정도 첨가되기도 한다. 반면 양송이 재배에 이용되는 재료는 벧짚이외에 계분 그리고 깻묵등 다양한 재료가 첨가된다. 두 배지의

근본적 차이는 배지의 질소원의 함량 차이에 있다. 그에 따라서 각각의 배지에서 식하는 미생물의 군집과 미생물 천이는 다르게 일어난다. 버섯 배지의 발효에 관여하는 미생물은 세균부터 진균까지 다양하며 시간과 온도에 따라 미생물 천이가 이루어지는 것으로 알려졌다. 그 중 방선균이 전체적 발효에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.

양송이 재배의 경우는 서유럽에서 재배되고 발달한 관계로 그 연구가 많이 이루어져 국내에서도 자세한 재배과정의 원리가 설명되어 있다. 그러나 외국에서 소비가 많지 않은 느타리의 경우에는 벗짚이나 특히 국내에 많이 이용되는 폐면을 이용하여 배지를 발효하는 과정은 상대적으로 잘 알려져 있지 않다. 국내에서 양송이 보다 재배면적이 월등히 높은 느타리의 경우 체계화되지 못한 발효 지식으로 많은 농가가 각자의 경험에 크게 의존하는 실정이다.

느타리버섯과 마찬가지로 표고버섯도 배지의 질소원 함량이 낮아야 자라는 공통된 성질을 가지고 있다. 그러므로 표고버섯 배지를 발효하기 위해 우선 느타리 재배에 이용되는 배지의 미생물의 집락과 천이 등 미생물의 기본적인 특성을 연구하는 것이 중요하다. 특히 발효과정에 중요한 미생물인 방선균이 중점적으로 연구되어야 한다. 연구로 얻어진 기초 자료는 표고버섯 발효 배지 제작에 적용할 수 있을 것이며 느타리 배지 발효에 부족했던 기초 자료가 될 것이다. 표고버섯은 참나무류에서 잘 자라는데 문제는 참나무를 가지고 버섯이 자라도록 발효시키기가 어려운데 있다. 다른 버섯재배에 쓰이는 벗짚이나 폐면은 미생물에 의해 쉽게 이용될 수 있는 셀룰로스가 풍부한 반면 톱밥은 셀룰로스 뿐만 아니라 리그닌, 헤미셀룰로스 등 미생물이 이용하기 어려운 성분이 많기 때문이다. 기초 자료를 토대로 참나무 톱밥을 주재료로 사용하여 발효온도와 pH 그리고 발효 시간을 정한다. 필요시 미생물이 쉽게 분해 할 수 있는 셀룰로스가 풍부한 보조 재료(옥수수 속대, 벗짚 그리고 폐면 등)를 첨가하여 발효의 최적 조건을 알아낸다.

톱밥 발효 배지에서 표고 균사 성장에 미치는 요인을 조사하여 균사체 성장의 최적 조건을 찾는다. 그리고 국내에 등록 표고버섯 품종과 외국 품종을 발효배지에 접종하여 균사성장과 자실체 생산이 좋은 품종을 선발한다. 자실체 생산을 유도하는 배양 기간과 자실체 생산량을 증가시키는 요인을 조사한다.

톱밥을 이용한 발효배지는 기존의 버섯재배에 이용되는 발효 과정과 다르

며 성장기간이 상대적으로 긴 표고버섯의 특성이 느타리나 양송이 재배 시스템과 구별된다. 그러므로 새로운 재배방식에 적용할 수 있는 기계화 연구가 필요하다. 우선 배지제작을 위한 성분배합과 발효 단계를 기계화 할 수 있도록 한다. 발효에 의해 제작된 배지는 오염이 근본적으로 차단되었으므로 종균 배합과 상자에 담은 시스템을 고안한다. 배양실과 발이실을 별도로 설치하여 목적에 맞는 공조설비를 확립한다.

3절. 국내·외 관련기술의 현황

우리나라의 표고재배는 1905년부터 시작된 원목재배가 그 주종을 이루어 왔다. 현대적인 표고의 원목재배는 1956년에 표고종균을 순수분리 및 배양하여 여러 지방에서 시험 재배한 것이 최초로써 현재까지 계속되고 있다. 그 후 표고의 원목재배기술은 크게 발전하여 세계 표고시장에서의 한국산 표고가 고급품으로 취급되고 있는 실정이다. 그러나 표고톱밥재배는 1970년대 후반부터 국가연구기관에서는 농림업부산물물의 활용법개발과 톱밥배지를 이용한 표고품종 선발시험 과정을 통하여 시작하게 되었고, 1980년대 중반에서부터 연구가 활성화되어 배지 재료(톱밥의 종류), 첨가물의 종류, 배양조건, 버섯발생 방법 등에서 커다란 성과를 거두었다. 한편 몇 개소의 민간 종균배양소를 중심으로 표고 톱밥재배가 시도된바 있으나 성공적인 보급에는 이르지 못하였다.

우리보다 버섯재배기술에서 한발 앞서있는 일본에서는 원목자원의 부족 등 여건변화로 공립연구기관을 중심으로 연구가 추진되어 왔으며 현재는 표고톱밥재배의 각종 기계화설비도 시판되고 있는 실정이다. 1947년 일본 돗토리시(鳥取市)에 버섯연구소가 설립되어 표고의 연구, 재배교육 및 기술보급에 획기적 기여를 하게 되었으며, 이 연구소에만 50여인의 연구자가 있어 표고 연구에 획기적 기여를 하고 있다. 또 일본 삼립총합연구소에는 버섯과가 있어서 표고에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있으며, 약 50개소에 달하는 각 부도도현(府道都縣)의 임업시험장, 표고산업관련회사 연구소를 비롯하여 각 대학에서도 많은 연구를 계속하여 오늘날 일본 표고재배기술의 선진화에 크게 기여하고 있다.

표고버섯 톱밥배지를 널리 보급하기 위해 일본에서는 표고톱밥재배에 상당한 시설을 갖춘 배양업소에서 톱밥배지에 종균을 접종하여 일정한 기간동안 배양한 후 일반 재배자에게 분양판매하고, 일반 재배자는 이 배지(균사배양이 완료된 배지)를 구입하여 오직 짧은 기간 동안 버섯을 발생시켜 수확만하는 일종의 생산공정 일부를 담당하는 방법이 성행 하고 있다. 특히 표고톱밥재배는 팽이버섯, 맛버섯 생산과 시기적인 보완 작목으로 재배하여 왔으나 요즘은 기존의 유희시설을 이용한 새로운 지역특화사업으로 활기를 띠고 있다. 또한 일부에서는 년중 재배를 위하여 표고전용 파이프 하우스 등의 개발을 서두르고 있다.

중국의 경우 상해농업시험장에서 1956년부터 툽밥종균 병 재배시험을 실시하여 1957년 병을 깨뜨린 후 꺼내어진 툽밥배지에서 버섯을 발생시켜 초보적인 연구의 성공이 이루어졌고, 상해과학원 식용균연구소에서는 1974년 배양이 된 종균을 꺼내 상자 틀에 넣어 덩어리모양 다진 균상에서 버섯을 발생시키는 기술을 개발함에 따라 1978년부터 상해부근의 가정(嘉定), 천사(川沙)등의 지역에 실용적 재배가 이루어지게 되었다.

그 후 1978년 목이(木茸)의 비닐봉지 재배법이 개발되었는데 80년대초 목이의 비닐봉지재배 기술을 응용한 표고 봉상균사체 재배기술이 개발되어 전국적으로 확대 보급되었다. 중국에서는 전술한 상해식용균연구소에만 105명이 연구원이 있으며, 광둥성(廣東省) 미생물연구소, 삼명(三明)진균연구소, 화중농업대학 응용진균연구소, 상업부 곤명식용균연구소, 중국과학원미생물연구소등 여러 연구기관에서 표고에 대한 연구를 하고 있다. 또 북경농업대학, 절강농업대학, 남경농업대학, 청화대학, 복건농업대학등 많은 대학에서 표고 및 각종 식용버섯에 대한 연구와 전문교육의 실시에 열중하고 있다.

대만의 경우 표고를 많이 소비하기 때문에 일본이나 한국 등으로부터 수입을 하여왔으나, 1964년 표고 종균배양에 성공하여 원목재배 기술이 전국적으로 확대되기 시작하였다. 1974년 대만 농업시험장의 송세복(宋細福)이 표고를 비닐봉지(太空包)에 재배하는 기술을 발명하여 표고툽밥재배에 대한 연구가 여러 연구소 및 대학에서 활발히 계속되었는데 툽밥배지에서 발생된 버섯이 생산량은 그다지 많지 않았으나 표고가격이 비쌌기 때문에 경제성이 있는 것으로 판명되었다. 1982년경부터 표고 툽밥재배 농가가 급격히 늘게 되어 1987년의 경우 표고의 원목재배 생산량은 2,205톤임에 비하여 툽밥재배 생산량은 2,598톤으로 원목재배 생산량을 앞지르게 되었다. 이후 저렴한 중국(본토)산 표고의 수입과 노동단가의 상승 등으로 원목재배는 급격히 줄어드는 추세인 반면, 툽밥재배 표고의 수량은 현상을 유지하고 있다. 우리 나라와 마찬가지로 상수리나무, 굴참나무 등의 참나무류나 서나무류, 밤나무, 너도밤나무 등 각종 활엽수가 자생하고 있어 이들을 이용한 원목재배가 이루어지기도 하지만, 연구결과 원목재배로는 쓰이지 않는 혼한 나무인 상사수(相思樹; *Acacia confusa* Merr.)의 툽밥이 툽밥재배에 적합한 것으로 밝혀져 이 툽밥이 가장 많이 쓰이고 있다.

현재에도 원목재배방법을 대체하기 위해 재배방법에 대한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 고압살균(121 ℃)방식의 단점인 투자비용의 문제를 줄이기 위해 상압 살균(80-100℃) 방법 등을 연구하고 있으며 액체 종균을 만들어 자실체 수율을 높여 고비용 문제를 줄이는 방향으로 진행되고 있다. 이는 원목재배의 한계를 인정하고 단점을 보완하여 균상 재배를 새로운 표고버섯 재배 방법으로 이끌려는 움직임으로 볼 수 있다.

제 2 장 서 론

표고(藟膏; 瓢菰: Pyogo)는 예로부터 향심(香蕈), 마고(磨菰, 磨菇), 참나무 버섯 등 여러 가지의 이름으로 불리어 왔다. 중국에서는 상구(香菇: Xianggu), 일본에서는 시이타케(椎茸: Shiitake)라고 불리고 있으며, 영어로는 oak mushroom, black forest mushroom 또는 표고의 일본식 발음인 Shiitake를 쓰기도 한다. 표고는 봄, 여름, 가을에 걸쳐 참나무류(상수리나무, 신갈나무, 졸참나무 등)나 서나무, 밤나무 등 활엽수의 죽은 나무나 죽은 가지에서 발생하며 예로부터 맛이 뛰어나 송이 및 능이와 더불어 우리 나라의 3대 주요 식용 버섯으로 취급되어 왔다(이태수외, 2000).

표고버섯은 송이균목 송이버섯과에 속하는 담자균의 일종으로 오래 전부터 중요한 임산물의 하나로 간주되어 왔으며 현재도 많은 양을 생산하여 소비하고 있다. 표고버섯은 섬유소, 무기질, 비타민 특히 Vitamin D를 많이 함유하고 있으며 이밖에도 다양한 아미노산도 함유하고 있다. 근래에는 표고버섯의 약리 작용에 관한 연구가 진행되어 항암(Thimmel과 Kluthe, 1988; 무 등, 1995; Mattila 등, 2000), 지질의 과산화 방지 (최 등, 1998) 등 건강보조식품으로 그 효능이 밝혀지고 있어 소비도 증가하고 있다.

국내의 재배면적은 최근까지도 지속적으로 증가하고 있으며 미국, 유럽 등지에서도 재배가능성을 검토하고 있어 앞으로 세계적으로도 생산량이 증가할 가능성이 크다(Jong, 1992; Chang, 1996; Campbell과 Racjan, 1999). 표고버섯을 주로 재배하는 나라는 우리나라를 비롯하여 관한 중국, 일본 등인데 일본의 경우 원목 재배에 의한 생산은 정체된 상태이며 톱밥을 이용한 배지 재배가 늘고 있다(Furutsuka와 Nishokori, 1995). 원목 재배한 표고와 톱밥 재배한 표고버섯의 품질에 관한 연구도 수행되었는데 원목 재배한 표고는 탄수화물과 회분 중 Ca, Cu, Mn 등이 많은 반면 배지 재배한 표고는 함유율이 높고 단백질, K, P, Zn 등이 높다고 하여(Aoyagi등, 1993) 재배조건에 따라 품질의 차이가 있다. 그러나 일본의 경우 원목 재배에 의한 표고버섯 생산량이 제한적이고 해외로부터 원목 재배한 신선 표고의 수입이 증가하고 있는 점을 고려하면 일본의 소비자도 톱밥 재배한 표고보다는 원목 재배한 것을 선호하는 것으로 추정된다.

우리나라의 표고버섯에 대한 연구는 임업시험장의 이원목이 1922년 표고 인공증식시험을 착수한 것이 시초이다. 이원목은 전국의 표고발생지 분포를 조사하여 표고버섯이 우리나라의 남부지방 이외에도 강원도의 평창 등 5개군, 함남의 안변, 함북의 경성 등 전국적으로 자생하고 있음을 밝혔다. 또 표고인공재배기술을 개발하기 위하여 1923-1929년간 버섯이 나고 있는 골목을 가늘게 쪼개어 원목에 타입 (打入)하는 종목 감입법(種木嵌入法)과 원목에 칼로 흠집을 내어준 후 포자액을 뿌려주는 포자액 주입법, 포자액 대신 배양한 균사액을 뿌려주는 균사액 주입법, 칼로 흠집 낸 원목과 버섯이 나고 있는 버섯나무(種木)를 섞어 두는 종목 혼입법 등을 비교 시험하였다. 그 결과 골목을 가늘게 쪼개어 원목에 타입하는 종목 감입법이 가장 효과적임을 밝히기도 하였다. 1929년부터는 광릉에서 종목 감입법으로 육성한 표고골목을 전국 20개 지역에 분양하고 종목 감입법을 보급, 교육함으로써 표고재배 기술을 전국 농가에 확산시킬 수 있게 된 것이다.

일본에서는 1961년 설립된 홋켄산업(北研産業)에서 맛버섯(나메코)의 병재배용 종균생산을 주로 하여오다가 1980년대 중반 대만 및 중국에서 표고 톱밥재배가 크게 확대됨에 자극을 받아 표고 톱밥재배에 적합한 표고 종균을 개발함과 아울러 톱밥재배 기술을 실용화 보급케 되었다. 최근에는 톱밥배지 배양소도 많이 늘게 되어 '96년도의 경우 생표고 생산량 75,157톤 중 톱밥재배 생산량은 40%인 30,000톤 이상으로 추정되고 있다.

우리나라에서도 1980년대 중반부터 상수리 톱밥이나 미루나무 톱밥을 이용한 표고 톱밥재배 시험연구를 계속하면서 많은 노력을 기울였으나 잡균 오염과 버섯 발생량의 저조로 실용화되지 못하였다. 1990년 홋켄산업의 오오모리(大森清壽)가 임업연구원을 방문하여 일본의 표고 톱밥재배기술에 대한 소개를 하게 됨으로써 1991년 임업연구원의 표고연구자들이 일본을 방문, 견학하게 되었으며 이후 표고 톱밥재배에 대한 본격적인 연구가 이루어지게 되었고 1993년도부터 톱밥재배 기술을 실용화 보급할 수 있게 되었다. 1997년부터는 액체종균 접종에 의한 톱밥재배 연구도 활발히 추진되고 있다.

표고톱밥재배는 원목재배에 비하여 ①활엽수자원을 거의 100% 이용 할 수 있으며, ②재배기간이 대단히 짧아 자금회전이 빠르고, ③재배과정의 많은 부분이 기계화 할수 있어 재배의 생력화와 재배인력난 해소가 가능하며, ④톱밥

재료에 대한 버섯 수확량도 2-3배에 달하여 재배원료에 대한 생산성이 높아 고도의 재배원목자원 절약효과가 있는 등 기존의 원목재배 단점을 보완할 수 있는 많은 장점을 갖고 있다. 현재 일본, 중국, 대만등에서는 이 재배방법으로 많은 량의 표고를 생산하고 있다(민두식등, 1995) .

우리나라의 표고재배는 1905년부터 시작된 원목재배가 그 주종을 이루어 왔다. 현대적인 표고의 원목재배는 1956년에 표고종균을 순수분리 및 배양하여 여러 지방에서 시험 재배한 것이 최초로 현재까지 계속되고 있다. 그후 표고의 원목재배기술은 크게 발전하여왔으며 현재 세계 표고시장에서 한국산 표고는 고급품으로 취급되고 있는 실정이다. 그러나 표고톱밥재배는 1970년대 후반부터 국가연구기관에서는 농림업부산물인 활엽수기질과 톱밥배지를 이용한 표고품종 선발시험 과정을 통하여 시작하게 되었고, 1980년대 중반에서부터 연구가 활성화되어 배지(培地) 재료(톱밥의 종류), 첨가물의 종류, 배양조건, 버섯발생방법등에서 커다란 성과를 거두었다. 한편 몇 개소의 민간 종균배양소를 중심으로 표고톱밥재배가 시도된바 있으나 성공적인 보급에는 이르지 못하였다(이태수외, 2000).

버섯 소비의 세계적 증가 및 생산량의 급증, 재배기질로 특정 수종의 선호에 따른 환경문제 등을 해결하기 위해 재배용 대체기질에 관한 연구는 다양하게 이루어지고 있다 (Mata 와 Savoie, 1998). Park 등(1992)은 포플러류 톱밥에 Coffee waste나 탄닌산을 첨가하여 표고버섯을 생산한 결과 매우 적합한 것으로 나타났으며 Terashima (1994)는 *Pasania edulis*와 *Fagus crenata*를 이용한 표고버섯 생산실험 결과 균사생장도, 수확량, 배지의 조성분의 변화량에 큰 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다.

Chai등(1999)은 미이용 활엽수인 아카시나무(*Robinia pseudoacacia*)를 이용한 한식·약용버섯 재배에 있어 적절한 첨가물이 처리될 경우 그 생산량에 있어 졸참나무(*Quercus serrata*) 톱밥을 재배기질로 이용했을 때와 큰 차이를 나타내지 않아 그 대체가능성을 강하게 시사하였다. 또한 침엽수류 톱밥(Park 등, 1994) 및 농산폐기물을 이용한 버섯 재배에 관한 연구도 다각적으로 연구되고 있다. 일반적으로 침엽수류의 목재에 함유된 지방산(fatty acid) 이나 페놀화합물은 표고버섯의 균사생육을 억제하는 작용이 있어 재배용 기질로 적합하지 않은 것으로 인식되고 있다(Ohga 등, 1977; Kawachi 등, 1991). 하지만, Ohga

(1993)는 침엽수류의 목재를 이용한 펄프 제조시 발생하는 폐액이 표고버섯 자실체 형성을 촉진한다고 보고하였으며 Takabatak 등(1994)은 시베리아산 잎갈나무의 냉수추출물을 톱밥배지에 처리한 결과 표고버섯 균사생육이 비교구에 비해 2배나 촉진된 것으로 보고하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 버섯의 소비동향은 세계적으로 증가추세에 있음에도 불구하고 한국의 표고버섯 산업은 세계적인 생산량의 증가, 생산 단가의 상승 그리고 중국 등지에서 저단가 버섯의 대량수입으로 인해 많은 어려움을 겪고 있다. 이에 원목재배 방법을 대체 개발하고자 연구를 수행하였다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 톱밥발효배지에 관여하는 미생물

1. 연구내용 및 방법

가. 톱밥발효 배지의 제조

발효를 시키기 위한 배지는 폐면과 참나무류 톱밥을 재료로 하였다. 발효 배지 제작을 위한 배지조성은 무게비(w/w)로 하여 6:4, 7:3, 8:2, 그리고 9:1 비율로 사용하였다. 그리고 톱밥만을 사용하였을 때는 10으로 표시하였다. 수분 함량은 1.6 ℓ/kg 배지 건조무게를 첨가하였다.

수분이 첨가된 배지는 30℃에서 2일간 발효한 후 50℃에서 5일간 발효하였다.

나. 발효배지에서의 미생물 수 측정

10g 발효된 배지를 멸균된 증류수에 넣고 10배씩 희석하여 YEME 배지 (2g yeast extract + 4g malt extract + 5g glucose + 15g agar / ℓ)에 도달한 후 30℃와 50℃에서 48시간 배양하여 발효시간 별로 집락 수를 측정하였다.

다. 발효배지의 pH 측정

10g 발효된 배지를 50ml 증류수에 넣고 잘 섞은 후 pH meter (orion model 720A)를 사용하여 발효시간 별로 측정하였다.

라. 발효에 관여하는 고온성 미생물의 분리

방선균이 잘 자란 배지를 육안으로 확인 한 후 멸균된 증류수에 적당량을 희석하여 potato dextrose 배지 도달한 후 50℃에서 배양한 후 방선균의 집락을 확인하여 needle loop를 사용하여 재 접종하였다. 분리된 미생물은 3차 분리법을 사용하여 순수분리과정을 10차례 이상 반복하였다.

마. 분리균의 16srDNA 염기서열분석

1) Genomic DNA 분리

Genomic DNA 분리는 Fitcher의 방법으로 하였다. YEME 배지 (34 % sucrose) 에서 2 일간 키운 균을 수확하였다. 수확한 균체 50 mg을 TE buffer

(0.5 M EDTA (pH 8.0), 1 M Tris (pH 8.0)) 100 μ l와 섞은후 손가락으로 쳐서 균체를 현탁시켰다. 여기에 50 μ l lysozyme (50 mg/ml in TE)과 10 μ l RNase (10 mg/ml) 를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 현탁액이 맑아질 때까지 배양하였다. 이때 20 분마다 한번씩 고무 섞어 주었다.

균체가 맑아진 것이 보이면 여기에 400 μ l의 guanidine solution (5 M guanidine thiocyanate, 100 mM EDTA, 0.5 % N-laurylsacosine) 을 넣고 고무 섞으면서 반응 용액이 완전히 맑아지는 것을 관찰했다. 이것을 37 $^{\circ}$ C에서 10 분간 배양한 후 얼음에서 5 분간 lysates 시켰다. 그후 200 μ l의 7.5 M ammonium acetate를 첨가한 후 다시 얼음에서 10 분간 넣어 두었다. 여기에 400 μ l의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1 v/v) 을 넣어준 후 반응 용액이 고무 섞이도록 뒤집으면서 섞었다. 그런 후 13,000 rpm에서 15 분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 반응 용액은 3가지 층이 생성이 되는데 멸균된 팁의 끝을 가위로 절단한 후 가장 위에 층을 다른 microcentrifuge tube에 옮겼다. 옮겨진 용액에 400 μ l의 chloroform : isoamylalcohol (24:1 v/v) 을 넣은 후 뒤집으며 섞었다. 잘 섞인 용액을 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리를 하였다. 그 후 원심 분리된 용액의 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후, 용액에 0.54 volume의 차가운 isopropanol (-20 $^{\circ}$ C) 을 넣은 후 여러번 섞은 후 13,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 15 분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 pellet이 떨어지지 않도록 조심스럽게 상층액을 버린 후 500 μ l의 차가운 ethanol (70 % v/v) 로 넣은 후 세척한 후 13,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 5 분간 원심분리를 하였다. 다시 상층액을 버리고 차가운 absolute ethanol을 넣은 후 1 분간 얼음에 넣은 후 13,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 5 분간 원심분리를 하였다. 그 후 상층액을 버리고 ethanol이 제거되도록 실온에서 건조를 시켰다. 건조가 다 되었으면 tube에 증류수를 20-40 μ l 를 넣고 잘 녹인 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관했다

2) 16S rDNA 증폭을 위한 PCR 조건

16S rDNA 유전자를 증폭하기 위해 eubacteria에 특이적으로 부착하는 primer인 27F (E.coli numbering 8~27 ; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (E. coli numbering 1492~1510; 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 10 \times 반응용액(20mM Tris-HCl, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol, 0.5%Tween

20)1.5mM MgCl₂, 250 mM dNTPs(promega, USA), 40 pmol primer이며 정제된 DNA (10~80ng/ μ l)와 1U Taq polymerase (promega, USA)를 첨가하여 총 50 μ l의 혼합물을 만들고 반응을 진행시켰다. PCR 반응을 이용하였으며 PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기열처리를 한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분 72 $^{\circ}$ C에서 2분씩 30회 반복하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 8분간 처리한 후 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 증폭된 PCR 반응물은 agarose gel에서 확인하고 1.5kb 절편을 잘라낸 후 gene clean kit (BIO 101)를 사용하여 분리하였다..

3) 16S rDNA의 염기서열 결정

염기서열 결정시 사용되어진 primer는 27F(E.coli numbering 8~27 ; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')이었으며 기초과학연구소에 시료를 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 시료의 염기서열은 National center Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment search tool (BLAST)를 이용하여 수행하였다.

2. 연구결과

가. 배지재료별 미생물 수의 측정

표고 재배시 주로 쓰이는 나무는 참나무류와 서어나무이며 밤나무, 자작나무, 오리나무 등이 사용되기도 한다. 참나무류(*Quercus* spp.)에는 상수리나무, 졸참나무, 신갈나무(물참나무 포함), 갈참나무, 굴참나무 등 여러 가지의 수종이 있다 (이태수 외, 2000) 배지를 발효하여 표고버섯을 재배하기 위해 기본적으로 참나무류 톱밥을 선정하였다. 그러나 톱밥은 셀룰로스 뿐만 아니라 리그닌, 헤미셀룰로스등 미생물이 이용하기 어려운 성분이 많기 때문에 다른 버섯재배에 쓰이는 벚짚이나 폐면 등을 부재료로 선택하였다. 벚짚이나 폐면은 미생물에 의해 쉽게 이용될 수 있는 셀룰로스가 풍부하며 자연상태에서 노출된 재료이기 때문에 톱밥보다는 미생물이 풍부할 것이므로 발효에 필요한 미생물 공급원으로도 사용하고자 하였다.

그림 1과 2에서 보는 바와 같이 재료에 따라 각기 자라는 미생물의 형태가 다른 것을 알 수 있다. 이 그림에서는 곰팡이의 성장을 관찰 할 수 없는 이유는 YEME 한천배지에서는 일반 세균이 잘 자라는 배지이며 곰팡이는 이보다 pH가 낮은 감자한천배지에서 잘 자라며 일반 세균의 성장이 곰팡이 보다 빠르기 때문으로 생각된다.

각기 재료에 있는 미생물들은 집락의 형태로 보았을 때 서로 다른 미생물로 보이며 그 수도 차이가 많은 것으로 나타났다. 표 1에 나타난 것과 같이 중온성 미생물의 경우 폐면과 톱밥에서 비슷한 미생물 수를 존재하지만 고온성 미생물의 경우 톱밥보다 폐면에서 미생물의 수가 400배 정도 많은 것으로 나타났다. 또한 미강에서는 중온성과 고온성 미생물이 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 고온성 발효를 하기 위해서는 고온성 미생물이 많은 폐면이 중요한 역할을 할 것으로 보인다. 그러므로 배지발효를 하기 위해 폐면의 비율을 적절히 조절하는 것이 발효의 중요한 요인으로 작용할 것으로 생각된다.



