

Pleurotus ostreatus 의 액체 종균 생산에 관한 연구

강 태 수 * 천 병 익 **

Studies on the production of liquid spawn of *Pleurotus ostreatus*

Tae-Su Kang *, Byong-IK Chun **

Abstract

For the improvement of productivity of *Pleurotus ostreatus*, the production of liquid spawn was studied.

The highest liquid spawn production was obtained after shaking culture for 4 days in the culture medium containing 5% (W/V) wheat flour, 0.2% (W/V) yeast extract, 0.1% (W/V) KNO_3 , 0.05% (W/V) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% (W/V) KH_2PO_4 . The optimum pH and temperature was 7.0 and 30 °C.

The period required to complete the mycelial growth after spawning were 28, 22, 10 and 9 days, respectively, when the 2% (V/V) of solid spawn and 2% (V/V), 5% (V/V) and 10% (V/V) of liquid spawn were inoculated. The days required from spawning to fruiting bodies were 38, 34, 28 and 27 days.

1. 서 론

최근 생활 수준이 향상되면서 느타리 버섯의 수요가 급격히 증가하여 농가의 소득 증대에 크게 기여하고 있다. 그러나 현재의 느타리 버섯 재배법은 비효율적인 재배사의 구조,

재배 기술의 원시성 등 많은 문제점을 갖고 있다. 특히 종균의 경우 고체인 톱밥종균을 사용하고 있어 무균 조작이 불가능하며 따라서 잡균 오염에 의한 재배 실패가 빈번한 실정이다. 또한 종균 배양 기간이 길어 종균의 적기 공급이 어려우며 고가의 종균 구입비의

* 강원대학교 공과대학 발효공학과 대학원생

** 강원대학교 공과대학 발효공학과 조교수

* Graduate Student, Dep't of Fermentation Engineering, Kangweon National University

** Assistant Professor, Dep't of Fermentation Engineering, Kangweon National University

부담등의 문제점을 지니고 있다.

이러한 톱밥 종균의 단점을 개선할 수 있는 방법의 하나가 액체 배양에 의한 종균 생산이라 할 수 있으며 기존의 톱밥 종균과 비교하면 종균 생산 기간의 단축, 접종 및 조작의 간편, 수확 기간 단축등의 장점을 가지고 있다.

버섯 균사체의 액체 배양은 1948년 Humfeld가 *Agaricus campestris*로 최초 시도하였고¹⁾ 1952년에는 Humfeld와 Sugihara가 역시 *Agaricus campestris*의 액체 배양을 행하였다.²⁾ 1963년에는 Litchfield등이³⁾, 그리고 1968년에는 Torev와 Rantcheva가 당밀을 이용한 느타리 버섯의 액체 배양을 각각 시도하였다.⁴⁾ 1972년 Zadrazil은 펄프 공장 폐수를 이용한 느타리 버섯의 액체 배양을 행하여 폐수 처리와 단백질원의 생산을 동시에 꾀하였다.⁵⁾

그러나 국내에서는 액체 배양에 의한 느타리 버섯의 종균 생산에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 느타리 버섯의 종균 개량의 일환으로 액체 종균 배양에 대하여 검토하였으며 이로부터 액체 종균의 현실적 이용 가능성에 대한 기초 자료를 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *Pleurotus ostreatus*로서 시판 종균으로부터 순수 분리하였으며 감자 한천 배지⁶⁾에서 계대 배양하여 4°C에서 보존하였다. 균주 배양용 배지(P.O.1배지)는 corn starch 2.5%, sucrose 2%, yeast extract 0.2%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%의 조성을 가지며 pH 7로 조절 한 후 121°C에서 15분간 가압 살균을 행하였다.

최적 배지 조성을 조사하기 위하여 P.O.1

배지에 각종의 탄소원, 질소원 및 무기 염류를 첨가하여 배양한 후 균체 생산량이 증가할 경우에는 이후의 실험에서는 새로운 배지 조성을 사용하였다.

