

액체배양에서 느타리버섯균의 적합한 성장조건 구명

성재모* · 문희우 · 박동수

강원대학교 자원생물환경학부 균학실험실

Growth Condition of Liquid Culture by *Pleurotus ostreatus*

Jae-Mo Sung*, Hee-Woo Moon and Dong-Soo Park

Department of Environmental Biology, Mycology Lab., Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT: For the practical using of liquid spawn we carried out selection test of nutrient sources, cultural methods and cultural apparatus for liquid spawn production of oyster mushroom (ASTI 2001, ASTI 2018, ASTI 2072, ASTI 2016, ASTI 2070, ASTI 2180, ASTI 2183, ASTI 2042). The optimal temperature and pH range for mycelial growth of *Pleurotus* species were 25°C to 30°C and 5.5 to 6.5, respectively. The effect of carbon sources, nitrogen sources and mineral salts on the mycelial growth was studied using petridish culture. Generally, the disaccharides and polysaccharides showed good effect for mycelial growth of *Pleurotus* species, and the polysaccharides were superior to the other classes of carbon sources for mycelial growth. For the mycelial growth of the 8 oyster mushroom stains, soybean flour was superior to the other kinds of nitrogen sources. On the other hand, addition of mineral salts did not affect, and even poor under certain mineral salts, the mycelial growth of the 8 oyster mushroom stains. The brown sugar selected out the carbon source of the agricultural medium. Also the soybean flour selected out the nitrogen source of agricultural medium. In the medium selection, we selected out agricultural optimum medium composed of brown sugar 3%, soybean flour 0.3%, potassium phosphate 0.05%, magnesium sulfate 0.05%. Under the 250 ml erlenmeyer culture, the effects of such factors as the inoculum rate, the working volume, cultural method and flask shapes on the mycelial growth were examined. The optimal inoculum rate and working volume on the mycelial growth of oyster mushroom was 2 mycelial disk (diameter 6 mm) and 100 ml, respectively. The shake flask culture was enhanced the mycelial growth than at the erlenmeyer flask. Pulp form growth of mycelium in the erlenmeyer flask culture was obtained in the culture with glass rod of length 50 mm, diameter 10 mm.

KEYWORDS: Liquid spawn, *Pleurotus*

느타리(*Pleurotus ostreatus*)은 주름버섯목(Agaricales)의 느타리과(Pleurotaceae)에 속하는 사물기생균으로 한국을 비롯한 세계 각지에 널리 분포한다(Lee, 1990). 국내에서는 옛날부터 미루나무버섯 또는 버드나무버섯으로 불려졌으며, 일본에서는 그 모양이 부채꼴을 하고 있어 평이(ひらたけ)라고 부르고, 구미에서는 그 맛과 모양이 굴과 같다 하여 굴버섯(oyster mushroom)이라고 부른다(강 등, 1989).

느타리버섯은 단백질, 탄수화물, 지방, 무기물, 섬유소, 비타민 등이 풍부한 영양적 가치(Chang *et al.*, 1993; Chang and Hayes, 1978; Chang and Miles, 1989; Ganeshan *et al.*, 1989; Jandaik and Rangad, 1978; Khanna and Garcha, 1981)와 함께 항암작용, 성인병 예방 등의 의학적 가치(Chang *et al.*, 1993; Chang and Miles, 1989; Mori *et al.*, 1989; Yang and Jong, 1989; Yoshioka *et al.*, 1985; Yoshioka *et al.*, 1972)가 높은 다기능성 버섯이다. 국내 생산량은 1990년 87톤에서 1992년에는 220톤으로 생산량이 증가함에 따라 소비 또한 급증하였으며(산림청, 1993), 전체 계적으로도 1986~1991년 사이에 약 442.6%가 증가하였다

(Chang *et al.*, 1993).

식용버섯의 인공재배를 위해서는 종균, 배지재료, 재배시설, 재배기술이 필수적으로 요구된다. 그 중에서도 유전적으로 형질이 안정하며, 잡균에 대한 저항성이 강할 뿐만 아니라 버섯 생산성이 우수한 우량종균의 확보는 최우선적으로 갖추어져야 한다(Goltapeh and Kapoor, 1989; Martinez, 1989). 이러한 필요조건을 충족시킬 수 있는 새로운 형태의 종균으로 균사체 현탁액인 액체종균(liquid spawn)을 버섯 재배시 종균으로 이용할 수 있음을 제안하였다(Humfeld, 1948; Shiio *et al.*, 1974).