툽밥

폐면

그림 1. 재료에 따른 30°C에서 성장하는 중온성 미생물
; 폐면과 툽밥의 재료를 멸균된 증류수에 섞은 후 YEME 한천배지에 접종하여 30°C에서 배양.



툽밥

폐면

그림 2. 재료에 따른 50°C에서 성장하는 고온성 미생물
; 폐면과 툽밥의 재료를 멸균된 증류수에 섞은 후 YEME 한천배지에 접종하여 50°C에서 배양.

표 1. 배지 재료별 미생물 수 측정

미생물수 \ 재료	폐면	툽밥	미강	비고
중온성미생물 (30℃에서 배양)	75×10^4	54×10^4	8×10^2	폐면이 툽밥보다 1.3 배 많다
고온성 미생물 (50℃에서 배양)	47×10^4	12×10^2	12	폐면이 툽밥보다 390배 많다

나. 배지 발효과정에서의 미생물 성장

발효과정은 30℃에서 2일간 발효한 후에 50℃에서 5일간 발효하여 총 7일간 발효하였을 때 미생물의 변화를 관찰하였다. 배지발효를 위한 온도는 30℃에서 2일 50℃에서 5일을 설정하였다. 배양기에서 느타리버섯과 양송이버섯은 모두 발효된 배지에서 성장하는 버섯이다. 배지를 발효하기 위해서는 두 버섯 모두 야외발효과정과 후 발효과정, 2단계의 과정을 거치게 된다(Fermor과 Grant, 1985). 그러므로 발효의 두 단계는 버섯배지의 발효과정에서 일반적 사실로 되어 있다. 야외발효과정은 미생물증식과 미생물 천이를 이루어 고온성 미생물 성장을 유도하는 단계이며 후 발효과정은 고온성 미생물에 의해 당당류의 영양원을 소비시키고 다당류를 축적시키며 버섯균사에 필수적인 중요 지방산 축적등을 이루어 배지재료의 물성과 영양분 축적 등이 일어나도록 돕는 단계이다(Stanek, 1972). 이와 같이 발효는 두 단계로 이루어져야 하지만 배양기에서 실험실 소규모 발효로 발효할 때 야외발효와 같은 첫 단계를 진행할 수 없으므로 인위적으로 30℃의 중온을 설정하여 중온성 미생물의 발달을 유도하였다. 발효과정에서 중온성 미생물의 변화를 보기 위해 YEME 배지를 이용하여 30℃에서 배양하였고 고온성 미생물의 변화를 보기 위해서 50℃에서 배양하였다.

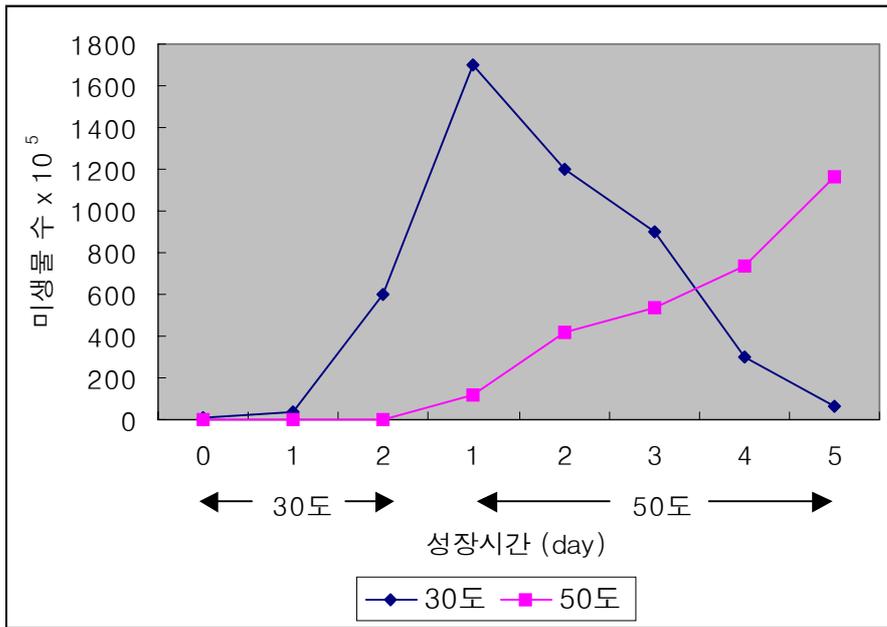


그림 3. 발효시간에 따른 폐면 배지에서의 미생물 성장변화

- , 30℃; 30℃에서 배양한 중온성 미생물
- , 50℃; 50℃에서 배양한 고온성 미생물

폐면 만을 사용하여 발효하였을 때는 그림 3에서 보는 바와 같이 30℃에서 2일간 배양하면 중온성 미생물은 초기 보다 600 배정도 증가하여 50℃에서 1일 배양 할 때까지 계속 성장하여 최고 1,800배까지 증가하였다. 그 후부터는 계속적으로 감소하여 50℃ 발효 5일 에서는 초기의 미생물 수만큼 감소하였다. 고온성 미생물은 30℃에서 발효하는 동안에는 거의 변화하지 않다가 50℃ 발효 1일부터 증가하기 시작하여 50℃ 발효 5일에 1,200배까지 성장하였다.

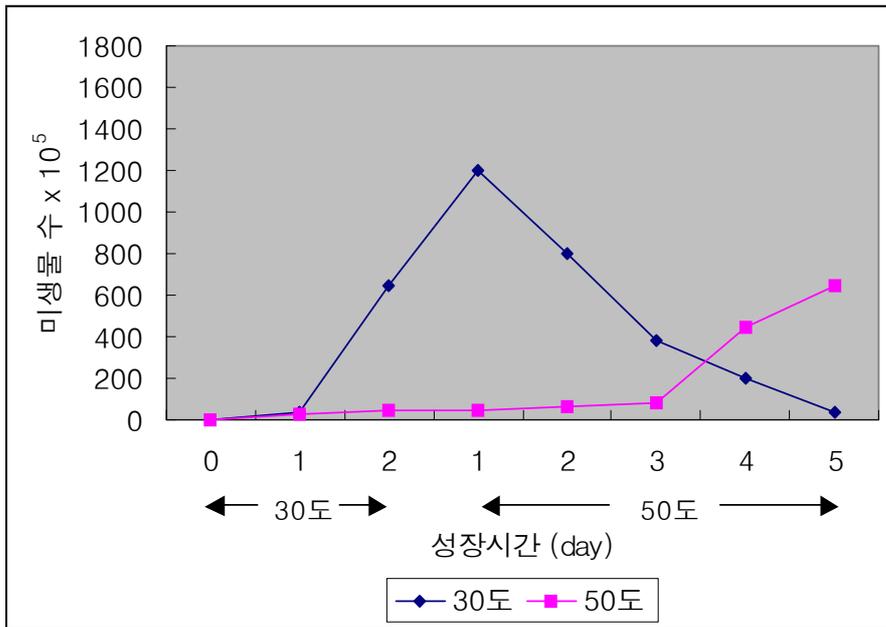


그림 4. 발효시간에 따른 폐면: 톱밥 (5:5) 배지에서의 미생물 성장변화

- , 30°C; 30°C에서 배양한 중온성 미생물
- , 50°C; 50°C에서 배양한 고온성 미생물

톱밥과 폐면의 비율을 5:5로 하였을 때 그림 4에서 보는 바와 같이 30°C에서 2일간 배양하면 중온성 미생물은 초기 보다 700배정도 증가하였고 50°C에서 1일 배양 할 때까지 계속 성장하여 최고 1,300배까지 증가하였다. 그 후부터는 계속적으로 감소하여 50°C 발효 5일 에서는 초기의 미생물 수만큼 감소하였다. 고온성 미생물은 30°C에서 발효하는 동안에는 거의 변화하지 않다가 50°C 발효 3일부터 증가하기 시작하여 50°C 발효 5일에 600배까지 성장하였다

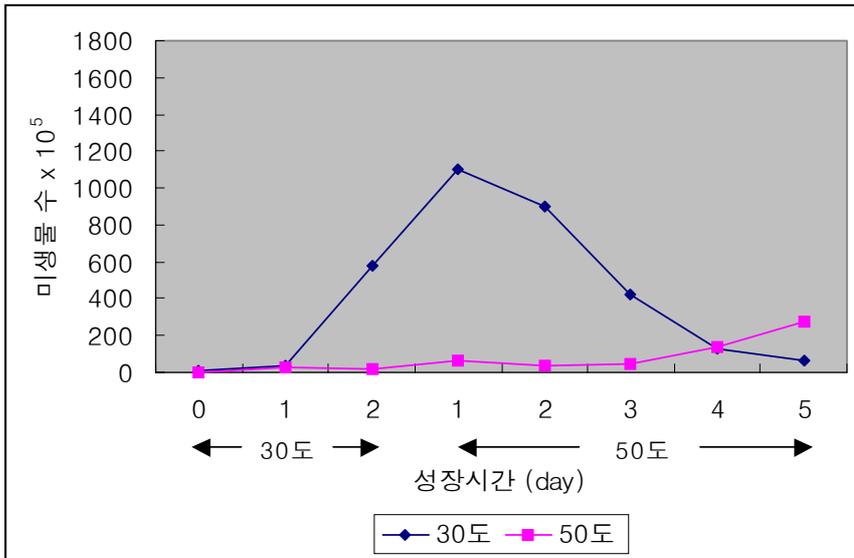


그림 5. 발효시간에 따른 툽밥 배지에서의 미생물 성장변화

- , 30°C; 30°C에서 배양한 중온성 미생물
- , 50°C; 50°C에서 배양한 고온성 미생물

툽밥만을 사용하여 발효하였을 때 그림 5에서 보는 바와 같이 30°C에서 2일간 배양하면 중온성 미생물은 초기 보다 600배정도 증가하였고 50°C에서 1일 배양 할 때까지 계속 성장하여 최고 1200배까지 증가하였다. 그 후부터는 계속적으로 감소하여 50°C 발효 5일 에서는 초기의 미생물 수만큼 감소하였다. 고온성 미생물은 30°C에서 발효하는 동안에는 거의 변화하지 않다가 50°C 발효 3일부터 증가하기 시작하여 50°C 발효 5일에 300배까지 성장하였다

위의 3가지 재료에 따라 발효를 하였을 때 중온성 이나 고온성 균의 수는 폐면 만을 가지고 하였을 때 가장 성장이 좋았으며 툽밥이 첨가할수록 미생물의 성장은 감소하였다. 중온성 미생물의 차이는 크지 않았으나 고온성 미생물의 차이는 폐면 만으로 발효할 때와 툽밥만을 가지고 발효 할 때를 비교해 보면 4배 이상의 차이를 보였다. 이러한 미생물의 차이는 재료를 발효시키는데 중요한 요인으로 작용할 것이다. 발효과정이란 미생물의 활성에 의해 배지재료가 영양분 재조합을 통해 잡균의 오염을 줄이고 버섯균사가 잘 자랄 수 있게 하는 과정인데 미생물이 충분히 자라지 않으면 영양분 재조합이 충분히 이루

어지지 않아 오염을 일으키거나 버섯균사가 성장하기에 적합하지 않게 된다.

그러므로 고온성 미생물의 충분한 성장이 발효 배지에 중요한 요인으로 작용할 것이므로 배지의 톱밥비율이 높더라도 미생물이 충분히 자랄 수 있는 조건을 찾는 것이 중요할 것으로 보인다.

다. 발효에 관여하는 고온성 미생물 분리

발효의 과정은 미생물의 성장활동에 의해 발산되는 열로 자연스럽게 배지 재료의 온도가면서 미생물 천이가 일어나 고온성 미생물이 점차 증가하여 고온성 발효가 이루어진다. 그러므로 고온성 미생물은 배지의 발효에 가장 중요한 요인이기 때문에 고온발효에 관한 연구에서 반드시 발효에 관여하는 고온성 미생물을 분리하여 그 특징을 밝히는 과정이 필수적이다. 이에 따라 발효에 관여하는 많은 고온성 미생물들이 분리되고 그 특징을 알아내었다 (Alfredsson, 1985; Strom, 1985; Trello, 1996). 그러므로 30℃ 정도의 중온에서 자라는 미생물은 발효과정에서 고온성 미생물을 성장시키기 위한 과정으로 고온성 발효의 영양원으로 작용하여 고온성 미생물들을 자라게 하기 때문에 발효에 관여하는 중심 미생물은 고온성 미생물이라고 할 수 있다. 그 중 고온성 방선균은 발효에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 느타리버섯 재배의 경우 폐면이나 벗짚을 발효하게 방선균이 자라게 되는데 이러한 현상을 흔히 백화현상이라 하여 버섯재배의 적합성여부를 판가름하는 지표로 사용된다. 본 실험에서도 고온성 발효에 중심적 역할을 할 것으로 생각되는 이러한 방선균을 분리하여 그 특성을 알아내고자 하였다. 방선균 성장의 최적조건들을 발효의 조건에 적용하고자 하였다.

방선균을 분리하기 위해 다양한 비율로 첨가된 폐면과 톱밥 배지를 발효하여 방선균의 성장이 육안으로 관찰된 재료를 방선균 분리 시료로 사용하였다. 우선 방선균이 자란 부분을 현미경으로 20×로 관찰하여 needle loop를 사용하여 YEME 배지에 접종하였다. 접종된 배지에서는 방선균 집락을 형성하였지만 순수분리 하기 위해 재차 접종하였을 때에는 전혀 자라지 않았다.



A

B

C

그림 6. YEME 배지에서 분리된 고온성 세균의 성장 비교

A; 50℃에서 3일간 배양한 *Thermobifida cellulolytica* DK-2

B; 50℃에서 3일간 배양한 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1

C; 50℃에서 3일간 *T. cellulolytica* DK-2 와 *Pseudoxanthomonas* sp.

DK-1 의 혼합 배양

이와 같은 방법으로 수십 차례 재 접종 과정에서 방선균의 집락이 형성되는 것을 발견하였다. 이 방선균을 다시 재 접종한 결과 노란색의 색소를 나타내는 세균이 오염되어 있었고 이 균을 방선균과 분리하기 위해 계속적으로 재 접종을 하였지만 계속해서 이 세균과 함께 같이 자라던가 아니면 방선균이 자라지 못하였다. 그러나 포자를 형성하지 않고 간균인 노란색 세균은 순수분리가 가능하였다(그림 6). 이러한 결과는 노란색 세균은 쉽게 분리할 수 있지만 방선균은 노란색 세균의 의존적으로 자랄 것을 판단되어 노란색 세균을 50℃에서 액체 배양을 하여 균을 제거하고 배양한 배양여액을 멸균하여 방선균 분리를 위한 배지로 사용하였다.

그 결과 이 배양 여액 배지에서 방선균을 자라게 할 수 있었다. 분리된 방선균은 다시 YEME 배지에 접종을 하면 자라지 못하였다. 그러나 분리된 노란색 세균과 혼합 접종을 하면 방선균이 잘 자라는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 방선균은 일반 영양배지에서는 자라지 못하지만 노란색 세균이 있으면 노란색 세균을 이용하여 잘 자라게 되는 것으로 보인다. 이러한 현상은 방선균이 다른 세균에 의존적으로 자라는 것을 보여주는 결과이다.

라. 16S rDNA 염기서열 분석

현미경 상에서 간균의 형태를 보이는 노란색 고온성 세균을 16S rDNA 염기서열을 분석하여 EMBL/ gene bank Database와 비교해 볼 결과 *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3와 98% 유사도로 나타났다(그림 7). 이 균은 셀룰로스 기질을 분해하는데 관여하는 미생물로 NCBI gene bank에 등록이 되어있다. 또한 노란색 색소를 분비하는 *Pseudoxanthomonas broegbernsis*와는 94%의 유사성을 보였다. 본 실험에서 분리된 노란색 세균과 일치하는 점이다. 본 실험에서 분리한 이 균을 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1로 명명하였다.

고온성 방선균은 16S rDNA 염기서열을 분석하여 EMBL/ gene bank Database와 비교해 볼 결과 *Thermobifida cellulolytica* 와 99% 이상 유사성을 보여 본 실험에서 분리한 방선균은 *Thermobifida cellulolytica* DK-2로 명명하였다(그림8). *Thermobifida cellulolytica*는 Actinomycetales; Streptosporangineae; Nocardopsaceae; Thermobifida에 속해 있으며 양송이 발효배지로 사용되는 manure compost에서 분리되었으며 lignocellulose decomposing actinomycete로 알려졌다.(Kukolya.등, 2002) 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 조사해본 결과 이 두개의 균 모두 발효에 관여하는 미생물인 것으로 나타났다.

Identities = 711/721 (98%)

```
1   tcctatgccggcagtgccggacgggtgaggagcacatcggaaatctactccgtcgtggg 60
   |||
85  tcctatgccggcagtgccggacgggtgaggaaacacatcggaaatctactccgtcgtggg 144
   |||
61  gataacgtagggaaacttacgctaataccgcatacaccctaagggtgaaagtgggggac 120
   |||
145 gataacgtagggaaacttacgctaataccgcatacacc- taagggtgaaagtgggggac 203
   |||
121 cgcaaggcctcacgcgatggaaatgagccgatgtccgattagctagtggcgggtaagg 180
   |||
204 cgcaaggcctcacgcgatggaaatgagccgatgtccgattagctagtggcgggtaagg 263
   |||
181 cccaccaaggcgacgatcggtagctggctgagaggatgatcagccacactgggactgag 240
   |||
264 cccaccaaggcgacgatcggtagctggctgagaggatgatcagccacactgggactgag 323
   |||
241 acacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaaatattggacaatgggcgaaagcc 300
   |||
324 acacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaaatattggacaatgggcgaaagcc 383
   |||
301 tgatccagccatgccgcgtgggtgaagaaggccttcgggttgtaaagccctttgttgg 360
   |||
384 tgatccagccatgccgcgtgggtgaagaaggccttcgggttgtaaagccctttgttgg 443
   |||
361 gaagaaatcctgctggctaatacccggcggggatgacggtacccaaagaataagcaccgg 420
   |||
444 gaagaaatcctgctggctaatacccggcggggatgacggtacccaaagaataagcaccgg 503
   |||
421 ctaacttcgtgccagcagccggttaatacgaagggtgcaagcgttactcggaaattactg 480
   |||
504 ctaacttcgtgccagcagccggttaatacgaagggtgcaagcgttactcggaaattactg 563
   |||
481 ggcgtaaagcgtgcgtaggtggcttaagtccgttgtaaagccctgggctcaacctg 540
   |||
564 ggcgtaaagcgtgcgtaggtggcttaagtccgttgtaaagccctgggctcaacctg 623
   |||
541 ggaattgcagtgagatactgggtcactagagtgtggtagaggggtggcggaattcccggtg 600
   |||
624 ggaattgcagtgagatactgggtcactagagtgtggtagaggggtggcggaattcccggtg 683
   |||
601 agccagtgaaatgcgtagagatcgggagggaacaccggtggcgaaggcggcaccctggg 660
   |||
684 ag-cagtgaaatgcgtagagatcgggagggaacaccggtggcgaaggcggcaccctggg 742
   |||
661 aacactgac-cttaggcaccnaaagcgtnggggagcaaacaggattagatcccctggtag 719
   |||
743 aacactgacactgaggca-cgaaagcgt-ggggagcaaacaggattagatcccctggtag 800
   |||
```

그림 7. *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 과의 16S rDNA 염기서열 비교

Identities = 718/720 (99%)

```
1   cctgcccctgactctgggataagcctgggaaccgggtctaataccggatatgactcctg 60
   |||
84  cctgcccctgactctgggataagcctgggaaccgggtctaataccggatatgactcctg 143

61  ctcgcatgggtgggggtggaaagggttggttttccttccggtcggggaaggctcgcggcc 120
   |||
144 ctcgcatgggtgggggtggaaagggttggttttgcttccggtcggggaaggctcgcggcc 203

121 tatcagcttgttggtgggggtgacggcctaccaaggcga tgacgggtagccggcctgagag 180
   |||
204 tatcagcttgttggtgggggtgacggcctaccaaggcga tgacgggtagccggcctgagag 263

181 ggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctcgggaggcagcagtgagg 240
   |||
264 ggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctcgggaggcagcagtgagg 323

241 gaaatattgcgcaatgggcggaagcctgacgcagcgcgcgctggggga tgaaggcctt 300
   |||
324 gaaatattgcgcaatgggcggaagcctgacgcagcgcgcgctggggga tgaaggcctt 383

301 cgggttgtaaacctcttttaccactcacgaggccttggttttcctgggggtgacggta 360
   |||
384 cgggttgtaaacctcttttaccactcacgaggccttggttttcctgggggtgacggta 443

361 ggtggtgaa taaggaccggctaaactacgtgccagcagccgcggtaa tacgtagggtccga 420
   |||
444 ggtggtgaa taaggaccggctaaactacgtgccagcagccgcggtaa tacgtagggtccga 503

421 gcgttgccggaattattgggcgtaaaagagctcgtaggcggcctgtcgcgtctgctgta 480
   |||
504 gcgttgccggaattattgggcgtaaaagagctcgtaggcggcctgtcgcgtctgctgta 563

481 aagtcggggccttaactcgggtgtgcagtgatagcggcaggccttaggtaggtagggg 540
   |||
564 aagtcggggccttaactcgggtgtgcagtgatagcggcaggccttaggtaggtagggg 623

541 agactggaaatcctgggttagcgggtgaaatgcgagataatcaggaggaacaccggtggcg 600
   |||
624 agactggaaatcctgggttagcgggtgaaatgcgagataatcaggaggaacaccggtggcg 683

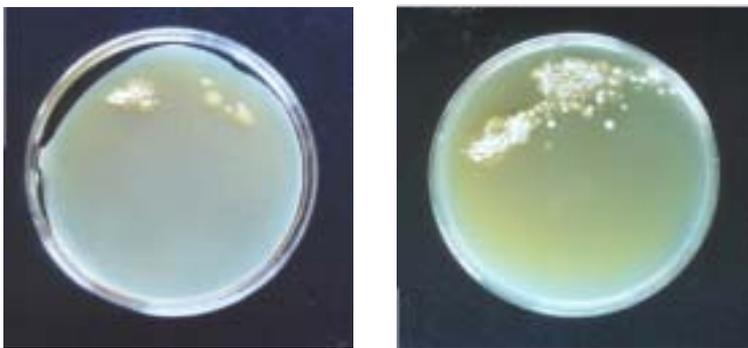
601 aaggcgggtctctgggccttacctgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacagga 660
   |||
684 aaggcgggtctctgggccttacctgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacagga 743

661 ttaga taccctggtagtccacgccgtaaacgttgggcgctagggtgtggggactttccacg 720
   |||
744 ttaga taccctggtagtccacgccgtaaacgttgggcgctagggtgtggggactttccacg 803
```

그림 8. *Thermobifida cellulolytica* 와의 16S rDNA 염기서열 비교

마. *Thermobifida cellulolytica* DK-2의 증식배지

Pseudoxanthomonas sp. DK-1은 일반영양배지 즉 nutrient agar (Difco), YEME agar(Difco), PDA agar(Difco) 그리고 tryptic soy agar(Difco)등에서 잘 자라지만 분리된 *Thermobifida cellulolytica* DK-2 는 일반 영양배지에서는 자라지 못하고 (그림 9. A) *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1의 배양여액 과 tryptic soy agar (그림 9. B)에서만 성장한다. 그러나 tryptic soy agar에서는 배양시간이 5일 정도로 길며 성장상태도 좋지 않았다. 또한 이 두 종류의 배지에서 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2를 혼합하여 키운 것보다는 성장상태가 양호하지 못했다.



A

B

그림 9. triptic soy 배지 (A)와 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1를 배양한 YEME 배양여액 배지 (B)에서 성장한 *Thermobifida cellulolytica* DK-2

바. pH에 따른 고온성 미생물의 성장특성

Pseudoxanthomonas sp. DK-1는 pH 5에서 자라지 못하며 6에서부터 자라 최적 성장은 7로 나타났다(그림 10). *Thermobifida cellulolytica* DK-2는 pH 7에서부터 자라기 시작하여 8에서 최적 성장을 보였고 7에서 보다 9에서 더 잘 자라 알칼리 조건에서 성장이 더 우수한 것으로 나타났다. pH 변화에 따른 두 균주의 최적 성장차이는 발효과정에서의 두 균주의 관계를 잘 나타내주는

결과이다. 발효하기 위해 준비된 배지의 pH는 약 5.8-6.2 사이를 나타내는데 발효가 진행됨에 따라 pH가 증가하게 된다. pH 6정도인 발효초기에는 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1이 먼저 자라고 발효가 진행됨에 따라 pH가 증가하면 *T. cellulolytica* DK-2이 자랄 수 있는 pH가 되어 이미 자라있는 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1을 이용하여 성장하게 될 것으로 생각된다. 이러한 관계는 최적의 pH가 동일할 때 보다 효과적으로 발효에 관여할 것으로 생각된다.

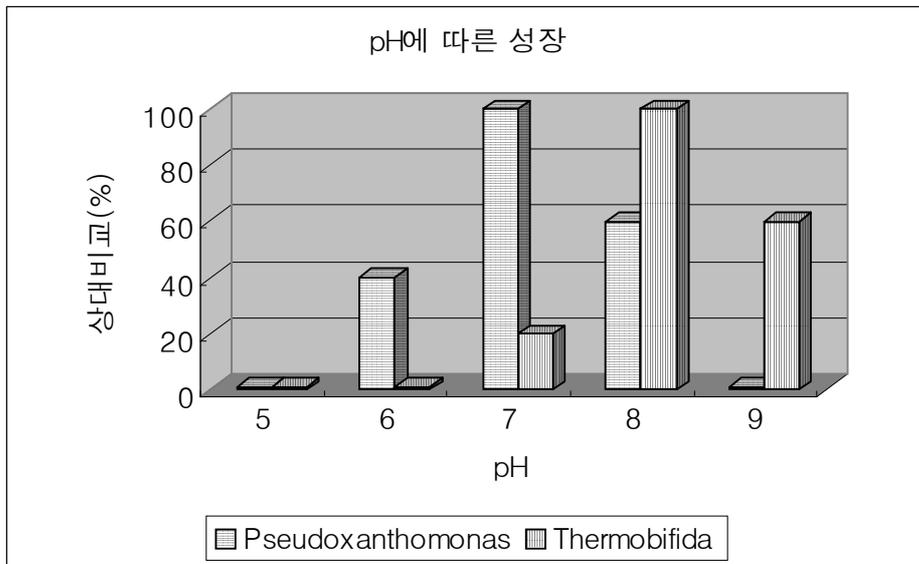


그림 10. pH에 따른 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2의 최적성장

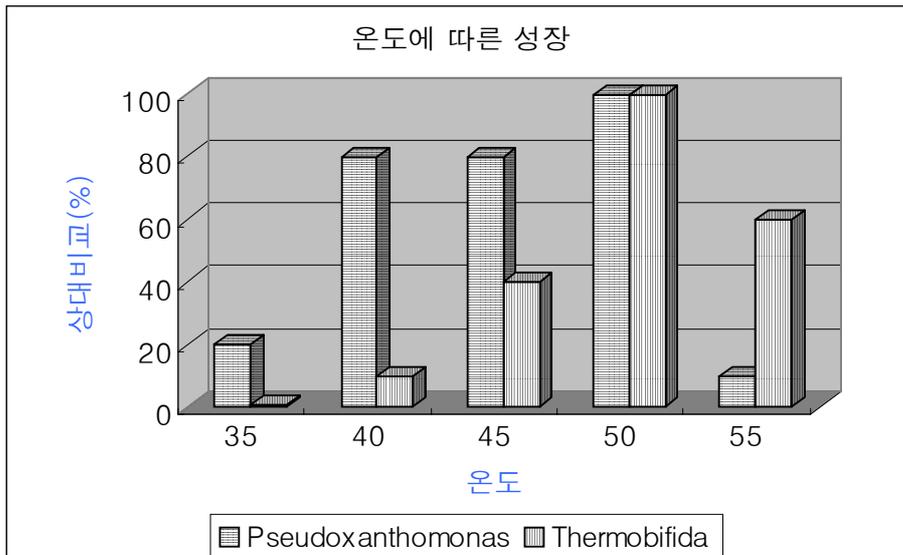


그림 11. 온도에 따른 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2의 최적성장

사. 성장온도에 따른 고온성 미생물의 성장특성

Pseudoxanthomonas sp. DK-1은 35°C에서 자라기 시작하여 50°C에서 최적의 성장을 나타냈다 (그림 11). 반면 *T. cellulolytica* DK-2는 45°C에서 자라기 시작하여 50°C에서 최적의 성장을 보였고 55°C에서 45°C보다 더 잘 자랐다. 성장 온도변화에 따른 두 균주의 최적 성장 차이로 발효과정에서의 두 균주의 특성을 설명할 수 있다. 발효초기온도는 계절에 따라 차이는 있지만 실내온도가 27°C 정도에서 시작하였다고 가정하면 시간에 지남에 따라 온도가 증가하여 55°C 정도를 유지할 수 있다. 이러한 발효온도 변화에서 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1은 발효온도가 상승함에 따라 *T. cellulolytica* DK-2 보다 먼저 성장하게 되고 *T. cellulolytica* DK-2이 자랄 수 있는 온도에 이르면 이미 자라있는 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1을 이용하여 *T. cellulolytica* DK-2이 성장하는 것으로 생각된다. 이러한 관계는 최적의 온도가 동일할 때 보다 효과적으로 발효에 관여할 것으로 생각된다.