2-2. 배양방법

균의 생리적 활성을 증가시키기 위하여 보존 균주를 P.O.1배지 20 ml에 직경 5 mm의 mycelium disk로 접종하여 30°C에서 4일간 전배양하였으며 P.O.1배지 50 ml에 전배양액 5% (V/V)를 접종한 다음 30°C에서 3일간 진탕 배양하여 종균 배양액으로 사용하였다.

플라스크 배양의 경우 배지 액량의 영향을 제외한 모든 실험은 250 ml 삼각 플라스크에 배지 액량 50 ml로 하였으며 접종비 5%(V/V) 온도 30°C, 교반 속도 120 r.p.m.으로 4일간 진탕 배양하였다. 배지 액량의 영향 실험의 경우에는 1 L 삼각 플라스크에 배지 액량을 5-40% (V/V)로 변화시켰다.

발효조 배양시에는 2.6 L jar fermentor (Marubishi co. model MD 250)를 사용하여 working volume 1L, 온도 30°C, pH 7, 교반속도 120 r.p.m., 통기량 0.4 L/min의 배양 조건하에서 실험하였다.

pH의 영향은 p.O.1의 배지에 1.5% (W/V)의 한천을 첨가하고 pH 범위를 4-9로 조절하여 평판 배지를 제조한 다음 직경 5 mm 크기의 mycelium disk를 접종하여 30°C에서 일정 기간 동안 균사의 생육 정도를 측정하였으며⁷⁾ 온도의 영향도 상기와 동일한 방법으로 온도 범위 20-40°C에서 균사의 생육 상태를 조사하였다.

2-3. 분석 방법

건조 균체량은 배양액을 filter paper No.5A (Toyo roshi co., Tokyo, Japan)를 사용하여 filtration 한 후 Litchfield 등의 방법³⁾으로 측정하였다. 또 배양액내에 존재하는 전분 특유의 점도때문에

filtration 이 곤란할 경우는 α -amylase (태평양화학, 20,000 unit / g) 1%(w/v) 용액 20 ml를 배양액에 첨가하여 75 °C에서 20 분간 반응시킨 뒤 상기와 동일한 방법으로 균체량을 구하였다.⁸⁾

전단량은 시험관에 시료 1 ml와 5% 페놀용액 1 ml를 취하고 진한황산을 액면에 가한 후 교반하여 실온에서 20 - 30분간 방치한 다음 490mm에서 흡광도를 측정하였다.⁹⁾

2-4. 액체 종균의 버섯 생산성 실험

일반계 벚짚을 길이 1cm내외로 절단하여 건조중량 8 g (volume 50 ml)을 수분 함량 70%되게 조절하여 직경 2.5cm, 길이20.5cm의 시험관에 넣고 121 °C에서 20분간 멸균한 후 액체 종균은 2% (V/V), 5% (V/V) 및 10% (V/V)물, 고체 종균은 2% (V/V)를 접종한 다음 30 °C에서 배양하며 균사의 생육 및 활착 정도를 측정하였다.

또 초발이 기간을 알아보기 위해 균사 활착이 완전히 끝난 시험관을 15±5 °C의 변온하에서 90%의 습도를 유지하고 빛을 조사하여 발이 조건¹⁰⁾을 유지시켜 주었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 기본배지의 선택

기본배지의 선택을 위해 감자 배지, Torev 배지⁽⁴⁾ 및 P.O.1 배지의 균체 생산 비교 실험을 행하였으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 균체량은 P.O.1 배지에서 가장

Table 1. Selection of the basal medium for *Pleurotus ostreatus*.

Medium	Mycelium dry weight (g/l)
감자 배지	1.55
Torev 배지	5.27
P.O.1 배지	13.24

높았으며 Torev 배지에 비하여 약 2.5배 정도 높았다.

3-2. 기본배지의 선택

초기 pH의 균체 증식에 대한 영향을 검토한 결과 Fig.1에 나타난 바와 같이 비교적 넓은 pH 4-9 범위에서 생육이 가능하였으며 최적 pH는 7이었고 그 이상에서는 균체생육이 급격히 감소하였다. 이 결과는 Hayes¹¹⁾가 fungi는 pH 3.5-9까지 생육이 가능하며 최적 pH는 6.8 - 7.0 이라 하였고 Zadrazil¹²⁾이 균사의 생육은 pH 7 이하에서 좋으며 그 이상에서는 떨어진다고 보고한 사실과 일치하였다.