액체종균은 버섯균의 생활환 중에서 영양세대의 균사체를 수용성의 영양분이 첨가된 액체배지에서 액체배양(submerged culture)하여 증식시키는 방법이다(吉川, 1992). 자연 생태계에서는 토양이나 수목과 같은 고체상의 기질에서 균사가 증식·만연하는 것에 반하여, 액체배양에서는 당류, 유기·무기의 질소화합물, 무기염류 등 버섯 생육에 필요한 영양분을 혼합한 수용액에 공기를 불어넣어 균사를 증식시킨다. 그러므로 액체종균을 생산하기 위해서는 물리적 환경요인과 농업적으로 이용이 가능한 염가의 영양원 및 배양장치의 연구가 선행되어야 한다. 또한 액체배양에

*Corresponding author

필요한 배양기술 및 배양방법에 대한 연구가 필요하다. 그러나 국내에서는 액체종균에 대한 다양한 연구가 미흡하여 액체종균의 실용화가 이루어지지 못하고 있다.

본 연구는 느타리버섯 균사체의 물리적 환경요인과 영양생리의 구멍을 통하여 염가의 액체배지 및 배양장치의 선발과 액체종균의 생산을 보다 간단화시키기 위한 배양방법에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 농촌진흥청에서 품종을 육종·보급하여 농가에서 재배되는 느타리버섯(*Pleurotus* spp.) 8품종으로 농기 2-1(PL.1), 농기 201호(PL.2), 농기 202호(PL.3), 사철느타리(PL.4), 여름느타리(PL.5), 원형느타리 1호(PL.6), 원형느타리 2호(PL.7), 애느타리(PL.8)를 강원도 농촌진흥원에서 분양받아 공시균주로 사용하였다. 공시균주는 Table 1의 배지조성을 갖는 MYPA배지 상에서 3개월 간격으로 계대배양하면서 4°C에 보관하였으며, MYPA 평판배지에 접종후 25±1°C의 항온기에서 배양하여 접종원으로 사용하였다.

배지조제 및 배양

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

삼각플라스틱 배양 배지조성이 각기 다른 액체배지를

조제하여 100 ml씩 삼각플라스틱(250 ml)에 분주하여 silicon plug를 채운후 121°C, 15 psi(1.1 kg/cm²)에서 20분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, Table 1의 배지조성을 갖는 고체배지에서 페트리디쉬 배양된 균총의 선단을 내경 6 mm의 cork borer로 취하여 삼각플라스틱 배양의 접종원으로 사용하였다. 접종량 실험을 제외하고는 직경 6 mm의 균사절편을 2개 접종하였으며, 회전형 진탕배양기에서 25±1°C, 120 rpm으로 7일간 진탕배양하여 건조균체량을 조사하였다. 병배양에 대한 접종원의 삼각플라스틱 배양은 직경 6 mm의 균사절편을 2개 접종하여, 25±1°C, 120 rpm으로 회전형 진탕배양기에서 5일간 배양하여 병배양의 접종원으로 사용하였다.

Carboy 배양 액체종균의 영양원으로 선발된 Table 8의 배지조성을 갖는 배양액량 8리터의 병배지를 조제하여 121°C, 15 psi(1.1 kg/cm²)에서 60분간 가압살균하여 배지를 조제하였으며, 액체종균의 농업용 배지로 선발된 Table 8의 배지조성을 갖는 액체배지에서 삼각플라스틱 배양된 배양액을 8리터 병배양의 접종원으로 사용하였으며, 25±1°C의 항온수조에서 통기량 0.5 vvm으로 5일간 통기배양하여 건조균체량을 조사하였다. 병배양의 접종량 실험을 제외한 모든 병배양의 접종량은 1%로 하여 실험하였으며, 병배양에서 통기시 발생하는 거품의 제거를 위하여 식물성 기름을 첨가하여 거품발생을 방지하였다.