2절 톱밥 발효배지에서 표고균사성장에 미치는 요인

1. 연구 내용 및 방법

가. 표고버섯 접종용 균주제작

1) 배지의 제작

종균제작을 위한 배지조성은 무게비(w/w)로 톱밥 80%, 미강 20%로 사용하였다. 배지재료를 혼합하여 충분히 섞은 다음 수분함량이 75%되게 배지를 조제하였다. 조제된 배지를 850cc 병에 채워 넣고 고압살균방법을 사용하여 121℃에서 60분 살균하였다.

2) 균사배양

22℃에서 40일간 배양하여 접종원으로 사용하였다.

나. 발효배지에 의한 표고균사성장

1) 발효배지 제작

발효를 시키기 위한 배지는 폐면과 참나무류 톱밥을 재료로 하였다. 발효 배지 제작을 위한 배지조성은 무게비(w/w)로 하여 톱밥과 폐면을 6:4, 7:3, 8:2, 그리고 9:1 비율로 사용하였다. 그리고 톱밥만을 사용하였을 때는 10으로 표시하였다. 수분함량은 1.6 l/kg 배지 건조무게를 첨가하였다. 수분이 첨가된 배지는 30℃에서 2일간 발효한 후 50℃에서 5일간 발효하였다.

2) pH 변화에 의한 발효배지제작

배지의 pH를 변화시키기 위해 KOH를 물에 첨가하여 배지의 pH를 5, 6 그리고 7로 적정하고 난 후 배지를 발효하였다.

3) 무기질소원 농도변화에 의한 발효배지제작

무기 질소원으로 사용된 성분은 ammonium nitrate (NH_4NO_3), ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 그리고 urea (NH_2CONH_2) 등이다. 각각의 농도는 물 1 l 에 각각 2g, 4g 그리고 6g을 첨가하여 배지에 kg 당 1.6 l 를 첨가하였다.

4) 무기이온 농도변화에 따른 발효 배지제작

무기이온은 K_2HPO_4 를 사용하여 물 1 l 에 각각 0.1g 단위로 0.8g까지 첨

가하여 배지에 kg 당 1.6 ℓ를 첨가하였다.

5) 유기물 첨가에 따른 발효배지제작

유기 질소원으로 사용된 재료는 미강(쌀겨)과 밀기운을 사용하였다. 배지의 미강 첨가는 재료의 건조 무게 비율로 하여 18% 로 하여 톱밥과 미강을 섞은 후 폐면을 첨가하였다.

다. 분리된 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2이 발효에 미치는 영향

1) *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2의 배양 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2를 배양하기 위해 YEME (4g yeast extract + 10g malt extract +5g glucose + 15g difco agar) 평판배지를 사용하였다. *Thermobifida*를 배양하기 위해 *Pseudoxanthomonas*를 24시간 배양한 배양여액에 YEME를 섞어 만들 배지를 사용하였다. *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2을 혼합배양하기 위해서 YEME 평판배지에 두 균주를 섞어 도말하였다. *Pseudoxanthomonas*와 *Thermobifida*를 혼합 접종한 경우에는 *Pseudoxanthomonas*는 배양24시간에 먼저 자라다가 24시간 이후부터 *Thermobifida*가 자라기 시작 하였다.

2) *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2의 폐면에 첨가효과

100g 폐면을 두 개의 비이커에 각각 담은 후 알루미늄 호일로 비이커를 막고 121℃에서 30분간 처리하여 폐면에 있는 미생물을 멸균하였다. *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2를 혼합 배양한 YEME 평판배지에 10ml의 멸균된 증류수를 넣고 면봉으로 수확하였고 *T.cellulolytica*도 같은 방법으로 수확하였다. 100g의 멸균된 폐면에 세균 현탁액과 혼합한 후 50℃에서 3일간 발효하였다.

3) *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2 의 발효배지에 첨가효과

Pseudoxanthomonas sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2를 각각 배양하여 한 개의 배지에 10ml의 증류수로 넣어 얻은 세균 현탁액을 각각

5ml 씩 취한 후 두 균을 섞어 10ml이 되게 하였다. 두 균주가 혼합된 용액은 320ml 멸균된 증류수에 각각 100, 200, 500 그리고 1000 μ l씩 접종하였다. 8:2 (w/w) 비율의 톱밥: 폐면 200g에 9%의 미강을 넣고 320ml의 균이 혼합된 증류수와 섞어 발효를 하였다.

라. 표고균사 접종

발효가 완성된 배지는 2.5 ℓ (15 x 10 x 22cm)용기에 절반을 담고 그 위에 종균을 접종한 후 다시 절반을 담아 샌드위치식 접종을 하여 균사성장을 관찰하였다.

마. 균사 배양

접종된 배지는 22 $^{\circ}$ C에서 배양하여 10일 후에 종균이 접종된 배지 중앙에서 위 아래로 균사 성장 길이를 측정하여 10일간의 균사성장 길이를 측정하였다.

균사밀도는 육안 관찰에 의해 진하고 굵게 균사가 자라면 +++으로 표시하였고 균사 성장이 가늘게 자라면 +로 상대적 비교를 하였다.

바. 오염관찰

발효가 끝난 배지는 종균을 접종하지 않고 2.5 ℓ (15 x 10 x 22cm)용기에 담아 22 $^{\circ}$ C에서 20일 배양하여 곰팡이의 성장 유무를 육안으로 관찰하였다.

사. 발효배지에 적합한 품종 개발

톱밥 발효배지에 성장이 적합한 품종을 선별하기 위해 호켄 600균주를 모균주로 하였다. 선별 방법은 발효된 톱밥배지를 상자(15 x 10 x 22cm)에 담고 그 위에 분쇄된 종균을 흩어 뿌려 배지 위에 종균이 드문드문 자라게 하였다. 종균이 접종된 배지를 23 $^{\circ}$ C에서 배양하여 5일 후 가장 성장이 좋은 균사를 무균적으로 채취하여 PDA 한천배지에 접종하여 오염된 균주를 제외하고 오염이 되지 않은 균주를 순수분리 하여 재차 PDA 한천배지에 계대 배양을 하였다. 모 균주보다 성장 상태가 양호한 균주를 멸균된 종균 배지(톱밥: 미강 8:2w/w)에 접종하여 발효배지에 접종할 종균으로 사용하였다. 이와 같은 방법을 3회 이상 반복하여 가장 성장이 좋은 균주를 분리하였다. 이와 같은 방식으로 계속하여 발효배지에 적합한 품종을 선별하였다.

2. 연구결과

가. 배지의 발효

표고버섯 성장에 적합한 배지 조성을 찾기 위해 폐면과 참나무류 톱밥을 주 재료로 하였다. 재료를 퇴비화 시키는데 있어 pH, C/N 비율, 입도, 온도, 습도 그리고 산소등 여러 가지 요인이 작용이 복합적으로 작용이 된다.(유영석등, 1999; suler와 finstein, 1977; Kuter, 1985). 이런 다양한 요인 중에서 우선 pH와 C/N 비율 그리고 입도가 발효에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 폐면과 톱밥의 비율을 다르게 하였을 때 표고균사 성장의 차이를 보고자 하였다. 그리고 배지의 pH를 인위적으로 변화시켜 표고버섯 성장에 적합한 발효배지의 최적 pH를 알아보려고 pH를 5와 6 그리고 7로 배지 pH를 변화시켰다.

폐면과 톱밥의 비율을 다르게 하여 균사성장 상태를 관찰한 결과 pH5 로 배지를 적정한 후 발효를 한 배지는 발효 후 pH가 폐면과 톱밥의 비율에 따라 차이를 보였다. (표 1) 반면 pH 6과 7로 적정한 배지에서는 폐면과 톱밥의 비율에 따라 상대적으로 적은 pH 차이를 보였다 (표2와 3).

폐면과 톱밥의 조성비율에서 톱밥의 비율이 증가할수록 pH가 점차 낮아지는 것으로 나타났다.(그림 1) 이러한 결과를 미생물 성장과 연관지어보면 미생물 성장이 잘 되면 배지의 pH를 알카리 쪽으로 변화를 시키는데 톱밥의 비율이 많을수록 미생물 성장이 충분히 일어나지 않아 알카리 쪽으로의 pH 변화가 일어나지 않는 것으로 보인다.

pH에 따른 표고균사 성장을 보면 초기 pH 7보다 5와 6에서 더 성장이 좋은 것으로 나타났고 배지 성분으로 톱밥의 비율이 증가할수록 표고균사 성장이 더 좋은 것으로 나타났다. 이는 초기 pH 변화와 상관없이 나타난 결과로 표고균사가 pH 5.5 부근에서 잘 자라는 성질 때문에 pH 영향에 의해 나타난 결과로 보인다. 그러므로 배지의 성분에서 톱밥의 비율이 증가하면 발효 후 배지의 pH가 낮게 되어 표고균사 성장에 적합한 것으로 보인다. 폐면과 톱밥의 비율이 9:1인 배지를 초기 pH 6에서 발효한 배지에서 10일 동안의 표고균사가 7.2cm로 가장 좋았다.

표 1. pH 5 배지에서 배지 성분 비율에 따른 균사 성장 특징

배지조성 (%) [*]	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도 [†]
6:4	8.2	4	++
7:3	7.8	4.8	++
8:2	7.3	5.4	++
9:1	6.2	6.2	++
10:0	4.5	5.9	++

* ; 톱밥 : 폐면의 비율

6 : 4 배지 ; 60% 톱밥+ 40% 폐면을 100%로 하는 배지

7 : 3 배지 ; 70% 톱밥+ 30% 폐면을 100%로 하는 배지

8 : 2 배지 ; 80% 톱밥+ 20% 폐면을 100%로 하는 배지

9 : 1 배지 ; 90% 톱밥+ 10% 폐면을 100%로 하는 배지

10 배지 ; 100% 톱밥+ 0% 폐면을 100%로 하는 배지

† ; +, week ++, normal +++, well

표 2. pH 6 배지에서 배지 성분 비율에 따른 균사 성장 특징

배지조성 (%)*	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
6:4	7.7	3.6	++
7:3	7.5	5	++
8:2	7.6	5.3	++
9:1	6.2	6.8	+++
10:0	5	6.2	++

* ; 톱밥 : 폐면의 비율

표 3. pH 7 배지에서 배지 성분 비율에 따른 균사성장 특징

배지조성 (%)*	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
6:4	8.3	3.2	+
7:3	8.0	4.4	+
8:2	7.6	3.8	++
9:1	7.3	5.0	++
10:0	6	5.2	++

* ; 톱밥 : 폐면의 비율

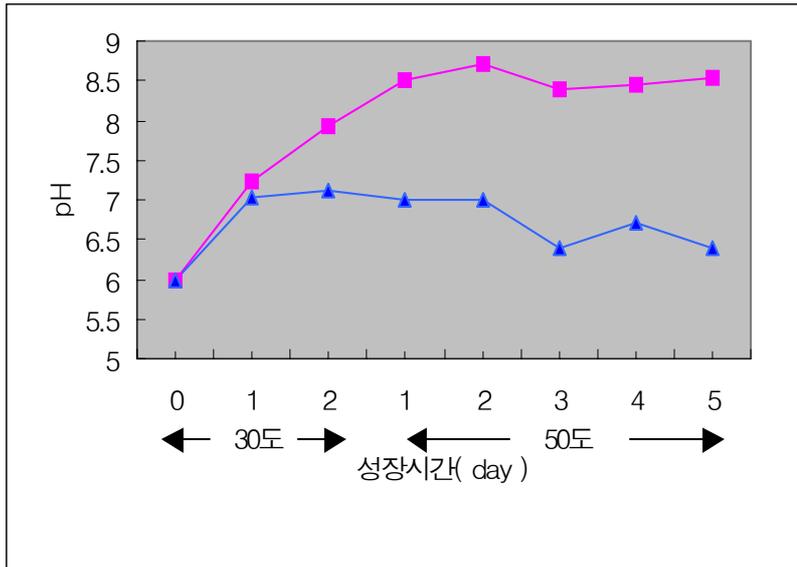


그림 1. 발효시간에 따른 배지의 pH 변화

■, 톱밥: 폐면(6:4) ; 톱밥과 폐면의 비율이 6:4의 무게비(w/w)

▲, 톱밥: 폐면(9:1) ; 톱밥과 폐면의 비율이 9:1의 무게비(w/w)

나. 무기 질소원 첨가 효과

배지조성에 부족된 질소원을 보충하여 발효과정에서 미생물의 성장을 촉진시키기 위해 배지조성에 무기질소를 첨가하였다. 무기질소원의 첨가는 표고버섯 자체에 여러가지 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 여러 무기질소를 배지에 첨가하여 표고버섯 재배에 적합한 재료를 찾기 위해 다양한 실험들이 이루어졌다(Ito, 1978; Han등, 1981; Royse, 1985; Schmidt, 1985) 뿐만 아니라 무기 질소원을 첨가하였을 때 발효에 미치는 영향과 그에 따른 양송이 버섯에 미치는 영향 등이 연구되었다(Bahl, 1991; Gerrits, 1970; Mccanna, 1969).

1) NH₄NO₃ 농도에 따른 성장비교

배지성분 중에 폐면의 비율이 증가할수록 발효 후 pH는 높았고 10일 동안의 균사 성장은 톱밥의 비율이 증가할수록 균사성장이 좋았다. 이는 폐면의 첨가 비율이 높을수록 미생물에 의한 발효가 잘되지만 그의 결과로 배지

의 pH가 증가하여 균사성장에는 적합하지 않는 것으로 보인다. (표 4,5,6,7,8)

같은 배지에서 NH_4NO_3 농도를 증가시키면 발효 후 pH는 감소하면서 균사성장은 억제되었다. 발효 후 NH_4 농도를 측정한 결과 배지에 첨가되는 NH_4NO_3 농도가 증가할수록 잔류되는 NH_4 의 농도가 높았다. NH_4 는 표고균사성장을 억제하는 것으로 알려져 있기 때문에 표고균사가 성장하기에 적합한 pH가 되더라도 NH_4 의 농도가 배지에 남았으면 오히려 균사 성장을 억제하는 것으로 보인다.

특히 폐면이 10%첨가된 9:1 배지와 톱밥만을 100%로 한 배지에서 $6\text{g}/\ell$ NH_4NO_3 첨가된 농도가 되면 균사성장이 거의 되지 않았다(표 7, 8). 이는 미생물의 성장이 잘 되지 않는 배지 조성에 많은 NH_4NO_3 농도가 첨가되어 발효 과정에서 미생물이 NH_4NO_3 를 미처 다 소모하지 못하여 표고균사 성장을 억제하는 것으로 생각된다. NH_4NO_3 첨가된 조건에서 균사성장이 가장 좋은 배지조성은 $2\text{g}/\ell$ NH_4NO_3 첨가된 9:1 비율의 배지로 10일 동안에 균사성장 길이는 7.2cm 이며 균사밀도도 가장 좋았다(표 7). 이러한 조건은 발효 후 배지의 pH가 표고균사가 성장하기에 적합한 pH가 되고 낮은 농도의 NH_4NO_3 를 발효 과정에서 미생물이 거의 다 소모하기 때문에 미생물 증식을 촉진하여 발효를 통한 영양분 재 조합이 잘된 것으로 생각된다.

표 4. 6 : 4 배지에서 NH_4NO_3 농도에 따른 균사성장비교

NH_4NO_3 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	8.7	3.6	++
4	8.3	3.4	++
6	8.5	2.1	+

6 : 4 배지 ; 톱밥과 폐면의 비율이 6:4의 무게비(w/w)

표 5. 7 : 3 배지에서 NH_4NO_3 농도에 따른 균사성장비교

NH_4NO_3 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	8.4	5	++
4	8.0	4.3	++
6	8.1	3.8	+

7 : 3 배지 ; 톱밥과 폐면의 비율이 7:3의 무게비(w/w)

표 6. 8 : 2 배지에서 NH_4NO_3 농도에 따른 균사성장비교

NH_4NO_3 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	7.9	6.2	+++
4	8.0	5.7	++
6	7.5	2.5	+

8 : 2 배지 ; 톱밥과 폐면의 비율이 8:2의 무게비(w/w)

표7. 9 : 1 배지에서 NH_4NO_3 농도에 따른 균사성장비교

NH_4NO_3 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	6.8	7.2	+++
4	6.4	5.8	++
6	6.6	NG	

9 : 1 배지 ; 톱밥과 폐면의 비율이 9:1의 무게비(w/w)

NG; no growth

표 8. 10:0 배지에서 NH_4NO_3 농도에 따른 균사성장 비교

NH_4NO_3 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	5.8	6.4	++
4	4.9	5	++
6	4.7	NG	

10 : 0 배지 ; 톱밥을 100%로 한 경우

NG; no growth

2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도에 따른 성장비교

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 배지 내에 첨가는 배지의 pH를 낮추는 결과를 가져왔다(표 9, 10). 또한 폐면을 첨가하지 않으면 pH가 더 낮았다. 결과적으로 NH_4NO_3 첨가와 비교할 때 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가는 배지의 pH를 산성 pH로 변하게 하였

다. 균사성장은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도에 상관없이 억제되었다. 또한 균사밀도도 NH_4NO_3 를 첨가한 배지보다 낮았다.

발효에 관여하는 미생물의 성장 pH는 6-8까지의 중성에서 알칼리성에서 자라게 되는데 배지의 pH가 산성이 되면 미생물의 성장이 이루어지지 않아 발효가 되지 않는다. 그러므로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가한 배지의 발효는 산성 배지가 됨으로 해서 배지에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가는 적합하지 않는 것으로 나타났다.

표 9. 8 : 2 배지에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도에 따른 균사성장 비교

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	6.3	1.5	+
4	5.2	1.7	+
6	5	2.8	+

표 10. 10 : 0 배지에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도에 따른 균사성장 비교

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	3.5	3.5	+
4	3.7	4.5	+
6	3.6	NG	+

NG; no growth

3) Urea농도에 따른 성장비교

Urea의 배지 내에 첨가는 NH_4NO_3 첨가와와는 다르게 배지의 pH를 높이는 결과를 가져왔다. 또한 Urea의 농도에 상관없이 배지의 pH는 8이상을 나타냈다(표 11, 12). 이러한 결과는 urea 성분이 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 질소원이기 때문에 미생물이 크게 증식하면서 암모니아 가스를 발생시켜 배지의 pH가 높아진 것으로 생각된다.

배지에 Urea의 첨가는 고온성 방선균의 성장을 증가시켜 육안관찰로도 방선균이 많이 관찰되었다. 이 고온성 방선균은 pH 8이상에서 잘 자라는 특성을 갖고 있기 때문에 Urea 첨가는 배지의 pH에 영향을 주어 방선균의 성장을 촉진시킨 것으로 생각된다. 그러나 방선균이 잘 자라는 등 발효가 잘 되었음에도 불구하고 표고균사 성장은 억제되었다. 그러나 균사 밀도는 아주 양호한 것으로 관찰되었다. 발효는 잘 되었음에도 불구하고 균사성장의 억제는 배지의 pH가 표고균사가 성장하기에 너무 높은 pH를 유지하기 때문인 것으로 생각된다. Urea의 첨가는 발효배지에 많은 ammonia가 형성하기 때문에 버섯이 자라는 동안 독성으로 작용하는 것으로 알려져 있고 (Beck 와. Rasmussen, 1969) 배지의 pH를 증가시키는 요인은 ammonia인 것으로 알려졌다기 때문에 배지의 높은 pH는 ammonia의 영향 때문으로 알려졌다기 때문에 (유영석, 1999) ammonia의 잔류가 표고성장을 억제하는 것으로 보인다.

3가지 무기이온의 첨가는 배지내의 질소원을 보충하기 위한 것으로 모두 NH_4 형태로 전환되어 발효과정에서 미생물의 성장을 촉진시키기 위한 것이었다. 그러나 어떤 이온 상태로 무기질소원을 공급하였느냐에 따라 발효 후 배지의 pH가 크게 차이를 나타냈고 표고균사 성장에도 영향을 미치었다.

위의 3가지 무기이온 첨가에 의한 실험에서 나타난 결과로 볼 때 무기질소원 으로서는 NH_4NO_3 첨가가 질소원으로서 가장 적합하였고 다른 무기질소원은 배지의 pH를 너무 높게 하거나 낮게 하여 표고버섯 재배를 위해 적합하지 않는 것으로 나타났다.

표11. 8 : 2 배지에서 Urea 농도에 따른 균사성장비교

Urea 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	8	2.8	+++
4	8.3	2.5	+++
6	8.8	2	+++

표 12. 10 : 0 배지에서 Urea농도에 따른 균사성장 비교

Urea 농도(g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장(cm)	균사밀도
2	7.8	3.8	+++
4	8.0	3	+++
6	8.5	1.5	+++

4) phosphate 첨가에 의한 표고균사 성장비교

phosphate는 버섯뿐만 아니라 모든 미생물에게 있어 성장에 중요한 요인으로 작용한다. 즉 phosphate 농도가 충분하면 성장을 촉진하지만 부족하게 되면 성장제한 요인으로 작용한다. 그러므로 배지에 phosphate 농도는 배지 발효과정 뿐만 아니라 표고균사 성장에도 중요하기 때문에 배지에 K_2HPO_4 (potassium phosphate)를 첨가하여 성장제한 농도를 알아보았다.

배지조건은 톱밥과 폐면의 비율이 8:2인 배지와 톱밥만을 10으로 하는 배지에 $2g/l$ NH_4NO_3 를 첨가 한 2종류의 배지를 사용하였다. 배지의 pH는 phosphate를 첨가하지 않은 대조군 보다 약간씩 높은 pH를 나타나

phosphate가 완충용액으로서의 역할을 한 것으로 생각된다. 그러나 pH 변화가 크지 않음에도 불구하고 표고균사성장은 크게 억제가 되었다. 표 13과 14를 보는 바와 같이 phosphate 농도가 증가할수록 균사성장이 억제되어 phosphate의 첨가는 오히려 균사성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 표고균사가 성장하는데 있어 더 이상의 phosphate가 필요하지 않는 것으로 나타나 표고 균사 배양을 하기 위해서 phosphate는 성장제한 요인으로 작용하지 않는 것으로 보인다.

표 13. 8 : 2 배지에서 phosphate 농도에 따른 균사성장 비교

phosphate 농도 (g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장	균사밀도
0.1	7.6	3	++
0.2	7.3	3.2	++
0.4	6.3	3	+
0.6	7.4	NG	+
0.8	6.2	NG	

NG; no growth

표 14. 10 : 0 배지에서 phosphate 농도에 따른 균사성장비교

phosphate 농도 (g)	발효 후 pH	10일 동안의 균사성장	균사밀도
0.1	5.2	4.2	+
0.2	5.3	4.1	+
0.4	5.3	4.3	+
0.6	5.4	NG	
0.8	5.3	NG	

NG; no growth

다. 유기질소원으로 미강 첨가 효과

1) 미강 첨가에 따른 8:2 배지에서의 균사성장

톱밥과 폐면으로 배지를 제조하면 질소원이 부족 되기 때문에 무기질소원을 배지에 첨가하여 발효하였다. 무기질소원을 첨가하면 균사성장을 촉진하였으나 농도가 증가하면 오히려 균사성장을 억제하는 것으로 나타나 무기질소원의 첨가는 적합하지 않은 것으로 보인다. 그러므로 무기질소원 대신 유기 질소원을 첨가하여 표고 균사성장에 미치는 영향을 조사하였다. 미강은 영양학적으로 전분, 질소 영양분, 및 금속이온의 영양분으로 사용되며 생물학적으로는 빠른 속도의 균사성장으로 다른 미생물의 오염을 방지하는 역할을 하는 것으로 알려졌다(이상선, 1991). 이 실험에서도 유기질소원으로 미강을 선택하였다. 미강은 우리나라에서 쉽게 구할 수 있는 농가부산물이므로 값싼 부재료가 될 수 있는 장점이 있다. 미강을 첨가한 7:3 배지의 발효 전 pH는 pH 5.6이었으나 발효 후 배지의 pH는 미강 첨가가 증가할수록 pH가 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 7:3 배지에서는 기본적으로 pH가 7.5이상이 되었다. 배지의 조성에서 폐면의 비율이 증가하면 발효하는 동안의 고온성 미생

물의 수가 증가한다는 결과와 비교하여 보면 7:3 조성이 8:2 조성 보다 발효하는 과정에서 고온성 미생물이 더 많이 증식을 하였고 호기성 조건에서 미생물이 증식하면 배지의 pH는 알카리 성질로 변하기 때문에 그에 따라 배지의 pH를 알카리성으로 변화시키는 것으로 생각된다. 10일 동안 군사성장을 관찰한 결과 미강의 첨가가 증가하면 군사성장이 증가하다 미강의 함량이 12%이상이 되면 오히려 군사성장이 감소하였다. 이러한 결과는 미강이 군사성장을 촉진하기는 하지만 그 이상이 되면 오히려 성장을 감소하는 결과를 가져오는 것으로 보인다. 미강의 첨가가 군사성장을 저해하는 직접적인 역할을 하는 것으로는 보이지 않으며 미강이 많이 첨가될수록 발효과정에서 미생물 성장이 더욱 활발하여 배지의 pH를 너무 높게 변화시켜 표고군사성장을 저해하는 것으로 보인다. 군사성장 밀도는 무기유기물 첨가하는 것보다 뚜렷하게 밀도가 증가하는 것을 육안으로 관찰 할 수 있었다(표 15).