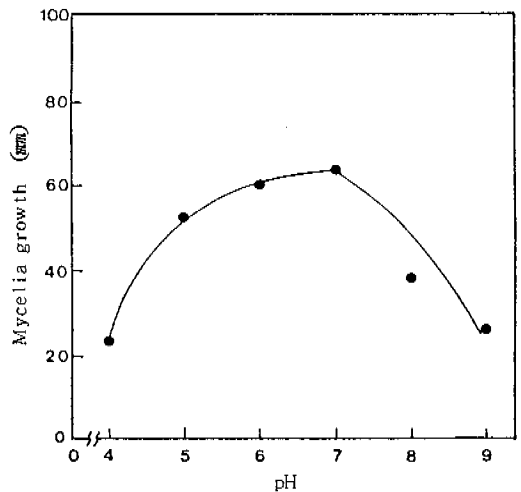


Fig 1. Effects of initial pH on the mycelia growth.

한편 온도의 영향을 검토한 결과를 Fig.2에 나타내었다. 균체의 증식은 온도의 변화에 비교적 민감하였고 온도 범위 25-30 °C에서 균체 생육이 양호하였으며 최적온도는 30 °C이었다. 또한 30 °C 이상에서는 균체생육이 급격히 감소하였으며 40 °C에서는 생육이 중지하였다. 이러한 결과는 Zadrazil¹²⁾과 이¹³⁾가 보고한 느타리 버섯의 생육 최적온도 30 °C 및 최고 온도 40 °C와 일치하였다.

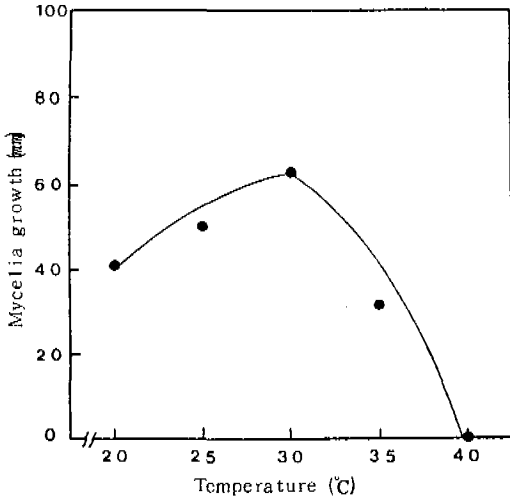


Fig 2. Effects of temperature on the mycelia growth.

3-3. *Pleurotus ostreatus*의 생육곡선

배양 시간에 따른 *P. ostreatus*의 생육도, 진분 소비량 및 pH의 변화를 보기 위해 발효조를 사용하여 4일간 배양한 결과는 Fig.3과 같다. 배양 초기 36시간까지는 균체생육이 급격히 증가하였으며 그 이후에는 완만히 증가하다가 72시간 후에 정상기에 도달하였다.

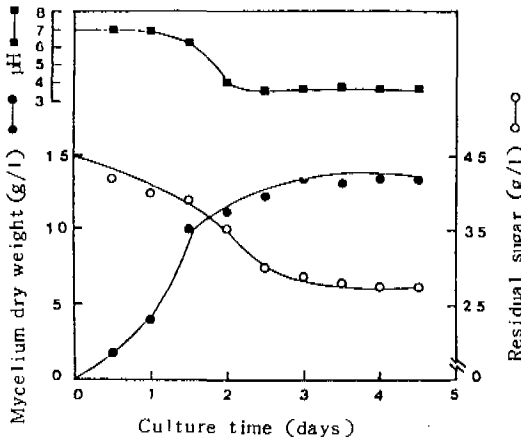


Fig 3. Time course of mycelia growth of the *Pleurotus ostreatus*.