균사체의 생육측정

페트리디쉬배양에서의 균사체 생육 고체배지가 분주된 페트리디쉬에서 일정기간 배양후 접종된 균사절편의 중심을 직교하는 수직선과 수평선을 페트리디쉬의 밑면에 그린 다음 각각의 직경을 평균하여 균총의 신장직경을 조사하였으며, mm/일로 나타내었다.

액체배양에서의 균사체 생육 삼각플라스틱배양 또는 병배양된 배양액을 취하여 100 mesh의 체로 균사체와 배양액을 분리하였으며, 80°C의 항온기에서 항량·건조하여 균사체의 건조중량을 측정하였다. 균사체의 건조량은 g/L로 환산하여 나타내었다.

균사체의 배양환경 및 영양원 선발

온도 및 초기 pH의 영향 느타리버섯 8품종의 균사생육에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 Table 2의 배지조성을 갖는 평판배지 상에서 15~35°C의 온도범위에서 5°C 간격으로 조절된 항온기에서 균총의 신장직경을 조사하였다. 또한 초기 pH가 균사생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 McIlvaine buffer solution(0.1M의 Citric acid와 0.2M의 Na₂HPO₄)으로 pH 4.0~8.0까지 0.5 간격으로 pH meter를 이용하여 pH 용액을 조제하였으며, 한천 및 배지성분의 농도가 2배인 Table 2의 조성을 갖는 배지를 조제하였다. 그리고 pH용액과 배지를 각각 다른 삼각플라스틱에 분주하여 121°C(15 psi)에서 20분간 살균 후 1:1의 부피비로 혼합하여 평판배지를 조제하였다.

Table 1. Composition of stock culture medium of *Pleurotus* species

Ingredient	Concentration (g/L)
Malt extract	30
Yeast extract	2
Peptone	1
Agar	20

Table 2. Composition of the basal medium (B.M) for mycelial growth of *Pleurotus* species

Ingredient	Concentration (g/L)
Brown sugar	30
Soybean flour	3
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1

영양원의 선발 균사생육에 미치는 탄소원, 질소원 및 무기염류 등의 영양원을 조사하기 위하여 기본배지(Table 2)에서 각 영양원의 종류를 달리하여 실험하였다. 탄소원은 농도를 brown sugar 30g과 동일한 탄소량이 되도록 조절하여 배지를 조제하였으며, 질소원도 농도를 soybean flour 3g과 동일한 질소량이 되도록 조절하여 배지를 조제하였고, 무기염류는 0.1%(w/v)씩 각각 첨가하여 25±1°C의 항온기에서 페트리디쉬 배양하였다.

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

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

농업용 액체배지의 선발

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

결 과

배지의 선발

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

기본배지 공시균주의 생육환경 및 영양원 선발 시험의

Table 3. Selection of the stock culture medium for the *Pleurotus* spp. culture

Media	Colony diameter of <i>Pleurotus</i> spp. (mm/5 days)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
MYPA ¹	45	60	47	53	64	67	61	38
PDA ²	39	52	30	51	51	63	56	26
YMA ³	40	58	45	48	58	65	56	30

MYPA; malt extract 30g, yeast extract 2g, peptone 1g, agar 20g, distilled water 1,000 ml; PDA; potato 200g, dextrose 20g, agar 20g, distilled water 1,000 ml; YMA; yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, dextrose 10g, agar 20g, distilled water 1,000 ml.

Table 4. Selection of the basal medium for the *Pleurotus* spp. culture

Medium	Colony diameter of <i>Pleurotus</i> spp. (mm/7 days)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
Hadar	40.3	57.5	43.3	44.7	35.7	53.7	69.7	34.7
Hasimoto	42.0	52.7	39.3	45.3	29.0	57.3	71.3	33.7
Torev	21.7	32.7	15.3	20.3	20.7	22.7	46.0	23.0
B.M	60.7	62.0	55.7	58.3	54.0	63.7	64.3	44.0

Hadar; glucose 20g, asparagine 0.65g, yeast extract (Difco) 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 1g, KCl 0.5g, distilled water 1,000 ml; Hasimoto; D-glucose 20g, peptone 2g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, CaCl₂ 0.1g, thiamine hydrochloride 100 µg, distilled water 1,000 ml; Torev; glucose 20g, NH₄NO₃ 2g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, ZnSO₄ 0.001g, distilled water 1,000 ml; B.M; brown sugar 30g, soybean flour 3g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 1g, distilled water 1,000 ml.