표 15. 미강 첨가에 따른 7: 3 배지에서의 군사성장비교

미강(%)	발효후 pH	10일간 군사성장 (cm)	군사밀도	비고
3	7.6	4.8	+++	
6	7.5	5	+++	
9	7.8	4.5	+++	
12	8.5	2	+++	
15	8.2	2.2	+++	

표 16. 미강 첨가에 따른 8: 2 배지에서의 균사성장비교

미강(%)	발효후 pH	10일간 균사성장 (cm)	균사밀도	비고
3	6.8	3.6	+++	
6	6.7	4.2	+++	
9	7.3	4.8	+++	
12	7.6	4.5	+++	
15	8.0	4	+++	오염

2) 미강 첨가에 따른 8:2 배지에서의 균사성장

8:2 배지에서도 미강 첨가가 증가할수록 pH가 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 8:2 배지에서는 기본적으로 pH가 약 산성과 약알칼리성을 나타내어 7:3 배지 보다는 pH가 낮았다. 고온성 미생물이 톱밥 보다 폐면에 400배정도 많기 때문에 발효과정에서 폐면에 있는 고온성 미생물에 전적으로 의존한다고 볼 수 있기 때문에 전체 배지에서 폐면의 비율이 적어진다는 것은 고온성 발효에 필요한 미생물이 감소함을 의미한다고 할 수 있다. 그러므로 pH 변화는 미생물의 증식 정도와 관계가 있는 것으로 보이며 발효 후 배지의 pH가 낮은 것은 고온성 미생물의 발달이 상대적으로 적게 일어났다고 볼 수 있다. 균사성장은 미강을 9% 첨가할 때 가장 좋았으며 그 이후로는 감소하였지만 7:3 배지보다는 균사성장이 좋았다. 이러한 결과는 폐면 양이 7:3 배지보다 적기 때문에 미강을 증가 시켜도 7:3 배지 보다 미생물 활동이 상대적으

로 적어 pH 변화도 적게 일어나며 따라서 표고균사가 성장하기에 7:3 배지보다는 적합한 것으로 보인다. 그러나 7:3 배지에서는 곰팡이 오염을 관찰할 수 없었지만 8:2 배지에서는 15% 미강을 첨가할 시 부분적인 곰팡이 오염을 관찰할 수 있었다. 이는 7:3 배지 보다 미생물활동이 적어 첨가된 미강이 미처 미생물에 의해 충분히 이용되지 않고 남아 오염을 일으키는 것으로 보인다.

표 17. 미강 첨가에 따른 9:1 배지에서의 균사성장비교

미강(%)	발효후 pH	10일간 균사성장 (cm)	균사밀도	비고
3	5.5	4	++	
6	5.4	6	++	
9	5.6	5.3	++	부분적오염
12	5.7	6	++	부분적오염
15	5.3	6.5	++	부분적오염

3) 미강 첨가에 따른 9:1 배지에서의 균사성장

9:1 배지에서는 미강의 첨가량과 관계없이 배지의 발효의 pH가 산성으로 나타났다. 7:3 배지와 8:2 배지를 발효하면 미생물에 의해 배지의 pH를 알칼리로 변화시키는 것으로 볼 수 있는데 9:1 배지에서는 발효전의 배지 pH와 거의 변화하지 않는 것으로 나타났다. 폐면과 같이 이용하기 쉬운 탄소원이 부족하거나 폐면에 있는 고온성 미생물이 부족하게 되면 유기질소원으로 미

강을 첨가하더라도 발효가 잘 되지 않는다고 할 수 있다. 그러나 표고균사성장은 미강이 첨가할수록 빨랐으며 7:3이나 8:2 배지보다 균사성장이 좋았다. 발효 상태는 좋지 않았으나 균사성장이 더 좋은 것은 발효 후 배지의 pH가 균사성장에 적합하기 때문인 것으로 보인다. 또한 발효 상태가 좋지 않기 때문에 배지의 곰팡이 오염도 쉽게 관찰 할 수 있었고 7:3이나 8:2 배지 보다 균사밀도 낮게 나타났다. 이러한 결과를 종합하여 보면 폐면의 비율이 많을수록 발효가 잘되며 따라서 배지의 pH가 높게 나타났다. 배지의 pH가 높으면 균사성장을 억제하는 것으로 보인다. 반면 폐면의 비율이 적을수록 배지의 pH는 낮으며 균사성장도 상대적으로 빠르다. 그러나 곰팡이 오염은 증가하였다. 그러므로 균사성장에 적합한 배지는 폐면과 톱밥의 비율이 8:2 라고 볼 수 있으며 첨가되는 미강의 함량은 9%가 적합하다. 그러나 배지의 pH를 중성으로 조절할 수 있고 호기성 발효를 시킬 수 있다면 9% 이상에서도 균사성장을 시킬 수 있을 것으로 판단된다(표 17).

표 18. 밀기운 첨가에 따른 8:2 배지에서의 균사성장비교

밀기운 (%)	발효후 pH	10일간 균사성장 (cm)	균사밀도	비고
3	7.4	3.2	+++	
6	7.2	4.5	+++	
9	7.8	4.5	+++	
12	7.7	4.8	+++	
15	8.3	4	+++	

4) 밀기운 첨가에 따른 8:2 배지에서의 균사성장

유기질소원으로 미강과 같이 이용되는 밀기운을 사용하여 미강 첨가와 차이를 비교하고자 하였다. 배지에 밀기운의 첨가하여 발효 후 pH를 측정하여 본 결과 미강을 첨가한 경우와 크게 차이가 나지 않았다(표 18). 이러한 결과는 어떤 영양분을 첨가하였는가가 중요한 것이 아니라 배지의 폐면 비율이 가장 중요하며 그 다음으로 미강이나 밀기운을 얼마만큼 첨가하는가에 달려 있다고 할 수 있다. 즉 폐면은 다른 재료들보다 미생물이 이용하기 쉬운 셀룰로스 함량이 73% 정도이며 톱밥은 50% 정도이고 미생물이 분해하기 힘든 리그닌의 함량이 폐면은 6% 인 반면 톱밥은 27%로 미생물이 톱밥을 분해하기가 더 어려우며 더욱이 폐면은 단섬유로 되어 있어 미생물 접근이 용이하지만 톱밥은 그 자체가 덩어리로 되어 있고 리그닌은 셀룰로스와 결합되어 있는 형태이기 때문에 상대적으로 미생물 접근이 용이하지 않다. 폐면에는 톱밥에 비해 발효에 필요한 미생물이 절대적으로 많기 때문에 폐면의 비율이 가장 중요하며 그 미생물들을 증식시키기 위해서는 부족한 질소원 공급이 절대적으로 필요하다. 그 질소원의 공급 한계는 발효과정에서 호기성을 유지시켜주는 농도에 의해 결정되어야 한다. 유기질소원 첨가가 증가할수록 미생물 증식활동이 더 증가를 하고 그에 따른 산소의 공급이 필수 적이며 산소가 부족할 시에는 혐기성 발효가 일어난다. 실험실에서는 인위적으로 50℃를 유지하여 밀폐된 공간에서 이루어지기 때문에 유기질소원을 증가시킬수록 그에 따른 산소의 공급을 유지하기 위해 자주 환기를 시키면 배지가 건조하게 된다. 실험실 내에서 배양기를 이용한 발효는 12% 이상 미강이나 밀기운을 첨가하게 되면 혐기성 발효가 일어나거나 배지가 건조하게 된다. 그러나 이러한 문제는 발효실에서는 항상 공기가 순화하기 때문에 이러한 문제는 발생하지 않았으며 발효실에서 배지를 발효할 때 유기질소원 첨가의 한계는 표고버섯이 요구되는 C/N 비율에 의해 정해져야 할 것이다.

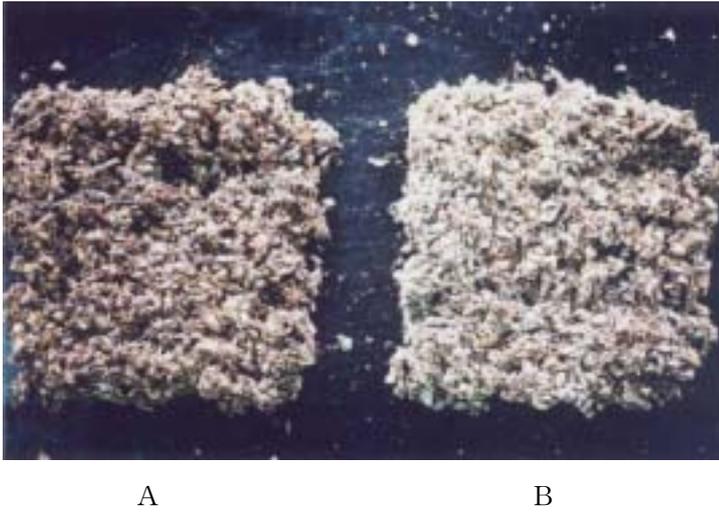


그림2. 분리균주의 첨가에 의한 폐면 발효상태

A : *T.cellulolytica* DK-2

B: *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1+ *T. cellulolytica* DK-2

라. 분리된 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2이 발효에 미치는 영향

1) *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2의 폐면에 첨가효과

한천배지에서 *Thermobifida cellulolytica* DK-2를 배양하기 위해서는 *Pseudoxanthomonas*가 있어야만 잘 자라는 것으로 나타났기 때문에 이러한 결과가 배지재료에서도 같은 결과를 나타내는지 알아보기 위해 폐면을 멸균하여 미생물을 없앤 후 대조군으로 방선균인 *Thermobifida cellulolytica* DK-2를 첨가하고 다른 하나는 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2를 같이 접종하여 발효한 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 두 균주를 혼합하여 접종한 폐면에서 방선균의 성장이 월등하게 나타났다. 그러므로 한천배지에서와 마찬가지로 고온 발효에서 방선균이 자라기 위해서는 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1의 역할이 중요한 것으로 나타났다.

표 19. 미생물 첨가에 따른 8:2 배지에서의 균사성장비교

발효 sample	10일 균사성장	균사밀도
8:2 + 9% 미강	4.8	+++
8:2 + 9% 미강 + 100 μ l	5	+++
8:2 + 9% 미강 + 200 μ l	6	+++
8:2 + 9% 미강 + 500 μ l	6.5	+++
8:2 + 9% 미강 + 1000 μ l	7	+++

2) *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2 첨가에 따른 8:2 배지에서의 균사성장

분리된 고온성 미생물들이 표고버섯 발효배지에서 어떤 효과를 나타내는 지 알기 위해 9% 미강이 첨가된 8:2 배지에 미생물의 농도 별로 첨가하여 표고균사 배양을 관찰한 결과 발효 후 육안으로 관찰되는 방선균이 미생물 첨가가 많을수록 증가하였고 표 19와 같이 접종한 표고 균사의 성장도 증가하였다. 이러한 결과는 분리한 두 균은 발효에 중요한 역할을 하며 발효의 상태를 더욱 좋게 하여 표고균사 성장도 촉진하게 하는 것으로 보인다. 그러므로 버섯 성장에 적합한 배지발효를 위해 이 두 균주를 첨가제로 활용할 방안도 생각해 볼 필요가 있다.

마. 발효 후 푸른곰팡이의 오염 측정

발효 후 표고균사가 잘 자라기 위해서는 푸른곰팡이가 오염을 일으키면 안 된다. 즉 발효가 잘되어 배지내의 영양분이 남아 있지 않아야 푸른곰팡이 등이 성장이 억제되고 표고균사가 성장할 수 있다. 그러나 발효 후에도 영양분이 남아 있으면 푸른곰팡이 등이 오염을 일으킬 수 있다. 그러므로 배지를 발효한 후에 표고균사를 접종하지 않은 상태에서 동일한 배양 조건으로 배

지를 육안 관찰하여 오염여부를 확인하는 것이 필수적인 요인이다.

표 1, 2, 3 에 조건에서 pH만을 변화시켜 발효한 배지들은 20일 동안 푸른 곰팡이가 육안으로 관찰되지 않았다. 6g/l NH_4NO_3 와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가한 조건에서 10일 이후부터 푸른곰팡이의 오염이 관찰되었다. 이는 발효 후에도 NH_4NO_3 나 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 완전히 소모되지 않아 배양동안에 푸른곰팡이의 영양분으로 사용되었을 것으로 생각된다.

그러나 그 이하의 농도에서는 20일 동안에 오염이 관찰되지 않았다. Urea를 첨가한 경우에는 푸른 곰팡이등의 오염은 관찰되지 않았다. 이는 Urea가 미생물에 의해 빠르게 소모되기 때문에 발효과정에서 urea가 모두 소모되었을 가능성보다는 발효 후 배지의 pH가 8로 높은 알칼리성으로 푸른 곰팡이등이 성장하는 pH 5.5-6보다 너무 높아 성장이 억제되는 것으로 생각된다. 결과적으로 곰팡이를 억제하기 위해서는 배지의 pH가 높으면 되지만 이 조건에서는 표고균사 성장도 억제되므로 곰팡이의 성장을 억제하기 위해서는 영양분이 남지 않도록 발효 시간과 배지 조건을 정하는 것이 중요하다.

바. 배양 과정

균사성장이 완성된 배지에서 자실체를 형성하는지를 관찰하기 위해 균사 접종하여 23℃에서 90일 동안 성장한 1kg 배지와 3kg 배지를 16℃에서 10일 동안 저온자극을 주어 발이를 유도하고 18℃와 80% 습도에서 자실체를 성장시켰다.



A

B

C

그림 3. 배지성분 비율에 따른 발효 상태

A; 톱밥과 폐면의 비율이 7:3 인 배지

B; 톱밥과 폐면의 비율이 8:2 인 배지

C; 톱밥과 폐면의 비율이 9:1 인 배지

그림 3은 톱밥과 폐면의 비율 차이에 의해 발효된 상태의 차이를 보여주고 있다. 폐면이 첨가되면 발효 후 배지의 색이 갈색이 되지만 톱밥이 많아지면 황토색이 된다. 이러한 색깔의 차이는 배지의 pH 차이에 의한 결과로 보인다. 그림 4는 1kg의 발효된 배지에 접종용 표고균주를 샌드위치식으로 중앙에 접종하여 균사 성장 길이를 관찰한 것이다. 최적의 성장 조건일 때 10일 동안 7.2cm 까지 자랄 수 있어 1kg 배지 전체에 버섯 균사가 성장되는데 걸리는 시간은 15일로 나타났다.

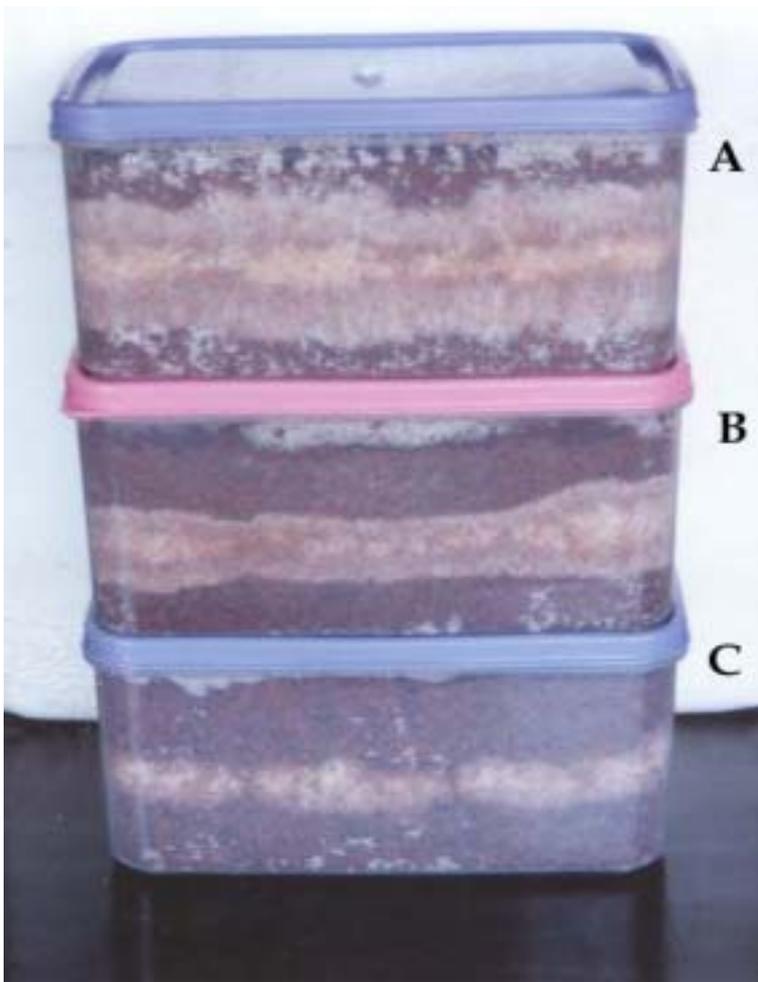


그림 4. 발효 배지에서의 표고균사 성장
; 샌드위치식으로 배지 가운데에 접종
A; 접종 후 3일 경과
B; 접종 후 5일 경과
C; 접종 후 10일 경과

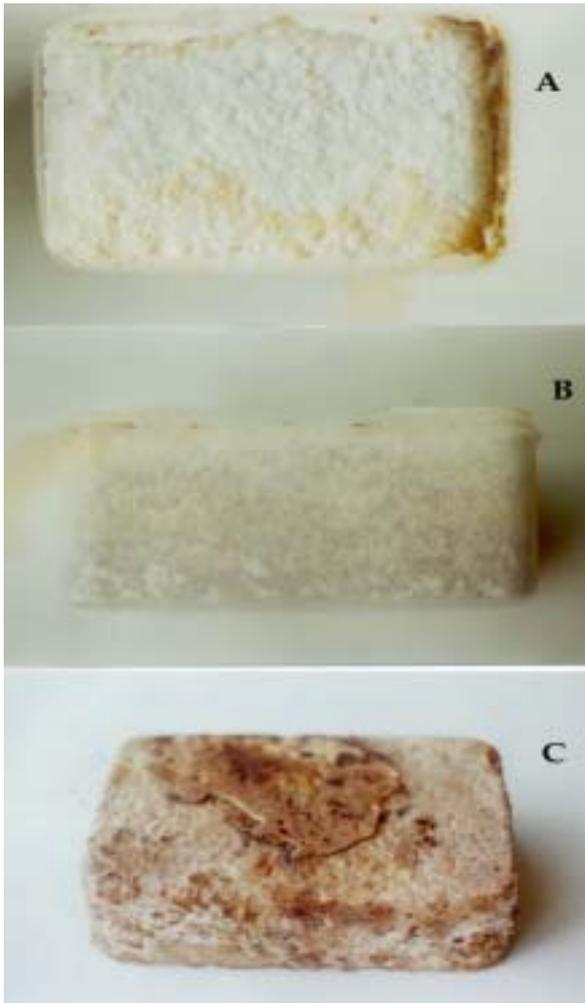


그림 5. 표고균사의 배양 상태

;1kg 배지를 2.5 ℓ용기에 담았다.

A; 배지 상자 위쪽의 균사 성장 상태

B; 배지 상자 측면에서의 균사성장 상태

C; 갈변화가 끝난 후 배지 상자에서 꺼낸 배지

툽밥과 폐면의 비율이 8:2 배지에서 미강의 첨가 없이 발효된 배지로 1kg 배지에 표고 접종원을 분쇄한 후 배지 무게의 15%를 배지와 혼합 접종하여 표고균사 배양이 완성된 상태로 표고 균사가 배지 전체에 퍼지는 기간은 10일이 소요되었으며 균사의 밀도가 증가하여 피막이 형성될 때까지의 시간은 30일이며 그 후 60일 동안은 숙성기간으로 하였다(그림 5). 숙성되는 동안 광원이 없어도 갈변화가 이루어졌으며 갈색 피막이 형성되었다. 그림 6는 1kg 배지가 90일 배양 후 저온자극으로 원기가 형성하여 발이 되는 과정(A)과 자실체가 형성(B)된 과정을 보여주고 있다. 성장한 자실체는 1kg 배지당 1-2개 정도로 매우 낮은 수준의 자실체 형성을 보였다. 이는 툽밥과 폐면만 으로 표고 자실체 형성하는데는 영양분이 너무 부족한 것으로 보인다. 그러나 툽밥 배지를 발효하여 표고버섯의 자실체를 형성할 수 있음을 증명하는 중요한 결과이다. 자실체 수량을 증가시키기 위해서는 미강과 같은 영양분의 첨가되어야 할 것으로 판단되어 9%의 미강을 첨가하여 툽밥배지를 만들어 자실체 형성을 유도하였다.



A

B

그림 6. 갈변화가 끝난 배지의 자실체 형성과정

A; 저온자극 후 원기가 형성되는 과정

B; 원기형성 후 자실체가 형성되는 과정

그림7은 8:2 배지에 미강을 9% 첨가하여 발효된 배지에 표고종균을 15% 혼합 접종하여 3kg 배지를 만들어 표고균사가 배양 완료된 상태(A)와 갈변화가 이루어진 상태 (B)를 보여주고 있다. 그림 8은 3kg 배지에서 원기가 형성하여 발이가 형성된 과정(A)과 자실체가 형성된 과정(B)을 보여 주고 있다. 미강을 첨가하면 첨가하지 않은 배지보다 자실체 수량이 크게 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 배지에 미강의 첨가를 증가시키면 자실체 수량을 증가시킬 수 있으며 발효배지로 충분히 생산성 있는 버섯 수량을 만들 수 있는 방법이 될 수 있음을 시사하였다.



A



B

그림 7. 표고균사의 배양 상태

A; 균사 배양이 끝나고 갈변화 되기 전의 상태

B; 갈변화가 끝난 상태



A



B

그림 8. 자실체가 형성되는 과정

A; 원기가 형성되어 발이가 된 상태

B; 발이가 되어 자실체로 발달하는 상태

사. 발효배지에 적합한 품종 개발

호켄(hokken) 균주는 톱밥배지에서 단기배양을 위해 일본의 Hokken Sangyo 회사에서 *Lentinus edodes*(Berk) Sing의 교잡 방법으로 개발된 균주이다(US Patent PP07339). 모 균주로 사용된 호켄 600과 개량된 품종인 호켄 603과 비교하여 보면 PDA 한천배지에서 600보다는 603이 좀 더 균사성장이 좋은 것으로 보인다. 그러나 호켄 품종은 느타리버섯과 비교하여 균사성장이 느리고 균사밀도도 낮게 나타났다. 이러한 품종의 균주는 멸균된 톱밥배지에 적합한 균주로 개발된 것이다. 이 균주로 톱밥발효배지에 접종용 균주로 사용될 수 있지만 발효배지를 위한 균주가 아니기 때문에 새로운 방법에 맞는 새로운 균주의 개발이 필요하다. 이 균주를 톱밥발효배지에 접종한 경우에 균사성장은 느리게 나타났다. 느타리버섯은 균사성장이 빠르기 때문에 발효배지에 혼합 접종하여도 빠른 시간에 배지 전체로 성장하기 때문에 오염의 기회를 줄이기 때문에 느타리버섯을 발효배지에 키우기에 적합하지만 표고균사의 성장은 느리기 때문에 이러한 단점을 보완하기 위해 느타리버섯보다 접종량을 증가시켜 배지 전체로 성장하는 느타리버섯 성장 시간만큼 단축해야 할 것이다. 그러나 성장 속도가 빠른 표고 균주를 개발한다면 표고버섯 발효 배지를 개발하는데 그만큼 유리하다고 할 수 있다.

새로운 특성의 균주를 개발하는 데는 단포자 분리에 의한 군사접합(Eger, 1978)을 하거나 세포벽을 제거한 후 원형질체 융합 방법(Ball, 1985)등이 일반적으로 연구되는 방법이다. 그러나 이러한 방법은 시간과 비용이 많이 드는 어려움이 있고 특히 새롭게 형질이 나타나더라도 원하는 특성을 나타내야하는 이중의 어려움이 있기 때문에 균주개발은 인내가 필요로 하는 연구이다. 이 과제에서도 새로운 방법에 적합한 균주가 필요하지만 연구과제의 주요 주제가 아니므로 다른 방법으로 균주를 분리하고 하였다. 새로운 균주의 선발 목적은 발효배지에서 모 균주보다 성장속도가 빠른 균주를 얻는 것이다. 성장 속도가 빠른 균주를 개발하기 위한 방법으로 배지환경에 적응한 균주 선별 방법을 택하였다. 생물은 변화한 환경에 적응하는 돌연변이를 만들기 때문에 톱밥발효배지에 표고 균주를 계속적으로 적응시키면 그 발효배지에 잘 적응한 균주를 선별할 수 있을 것으로 생각되었다. 톱밥 발효 배지에서 가장 빠르게 자라는 균사를 선택하여 무균적으로 분리하고 다시 발효배지에 접종하는 방식으로 하여

처음에 발효배지에서 가장 성장이 10균주를 분리하였다.

분리된 10균주 중 PDA 배지에서 군사성장 속도가 빠른 균주를 선택하여 최종적으로 2종의 우수 균주를 분리하여 super-1과 super-2로 명명하였다. 이 중 super-1이 가장 성장 속도가 빠르게 나타났다. 연암축산원예대학 이대진 교수로부터 분양받은 호켄 균주를 PDA 배지에서 성장을 관찰하면 군사성장 속도도 느리며 군사밀도도 낮게 나타났다. 그러나 600 보다는 603균주가 성장 속도나 군사밀도 면에서 더 우수한 것으로 나타났다.

모 균주인 호켄600과 분리균주 super-1을 PDA 한천배지에서 비교하여 본 결과 호켄 600 보다 훨씬 빠르게 성장 할 수 있었고 군사 밀도도 높은 것으로 나타났다. 또한 군사성장 형태도 군사덩이등과 같은 변이 현상이 나타나지 않았다. 또한 모 균주와 군사가 분리되지 않고 접합이 이루어져 모 균주에서 유래된 균주임을 확인 할 수 있었다.

균주의 선택을 확정하기 위해 PDA배지와 톱밥 종균배지에 교대로 계대하면서 super-1에서 선발된 6균주를 최종 획득하여 그 중 군사성장속도가 빠르고 군사밀도도 우수한 super-1-3균주를 선택하여 최종 발효배지 균주로 하였다. 최종 균주는 PDA 배지에서 성장한 균주를 한천과 같이 분리하여 멸균된 증류수에 넣고 4℃에서 보관을 하였다.

분리된 super1-3을 군사 성장이 빠른 느타리버섯과 비교하여 상대 비교하여 보았다. 느타리버섯 중에서도 성장 속도가 빠른 춘추2호와 super-1-3과 군사성장 비교를 한 결과 춘추2호보다는 군사밀도가 낮았지만 군사성장 속도는 더 좋았다. 춘추2호와 super1-3 군사 사이에 서로 군사가 섞이지 않고 분리되었고 모 균주인 호켄 600과는 군사가 섞이는 것으로 보아 선별한 super-1-3은 느타리 균주가 아니고 표고군사임을 확인할 수 있었다.