전분의 소비도 균체 생육과 유사한 경향을 보였으며 대수기에 도달한 후에도 상당량의 전분이 잔존하였다. pH는 36시간 이후에 급격히 감소하기 시작하여 48시간 이후에는 4 이하로 감소하여 일정 수준을 유지하였다. 이상의 결과를 볼때 균체의 생육 및 전분의 소비가 36시간 이후 급격히 감소하는 것은 pH의 감소가 원인으로 생각되며 pH의 조절이 필요함을 알 수 있었다. 한편 액체 종균의 생산에 필요한 기간은 상기의 결과에서 보듯 4일 이하이며 톱밥 종균의 생산에 28일¹⁴⁾ 이상 소요되는 것과 비교할때 액체 종균이 생산성에서는 훨씬 유리함을 알 수 있다.

3-4. 접종비 및 배지액량의 영향

접종비가 균체 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 접종량을 2.5% - 15%의 범위로 변화시켜 배양한 결과는 Table 2와 같다. 접종균의 건조중량은 10.9 ± 1.5 g/L이었으며 접종비가 증가함에 따라 균체량도 증가하였다.

Table 2. Effect of inoculum size on the mycelia production.

Inoculum size (% v/v)	Mycelium dry weight(g/l)
2.5	12.8
5	13.6
7.5	15.0
10	16.1
12.5	17.0
15	19.5

한편 산소의 영향을 알아보기 위해 1L 삼각플라스크에 배지 액량을 50-400 ml로 변화시켜 배양한 결과가 Table 3이다. 배지 액량이 50 ml일때 가장 높은 균체량을 보였으나 200ml까지는 균체 생산량이 거의 비슷하였고 그 이상에서는 약간 감소하여 통기가 균체의 생육

에 영향을 다소 주는 것으로 판단되었다. 이는 *P. ostreatus* 를 비롯한 대부분의 균류가 호기성임을 고려할 때 본 실험 조건에서는 배양액 내로의 산소 전달 속도가 성장 제한인자로 작용하지 않았음을 알 수 있다.

Table 3. Effect of working volume on the mycelia production.

Working volume (ml / L)	Mycelium dry weight(g/l)
50	13.88
100	13.73
200	13.42
300	12.42
400	12.35

3-5. 탄소원의 영향 및 최적탄소원 농도

균체 생산에 대한 각종 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 glucose를 비롯한 7종의 탄소원을 p.O.1배지에 4.5% 첨가하여 배양한 결과를 Table 4에 나타내었다. glucose, sucrose 등의 저분자성 당류보다는 전분에서 생육이 좋았으며 wheat flour 사용시 22.50 g/L로 가장 높은 균체량을 얻을 수 있었다. 예비 실험에 의하면 일반적으로는 다당류에서는 균사의 생장이 좋았으나 glucose, mannose, sucrose 및 dextrin을 제외한 단당류, 이당류 및 당알콜은 좋지않았다. wheat flour가 타 전분보다 균체 생육이 좋은 것은 wheat flour내에 당 성분이외에 9.0% (w/w) 이상의 단백질 및 소량의 회분 등이 첨가¹⁵⁾되어 있기 때문으로 판단되었고 실제 이것을 검증하기 위해 알카리 침지법¹⁶⁾을 이용하여 wheat flour로부터 순수 전분만을 추출한뒤 비교 실험을 행한 결과 균체량이 11.66 g /L으로 감소하였다.

wheat flour의 농도를 2-7%범위에서 변화시켜 최적 농도를 구한 결과 Fig.4에 나타낸 바와 같이 균체생육에 가장 좋은 농

Table 4. Effect of carbon source on the mycelia production.

Carbon source	Mycelium dry weight(g/l)
None	1.37
Glucose	5.74
Sucrose	8.92
Maltose	3.91
Lactose	2.47
Molases	6.03
Soluble starch	6.49
Corn starch	13.46
Wheat flour	22.50
Wheat flour starch	11.66

도는 5% (w/v) 였으며 그 이상의 농도에서는 점차 감소하였다. wheat flour의 농도가 6% 이상일 경우 배양액의 점도가 매우 높아 교반이 불량하였으며 따라서 고농도에서의 생육 감소는 교반 및 통기가 불량하고 균체 내로의 기질 흡수가 어렵기 때문으로 생각되었다.