기본배지를 선발하기 위하여 Hadar, Hasimoto, Torev, B.M 배지 상에서 공시균주인 느타리버섯 8품종을 페트리디쉬 배양하였을 때, 균사생장이 우수한 Table 2의 배지조성을 갖는 B.M 배지를 기본배지로 선발하여 사용하였다(Table 4).

잡균검색 및 활력검정 배지 액체중균 생산을 위한 균사체 액체배양 실험에서 발생하는 오염원의 검사를 위하여 Table 5 및 Table 6의 배지조성을 갖는 배지를 조제하여 사용하였다. 액체배양에서 발생하는 세균오염의 판별을 위하여 수분활성이 높고 자화가 용이한 질소원과 영양분이 풍부한 YMA배지를 세균 오염에 대한 검출배지로 사용하였으며, 사상균의 오염을 판별하기 위해서는 수분활성이 낮고 자화할 수 있는 영양분이 부족한 톱밥배지에서 배양하는 것이 한천평판 배지에서 배양하는 것 보다 단기간 배양에 의하여 오염판별을 용이하게 할 수 있었다.

또한 액체 배양된 느타리버섯 균사체의 활력측정을 위하여 Table 6의 톱밥배지를 페트리디쉬에 약 3 mm의 두께로 첨가한 후 121°C, 15 psi에서 30분 동안 살균하여, 액체배양된 느타리버섯균의 균사현탁액 1 ml를 접종하여 25°C에서 배양하여 균사의 활력을 조사하였다.

세균 및 사상균과 같은 오염원의 검색을 위하여 배양병의 접종구(또는 균사체 현탁액 배출구)에 연결된 연결관(aseptic or quick connector)을 분리하여 YMA 평판배지에 배양액을 약 5 ml 정도 취한 다음 페트리디쉬의 뚜껑을 약

Table 5. Composition of the check medium for bacterial contamination

Ingredient	Concentration (g/L)
Malt extract	3
Yeast extract	3
Peptone	5
Dextrose	10
Agar	20

Table 6. Composition of checking medium for fungal contamination

Ingredient	Concentration (% , v/v)
Hardwood sawdust (<i>Quercus dentata</i> Thunberg)	80.0
Rice bran	20.0
Water content	65.0

간 열어서 틈을 만들어 기울어지게 하여 배지표면의 유리수를 제거한다. 그런 다음 배양액이 접종된 평판배지에서 육안으로 식별이 가능한 균사체(펠렛)를 백금선으로 취하여 활엽수 톱밥배지가 첨가된 시험관에 접종한다. 검색하고자 하는 배양액이 접종된 시험관과 페트리디쉬를 각각 25°C와 30°C의 항온기에서 배양하여 잡균의 존재 유무를 판별한다. 특히 불완전균의 무성포자를 짧은 기간에 유도하기 위해서는 광조사 하에서 배양하였다.

균사체의 배양환경 및 영양원 선발

온도 및 초기 pH의 영향 공시균의 균사생장에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, 공시균주 중에서 원형2호(PL.7)가 25°C에서 균사생장이 우수한 것을 제외하고는 나머지 7품종 모두 30°C에서 균사생장이 가장 우수하였다(Fig. 1).

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

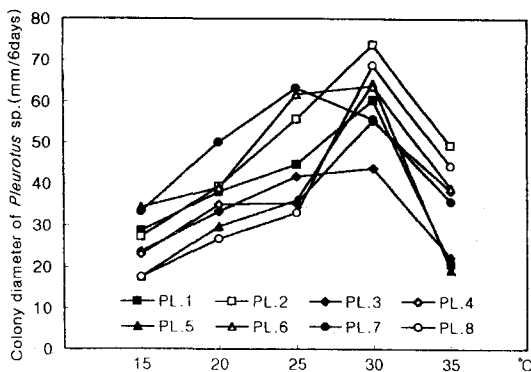


Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Pleurotus* spp. incubated at 25°C for 6 days. Medium contents; Brown sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%.