이상과 같이 발효배지에 적합한 균주를 계대 배양을 통한 선별 과정으로 성장성이 우수한 균주를 얻을 수 있었다. 이 균주를 발효배지에 이용하면 보다 안정적으로 발효배지를 만들 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 멸균된 톱밥배지에서 성장 속도를 비교하였을 때 모 균주와 분리된 균주의 성장 속도 차이는 나타나지 않았다.

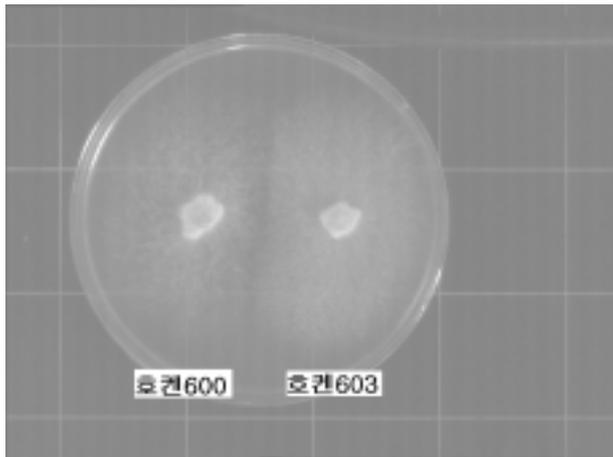


그림 9 PDA 한천배지에서 호켄 600 균주와 603균주의 균사성장 비교

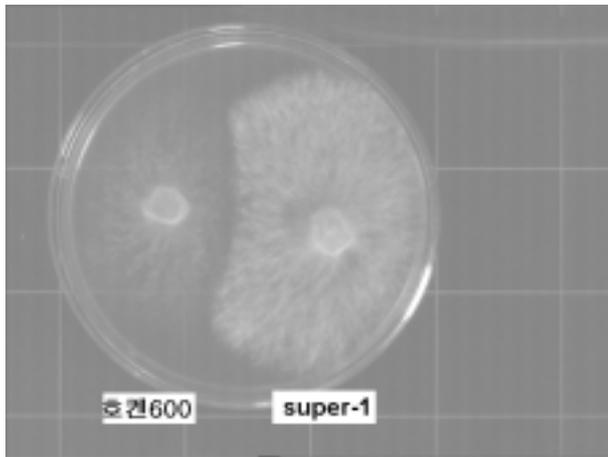


그림 10 PDA 한천배지에서 호켄 600 균주와 super-1균주의 균사성장 비교

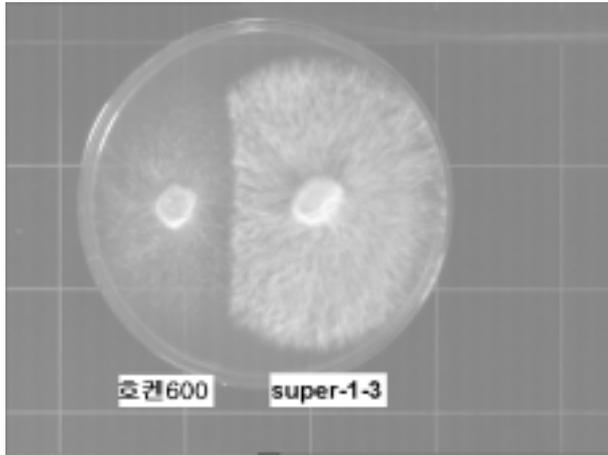


그림 11 PDA 한천배지에서 호켄 600 균주와 super-1-3 균주의 균사성장 비교

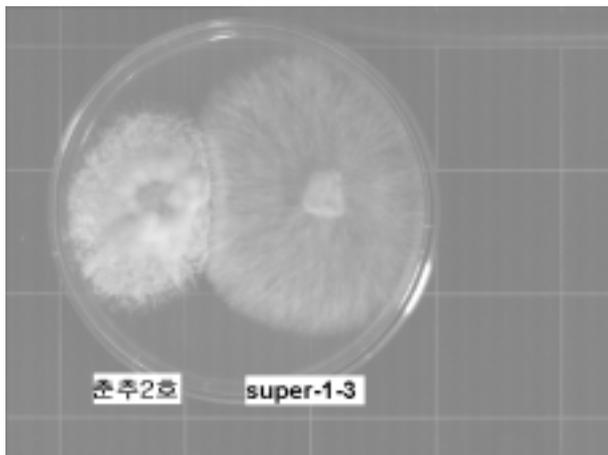


그림 12 PDA 한천배지에서 느타리 균주 춘추2호와 super-1-3 균주의 균사성장 비교

3절 발효실을 이용한 발효

I. 발효실 온도 50℃ 설정인 경우

1. 연구방법 및 내용

가. 배지의 제조

톱밥과 폐면의 비율을 8:2로 하여 1,000kg의 배지를 제조하였다. 유기질소원 첨가를 위해 미강을 6% 그리고 9%를 첨가하였고 무기질소원 첨가를 위해 NH_4NO_3 는 물에 4g/l 를 미리 녹여 재료와 섞었다. 재료의 배합은 우선 폐면을 탈면기를 사용하여 수분 공급을 먼저 한 후 톱밥과 미강을 섞은 다음 다시 수분공급을 하여 2번 더 탈면기를 이용하여 섞어 주었다. 최종 수분 함량은 80-85% 되게 하였다.

나. 배지의 발효조건

배지를 발효하는 조건으로 배지의 부피와 발효실의 공간의 비율을 1 : 1.5로 하였다. 즉 발효실 높이 180cm에 배지70cm를 만들어 배지를 입상하였다, 발효실의 부피가 180×230×380cm일때 배지의 부피는 70×150×380cm되게 하였다. 그리고 100T 스티로폼을 이용하여 발효실 벽에 부착하여 넓이를 조절하였다. 마루위로 배지를 놓을 때는 배지가 눌리지 않도록 흠어 뿌리고 벽과 배지 사이에 틈이 없도록 하여 바닥에서 올라오는 공기가 배지로만 통하도록 하였다. 발효실 온도설정은 53℃로 하여 53℃ 이상 온도가 올라가지 못하게 하였다. 발효실의 풍량은 설정된 온도를 유지할 수 있게 수 작업으로 조절판을 조절하였다.

다.종균접종

800cc 병에 배양이 완료된 호켄 600 표고버섯 균주를 분쇄기로 분쇄하여 혼합접종을 위한 종균으로 사용하였다. 배양상자는 삼정농산에서 판매하는 느타리 버섯재배용 상자 (10 ×40 × 40cm)를 사용하였다. 발효가 끝난 배지는환기구를 열어 외기 바람으로 실온까지 배지의 온도를 내렸다. 그 후 배지를 교반기로 옮겨 배지를 고루 섞이게 하였다. 분쇄된 종균을 배지 부피비 1/2,1/4 그리고 1/6을 넣고 배지와 균주를 혼합하였다. 종균이 접종된 배지는 버섯재배상자에 3kg 씩 담았다.

라. 배양

실험군은 100개의 배지상자로 하였으며 80% 습도와 22℃ 온도 그리고 탄산가스농도 1,200ppm이하로 배양을 하였다.

2. 연구결과

가. 발효실의 구조

발효실은 높이 180cm, 넓이 230cm 그리고 길이380cm의 크기이며 정면부에 배지 투입구가 있으며 후면에는 공기순환시스템과 온도센서 그리고 온도조절장치가 있다. 바닥과 마루의 공간을 마련하여 공기가 마루에서 재배실 공간으로 흐르게 하였다. 마루밑의 공간은 50cm높이이며 공기압력을 균일하기 위해 바닥의 경사를 주었다. 마루는 철조망으로 되어 있으며 그 위에 농자재로 공급되는 고추망을 다시 덮어 배지가 바닥으로 떨어지는 것을 예방하고 공기의 흐름을 방해하지 않도록 마루의 구멍 크기를 조절하였다. (그림 1) 발효실의 온도 조절은 온도센서의 의해 측정된 온도가 설정된 온도보다 높게되면 흡입구의 조절판이 열리게 되고 외부 공기가 흡입되어 설정된 온도까지 발효실 온도를 낮추게 하였다. 풍량을 조절하기 위해 발효실로 들어가는 환기구 부분에 풍량 조절판을 설치하여 수동으로 조절할 수 있게 하였다.

나. 발효시설

환기시설을 기계화하면 공기유동을 강제하여 배지내의 산소 공급을 할 수 있기 때문에 배지의 두께를 증가시킬 수 있다. 일정한 두께의 배지를 유지하면 미생물활동에 의해 일어나는 발열은 배지내에 축적이 되어 배지내의 온도가 상승하게 되고 발효에 필요한 50℃이상의 열을 얻을 수 있었다. 산소의 공급과 탄산가스 배출을 적정 수준을 유지하기 위해 공기 흡입구와 배기구의 조절판을 완전 밀폐형으로 하지 않고 흡입구나 배기구 크기 보다 약간 작은 조절판을 사용하여 항상 공기의 유입과 탄산가스의 배출이 일어나도록 하였다.

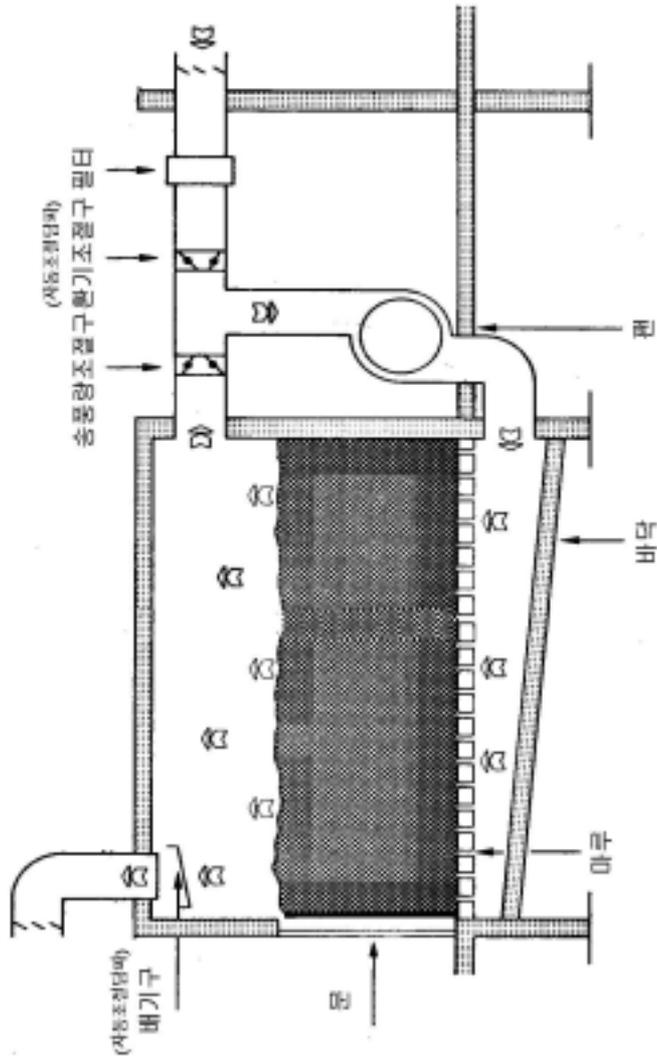


그림 29 발효실 구조의 모식도



A



B



C

그림 2 발효실의 실제 모습

A: 발효실의 공기 순환시스템과 온도제어장치 모습

B: 발효실의 정면부 와 배지투입구 모습

C: 발효실 내부의 모습

공기 순환은 바닥에서 발효실 내부로 공기를 불어넣고 다시 발효실 위쪽의 관을 통하여 공기가 흐르게 하는 순환시스템을 이용하였다. 발효실 온도를 조절하고 환기를 시키기 위해 온도 조절장치를 부착하고 배지 속으로 들어가는 온도센서와 발효실 내부에 노출된 센서 2개를 설치하였다. 온도 제어는 배지 속으로 들어가는 온도센서에 의해 조절 받도록 하였다. 온도 설정치 보다 발효 온도가 더 높게 올라가면 외부에 부착된 환기덕트의 팬이 자동으로 열리면서 외부 공기가 발효실 내부로 들어가게 되어있다. 발효하는 동안의 산소를 공급하기 위해 외부공기 유입 장치를 따로 하지 않은 이유는 미생물의 활동이 증가하여 더 많은 산소가 필요할 시점이 되면 자연스럽게 발효 온도도 올라가기 때문에 온도를 조절하는 과정에서 충분한 산소도 공급이 되기 때문으로 판단하였고 환기구의 팬이 환기구의 크기보다 약간 작게 되어 있기 때문에 항상 소량의 외부공기가 유입이 되게 하였다. 퇴비화를 하는 발효과정은 유기 재료를 미생물이 생물학적 분해를 하는 과정에서 발생하는 자체 발열을 하는 과정이기 때문에 (De Bertoldi 등, 1983; Finstein와 Morris, 1975). 이러한 발효실 구조는 배지의 자체 발열만으로도 고온성 발효를 할 수 있었으며 또한 호기성 발효도 할 수 있는 것으로 나타났다. 그러므로 이러한 시스템으로 하면 대규모 발효도 가능하며 발효에 필요한 별도의 장치나 유지비 없이도 가능한 것으로 판단된다.

그림 3은 발효실에서 발효가 끝난 배지 상태의 모습이다. 배지 사이의 흰색은 고온성 방선균이 성장한 모습으로 배지전체에 자라있음을 볼 수 있다. 그림 4은 발효가 끝난 배지를 근접 촬영한 사진으로 방선균이 배지에 상당히 많이 자라있음을 볼 수 있다. 발효실에서 공기 순환시스템을 사용하면 충분한 호기성 발효를 할 수 있어 그에 따라 호기성 방선균의 성장이 잘되는 것으로 보인다.



그림 3. 발효실에서 발효가 이루어진 배지상태



그림 4. 발효가 이루어진 배지에서의 방선균 관찰



그림 5. 배양실에서의 배지의 배양 모습

다. 발효실에서 배지발효를 위한 조건

1) NH_4NO_3 를 첨가한 8:2 배지의 발효

툽밥과 폐면을 8:2 비율 배지에 $4\text{g}/\ell$ NH_4NO_3 를 첨가하였으며 배지의 제조를 위한 재료의 양은 $1,000\text{kg}$ 으로 하여 배지에 수분을 공급한 후 바로 발효실에 배지를 입상하였다. 이 때 온도제어의 온도는 50°C 로 설정하여 미생물 발열에 의해 자연스럽게 고온으로 상승하도록 유도하였다.

발효한 결과, 그림 6에서 보는 바와 같이 발효 1일 후부터 온도가 급격히 상승하여 2일에 49°C 에 최고점에 달하였다. 2일 후부터 발효 온도가 서서히 감소하여 발효 7일째에는 28°C 까지 감소하였다. 표고버섯 배지발효를 하기 위해 $50\text{--}55^\circ\text{C}$ 온도의 유지가 필요하지만 NH_4NO_3 를 첨가한 경우에는 최고 온도점조차도 발효온도에 접근하지 못하였다. 고온 발효온도가 충분히 발생하지 못하는 이유는 호기성 발효를 시키기 발효실 내부를 계속적으로 공기 순환을 시키기 때문에 발효과정에서 발생하는 열보다 외부로 소멸되는 열이 더 크기 때문이며 발효과정에서 발생하는 열은 미생물의 활동에 의해 발생하는 열이기 때문에 결국 NH_4NO_3 를 영양분으로 첨가하여 발효하는 배지에서는 $50\text{--}55^\circ\text{C}$ 를 유지 할만한 미생물의 활동이 일어나지 못한 것으로 보인다. 결과적으로 실

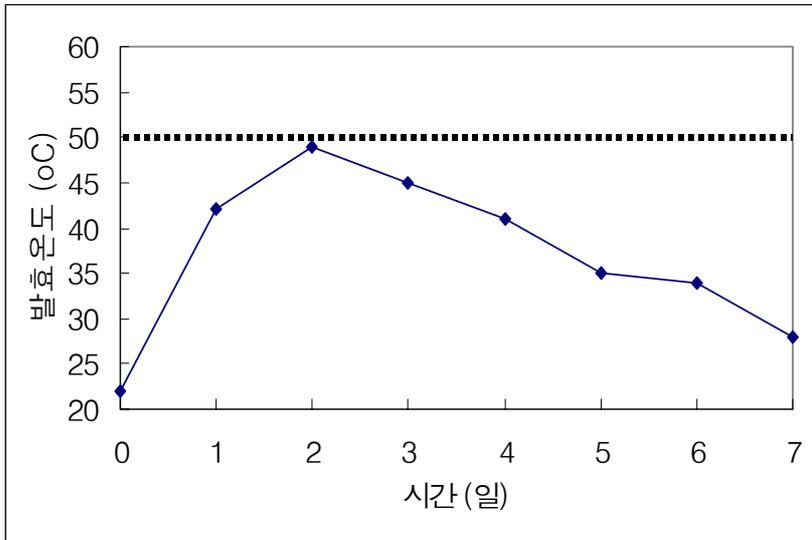


그림 6. NH_4NO_3 첨가에 의한 발효배지의 온도변화

협실에서의 발효는 인위적으로 50-55°C를 유지하였기 때문에 발효가 가능하였지만 발효실에서의 발효실험은 발열량이 충분하지 못하여 온도를 50-55°C를 유지할 수 없기 때문에 대규모 발효실험에서는 발효실험 대상이 될 수 없었다.

2) 6% 미강이 첨가된 8:2 배지의 발효-배지의 무게가 1,000kg인 경우

무기물 첨가에 의한 배지 발효는 발열량이 작기 때문에 고온발효를 할 수 없어서 미생물 활동 증가시키기 위해 유기물 첨가에 의한 발효실험을 하였다. 3% 미강 첨가부터 발효실험을 하였으나 이 경우 발열량이 많지 않아 NH_4NO_3 첨가한 경우처럼 50°C를 넘지 못하였기 때문에 미강의 함량을 6%로 증가하여 실험하였다. 그림7에서 보는 바와 같이 6% 미강을 첨가하면 NH_4NO_3 를 첨가하였을 때 보다 발열량이 증가하여 발효 1일부터 발효에 필요한 온도인 50°C에 도달하는 것을 볼 수 있다. 하지만 50°C를 유지하지 못하고 발효 2일을 정점으로 발효온도가 감소하여 발효에 필요한 충분한 온도를 유지하지 못하였다. 이 실험을 통해 알 수 있는 것은 무기물보다는 유기물의 첨가가 미생물 활동을 증가시키는 것으로 보이며 따라서 발열량을 증가시키기 때문에 유기물의 첨가로 발효 할 수 있는 충분한 열량을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

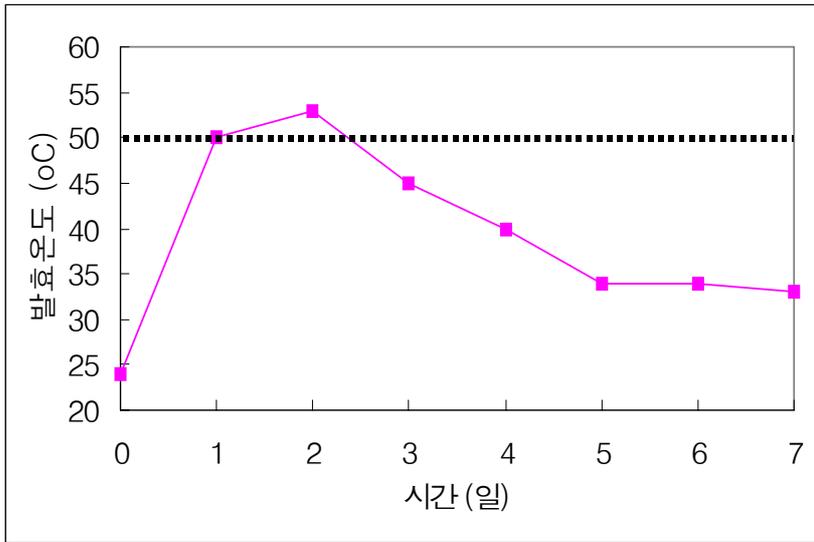


그림 7. 6% 미강 첨가에 의한 발효배지의 온도변화
; 배지무게가 1,000kg인 경우

3) 6% 미강이 첨가된 8:2 배지의 발효-배지의 무게가 1500kg인 경우

그림 8에서 보는 실험 조건에서는 발효에 필요한 온도에 도달 할 수 있지만 그 온도를 유지시키지 못하기 때문에 그 원인이 발열량 보다 외부로 빼앗기는 열량이 더 많다면 발열량을 증가시키기 위해 배지의 량을 증가시킬 필요가 있을 것으로 판단되어 배지의 량을 증가 시켜 발열량을 증가시키고자 하였다. 그림 8은 1,000kg에서 1,500kg으로 배지의 량을 증가시켜 발효의 온도변화를 본 것이다. 발효에 필요한 50°C 이상을 3일 동안 유지하였고 그 후 온도의 감소도 천천히 일어나 배지의 증가에 의해 발효에 필요한 열량을 증가시킬 수 있음을 알았다. 그러나 여전히 7일 까지 온도를 유지하지 못하였다.

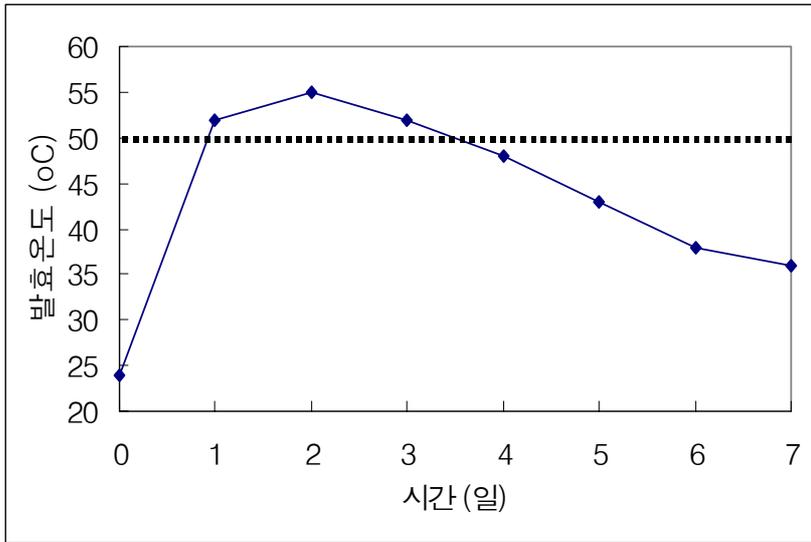


그림 8. 6% 미강 첨가에 의한 발효배지의 온도변화
; 배지무게가 1,500kg인 경우

4) 9% 미강이 첨가된 8:2 배지의 발효-톱밥의 입자가 굵은 경우

6% 미강의 첨가하고 배지의 양도 늘려 발효에 필요한 50°C를 하루씩 늘릴 수가 있었다. 그러므로 미강의 첨가 농도를 증가 시켜 발효에 필요한 열량을 얻고자 하여 미강을 농도를 3% 증가 시켜 9% 되게 하였다. 그림 13은 9% 미강 첨가에 의한 발효온도변화이다. 4일까지 50°C 이상을 유지 할 수 있었으며 4일을 정점으로 온도가 서서히 감소하였다. 미강을 3% 더 첨가하므로 해서 발효에 필요한 온도를 1일 더 유지 한 것으로 보아 미강의 첨가가 많을수록 발열량은 증가하는 것으로 나타났다.

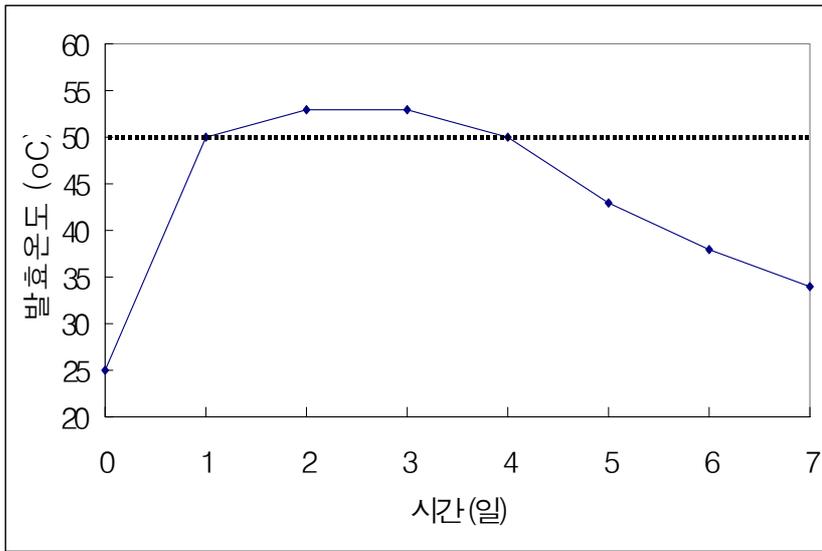


그림 9. 9% 미강 첨가에 의한 발효배지의 온도변화
; 1,500kg 배지를 발효하였을 경우- 입자가 굵은 톱밥을 사용

5) 9% 미강이 첨가된 8:2 배지의 발효-톱밥의 입자가 가는 경우

미강의 첨가는 발열량을 증가시키는 것으로 나타났지만 발열량을 증가시키기 위해 계속해서 미강을 첨가 할 수가 없었다. 그 이유는 미강 첨가에 따른 표고버섯 수량에 미치는 영향에 관한 실험이 이루어지지 않은 상태에서 발효 온도 유지를 위해 무조건 미강만 증가시킬 수 없기 때문이다. 그리고 15% 미강의 첨가는 실험실 수준에서도 오염이 잘 일어나는 농도이기 때문에 발효 온도를 유지 할 수는 있어도 결국 표고균사배양에 문제점이 발생 할 수 있기 때문이다. 그러기 때문에 발효온도를 유지하기 위해 더 많은 미강을 첨가하기보다는 다른 원인을 찾아서 발효온도를 유지하여야 했다. 위의 발효 온도 그림을 보면 모든 공통점이 온도상승은 급격히 일어나고 서서히 온도가 감소하고 미강과 같은 영양분이 증가하면 발효온도 유지시간이 늘어났다. 온도가 급격히 상승한다는 것은 미생물이 이용할 수 있는 영양분이 풍부하기 때문이며 미생물이 급격히 늘어나는 것이고 온도가 서서히 감소하는 것은 이러한 영양분이 고갈되기 때문인 것으로 보인다. 미생물이 급격히 증가시키는 배지 성분은 미강이 가장 요인으로 작용하는 것으로 판단된다.