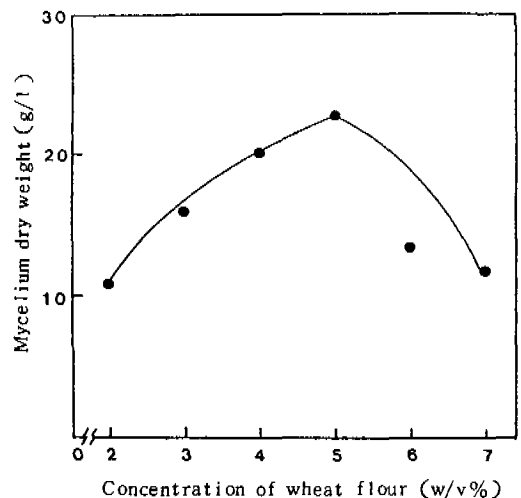


Fig 4. Effects of wheat flour concentration on the mycelia production

3-6. 질소원의 영향

각종 질소원이 균체 생산에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 5에 나타내었다. 유기 질소원은 0.2%, 무기 질소원은 0.1%를 첨가한 결과 모든 유기 질소원들은 균체 생산에 좋은 영향을 주었으나 KNO_3 를 제외한 무기질소원들은 효과가 없었으며 Yeast extract- KNO_3 (2:1)의 조합에서 약 27g/l의 높은 균체생산량을 보였다. 그러나 전반적으로 Control 보다 크게 수율이 증가하지 않은것은 앞에서 언급한바와같이 wheat flour내에 단백질 성분이 과량 함유되어 있기 때문인 것으로 생각되었다.

Table 5. Effect of nitrogen source on the mycelia production.

Nitrogen source	Mycelium dry weight(g/l)
None	22.0
Tryptone	24.6
Soybean meal	24.8
Corn steep liquor	23.0
Peptone	23.9
Malt extract	23.4
Yeast extract	25.0
KNO_3	22.6
$NaNO_2$	18.5
$NaNO_3$	20.9
NH_4Cl	21.1
NH_4NO_3	21.3
$(NH_2)_2CO$	20.9
$(NH_4)_2SO_4$	21.7
Y.E. + KNO_3	26.8
Y.E. + $(NH_4)_2SO_4$	25.9

Organic N-source: 0.2% (w/v), Inorganic N-source: 0.1% (w/v)

Yeast extract와 KNO_3 첨가 농도의 영향을 검토한 결과가 Fig.5이다. 농도별 균체 생산량은 뚜렷한 차이가 없었으나 첨가 농

도 0.3% (w/v)에서 최고의 균체 생산을 나타냈으며 그 이상에서는 다소 감소하는 경향을 보였다.

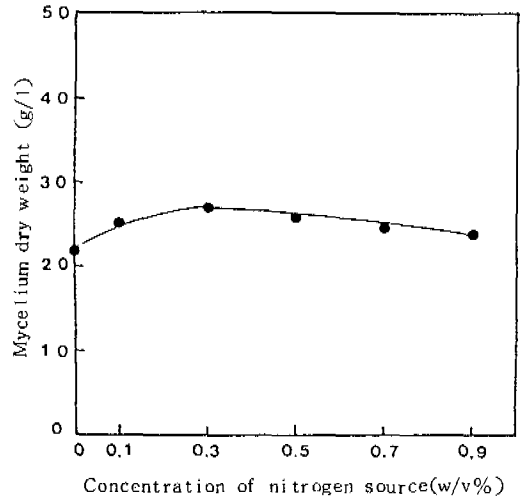


Fig 5. Effect of concentration of nitrogen source on the mycelia Production. (Nitrogen source = yeast extract + KNO_3 (2:1))

3-7. 무기 염류의 영향

배지에 각종의 무기 염류를 0.1% 첨가하여 균체 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 6과 같다. KH_2PO_4 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 제외한 모든 무기 염류는 부첨가시보다 균체 생산이 크게 떨어졌으며 KH_2PO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1:1) 0.1%의 조합에서 약 28g/l의 최고 균체 생산을 보였다. 이러한 결과를 볼때 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} 등의 미량 원소는 과잉 첨가시 오히려 균체 생산에 저해를 가져오는 것으로 판단되었다. 또한 Hayes¹⁷⁾ 등이 fungi의 균사 생육시 K^+ 및 Mg^{2+} 이온을 많이 요구한다고 보고한 사실과 일치하며 이 두가지 금속 염의 첨가가 바람직 함을 알 수 있었다.