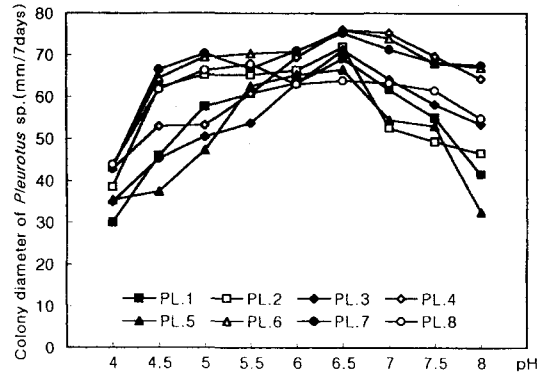


Fig. 2. Effect of initial pH on the mycelial growth of *Pleurotus* spp. incubated at 25°C for 7days. Medium contents; Brown sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%.

것을 확인할 수 있었다.

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

질소원의 선발실험에서는 대부분에서 공시균주 모두 균

Table 7. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *Pleurotus* spp. at the petridish culture, incubated at 25°C for 5 days

Carbon sources	Colony diameter of <i>Pleurotus</i> spp. (mm/5 days)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
Caramel	67.0	71.7	61.3	70.3	60.7	74.0	75.0	59.0
Corn flour	73.3	76.2	66.5	76.8	69.3	79.5	80.0	57.3
Corn starch	66.3	66.0	58.7	69.7	62.0	70.3	70.8	49.8
Glucose	35.0	68.0	54.7	49.0	40.7	45.7	50.7	28.3
Molasses	61.0	65.7	64.3	64.7	71.0	70.7	71.3	57.7
Potato starch	64.7	65.7	51.0	58.7	57.2	70.3	66.5	42.7
Wheat flour	74.2	79.2	71.7	73.5	64.8	79.0	78.5	65.5
Brown sugar	74.0	77.3	72.3	73.3	69.0	80.0	78.7	59.0

Medium contents; Each carbon sources were added 3%, Soybean flour 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%.

Table 8. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *Pleurotus* spp. at the petridish culture, incubated at 25°C for 5 days

Nitrogen sources	Colony diameter of <i>Pleurotus</i> spp. (mm/5)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
Cornsteep liquor	59.3	63.0	39.3	38.7	52.0	61.7	52.7	49.7
Peptone	69.7	64.2	40.3	59.7	60.3	70.3	72.5	30.8
Soybean flour	72.3	68.8	61.7	74.0	77.8	79.7	80.0	43.0
Yeast extract	69.2	69.2	52.5	64.5	58.5	70.7	73.0	40.3

Medium contents; Brown sugar 3%, each nitrogen sources were added 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%.

Table 9. Effect of various mineral salts on the mycelial growth of *Pleurotus* spp. at the petridish culture, incubated at 25°C for 6 days

Mineral sources	Colony diameter of <i>Pleurotus</i> spp. (mm/6 days)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
Control	54.0	69.8	63.5	61.5	59.5	67.5	67.8	46.0
CaCl ₂	54.0	68.8	65.0	64.0	63.0	72.5	70.0	51.0
CaSO ₄ ·2H ₂ O	52.5	70.5	64.0	65.5	60.5	70.5	70.3	48.2
KH ₂ P ₄	48.8	63.5	58.3	58.8	54.3	64.3	66.3	44.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	53.3	70.0	63.3	61.8	60.8	69.5	69.5	46.3

Medium contents; Brown sugar 3%, Soybean flour 0.3%, each mineral salts were added 0.1%.

사생장이 가장 우수하였으며, 다음으로는 yeast extract, peptone, 옥수수침출액 순으로 균사생장이 감소하였다 (Table 8).