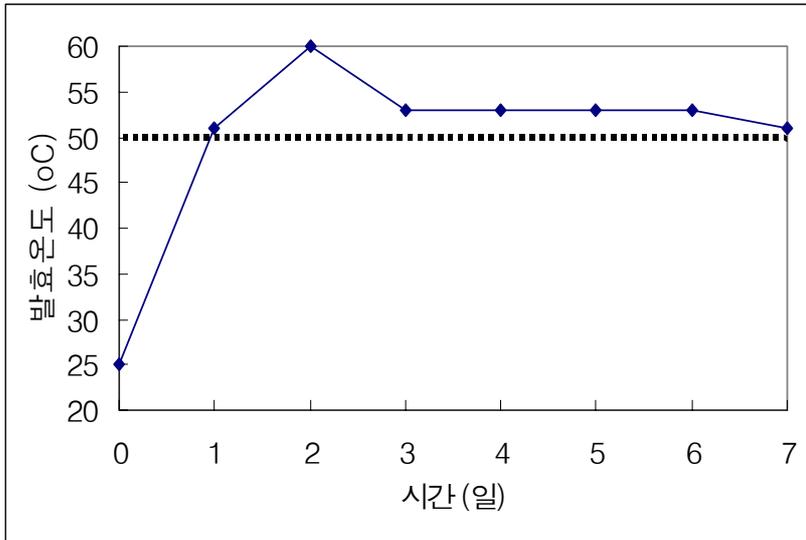


그림 10. 9% 미강 첨가에 의한 발효배지의 온도변화
 ; 1,500kg 배지를 발효하였을 경우-입자가 고운 톱밥을 사용

앞의 실험들을 보아 미강 첨가량이 증가할수록 발열량이 증가하는 것으로 보아 미강의 첨가가 미생물 활동을 증가시키지만 첨가된 미강 소모되면 미생물 활동도 감소하는 것으로 보아 발효과정에서 미생물의 증가는 전적으로 첨가되는 미강에 의존하며 톱밥이나 폐면, 특히 배지의 주성분인 톱밥은 발효과정에서 미생물의 탄소원으로 크게 기여하지 못하는 것으로 보인다.

그러므로 미생물에 의해 톱밥도 미강이 소모될 때 같이 소모된다면 더 오랜 시간동안 발효온도를 유지할 수 있을 것으로 판단되어 톱밥을 이제까지 사용하였던 굵기 보다 더 고운 톱밥을 사용하여 미생물이 톱밥을 이용할 면적을 증가시키고자 하였다. 이전에 사용하던 톱밥의 굵기는 100g 당 2mm이하의 톱밥이 34g 이었고 그 이상은 66g 이었다. 더 고운 톱밥의 굵기는 100g 당 2mm 이하가 55g 이었고 그 이상이 44g 이었다. 고운 톱밥에서 1mm 이상 되는 톱밥도 2mm 크기의 구멍을 거의 통과하여 그 이전의 톱밥 보다 훨씬 입자가 작은 톱밥임을 알 수 있다(그림 11).

톱밥의 입자를 바꾸어 주므로 해서 그림 10에서 보는 바와 같이 1일부터

50℃까지 온도가 올라갔고 2일 째에는 60℃까지 올라갔다 그 이상도 올라 갈 수 있을 것으로 판단하여 온도가 더 이상 올라가지 못하게 53℃로 온도를 설정하여 53℃ 이상이 되면 환기구가 열리고 외부바람이 흡입되어 온도 조절을 하였다. 발효 6일까지 53℃를 유지하였고 7일째에서 온도 설정치가 53℃임에도 51℃가 되어 이 때부터 온도가 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 결과적으로 톱밥의 입자 굵기를 작게 함으로 해서 발효에 필요한 충분한 열량을 얻을 수 있었다. 이상과 같은 결과를 종합하면 발효실에서 발효에 필요한 열량을 얻기 위해 배지의 양과 유기 질소원의 양 그리고 톱밥의 입자가 중요한 요인으로 작용하고 있음을 알았다.

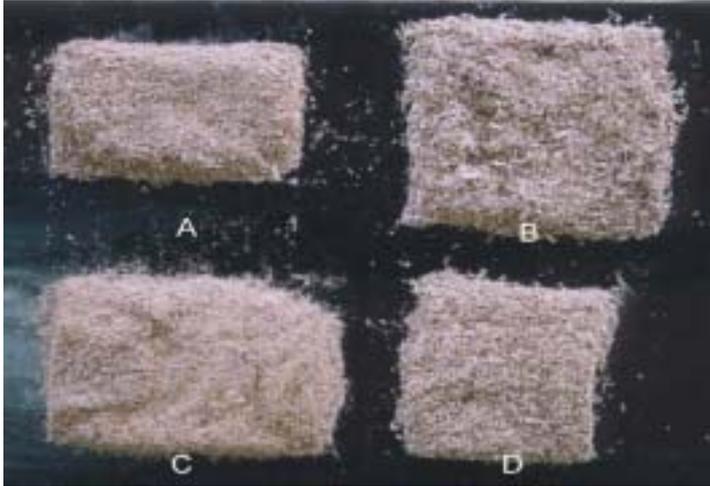


그림 11. 발효재료로 사용된 참나무류 톱밥의 굵기 비교

; A: 굵은 톱밥 재료에서 2mm 이하의 톱밥

B: 굵은 톱밥 재료에서 2mm 이상의 톱밥

C: 가는 톱밥 재료에서 2mm 이하의 톱밥

D: 가는 톱밥 재료에서 2mm 이상의 톱밥

라. 발효 조건에 따른 표고균사성장

1) NH_4NO_3 첨가한 발효배지

NH_4NO_3 에서 발효한 배지를 배지 중량의 15%의 종균을 혼합 접종하였지만 충분한 발효 온도를 유지하지 못하였기 때문에 발효가 되지 않았기 때문에 균사가 전혀 성장하지 못하고 배양 4일부터 푸른곰팡이에 오염이 되어 5일째에는 배지 표면에 50% 정도가 오염이 되었다. 오염부위는 접종원으로 사용한 종균에서부터 발생하여 점차 배지로 퍼져갔다.

2) 6% 미강이 첨가된 발효배지

6% 미강 첨가에 의한 발효배지도 발효에 필요한 온도를 유지하지 못하였기 때문에 표고균사배양이 일어나지 못하고 푸른곰팡이에 의해 오염이 되었다.

3) 9% 미강이 첨가된 발효배지

고운 톱밥을 사용하여 9% 미강을 첨가한 배지에 15% 종균을 혼합 접종하여 배양하였다. 배양 2일째부터 접종원으로 부터 균사성장이 일어났지만 배양 4일부터 균사가 서서히 약해지면서 5일 부터는 균사가 소멸하기 시작하고 균사가 소멸하는 자리에서 푸른곰팡이의 오염이 나타나기 시작하여 균사 배양에 실패하였다(그림 12).



그림 12. 배지에서의 푸른 곰팡이 오염

마. 물에 의한 발효 배지 조건

9% 미강 첨가에 의한 발효배지 조건은 발효하는 동안 충분한 발효온도를 유지하였기 때문에 발효과정에서의 문제점은 없었다. 표고종균을 15, 30 그리고 50% 등으로 3가지 혼합 접종하여 100상자를 실험군으로 하여 배양하였다. 3일 까지 접종된 종균으로부터 균사가 성장하더니 4일부터 더 이상 성장하지 못하고 점차 균사가 희미해지더니 5일 부터는 균사가 거의 없어지고 그 자리에 푸른곰팡이가 자라기 시작하였다. 표고균사의 접종량을 늘리더라도 오염은 줄어들지 않았다. 접종량에 상관없이 오염이 된다는 것은 발효상태가 표고균사 성장에 적합하지 않기 때문에 배지에 활착이 되지 못하고 사멸하는 것으로 보

인다. 발효과정에서 문제점은 없었기 때문에 군사가 성장하지 못한 이유를 찾아내기 위해 실험실 조건과 비교하여 발효 조건이 다른 부분을 찾고자 하였다. 실험실에서는 증류수를 사용하였고 현재 대량 배양을 위해 발효실을 설치한 곳은 천안시 북면으로 이곳의 지하수를 사용하였다. 실험실과의 차이는 증류수와 지하수를 사용한 차이 밖에 없기 때문에 원인을 물에 초점을 두고 실험실에서 증류수와 북면 지하수를 사용하여 발효를 하여본 결과 증류수와 북면 지하수의 차이를 발견하지 못하였다.

바. 톱밥 벌채 시기에 따른 발효배지 조건

군사가 성장하지 못한 이유를 찾아내기 위해 실험실 조건으로 2ℓ 비이커를 이용하여 발효를 실시하였다. 증류수를 사용하여 9% 미강을 첨가한 8:2 배지를 발효시켜서 표고 접종원을 15% 혼합 접종하였다. 배양 2일부터 군사 성장을 하였고 4일 까지 군사 성장을 하다 5일부터 다시 군사가 서서히 사멸하고 곰팡이의 오염이 접종원을 중심으로 나타나기 시작하였다.

실험실 조건에서도 표고군사 성장을 재현하지 못하였다. 실험실 조건과 같은 조건으로 하였는데도 군사가 성장하지 못하여 결국 대량배양은 실패한 것으로 생각되었다. 발효에 대한 재현성이 나타나지 않았기 때문에 톱밥에 원인을 두고 재료의 출처를 파악해 보기로 하였다. 참나무 톱밥의 공급처인 신우임산에 알아본 결과 이번에 공급한 톱밥은 자라고 있는 생나무로 톱밥을 만들었으며 버섯을 배양하기 위해 가져가는 업자들은 마른 상태의 톱밥보다는 수분이 있는 생나무의 톱밥을 선호하여 생나무를 사용하였으며 배지를 만드는 과정은 아무상관이 없다고 하였다. 그래서 발효와 어떤 관계가 있는지 알아보기 위해 이전에 구입한 마른 톱밥과 이번에 구입한 생나무 톱밥을 가지고 고압 멸균하여 종균을 접종하였다. 두 종류의 톱밥을 비이커에 담아 고압살균하여 접종을 하였을 때는 표고군사 성장에는 톱밥판매회사의 답변처럼 아무런 차이 없이 성장하였다(그림 13).

이번에는 미강을 처리하지 않고 톱밥만을 가지고 수분을 공급한 후 종균을 50% 넣고 혼합 접종하여 멸균하지 않은 상태에서 표고 군사 성장의 차이를 알아보았다. 그 결과 마른 나무에서는 군사 성장이 이루어지지만 생나무 톱밥에서는 군사가 전혀 성장하지 못하였다.(그림 14). 물론 5일 이상 배양을 하면

두 톱밥 모두 오염이 되기 시작하였지만 생나무 톱밥에서는 균사성장이 되지 못하는 것을 알았다. 이번에는 두 종류 톱밥으로 발효를 한 결과 마른 톱밥에서는 균사성장을 하였으나 생나무 톱밥에서는 균사성장을 하지 못하였다 (그림 15).

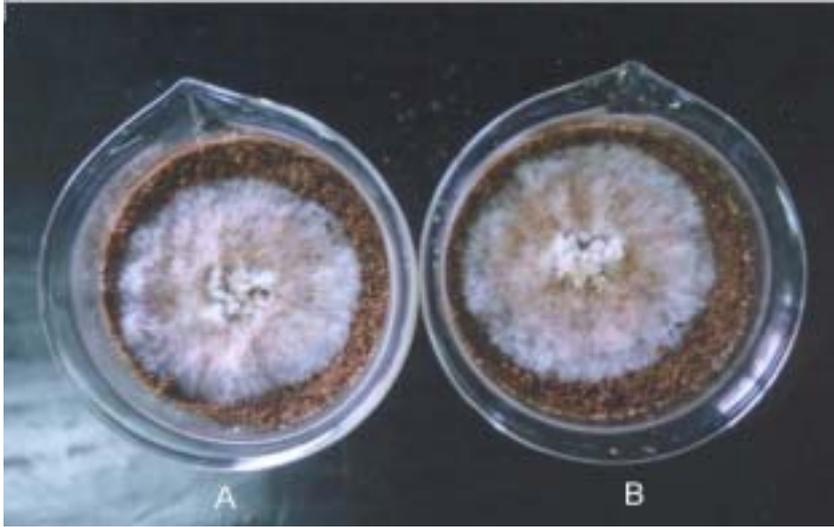


그림 13. 멸균상태에서 톱밥 종류에 따른 표고균사 성장비교
 ; 121℃, 30분 고압살균 후 표고종균 접종하여 10일 배양.
 A: 생나무 톱밥 , B: 마른나무 톱밥

지금 까지 표고버섯을 재배나 종균생산 하기 위해 모두 고압 살균을 하였기 때문에 생나무나 마른 나무나 그 차이를 알지 못하였기에 발효에 필요한 톱밥의 상태가 중요하다는 것을 알 수가 없었다. 그러나 어떤 물질인지는 모르지만 생나무에서는 균사성장을 저해하는 물질이 존재하며 고압살균과정에서 저해물질은 제거되지만 발효하는 과정에서는 제거가 되지 않는 것으로 보아 그 저해 물질은 고온 열에 의해 제거되며 미생물에 의해 분해되지 않는 물질로 보인다. 그러므로 발효를 하기 위해서는 톱밥을 만드는 나무의 벌채시기가 중요하며 원목재배에 쓰이는 나무로 톱밥을 사용해야 할 것으로 보인다.

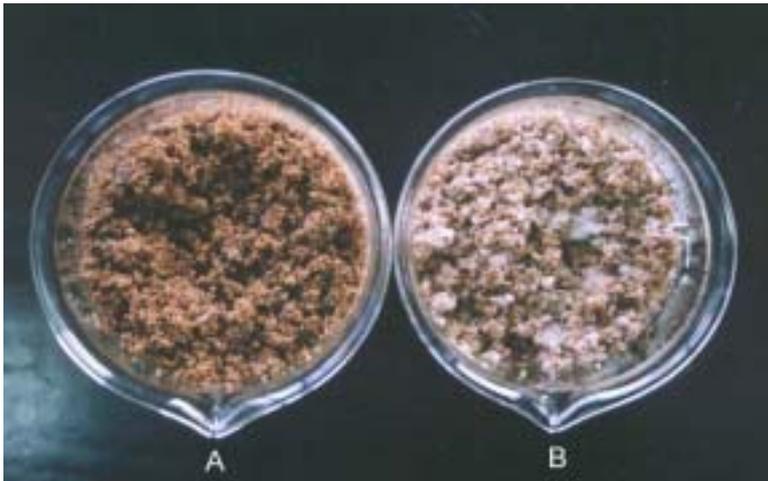
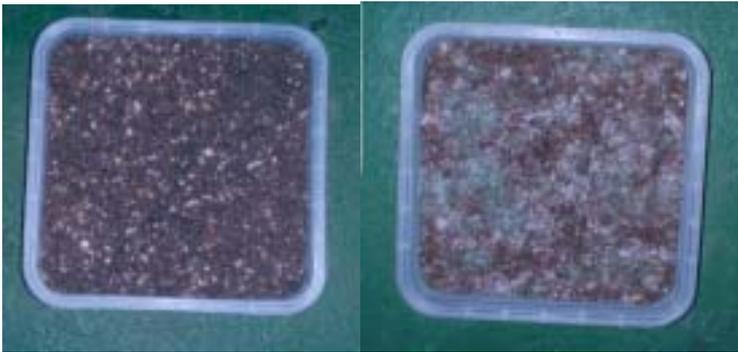


그림 14. 멸균하지 않은 상태에서 톱밥 종류에 따른 표고균사 성장비교
 ; 톱밥에 증류수 첨가 후 표고종균 접종하여 4일 배양
 A: 생나무 톱밥 B: 마른나무 톱밥



그림 15. 발효된 배지에서 톱밥종류에 따른 표고균사 성장비교
 ; 발효를 한 후 표고종균 접종하여 5일 배양
 A: 생나무 톱밥 B: 마른나무 톱밥



A

B

그림 16. 발효한 배지에서 표고균사가 사멸하는 모습

A; 종균접종 후 3일 배양

B; 종균접종 후 10일 배양

사. 마른나무로 만든 톱밥의 발효배지 조건

마른나무 톱밥을 사용하여 9% 미강을 섞고 정수된 물을 사용하여 발효를 하였다. 이때도 발효온도는 53℃로 설정하여 발효하였으며 발효온도를 충분히 유지하였다. 발효된 상태는 방선균이 풍부하게 자랐으며 배지의 물성도 손으로 비비면 부드럽게 부서지면서 뭉치지 않아 발효상태가 양호한 것으로 판단되었다. 그러나 방선균이 너무 잘 자란 것이 실험실 조건과 차이가 났다. 실험실 조건에서는 방선균보다는 흰 고온성 곰팡이의 성장이 두두러 졌는데 이 경우는 흰 곰팡이는 거의 없고 방선균만 풍부하게 자랐다.

이전의 실험에 의하면 방선균은 pH 7.5 이상에서 가장 잘 자라기 때문에 이 경우에도 pH를 측정하여 본 결과 pH가 8.2로 나타났다. 이 pH에서는 표고 균사성장이 억제되기 때문에 100상자는 현 상태에서 균사접종을 하였고 50상자는 교반기에서 1M의 HCl로 분무하여 배지의 pH를 7.0으로 조절하여 균사접종을 하였다. pH를 조절하지 않은 배지에서는 5일 까지 균사성장을 하지 못하고 접종원에서만 균사가 조금 자랐고 오염은 나타나지 않았다. 오염의 관찰은 7일부터 나타나기 시작하였다. 그러나 pH를 7.0으로 조절한 배지에서는 균사

가 성장하기 시작하여 하다가 배양 10일정도가 지나면서 배지 군데 군데 성장하지 못하고 균사가 약화되어 서서히 사라지는 현상이 나타났다. 이러한 현상이 시간이 지남에 따라 점점 확산되어 배지 전체에 퍼져 결국 오염이 되는 결과를 나타내었다. 결국 그림 16에서 보는 바와 같이 중균접종 후 10일 안에 균사가 사멸되면서 배지 전체가 푸른 곰팡이에 오염되었다. 또한 접종량에 상관없이 균사가 사멸되고 곰팡이 오염이 되었다. 그러므로 발효실에서의 배지 발효는 표고균사 성장에 실패하여 발효실에서의 대량 발효는 되지 않았다.

II. 야외 퇴적 후 발효실에서 발효한 경우

가. 8:2 배지

1) 야외퇴적

느타리 버섯과 양송이 버섯은 모두 발효된 배지에서 성장하는 버섯이다. 배지를 발효하기 위해서는 두 버섯모두 야외발효과정과 후 발효과정, 2단계의 과정을 거치게 된다(Fermor과 Grant, 1985). 그러므로 발효의 두 단계는 버섯 배지의 발효과정에서 일반적 사실로 되어 있다. 야외발효과정은 미생물증식과 미생물 천이를 이루어 고온성 미생물 성장을 유도하는 단계이며 후 발효과정은 고온성 미생물에 의해 단당류의 영양원을 소비시키고 다당류를 축적시키며 버섯균사에 필수적인 중요지방산 축적등을 이루어 배지재료의 물성과 영양분 축적등이 일어나도록 돕는 단계로 알려졌다(Stanek, 1972).

표고버섯 재배용 발효 과정도 발효실에서 직접 고온 발효를 유도하지 않고 기존의 발효방법과 같이 두 단계로 실시하여 표고균사 성장관찰과 발효과정의 차이점을 알아보려고 하였다. 톱밥과 폐면의 비율을 8:2로 하여 500kg의 배지를 만들었다. 유기질소원으로 미강을 사용하여 10, 15 그리고 20%를 첨가하였다. 배지제조과정은 발효실을 이용한 발효방법과 동일하였다. 제조된 배지는 콘크리트 바닥 위에 퇴적하였고 퇴적된 배지는 1일 마다 한번씩 뒤집기를 하였다. 야외 퇴적이 끝난 배지는 발효실로 입상하여 후 발효과정을 거쳤다. 발효 기간과 배지 재료를 선정하기 위해 우선 야외 발효 시간과 발효실에서의 후 발효 적정 시간을 측정하고자 하였다.

퇴적된 배지는 부분별 발효가 이루어지기 때문에 퇴적된 배지는 부분별 온도가 다르게 나타난다. 이 때 퇴적 더미내의 온도는 상단부에 온도계를 30cm 깊이의 온도를 측정하였다. 1일이 지나면 약 40℃의 온도를 나타내며 2일일 경과하면 55℃ 이상이 되었다. 배지 퇴적물을 매일 뒤집기를 하여 pH 변화를 관찰한 결과 표1처럼 시간이 퇴적시간이 증가하면서 pH도 따라서 증가하였고 미강의 함량이 증가할수록 pH가 높게 나타났다.

표 1. 8:2 발효배지의 야외 발효 pH 변화

시간(일) 미강(%)	1	2	3	4	5
10	5.8	6.3	6.7	7.0	7.3
15	6.2	6.1	6.4	7.6	7.9

2) 후발효

후발효 과정은 발효실에서 야외발효가 끝난 배지를 입상하여 50℃에서 발효하였다. 야외발효와 후 발효의 최적시간을 알기 위해 2일부터 5일 까지 야외 발효한 배지를 2-4일간 후 발효하였다. 후 발효과정의 pH 변화를 보면 전발효인 야외발효의 pH보다 pH가 1정도 증가한 후 후발효 시간에 따른 pH 변화는 일정하게 나타났다. 배지의 pH는 야외발효과정에서 정해지며 후 발효는 야외 발효에서 정해진 pH 보다 1정도 증가된 상태를 유지하였다. 그러므로 배지의 pH는 야외발효에 의해 정해지는 것으로 보인다. 즉, 야외발효에서 pH가 정해지면 후 발효는 pH가 1정도 증가한 상태에서 고정되는 것으로 나타났다.

표 2 8:2 배지+10% 미강을 첨가한 발효배지의 후 발효 pH 변화

후발효 야외발효	2일	3일	4일
2일	7.2	7.3	7.2
3일	7.3	7.5	7.6
4일	7.6	7.8	7.8
5일	7.8	8.0	7.9

표 3. 8:2 배지+15% 미강을 첨가한 발효배지의 후 발효 pH 변화

후발효 야외발효	후발효		
	2일	3일	4일
2일	7.3	7.5	7.5
3일	7.5	7.7	7.9
4일	7.9	7.9	7.8
5일	8.1	7.9	8.0

3) 균사 성장

발효가 끝난 배지는 샌드위치식 접종으로 배지 가운데에 접종하여 균사 성장을 관찰하였다. 배양조건은 앞의 실험과 동일하였다. 미강이 10% 첨가된 배지인 경우(표 4), 야외 발효 2일 후 후발효한 배지에서 균사성장은 후 발효 시간이 길수록 균사성장이 좋았다. 야외 발효 3일간 이루어진 배지에서도 후발효 시간이 길수록 균사성장은 좋았다. 그러나 야외발효 4일째 부터는 후발효 시간이 길수록 균사성장은 억제되었고 야외발효 5일 후 후발효 시간이 5일째는 균사성장을 하지 못하였다. 이러한 결과로 보아 후발효 시간은 길수록 좋지만 야외발효 시간은 길수록 균사 성장이 좋지 않았다.

그러므로 전발효인 야외발효의 시간은 배지를 만드는데 중요한 결정요인으로 작용하는 것으로 보인다. 야외발효 시간은 짧을수록 좋고 후발효 시간은 길수록 좋은 것으로 나타났다. 야외발효시간이 중요한 이유는 아마도 배지의 pH와 밀접한 관계를 나타내는 것으로 보인다. 즉, 후발효 기간 동안의 pH 변화는 거의 일정한데 비해 야외발효동안의 pH는 시간이 길수록 pH가 증가하여 표고균사성장에 부적합한 알카리 pH를 나타내기 때문으로 보인다.

15% 미강이 첨가된 경우도 같은 결과를 나타내고 있다. 2일동안 야외발효 4일 후발효에서 균사성장이 가장 좋았다. 그러나 5일 야외발효한 경우에는 후발효 기간에 상관없이 균사성장을 하지 못하였다. 야외발효와 후발효를 하는 발효방법도 미강의 첨가가 증가하면 균사성장을 억제하기 때문에 이러한 발효

방법도 수량을 증가시키는 요인으로 미강을 증가시키는데 한계를 갖고있다.

배지부피의 1/6만큼 종균과 혼합 접종하여 배양하여 균사성장을 관찰하였다. 그림 1은 2일간 야외발효 후 2,3그리고 4일 후발효한 배지에 종균을 혼합 접종하여 7일간 배양한 것이다. 2일간 후 발효한 배지에서 균사성장과 밀도가 가장 좋은 것으로 나타났다(표 5). 그러나 그림 2에서 보듯이 배양시간이 경과 하면서 배지 전체에 퍼져 있던 균사는 부분적으로 사멸하여 푸른곰팡이에 오염이 되었다. 오염의 정도는 후발효 기간이 적을수록 많았다. 배양 초기에는 후발효기간이 적을수록 균사성장은 좋다가 배양시간이 지나면서 오염은 잘되었다. 이러한 결과로 보았을 때 미숙 발효가 표고균사성장에 좋지만 미생물이 충분히 발달하지 못하여 푸른 곰팡이등과 같은 경쟁관계의 미생물들이 이용할 수 있는 영양분들이 남아 있어 오염을 일으키는 것으로 보인다.

표 4. 8:2 배지+10% 미강을 첨가한 발효배지에서의 균사성장

야외발효 기간	후발효시간(일)	10일 동안의 균사성장(cm)
2일	2	5.8
	3	6.5
	4	7.2
3일	2	4.2
	3	5.5
	4	5.9
4일	2	3.9
	3	4.3
	4	2.8
5일	2	2.3
	3	1.8
	4	no growth

표 5. 8:2 배지+15% 미강을 첨가한 발효배지에서 균사성장

야외발효 기간	후발효시간(일)	10일 동안의 균사성장(cm)
2일	2	5.4
	3	6.1
	4	6.9
3일	2	3.9
	3	4.8
	4	5.2
4일	2	4.1
	3	2.8
	4	1.3
5일	2	no growth
	3	no growth
	4	no growth



A

B

C

그림 1. 8:2 배지+15% 미강 발효배지에서의 7일 균사 성장

;종균은 배지무게의 14%를 혼합 접종

A: 2일 야외발효 + 2일 후발효

B: 2일 야외발효 + 3일 후발효

C: 2일 야외발효 + 4일 후발효



A

B

C

그림 2. 8:2 배지+15% 미강을 첨가한 발효배지에서의 14일 군사성장

A: 2일 야외발효 + 2일 후발효

B: 2일 야외발효 + 3일 후발효

C: 2일 야외발효 + 4일 후발효

나. 100% 톱밥배지

1) 야외발효와 후발효

실험실 조건인 small-scale에서 100% 톱밥만을 사용하여 발효를 한 배지는 군사밀도는 낮지만 군사성장이 빠르게 되었다. 톱밥만으로도 large-scale에서 같은 결과를 나타내는지 알기 위해 톱밥만으로 발효를 시도하였다.

톱밥만을 사용하면 영양원이나 자체적으로 존재하는 미생물이 적기 때문에 영양원으로 미강첨가를 15와 20%를 하였다. 톱밥만을 가지고 야외발효를 하는 동안 pH 변화는 5정도의 산성을 나타냈다. 이는 톱밥 자체의 pH와 같은 값이다. 야외발효 3일까지 pH가 5정도로 유지되다가 그 이후부터는 pH가 조금씩 증가하였다. 이러한 현상은 미강의 함량이 증가하면 야외발효 5일까지 산성을 나타냈었다. 퇴적된 배지의 30cm 깊이의 온도는 일반 발효처럼 50℃ 까지 올라갔기 때문에 pH가 낮은 이유가 미생물이 성장하지 않았기 때문에 톱밥의 pH가 그대로 유지 된 것이 아니라 톱밥만으로 퇴적을 하면 폐면을 첨가

한 배지보다 공극이 적어 공기의 흐름이 차단되기 때문에 혐기성 발효가 일어나는 것으로 보인다. 배지는 쉰 냄새가 가지고 있으며 배지의 색깔도 폐면을 첨가한 배지는 발효시간에 따라 점점 검은 갈색으로 되는데 반해 톱밥만을 발효하면 황토색으로 나타났다. 1일마다 뒤집기를 실시하여 신선한 공기를 공급하면 발효 4일부터는 쉰 냄새가 사라지면서 배지도 갈색을 나타내고 pH도 조금씩 올랐다.