Table 6. Effect of mineral salts on the mycelia production.

Mineral salt	Mycelium dry weight(g/l)
None	25.7
KH_2PO_4	27.5
NaCl	13.6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	9.49
$\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$	6.58
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12.7
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.57
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(1:1)$	28.2
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}(1:1)$	11.9
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}(1:1)$	25.2
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(1:1)$	25.6
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(1:1)$	22.2

Final Mineral salts concentration: 0.1% (w/v)

무기 염류 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(1:1)$)의 최적 농도를 결정하기 위하여 무기 염류의 농도를 0.5%까지 증가시켜 실험한 결과 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 무기 염류의 첨가가 균의 생육에는 그다지 큰 영향을

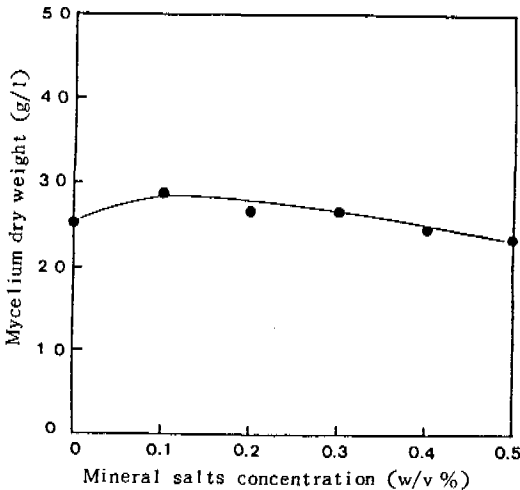


Fig 6. Effect of mineral salts concentration on the mycelia production. (Mineral salts = $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(1:1)$)

주지는 않았으며 K^+ 및 Mg^{2+} 의 농도가 0.1% (w/v)일때 최대의 균체 생산을 나타내었다.

이상의 배지 조성 검토에서 얻은 결과를 종합하여 볼때 최적 배지 조성은 Table 7과 같으며 최고 균체 생산량은 28.2 g/L로 T-orev⁴⁾ 등의 결과와 비교하면 약 5.4배, 기본 배지보다는 2.1배 증가하였다.

Table 7. Modified medium for mycelia production.

Ingredient	Concentration(g/l)
Wheat flour	50
Yeast extract	2
KNO_3	1
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
pH	7.0

3-8. 액체종균의 버섯 생산성 실험

벗짚 배지에 액체 및 고체 종균을 접종한 후 균사의 생육 및 초발이 기간을 비교 실험한 결과가 Fig.7이다. 액체 및 고체 종균을 2% (v/v) 접종한 경우 100% (16cm)의 균사 활착을 보일때까지의 기간은 각각 22일과 28일로 액체 종균이 빨랐으며 액체 종균의 접종량을 5% (v/v) 및 10% (v/v)로 증가함에 따라 10일과 9일로 단축되어 액체 종균이 유리함을 알 수 있었다.

또 초발이까지의 소요 기간은 Table 8에 나타낸 바와 같이 2% (v/v)의 액체 및 고체 종균의 접종시 34일과 38일로 액체 종균이 빨랐으며 5% (v/v) 및 10% (v/v)의 액체 종균 접종 시는 각각 28일 및 27일로 크게 단축되어 액체 종균의 사용이 바람직함을 알 수 있었다.