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

삼각플라스크에서의 배양환경 삼각플라스크 배양에서 접종원의 접종량, 배양액량, 삼각플라스크의 형태 배양방법이 원형느타리2호의 균사체 생산에 미치는 영향을 조사하여 다음의 결과를 얻었다. 직경 6 mm로 취한 균사절편의 접종량이 증가할 수록 초기 균사체 증식은 왕성하였다. 그러나 일정기간 배양후 건조균체량을 비교하였을 때 접종량의 증가와 건조균체량의 증가가 비례하지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

또한 삼각플라스크에서의 배양액량 및 삼각플라스크의 종류가 원형느타리 2호(PL.7)의 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 배양액량 100 ml의 shake flask에서 건조균사체의 생산이 가장 우수하였다(Fig. 4).

다음으로 진탕플라스크가 아닌 일반 삼각플라스크에서

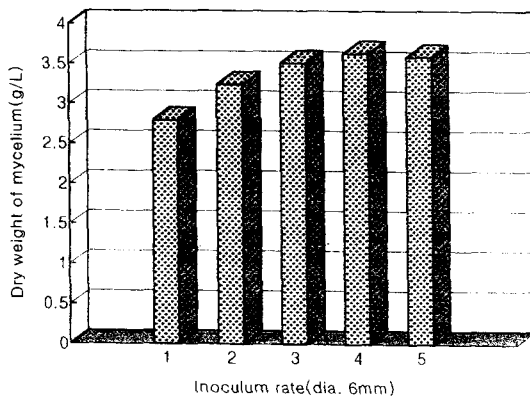


Fig. 3. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PL.7 at the erlenmeyer flask culture, incubated at 25°C, 120 rpm for 7 days. Medium contents; Brown sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%.

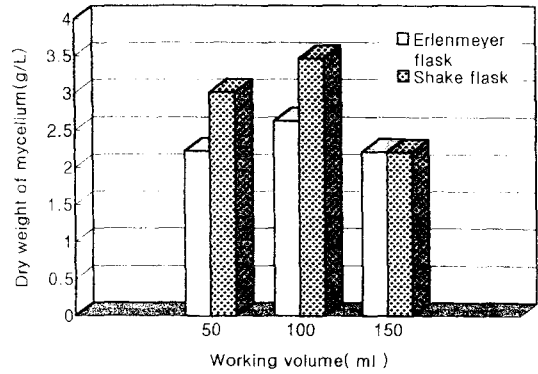


Fig. 4. Effect of working volume and different flask on the mycelial growth of PL.7 at the Erlenmeyer culture, incubated at 25°C, 120 rpm for 7 days. Medium contents; Brown sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%.

Table 10. Effect of various cultural methods for the mycelial growth of *Pleurotus* spp. (PL.7), incubated at 25°C, 120 rpm for 7 days

Cultural method	Dry weight of mycelium (g/L)	Growth form	Size (mm)
control	5.36	pellet	2±0.5
5 mm	5.43	pellet	1±0.5
10 mm	4.79	pulp	-
45° slant	5.55	pellet	1±0.5

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

Table 10과 같이 배양방법을 달리하여 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조구에 비하여 45° 경사배양과 직경 5 mm의 유리막대를 넣고 배양한 처리구에서 균사생육이 우수하였다. 그리고 직경 10 mm의 유리막대를 넣은 처리구는 대조구에 비하여 건조균체량은 작았으나 균사체의 생육형태가 펠프형으로 균사체가 생육하였다.

Carboy에서의 배양환경 병배양에 접종량을 달리하여

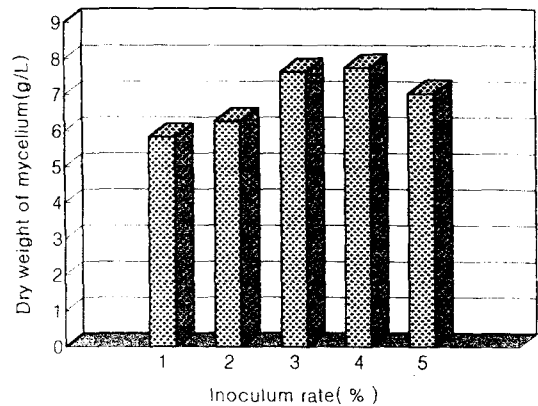


Fig. 5. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PL.7 at the carboys culture, incubated at 25°C, 0.5 vvm for 5 days. Medium contents; Brown sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%.