그러므로 톱밥만을 사용하였을 때 낮은 pH는 미생물이 증식하는 만큼 산소공급이 이루어지지 않아 혐기성 상태로 유지되기 때문에 나타나는 현상으로 보인다. 15% 미강을 첨가한 톱밥배지는 야외발효 후 발효실에서의 2일간 후발효 한 배지는 계속해서 산성을 유지하였고 야외발효가 3일 이상된 배지에서는 중성의 pH를 유지하였다. 미강이 20% 첨가된 톱밥배지에서는 야외발효가 3일 동안 유지된 배지의 pH가 후발효 후에도 계속해서 산성을 나타내었다. 그러나 야외발효가 3일 이상이 되면 후발효의 pH는 크게 증가하여 pH 8이 되었다. 이러한 양극화된 현상은 야외발효에 의해 정해지는 것으로 보인다. 야외발효 pH가 6 이하 일때는 후발효 기간에 상관없이 산성 pH를 나타내며 야외발효 pH가 6 이상이 되면 후발효 동안 중성이나 알칼리성을 가진다. 그러므로 톱밥만으로 발효를 하는 경우 배지의 pH는 전적으로 야외발효에 의해 결정되는 것으로 보인다. 이러한 pH는 군사성장에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

표 6. 100% 톱밥 발효배지의 야외 발효 pH 변화

시간(일) 미강(%)	1	2	3	4	5
15	5.6	5.2	5.5	6.2	7.6
20	5	5	5	6.6	6.8

표 7. 100% 톱밥+15% 미강을 첨가한 발효배지의 후 발효 pH 변화

후발효 야외발효	2일	3일	4일
2일	6.4	6.8	6.8
3일	6.9	7.2	7.3
4일	7.2	7.2	7.5
5일	7.4	7.6	7.6

표 8. 100% 톱밥+20% 미강을 첨가한 발효배지의 후 발효 pH 변화

후발효 야외발효	2일	3일	4일
2일	5.3	5.3	5.6
3일	5.2	5.3	5.5
4일	8.2	8.8	8.9
5일	8.7	8.8	8.6

표 9. 100% 톱밥+15% 미강을 첨가한 발효배지에서의 군사성장

야외발효 기간	후발효시간(일)	10일 동안의 군사성장(cm)
2일	2	2.7
	3	4.1
	4	4.2
3일	2	5.4
	3	6.6
	4	7.2
4일	2	4.3
	3	3.1
	4	2
5일	2	2.2
	3	1
	4	no growth

2) 군사성장

군사 성장은 야외발효 3일과 후발효 4일에서 가장 좋았고 야외발효기간이 길수록 군사성장이 억제되었다. 표 9에서 보는 바와 같이 야외발효와 후발효기간이 총 7일인 경우, 야외발효 3일 후 4일간 후발효한 배지에서 군사성장은 10일 동안 7.2cm 성장하였는데 반해 야외발효 5일 후 2일간 후발효한 배지에서는 2.2cm 성장한 것으로 보아 군사성장에 미치는 요인은 후발효 보다는 야외발효 기간이 결정적인 역할을 하는 것으로 보인다(그림 3). 종균을 배지와 혼합접종을 하여 군사성장을 관찰한 결과 2일간 후발효한 배지에서는 배양 7일 후 부분적으로 군사가 성장하지 못하는 부분이 발견되었다. 4일간 후발효한 배지에서는 오염 없이 군사성장을 하였다(그림 4).

미강이 20% 첨가된 배지에서는 15% 미강이 첨가된 배지와 다르게 야외발효2일에서는 후발효 일수와 상관없이 군사성장을 하지 못하였다. 이 조건의 배지의 pH는 5정도로 낮게 나타났기 때문에 pH에 의한 영향으로 보인다. 또한

균사성장을 하더라도 균사성장을 상당히 억제하는 것으로 나타났다(그림 5). 결국 20% 미강을 첨가하여 발효하는 것은 pH를 산성이나 알카리 조건으로 치우치게 하여 균사성장을 억제하는 것으로 보인다.



A B C

그림 3. 100% 톱밥+15% 미강을 첨가한 발효배지에서의 균사성장

- A: 3일 야외발효 + 2일 후발효
- B: 3일 야외발효 + 3일 후발효
- C: 3일 야외발효 + 4일 후발효



A B C

그림 4. 100% 톱밥+15% 미강을 첨가한 발효배지에서의 7일 균사성장

;종균은 혼합 접종하였다.

- A: 2일 야외발효 + 2일 후발효
- B: 2일 야외발효 + 3일 후발효
- C: 2일 야외발효 + 4일 후발효

표 10. 100% 톱밥+20% 미강을 첨가한 발효배지에서의 균사성장

야외발효 기간	후발효시간(일)	10일 동안의 균사성장(cm)
2일	2	no growth
	3	no growth
	4	no growth
3일	2	1.6
	3	1.5
	4	1.7
4일	2	1.8
	3	2.4
	4	2.3
5일	2	1.1
	3	1.3
	4	1.1



A



B

그림 5. 100% 톱밥+20% 미강을 첨가한 발효배지에서의 10일간 균사성장

A: 4일 야외발효 + 3일 후발효, 샌드위치식 중균 접종

B: 4일 야외발효 + 3일 후발효, 혼합식 중균 접종

Ⅲ. 발효실에서 중온발효 후 고온 발효한 경우

1. 연구방법 및 내용

가. 배지제조

발효배지의 제조는 앞의 실험과 동일하게 하여 제작하였다. 배지의 성분은 참나무류 톱밥: 폐면의 비율이 8:2로 하였고 유기물 첨가로 미강을 사용하였다. 미강의 농도는 3, 6, 9 그리고 12%로 3%씩 증가시켜 표고 자실체 수량을 측정하고자 하였다. 배지의 총 무게는 500kg으로 하였으며 스팀보일러를 설치하여 50℃ 고온발효 유지와 65℃ 살균에 사용되었다.

나. 살균 조건

48시간동안 30℃에서 중온발효가 끝나면 배지 뒤집기를 하고 65℃에서 살균과정을 실시하여 표고균사성장을 관찰하였다. 살균시간을 정하기 위해 살균을 하지 않은 대조군과 65℃에서 2시간과 4시간을 실시하였다. 스팀보일러로 증기를 주입하여 저온살균을 하였다. 살균이 끝난후 배지온도를 50℃로 하온 시킨 후 5일간 50℃ 발효를 하였다. 50℃ 발효 2일 후 다시 뒤집기를 하여 발효동안 총 2번 뒤집기를 하였다.

다. 접종

표고버섯 접종원은 천안시에 위치한 세화종균개발원 종균회사에 주문하여 제작하였으며 40일 배양한 종균을 사용하였다. 850cc 1회용 종균병을 사용하여 종균분쇄기로 종균을 분쇄하였다. 발효가 끝난 배지에 분쇄된 종균을 혼합 접종하였다. 접종된 종균량은 배지 부피의 1/6 비율로 접종하였다

2. 연구결과

가. 발효과정

실험실 규모에서 사용한 발효방법과 동일한 과정의 발효를 진행하였다. 앞의 실험에서 보듯이 발효실에서의 배지 발효는 실험실에서처럼 동일한 조건이 되지 못하였다. 그러한 이유는 배지의 미생물이 발달하면서 자체 발열에 의해 배지온도가 올라가고 그 온도를 발효실의 환기시스템으로는 제어할 수 없었다. 또한 배지의 자체 발열이므로 자연스럽게 배지 온도가 상승하면 그 상황에 맞는 미생물이 발달하므로 이상적인 시스템이라고 생각했다. 그러나 그러한 발효 배지는 표고균사성장을 시키지 못하였기 때문에 강제적으로 온도를 조절하여 실험실 발효방법을 재현하고자 하였다.

발효실에 배지를 입상하고 1일이 지나면 자체 발열에 의해 배지 온도가 45℃까지 상승하게 된다. 배지에서 발산하는 자체 열로 온도가 올라갔지만 30℃ 부근에서 성장하는 중온성 미생물이 충분히 발달하기에는 부족한 시간으로 판단되어 환기조절구 설정 온도를 30℃에 설정을 하였지만 배지의 중간 온도는 45℃가 되었고 배지 아래 온도는 38℃를 나타냈다. 그러므로 온도 자동조절에 의한 환기조절구의 개폐만으로 배지에서 발산하는 열을 30℃ 까지 내릴 수 없었다. 배지온도를 30℃에서 50℃까지 조절할 수 있도록 하기 위해 송풍량 조절구와 바닥으로 들어가는 담파에 추가로 온도조절기를 설치하여 자동으로 개폐를 할 수 있도록 추가 보완조치를 하였다 (그림 1).

보완된 발효실 환기 장치는 그림 1에서 보는바와 같이 발효실의 모든 조절담파에 온도에 의해 자동으로 개폐가 가능하도록 하였다. 즉, 발효실의 온도가 30℃ 온도로 설정될 경우 배지의 온도가 올라가면 환기조절구가 열리면서 외부환기를 증가시키면서 동시에 송풍량 조절구는 닫히게 되어 발효실의 공기의 흐름을 줄여 외부 공기흐름을 증가시켰다. 이전의 환기시스템에서는 온도설정에 의한 송풍량 조절구의 개폐가 이루어지지 않았기 때문에 외부환기구의 개폐만으로 온도가 제어되어 30℃의 온도를 유지 할 수 없었다. 환기조절구가 열리고 송풍량 조절구가 닫히는 상태에서도 배지의 온도를 30℃를 유지하지 못하고 배지의 온도가 31℃가 되면 또 다른 자동온도조절기에 의해 바닥에 설치한 개폐구가 2차로 열리게 되어 발효실로 이동되는 송풍량을 증가시켜 강

제로 발효실 온도를 내리게 된다. 배지의 온도가 내려가면 1차적으로 바닥의 송풍량 조절구가 닫히고 2차적으로 환기조절구가 닫힌다. 이러한 시스템으로 하였을 때 배지의 온도를 30℃ 부근에서 조절할 수 있었다. 이 때 배지 중앙은 33-35℃가 되었고 배지아래는 26-28℃를 유지하였다.

이와 같이 30℃ 부근에서 중온발효를 48시간 실시하였고 24시간이 지나면 발효를 일정하게 하기 위해 배지 뒤집기를 하였다. 배지 뒤집기는 발효실에서 배지를 다시 꺼내 스크루 이송로더에서 섞어 준 후 다시 발효실로 재 입상하는 형식이었다. 30℃, 중온발효가 끝나면 스팀보일러로 생증기를 주입하여 65℃에서 3시간 저온살균을 한 후 50℃에서 고온발효를 하였다. 배지온도가 50℃ 이하로 내려가면 스팀보일러로 생증기를 주입하여 온도를 올려 주었다. 균사성장은 미강의 함량이 증가할수록 좋았으며 곰팡이등의 오염은 미강의 함량이 증가한다고 해서 더 증가하지는 않았다. 곰팡이의 오염은 미강함량의 증가보다는 발효가 제대로 이루어지지 않을 때 일어나는 것으로 보여진다.

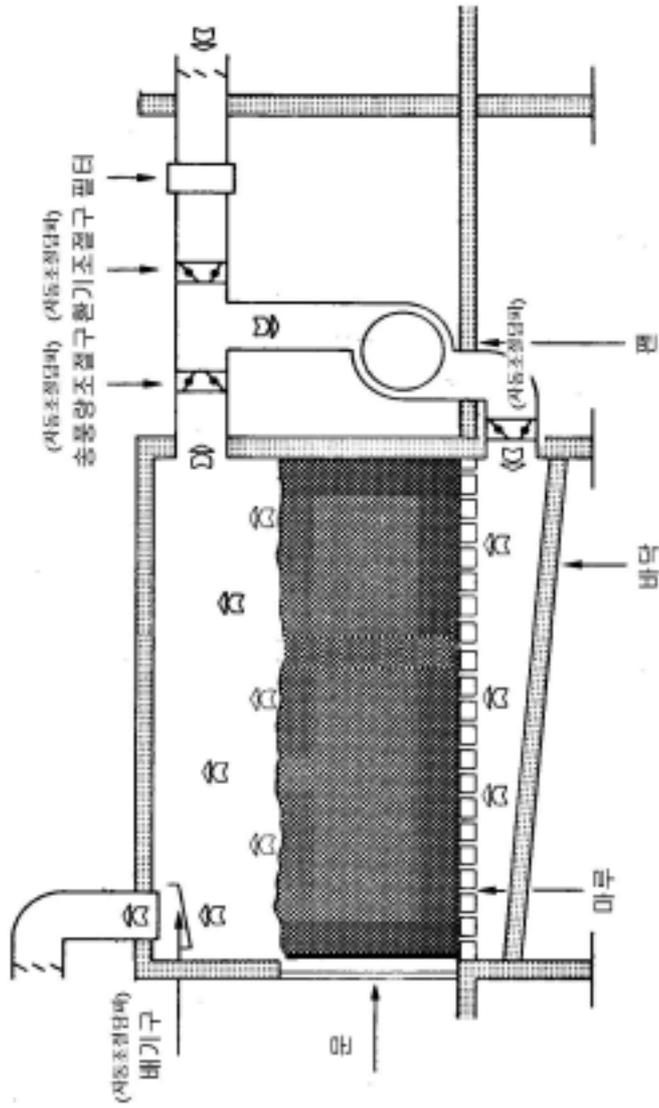


그림 1. 자동 담파 개폐기 추가 보완된 발효실 모식도

나. 발효시간

중온발효 후 고온 발효의 적정 시간을 알아내기 위해 시간별로 표고종균을 접종하여 배양 10일 후 균사 성장을 관찰하였다. 그 결과 4일 고온 발효된 배지에서는 균사성장을 하였지만 성장하지 않는 부분이 발생하였다. 성장하지 않는 부위는 균사성장이 억제되는 부위로 이곳에서 푸른 곰팡이의 오염이 발생된다. 발효된 배지에 표고종균을 접종 하지 않은 상태로 방치하면 20일이 지나도 푸른 곰팡이등의 오염은 관찰되지 않는 것으로 보아 표고균사의 성장이 억제되는 부분의 표고균사가 사멸하면서 오염을 유도하는 것으로 보인다. 5일간 후발효된 배지에서는 이러한 억제 부분이 나타나지 않았고 균사성장도 빠르게 일어났다. 6일 이상 후발효된 배지에서는 균사성장이 점점 낮아졌고 균사 억제되는 부분도 증가하였다. 이로서 고온발효는 일정한 시간이 요구됨을 알았다. 그러나 고온발효를 필요이상 오래하게 되면 오히려 균사성장이 억제되는 효과를 가져 왔다. 그러므로 고온발효는 4일 이상 6일 이하가 좋으며 최적의 고온발효 일수는 5일임을 알 수 있었다 (그림 2).

다. 살균 조건

중온발효가 끝나면 50℃ 고온발효를 하기 전에 65℃에서 살균과정을 실시하여 표고균사성장을 관찰하였다. 살균시간을 정하기 위해 살균을 하지 않은 대조군과 65℃에서 2시간과 4시간을 실시하였다. 4시간 살균하여 발효한 배지에서 표고균사 성장이 가능하였지만 한 개의 배지상자에 균사가 성장하지 못하는 부분이 4-8군데가 발생하여 그 부분에 곰팡이 오염이 되었고 100개 상자당 90개 이상에서 부분 오염이 되었다. 그러나 2시간 살균한 배지에서는 상자 배지당 오염되는 부분이 크게 줄었다. 100개의 상자에서 오염된 배지가 67개로 나타났고 오염된 배지의 경우도 부분 오염된 부위가 3-6개로 크게 줄었다(그림 3). 대조군으로 살균을 하지 않은 조건에서 배지의 오염을 더 줄어들어 61개의 부분오염이 되었으며 배지당 오염 부위는 4-7개로 비슷하게 나타났다. 배지의 살균은 발효과정에서 아주 중요한 요인으로 작용하는 것으로 되어있다. 느타리버섯 재배용 벚짚재배의 살균과 관련하여 균사 생장에 미치는 영향을 조사한 경우, 느타리 버섯 균사성장은 60℃에서 살균 한 것이 가장 우수하였고 살균온도가 높을수록 감소하였다. 살균시간은 12시간에서 좋았고 그 이상 일

때 오히려 감소하는 것으로 알려졌다 (전창성외, 2000). 이와 같이 살균과 살균 시간은 발효배지에 중요한 영향을 미치는 중요한 과정이다. 그러나 표고버섯을 재배하기 위한 톱밥발효의 경우 살균시간이 다른 발효배지보다 적은데도 불구하고 더 안 좋은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 오히려 살균을 하지 않은 대조군에서 오염이 더 적게 나타나 톱밥 발효배지는 느타리나 양송이 배지 발효와는 다른 결과를 나타냈다. 이러한 이유는 느타리나 양송이 배지에 있는 미생물이 상대적으로 적어 살균동안에 고온성 미생물이 크게 줄어 후 발효가 잘 이루어지지 않기 때문으로 생각된다.

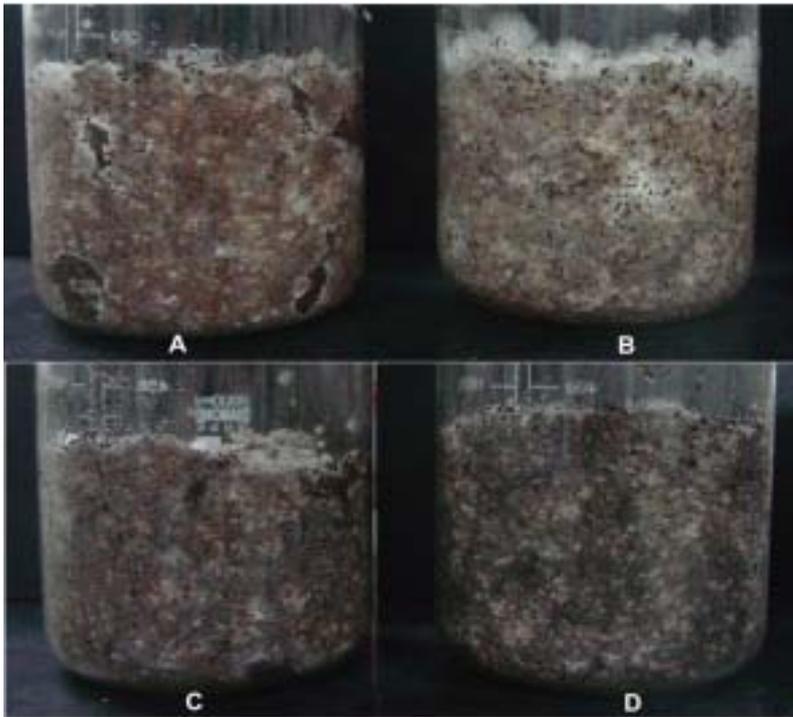


그림 2. 후발효 시간에 따른 표고균사성장 비교

- ; 10일간 배양
- A; 후발효 4일
- B; 후발효 5일
- C; 후발효 6일
- D; 후발효 7일



그림 3. 배양과정에서의 균사억제 부분

라. 배지 뒤집기

배지 뒤집기는 발효실에서 배지 발효온도 편차가 5-6℃ 정도 발생하기 때문에 고루게 발효시키기 위해 뒤집기를 실시하였다. 이러한 뒤집기를 실시하면서 후 발효 시간별로 균사성장을 관찰한 결과 후 발효 2일까지는 균사성장이 빠르게 일어나다 뒤집기를 실시하고 난 발효 3일째에는 균사성장이 크게 줄었다. 또한 4일과 5일째 후발효 배지에서도 균사성장은 크게 줄었다. 그러나 발효 2일째 배지에서도 표고균사 성장은 빠르게 일어났으나 배양 3일째부터 균사 성장을 멈추고 부분오염이 발생하였다. 발효 2일부터 갑자기 균사성장이 억제되는 현상은 무엇인가 발효조건이 나쁘게 일어나는 것으로 판단하여 배지 뒤집기에 문제가 있는 것으로 보았다. 배지 뒤집기를 실시하면 뒤집기 전에 풍부하게 자라던 고온성 곰팡이도 더 이상 관찰되지 않았다. pH 변화를 보면 뒤집기를 실시한 후에 pH가 증가했음을 알 수 있다(표 1). pH 변화만 보더라도 표고균사 성장에 적합하지 않은 pH 이기도 하지만 이렇게 갑자기 pH가 변했다는 것은 배지 뒤집기 후 발효 조건이 크게 달라졌음을 의미한다. 균사성장을 보면 배지 뒤집기 이 후 표고균사 성장이 크게 억제됨을 알 수 있다(표 2).

따라서 후발효 동안에 배지 뒤집기를 실시하지 않았다. 그 결과 배지의 pH는 후 발효동안 일정한 pH를 나타내었고 표고균사 성장에 적합한 약산성을 나타냈다. 균사성장도 뒤집기를 한 배지 보다 균사성장이 억제되지 않고 성장하였다. 이러한 결과는 배지 뒤집기를 하면 배지의 미생물군집에 영향을 미쳐 뒤집기 전에 미생물 군집과 뒤집기 후의 미생물군집이 다르게 형성되는 것으로 보인다. 그로 인해 pH 변화 유도하는 것으로 보인다. 결국 배지에서 미생물 성장은 일정한 조건에서 자연스러운 미생물의 변화가 일어나는 것이 좋으며 배지 뒤집기와 같은 인위적인 환경변화는 배지의 미생물 군집의 변화를 가져오며 배지의 환경이 새롭게 변해 배지의 성질을 변화하게 되는 것으로 보인다. 그러므로 고온 발효를 하는 동안 배지 뒤집기와 같은 환경 변화를 주지 않는 것이 중요하다.

표 1. 배지뒤집기 횟수에 따른 배지 pH 변화

후발효일수 \ 뒤집기 횟수	2	3	4	5
1	6.5	7.4	7.7	7.7
0	6.4	6.6	6.6	6.5

표2. 배지뒤집기 횟수에 따른 균사성장

후발효일수 \ 뒤집기 횟수	2	3	4	5
1	2.8cm	1.3cm	1.5cm	2.1cm
0	2.7cm	2.9cm	3.2cm	3.4cm

; 샌드위치 접종 후 22℃에서 7일간 배양, 미강 9% 첨가한 8:2 배지

마. 접종

표고버섯 접종원은 천안시에 위치한 세화종균개발원 종균회사에 주문하여 제작하였으며 40일 배양한 종균을 사용하였다. 850cc 1회용 종균병을 사용하여 종균분쇄기로 종균을 분쇄하였다. 발효가 끝난 배지에 분쇄된 종균을 혼합 접종하였다. 접종된 종균량은 배지와 종균의 부피 비로 1/6 비율 하였다. 배양 상자에 3-3.2kg 정도의 배지를 담았다. 배양조건은 20-22℃에서 습도는 80%였다. 종균 접종량의 차이를 보기 위해 1/2과 1/3 비율로도 접종하여 보았다. 종균량이 많은 배지는 당연히 균사 성장이 빠르게 일어나 배양 15일 정도되면 균사 밀도가 증가하여 배지 위의 균사는 피막을 형성하기 시작하였고 수분 발생이 많아 재배상자 뚜껑에 물방울이 많이 생겨 다시 배지 위로 떨어지는 결과를 가져 왔다. 그러나 종균 접종량이 적을수록 균사 성장시간은 늘어났지만 15일 지나도 배지의 위의 균사는 피막이 형성되지 않고 솜처럼 부드러운 균사를 유지하였고 배지 뚜껑에 물방울이 생기는 현상도 나타나지 않았다. 배지의 발효가 제대로 이루어지지 않은 경우는 접종량에 상관없이 오염이 나타났다. 이러한 결과는 배지의 발효상태가 오염 없는 균사성장에 절대적이며 접종량과는 관계가 없는 것으로 나타났다.

배지 배양은 10일이 지나면 배지 전체에 균사가 퍼지게 된다. 그러므로 오염 여부는 10일 이전에 자라지 못하는 부분이 나타나게 된다. 10일 이후부터 균사의 밀도가 점차 증가하면서 배지전체에 균사로 만연하게 된다(그림 2). 배지의 오염 주범은 푸른 곰팡이이며 배양 6일부터 균사성장이 억제되는 부분이 발생하여 이 부분에서 곰팡이의 오염이 발생한다. 표고균사와 함께 푸른 곰팡이도 성장을 하다 배양 30일 정도가 되면 표고균사에 밀려 점차 사멸해 가거나 더 이상 오염이 확산되지 않고 표고균사가 성장하였다. 이 배지를 배양완료 후 상자에서 꺼내 분무기로 세척한 후 자실체 유도를 하여도 푸른 곰팡이의 발생은 관찰되지 않았다. 발효실에서 배지를 발효하는 앞의 실험에서 배지에 접종된 표고균사는 배양 10일 이전에 균사성장을 멈추고 푸른곰팡이에 오염이 되어 결국 배지 전체가 푸른곰팡이에 오염이 되어 표고균사가 성장하지 못하고 사멸하였지만 중온발효를 실시한 조건에서는 푸른 곰팡이가 부분적으로 오염이 되지만 표고 균사성장을 계속 진행되어 표고균사가 성장한 배지를 만들 수 있었다. 그러므로 표고균사 성장을 위해 중온발효 과정이 절대적으로



그림4. 표고균사배양

- A: 균사배양 단계
- B: 숙성 배양 단계

중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

바. 배양

고압살균에 의한 봉지 재배방법의 경우 암배양과 명배양으로 나뉘어 배양하게 되는데 표고균사가 자라서 톱밥배지에 만연하게 되면 배지의 표면이 갈색~흑갈색으로 변하게 된다. 약 60일간의 전기 배양이 완료되는 시기부터 톱밥배지를 약 50~150 룩스의 빛이 있는 곳에서 명배양을 30~40일간 계속하면 배지표면에 갈색피막이 형성된다. 이 피막이 형성되면 이제까지 PP봉지나 통으로 보호되던 표고균사가 만연된 배지덩이는 외부공기와 접촉시켜도 다른 균에 잘 오염되지 않을 뿐 아니라 배지내의 수분 증발을 억제하게 된다.

발효에 의한 표고균사 배양인 경우, 따로 빛을 주어 갈색피막을 유도하지 않아도 배양 30일 전 후 하여 배지 위부터 갈변화가 시작되고 점차 배지 측면으로 이어져 배지 아래까지 갈색으로 변하면서 두꺼운 갈색피막이 이루어진다. 그러나 모든 배지가 배지 아래까지 갈변화가 되는 것은 아니지만 배지 위와 측면의 갈색피막은 모든 배지에서 일어나는 공통된 상황이다(그림 4, 6). 지금까지는 빛에 의해 갈색 피막을 유도하였지만 이 실험에서 갈변화를 유도하지

않아도 된다는 사실을 알았다. 이러한 이유는 고압살균에 의한 봉지 배양은 완전히 밀봉하여 공기필터에 의해 공기흐름이 이루어져 원활한 산소 공급이 이루어지지 않았지만 발효에 의한 재배 방법은 상자에서 재배를 하고 상자의 뚜껑에는 공기의 흐름이 잘 이루어지도록 공간이 있기 때문에 공기의 흐름이 원활하여 산소에 의해 갈변화를 촉진하는 것으로 보인다.