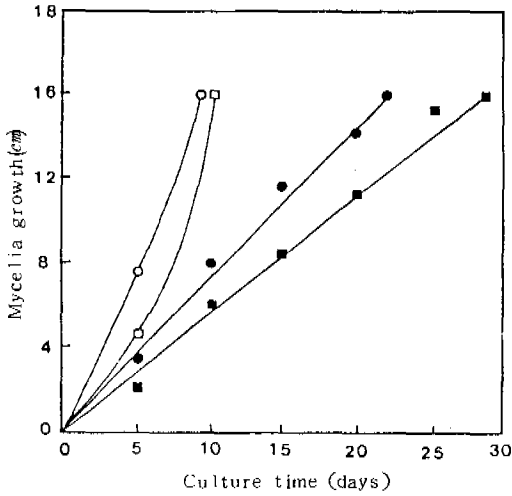


Fig 7. Time course of mycelia growth of the *Pleurotus ostreatus* on the rice straw medium.

- : Liquid inoculum 10% (v/v)
- : Liquid inoculum 5% (v/v)
- : Liquid inoculum 2% (v/v)
- : Solid inoculum 2% (v/v)

Table 8. Effects of inoculum on the days required for first fruiting of *P. ostreatus*.

Inoculum size (% v/v)	Days from spawning to fruiting (days)
* 2	38
2	34
5	28
10	27

* : Comercial solid spawn.

4. 결 론

느타리 버섯 종균 개량의 일환으로 시판되고 있는 종균으로부터 순수 분리한 후 균주의 액체 배양 최적 조건 및 버섯 생산성 실험을 하

여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 최적 배지 조성은 wheat flour 5% (w/v), Yeast extract 0.2% (W/v), KNO_3 0.1% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% (w/v), KH_2PO_4 0.05% (w/v)이며 pH7, 온도 30℃, 120 r.p.m.에서 4일간 진탕배양 하였을때 28.2g/l의 균체를 얻었다.

2. 액체 및 고체 종균에 대한 균사 활착 및 초발이 기간의 비교 실험 결과는 접종비 2% (v/v)일때 액체 종균은 22일, 고체 종균은 28일만에 100% (16cm)의 생육을 보여 액체 종균이 빨랐으며 초발이까지의 기간은 각각 34일과 38일로 역시 액체 종균이 빨랐다. 또한 액체 종균 5% (v/v) 및 10% (v/v)를 배지에 접종하였을때 균사 활착 기간은 각각 10일과 9일, 초발이까지는 28일과 27일로 단축되었다.

참 고 문 헌

1. Humfeld H.; Science, 107, P; 373 (1948)
2. Humfeld H. and Sugihara; Applied microbiology, 8, P. 63 (1960)
3. Litchfield J.H., R.C. Overbeck and R.S. Davidson; Agricultural and food chemistry, 11, P. 158 (1963)
4. Torev A., I. Kostadinov and Tz. Rantcheva; Mushroom science, P. 253 (1968)
5. Zadrazil F.; The biology and cultivation of edible mushroom, Academic press, Ind., p. 526 (1978)
6. 유주현, 양한철, 정동호, 양용; 식품공학실험Ⅱ, 탐구당, P. 48 (1981)

7. Calam C.T.; Method in microbiology, Imperial chemical industries ltd., P.583 (1969)
8. 김재조; 식품화학, 문운당, P.161 (1982)
9. 일본식품공학회(편); 식품분석법, (주) 광림, 동경, P. 189 (1972)
10. 차동열; 느타리버섯 벗짚다발재배, 농업기술연구소, P.35.
11. Hayes W.A.; The biology and cultivation of edible mushroom, Academic press, Inc., P.196 (1978)
12. Zadrazil F.; The biology and cultivation of edible mushroom, Academic press, Inc., P.533(1978)
13. 이춘용; 예산농업전문대학-논문집, 제15권 P.16 (1977)
14. 고승주; 느타리버섯의 품종해설 및 종균 제조, P.21.
15. 정동효, 장원기; 최신식품분석법, 삼중당, P.247 (1985)
16. K.Yamamoto, S.Sawada, and T.O-nogaki; Properties of rice starch prepared by alkali methed with various conditions Denpun Kagaku., 20, p.99 (1973)
17. Hayes W.A.; The biology and cultivation of edible mushroom, Academic press, Inc., P.221 (1978)