사. 발이 유도

표고버섯 자실체 유도 기간을 알기 위해 배양 일 수를 80, 90 그리고 100일로 하여 재배상장에서 배지를 꺼내서 저온자극으로 발이를 유도하였다. 재배상장에서 배지를 꺼낸 후 분무기로 배지를 세척하여 배지의 분해수를 제거하였다. 세척된 배지는 재배실로 옮겨 18℃에서 저온자극을 주었다(그림 7). 이 때 상대 습도는 85-90%를 유지하였다. 80일 배양한 경우 자실체 유도 기간은 25-30일이 소요되었으며 90일 배양한 경우에는 20-25일 소요되었다. 100일 배양한 경우에는 10-12일이 걸렸다. 이러한 결과로 보아 자실체 유도를 위한 군사배양 기간은 100일 이상 하는 것이 자실체 유도에 적당한 배양일 수로 판단된다.

고압살균에 의한 봉지재배는 1kg 정도의 톱밥배지의 경우 배양기간 80~100일, 정도 소요되며 배지의 중량이 증가할수록 배양일수는 증가하는 것으로 되어 있다. 2.5kg 배지의 경우 접종 후 5-6개월의 배양기간이 소요되는 것으로 되어 있다. 배지 발효에 의한 상자 재배의 무게는 3-3.2kg 정도이므로 100일 정도의 배양으로 자실체를 형성할 수 있으므로 표고버섯 배양일 수를 크게 줄일 수 있었다. 지금까지 표고버섯 봉지재배법의 단점 중에 하나인 긴 배양기간을 크게 줄일 수 있어 배양 기간을 단축할 수 있는 재배법이 될 수 있다. 재배기간이 단축되는 이유는 종균을 혼합 접종을 하여 군사가 배지 전체에 자라는 시간을 줄일 수 있기 때문으로 보이며 또한 배지상자의 환기가 잘 되기 때문에 성장을 촉진시키는 것으로 보인다.

자. 표고버섯 발생과 수확

1) 1차 자실체 수확

톱밥: 폐면(8:2)배지에 3% 미강을 첨가한 배지(그림 10)에서 100일 배양 후 1차 발이만 하였을 경우 3% 미강이 첨가된 배지에서는 평균 57g의 자실체를 얻었다. 120일을 배양하여 자실체를 유도하여도 같은 결과를 나타냈다.

이는 배양일 수에 상관없이 자실체 수량이 결정되었고 배지를 발효하는 경우라도 첨가되는 영양분이 부족하면 그에 따른 버섯의 자실체도 감소하는 것으로 나타났다. 6% 미강이 첨가된 배지(그림 11)에서는 171g의 자실체 그리고 9% 미강이 첨가된 배지(그림 12)에서는 257g이 수확되었다. 12% 미강 첨가의 경우 1차 배양에서 배지 개당 평균 372g이 수확되었다. 일반적으로 생표고 버섯의 상품성은 자실체의 중량, 갓의 크기, 두께 등에 영향을 받기 때문에 (Ohga 등, 1985), 이를 임의로 품질을 상, 중, 하로 3단계로 분류하여 그 중 상품은 162g, 중품은 140g 그리고 하품 70g이 되었다(그림 15, 표 3). 이러한 결과로 보아 미강의 첨가는 자실체 수량을 증가시키는 요인으로 작용하고 있음을 알 수 있다.

상자배지에서 형성된 자실체는 대부분 배지 위에서 발생하는 특징을 가지고 있다. 자실체의 13%만이 배지 측면에서 발생하였고 87%는 배지 위에서 발생하였다(그림 7). 배지 위에서 자실체가 형성하였기 때문에 버섯의 갓은 원형을 유지할 수 있고 줄기가 곧게 성장하여 형태 면에서 기존의 원목재배와 비교할 때 버섯의 형태를 변형시키지 않아 품질이 우수하다고 할 수 있다. 최근 일본에서는 버섯의 품질을 높이기 위해 톱밥배지 위에서만 버섯을 발생시키는 상면 재배방법을 개발하여 특허를 획득하였다. 발효배지로 재배를 한다면 윗면의 넓이가 측면보다 크기 때문에 대부분의 버섯을 상면 재배할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 표고버섯의 형태 그대로 유지하는 고품질의 버섯을 재배할 수 있게 되었다.

표 3. 미강 12% 첨가배지에서 버섯생산량 및 품질

버섯등급	발생량	갓직경	갓두께	줄기길이	줄기직경	개체중
상	162g	7.8cm	2.5cm	4.5cm	2.4cm	36g
중	140g	6.4cm	2.1cm	4.2cm	2.0cm	28g
하	70g	6.0cm	1.9cm	4cm	1.6cm	20g

2) 2차 자실체 수확

1차 수확은 톱밥배지에 원기가 형성되어 있으면 버섯 발생처리 후 10일~20일이면 최고에 달하여 기존의 봉지재배와 같은 결과를 얻었다. 그러므로 표고균사 배양과 자실체 수확은 기존의 봉지 재배방법과 같으므로 동일한 방법에 의해 표고버섯 발생과 수확을 실시하였다. 동일 배지에서 2차 수확을 얻기 위하여서는 수확 후 배지의 휴양을 필요하다. 2차 수확을 하기 위해서는 두 가지 방법이 있는데 연속발생법과 침수처리법이다. 연속 발생법은 1차 버섯발생에 이어서 충분한 살수와 가습 처리로 톱밥배지를 건조시키지 않은 상태에서 계속 버섯을 발생시켜 수확하는 방법이다. 그러나 이보다 큰 톱밥배지에서는 연속 발생법으로는 버섯의 발생량이 낮아지는 것으로 되어 있다(이원규, 1997; 이태수의, 2000). 그러므로 침수처리법으로 배지를 휴양과 침수를 하였다. 2차 및 3차 수확은 배지 내의 충분한 영양과 수분 등이 뒷받침되지 않으면 정상적인 수확을 기대할 수 없게 되기 때문에 침수통에 배지를 넣고 24시간 동안 침수처리 후, 재배실로 배지를 옮겨 2차 발이를 유도하였다(그림 9, 14). 12% 미강이 첨가된 배지에서 2차 발이된 버섯의 자실체 수량은 363g이 수확되어 1차 발이와 비슷한 자실체 수량이었고 품질도 같은 양상을 보였다. 그러나 3차 발이부터 자실체 수량이 214g으로 감소하면서 품질도 감소하였다.



그림 5. 재배상자에서 표고균사배양 단계



그림 6. 표고균사의 갈변화 단계



그림 7. 갈변 후 표고버섯 발이 단계



그림 8. 표고버섯 재배단계



그림9. 침수 후 2차 발이 유도 단계



그림 10. 톱밥:폐면:미강(8:2+3%)배지에서 성장한 표고버섯 자실체



그림 11. 톱밥:폐면:미강(8:2+6%)배지에서 성장한 표고버섯 자실체



그림 12. 톱밥:폐면:미강(8:2+9%)배지에서 성장한 표고버섯 자실체



그림 13. 톱밥:폐면:미강(8:2+12%)배지에서 성장한 표고버섯 자실체



그림 14. 톱밥:폐면:미강(8:2+12%)배지에서 2차 발이된 표고버섯 자실체



그림 15. 수확된 버섯 자실체의 비교

- A: 배지 측면에서 발이된 표고버섯
- B: 배지 상면에서 발이된 상품
- C: 배지 상면에서 발이된 중품
- D: 배지 상면에서 발이된 하품

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연도별 연구목표

1) 1단계 2000년도 연구목표

느타리와 양송이 재배를 위한 배지의 발효에서는 방선균의 존재 여부가 배지의 적합 여부를 알 수 있는 지표이다. 이러한 관점에서 기존의 재료로 발효를 하여 미생물의 분포와 발효 시간에 따른 미생물의 천이를 조사한다. 온도와 pH는 미생물 성장에 미치는 중요한 요인으로 작용을 하므로 온도와 pH를 인위적으로 변화시켜 미생물의 변화를 비교 조사한다. 이러한 자료를 바탕으로 발효에 미치는 중요한 요인을 찾아내어 참나무 톱밥을 이용한 발효 조건의 기초 자료로 이용하여 최적의 발효 배지를 완성한다.

2) 2단계 2001년도 개발목표

1차 연도에 완성된 톱밥 발효 배지에서 표고 균사 성장에 미치는 요인을 조사하여 균사체 성장의 최적 조건을 찾는다. 그리고 발효배지에 적합한 품종을 선발한다. 자실체 생산을 유도하는 배양 기간과 자실체 생산량을 증가시키는 요인을 조사한다.

3) 3단계 2002년도 개발목표

사업화가 가능한 수준까지 생산 수율을 향상시키고 발효 배지를 이용한 표고버섯 재배의 총괄적 시스템을 확립한다.

연구개발목표의 달성도

- ① 영양분이 풍부한 고체영양배지를 사용하여 중온성미생물과 고온성미생물의 집락수를 측정하여 미생물의 종류와 천이과정을 알아내었다.
- ② 발효배지에서 2종의 고온성 미생물을 분리하고 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 *Pseudoxanthomonas* sp. DK-1와 *Thermobifida cellulolytica* DK-2로 명명하였다. 이 미생물은 서로 연관되어 있으며 배지 발효에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.
- ③ 온도와 pH는 미생물 성장에 미치는 중요한 요인으로 작용을 하므로 온도와 pH를 인위적으로 변화시켜 미생물의 변화를 비교 조사한 결과 2종의 고온성 미생물은 약 알칼리성에서 최적의 성장을 보였다.

- ④ 이러한 자료를 바탕으로 발효에 미치는 중요한 요인을 찾아내어 참나무 톱밥을 이용한 발효 조건의 기초 자료로 이용하여 최적의 발효 배지를 조사하였다.
- ⑤ 표고버섯 품종간의 균사성장의 비교는 포테이토-텍스트로스 고체 배지를 사용하여 성장 적온에서 시간에 따른 균사 길이와 밀도를 측정하고 발효배지에서 품종간의 균사 성장 길이와 밀도를 측정하여 포테이토-텍스트로스 고체 배지에서 빠른 성장을 하는 표고버섯을 선발하였다.
- ⑥ 농가 부산물의 첨가에 의한 균사 성장 길이와 밀도를 측정하여 유기태급원 공급에 따른 영양원으로서의 가치를 측정한다.
- ⑦ 화학적 요인에 의한 균사성장 조사는 발효가 이루어진 배지에 완충용액과 HCl 그리고 KOH로 pH를 4-8까지 변화시켜 균사성장을 성장 길이와 밀도로 비교하여 화학적 요인에 의한 영향을 조사한다.
- ⑧ 톱밥발효배지에 미치는 요인을 조사하여 톱밥발효 배지 재료를 확정하였다.
- ⑨ 발효실에서 발효과정과 단계를 정립하였다.
- ⑩ 발효실에서 대규모 발효된 배지를 이용하여 표고버섯균사가 성장할 수 있게 하였다.
- ⑪ 발효배지를 이용하여 표고버섯 자실체를 생성시켰다.
- ⑫ 부재료로서 미강이 자실체 수량증가에 요인으로 작용하고 있음을 알아내었다.
- ⑬ 배지무게당 30%의 자실체 수량 수확하였다.
- ⑭ 버섯의 품질을 향상시킬 수 있는 상면재배가 가능하였다.

관련분야의 기술발전에 대한 기여도

원목재배에 의존하고 있는 표고버섯 재배법을 대체하기 위해 배지를 고압살균하여 무균적 조작과 배양으로 재배하는 톱밥배지 제조법이 개발되었다. 그러나 무균시설과 조작에 따른 과도한 투자비로 인하여 현재까지 경쟁력을 갖추지 못하여 보급되지 않고 있는 실정이다. 그러나 양송이 재배법처럼 발효에 의해 배지를 제작하여 표고버섯을 재배할 수 있다면 원목재배법을 대체할 수 있는 새로운 방법이 될 수 있다. 그러나 현재까지 톱밥을 발효하여 표고버섯을

재배하는 기술은 전 세계적으로 개발되지 못한 기술이다. 톱밥발효배지에 의한 표고버섯재배는 표고버섯분야를 크게 발전시킬 수 있는 기술로써 전 세계적으로 앞선 표고버섯재배기술을 선도하여 나아갈 수 있을 것이다.

발효배지에 의한 표고버섯재배의 장점은 다음과 같다.

- ① 멸균 톱밥재배법에서는 멸균기의 규모와 살균시간 그리고 무균실에서 사람이 접촉할 수 있는 능력에 따라 일일 생산량이 제한을 받는다, 그러나 발효에 의한 톱밥배지 제조과정은 무균조작이 필요하지 않으므로 기계 조작으로 인력을 줄일 수 있다.
- ② 고압살균기와 무균실, 무균접종장치등의 고가 장비가 필요하지 않아 원가가 절감되고 그에 따른 유지비가 필요하지 않다. 터널식 발효를 이용하면 자체 발열을 사용하여 발효를 하기 때문에 에너지 사용이 거의 필요하지 않아 에너지를 절약할 수 있다.
- ③ 발효실을 이용하여 배지를 생산하기 때문에 대규모 생산이 가능하다.
- ④ 발효를 하여 배지를 제작하게 되면 무균조작이 필요하지 않으므로 지금까지 하기 어려웠던 자동화를 상당부분 실현할 수 있을 것이다. 표고버섯 생산에 기계화가 가능해지면 규격품을 생산할 수 있고 인력절감이 이루어질 수 있으며 자본을 집약적으로 투자하여 시설을 현대화하는 데도 용이한 잇점을 갖게 될 것이다.

추가연구의 필요성

발효실에서 참나무류 톱밥을 발효하여 표고버섯을 재배할 수 있음을 증명하였다. 발효에 대한 기초 연구결과를 완성하였으며 버섯 자실체 수량을 증가시키는 요인과 가능성을 확인하였다. 그러나 지금까지 표고버섯의 배지발효에 대한 직접적인 연구가 없었기 때문에 기초자료에 대한 정보 부족으로 많은 시행착오를 경험하였다. 표고버섯 발효배지는 양송이나 느타리 버섯배지의 발효과정과 전혀 다르기 때문에 문제점을 수정하는데 더 많은 어려움을 겪게 되었다. 이 연구는 표고버섯 발효배지에 대한 최초의 연구이기에 아직도 해결하여야 할 과제가 남아 있다. 즉, 푸른 곰팡이와 같은 오염을 감소시키는 연구, 실험에 사용된 배양용기가 가장 적합한 것인가, 중온발효와 고온발효를 동시에 수행하는 발효실의 최적화문제, 배지제조와 뒤집기 그리고 종균접종의 기계화등 과

제가 남아 있다. 이는 새로운 재배 방법이기 때문에 당연히 수행되어야 하는 차후의 과제이다. 또한 자실체 수량을 보다 증가시키기 위한 연구가 남아 있다. 현재 12% 까지 미강을 첨가하였지만 그 이상의 미강을 첨가하여 충분히 자실체 수량을 증가시킬 수 있을 것으로 보인다. 그러면 현재의 고압살균에 의한 봉지재배법 보다 수율을 높일 수 있을 것이다. 이와 같이 추가의 연구가 수행된다면 국내에서 바로 산업화 할 수 있으며 선진국등에 특허를 출원하여 기술에 수출이 가능할 것으로 보인다.

타 연구에의 응용

현재 우리나라의 경우 느타리버섯과 양송이 버섯을 제외하고 재배되고 있는 식용과 약용버섯은 모두 고압살균에 의한 병버섯 재배에 의해 재배되고 있다. 이들의 특징은 모두 톱밥을 주재료로 이용되고 있기 때문에 톱밥발효기술을 적용하면 발효에 의해 재배될 수 있는 버섯이 상당히 있을 것으로 보인다. 예로 실험용으로 새송이 버섯을 톱밥발효배지에 접종한 결과 균사성장을 할 수 있었다. 뿐만 아니라 느타리 버섯의 경우 발효에 의한 재배가 대부분을 차지하는데 50% 정도의 실패를 경험하고 있다. 실패의 요인은 정해진 시스템에 의해 발효가 이루어지지 않고 발효와 살균, 배양과 재배등이 모두 같은 장소에서 이루어지기 때문에 정확한 발효과정을 진행할 수 없기 때문이다. 발효실을 통한 재배방법은 외부환경의 영향을 받지 않고 정확히 정해진 시스템에 의해 이루어지기 때문에 실패를 줄일 수 있을 것이다. 또한 발효실에서는 강제환기로 인하여 산소공급이 원활하기 때문에 호기성 발효를 유지할 수 있는 특징을 가지고 있다. 발효실의 설치비용이 판넬과 송풍기 그리고 온도조절기만 있으면 되므로 느타리 버섯재배용으로 보급이 가능할 것으로 보인다.

제 5 장 참고문헌

- 무익재, 정시련, 전경희. 1995. 표고버섯 렉틴의 림프구 자극 분열 및 암세포 응집효과. 약학회지. 39(3): pp. 260-267.
- 민두식. 1995. 표고버섯, 새로운 재배와 경영. 신농민 강좌시리즈. pp. 209-216.
- 전창성, 신동훈, 박정식, 오세종. 2000. 벚짚배지의 살균조건에서 느타리버섯 균의 균사생장에 미치는 영향. 균학회지. vol; 28. pp. 103-108
- 유영석. 1999. 퇴비화의 이론 및 응용. 동화기술. pp. 79-89.
- 이상선. 1991. 전통적인 버섯재배지에서 사용되는 미강의 역할. 균학회지. vol; 19. pp. 47-53
- 이태수, 윤갑희, 박원철, 김재성. 2000. 새로운 표고재배기술. 임업연구원연구 자료. 158호. pp. 1-11.
- 이원규. 1997. 표고 톱밥재배 기계화 및 시스템 개발. 농림부연구보고서. pp. 32-38
- 최미연, 정수자, 임상선. 1998. 표고버섯 열수 추출물이 발암원을 급여한 흰쥐의 간 기능 관련 효소활성에 미치는 영향. 한국식품영양학회지. 11(1): pp. 114- 122.
- Alfredsson, G. A., S. Baldursson, and J. K. Kristjansson.** 1985. Nutritional diversity among *Thermus* spp. isolated from Icelandic hot springs. Syst. Appl. Microbiol. vol; 6. pp. 308-311.
- Aoyagi, Y., A. Kasuga., H. Sasaki, M. Matuzawa, Y. T. sutagawa, H. Kawai** 1993. Chemical compositions of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) cultivated on logs and sawdust substrate beds and their relations to composition of the substrate. J. Japanese Soc. Food Sci. Tech. vol; 40. pp.771- 775.
- Bahl, N.** 1991. Supplementation of nitrogen in *Agaricus* compost by agro wastes. Mushroom science XIII. Vol; 1. pp. 201-204.
- Ball, C.** 1985. Perspectives for protoplasts in the genetics of industrially im

portant fungi. In *fungal protoplasts Application in biochemistry and genetics*. ed. J.f. Peberdy & L.Ferenczy. pp. 337-343. New york. Basel: Marcell Dekker.

Beck, K., C.R. Rasmussen. 1969. Further investigations on organic and inorganic supplementation of mushroom compost. *Mushroom science* VII. vol; 3. 329-341.

Campbell, A.C., M. Racjan 1999. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shiitake). *International biodeterioration and biodegradation*. vol; 43. pp.101-107.

Chai, J.K., Lee, S.J. and Kim, Y.S., 1999. Utilization of *Robinia pseudoacacia* as sawdust medium for cultivation of edible and medicinal mushrooms. *Plant Res.* vol; 2(1). pp. 42-48.

Chai, J.K., S.J. Lee, Y.S. Kim, K.H. Lee 1999. Biodegradation of Mill-waste Substrate by *Flammulina velutipes*. The 6th International Symposium on the Development of Anti-cancer Resources from Plants & Annual Meeting of the Plant Resources. *Plant Res.* pp .80-81.

Chang, R. 1996. Functional properties of edible mushrooms . 1st Int'l Conference on East- West perspective on functional foods . *Nutrition Rev.* Part 2. vol; 54. pp. 91- 93.

De Bertoldi, M., G. Vallini, A. Pera. 1983. The biology of composting, a review. *Waste Manage. Res.* vol; 1. pp 167-176.

Delpech, P., J.M. Olivier 1991 Cultivation of shiitake on straw based pasteurised substrates. *Mushroom science* XIII. Vol; 2. pp. 523-528

Eger, G. 1978. Biology and breeding of Pleurotus. In *the biology and cultivation of edible mushrooms*. ed. S.T. Chang & w.A. Hayes. pp. 497-519. New york. Academic press.

Fermor, T. R., D. A Grant. 1985. Degradation of fungal and actinomycete mycelia by *Agaricus bisporus*. *J.Gen. microbiol.* vol; 131. pp. 1729-1734)

Fermor, T., D.A. Wood 1991. Mushroom compost microbiol biomass: A

review. Mushroom science XIII. Vol.; 1. pp. 191-199

Finstein, M. S., M. L. Morris. 1975. Microbiology of municipal solid waste composting. Adv. Appl. Microbiol. vol 19; pp. 113-151.

Fujihara, S., A. Kasuga, T. Sugahara, K. Hashimoto, Y. Kiyomizu, T. Nakazawa, Furutsuka, H., T. Nishikori 1995. The present situation and managerial problems of fresh shiitake mushrooms . Bul. of the Fac. of Agri. Tottori Univ. vol; 48. pp.71-77.

Gerrits, J.P.G. 1970. organic and inorganic supplementation of mushroom compost. Mushroom Grow. Ass. bull. vol; 251. pp. 489-508.

Gerrits, J.P.G. 1974. the supplementation of horse manure compost and synthetic compost with chicken manure and other nitrogen sources. Mushroom science IX. vol; 2. pp. 78-98.

Gong, Y., K. Abe, K. Chachin 1993. Relationship between endogenous ethyl alcohol and browning in shiitake (*Lentinus edodes* Sing.) mushroom during storage in polyethylene film bags. J. Japanese Soc. Food Sci. Tech. vol; 40. pp. 708-712.

Han, Y.H., W.T. Ueng., L.C. Chen 1981. Physiology and ecology of *Lentinus edodes*. Mushroom science XI. Vol.; 2. pp. 387-388.

Hermans, C. 1988. Climate and cultivation technique in The cultivation of mushrooms. pp. 243-247.

Ito, T. 1978. Cultivation of *Lentinus edodes*. In *the biology and cultivation of edible mushrooms*. ed. S.T. Chang & w.A. Hayes. pp. 461-467. New york. Academic press.

Jong, S.C. 1992. Cultivation of shiitake mushroom on synthetic logs in the United States . Mushroom Res. vol; 2. pp. 67-71.

Kawachi, S., S. Meguro, S. Inada 1991. Cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) on wood-meal medium of *Cryptomeria japonica*. Inhibitory effect of ferruginol on mycelial growth. Mokuzai Gakkaishi. vol; 37(10). pp. 971-975.

- Khan, S.M., J.H. Mirza., M.A. Khan** 1991. studies on shiitake mushroom (*lentinula edodes* pegler). Mushroom science XIII, Vol; 2. pp. 503-508.
- Kukolya, J., Nagy, I., Laday, M., Toth, E., Oravec, O., Marialigeti, K., and Hornok, L.** 2002. "Thermobifida cellulolytica sp. nov., a novel lignocellulose-decomposing actinomycete." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. vol; 52. pp. 1193-1199.
- kuter, G.A.** 1985. Effects of aeration and temperature on composting of municipal sludge in a full-scale vessel system. J. of WPCF. vol; 57. pp. 309-314.
- Mata, G., G. Savoie** 1998. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiological & Biotechnology, vol; 14(4). pp. 513-519.
- Mattila, P., K. Suonp, V. Pironen** 2000. Functional properties of edible mushrooms. Nutrion. vol; 16. pp. 694-696.
- Mccanna, C.** 1969. Nitrogen supplementation of composts. Mushroom science VII. vol; 1. pp. 295-307..
- Ohga, S., S. Yano, K. Kira** 1993. Availability of enokitake mushroom, *Flammulina velutipes* cultural waste for use as a substrate in the sawdust-based cultivation of shiitake *Lentinus edodes*. Mokuzai Gakkaishi. vol; 39(12). pp. 1443-1448.
- Ohga, S., T. Tabata, T. Kondo** 1977. On the suitability of some trees for shiitake bed-logs. Mokuzai Gakkaishi. vol; 23(9). pp. 459-463.
- Ohga, S., T.I. Miyata, H. Imamura** 1985. Correlation between the shape of *Lentinus edodes* fruitbodies and bed-logs age, In *On biotechnological studies of edible mushrooms cultivation IV*. Bulletin of the Kyushu University Forests. vol; 55. pp. 223-233.
- Park, K.M.** 1994. Acceleration of mycelial growth of *Lentinus edodes* in coniferous sawdust. The Korean Journal of Mycology. vol; 22(3). pp. 222-228.

- Park, W.M., C.H. Song, J.W. Hyun** 1992. Nutritional physiology and improvement of substrate of *Lentinus edodes*. Korean Mycol. vol; 20. pp. 77~82.
- Paul, P., S. John** 1990. Shiitake growers handbook—the art and science of mushroom cultivation. Kendall/hunt publishing company
- Ratcliffe, B., W.H Flurkey, J. Kuglin, R. Dawley** 1994. Tyrosinase, laccase, and peroxidase in mushrooms (*agaricus*, *crimini*, oyster and shiitake). J. Food Sci. vol; 59. pp. 824- 827.
- Royse, D.J.** 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. Mycologia. vol; 77. pp.756-762
- Schmidt, O.** 1985. Investigations on mushroom culture on wood wastes. Versuche zum Pilzanbau Holzabfallen. Champignon. vol; 291. pp.22-29
- Stanek, M.** 1972. Microorganism inhabiting mushroom compost during fermentation. Mushroom Science. vol; 8. pp. 797-811.
- Stolzer, S., K. Grabbe** 1991. Mechanism of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. Mushroom science XIII. Vol.; 1. pp. 141-146.
- Strom, P. F.** 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. Appl. Environ. Microbiol. vol; 50. pp. 899-905.
- Strom, P. F.** 1985. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. Appl. Environ. Microbiol. vol; 50. pp. 906-913.
- Suler, D.J., M.S. Finstein** 1996. Effect of temperature, aeration and moisture on CO₂ formation on bench-scale, continuously thermophilic composting of solid waste. Applied and Environmental Microbiology. vol; 33. pp. 345-350.
- Takabatake, K., T. Sakuno, I. Furukawa, T. Kawada** 1994. Effects of water extracts from Siberian larch wood on mycelial growth of some edible mushrooms. Mokuji Gakkaish. vol; 40(10). pp. 1147-1151.
- Terashima, Y.** 1994. Mycelial growth and fruit body yield of *Lentinus*

edodes on *Pasania edulis* sawdust medium. J. Jpn. For. Soc. vol; 76(4). pp. 367-371.

Thimmel, R., R. Kluthe 1988. A nutritional database for edible mushrooms (abstract). Ernährung. vol; 22. pp. 63- 65.

Trello, B., M. Blanc, G. Vogt, L. Fischer, M. Aragno. Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C). 1996. Appl. Environ. Microbiol. vol; 62. pp. 1723-1727.

US patent PP09339. Shiitake mushroom plant named Hokken 601

Y. Aoyagi 2000. Nitrogen content of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Berk.) cultivated on sawdust medium and dependence on that in the medium. J. Japanese Soc. Food Sci. Tech. vol; 47. pp. 191- 196.