실험한 결과 접종원을 4% 접종한 처리구에서 균사체 생산이 가장 우수하였다(Fig. 5). 또한 접종량이 증가할수록 육안으로 확인 가능한 병배양 장치내의 균사밀도는 급격히 증가하였으며, 그결과 병배양 기간이 단축되는 것을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서는 접종량을 1%로 선발하여 이후의 실험을 수행하였다.

통기량을 달리하여 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 통기량이 증가할수록 건조균사체 생산량이 증가하였다(Fig. 6). 그러나 본 연구의 배양장치에는 배기되는 공기중의 수분을 응축할 수 있는 condenser를 배기구에 설치하지 않았기 때문에 통기량이 증가할수록 배양기로부터 배양액의 손실이 증가함을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 배양액의 혼합효과를 피할 수 있는 최소의 통기량인 0.5 vvm으로 이후의 실험을 수행하였다.

위에서 얻은 결과를 토대로 느타리버섯 8품종에 대하여 접종량 1%와 통기량 0.5 vvm으로 5일간 carboys 배양하였을 때 다음의 결과를 얻었다(Fig. 7). 배양이 완료된 다음

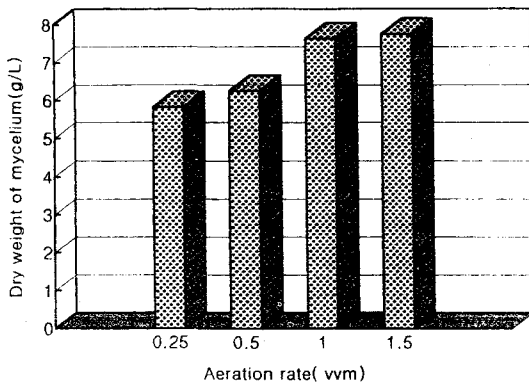


Fig. 6. Effect of aeration rate on the mycelial growth of PL.7 at the carboys culture, incubated at 25°C, various aeration rate for 5 days.

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

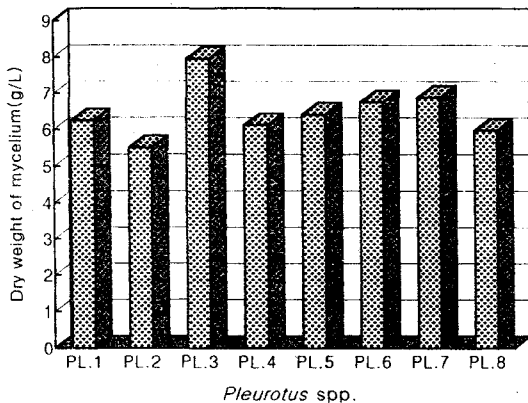


Fig. 7. Mycelial yield of *Pleurotus* spp. at the carboys culture, incubated at 25°C, 0.5 vvm for 5 days.

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

배양병을 방치하여도 균사체와 배양액의 분리는 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 액체종균의 병배양 조건으로 접종량 1%와 통기량 0.5 vvm으로 25±1°C에서 5일간 배양하여 액체종균을 생산할 수 있었다.

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

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

농업용 액체배지의 선발

농업용 최적배지의 탄소원으로 선발된 황백당(3%)에 대두분의 첨가량을 달리하여 느타리버섯 8품종의 균사체를 삼각플라스크 배양하여 다음의 결과를 얻을 수 있었다

Table 11. Production of liquid spawn (PL.7) at the several carboy with one carboy aeration volume, incubated at 25°C, 0.5 vvm for 5 days

	Carboy culture			
	1st	2nd	3rd	4th
Air pressure (kg/cm ²)	0.7	0.6	0.4	0.2
Dry weight of mycelium (g/L)	1 6.04	5.44	6.14	7.01
	2 6.23	5.80	7.43	7.44

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

Table 12. Effect of soybean flour concentration on the mycelial growth of *Pleurotus* spp. incubated at 25°C, 120 rpm for 7 days

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

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

Table 13. Effect of different mineral salts on the mycelial growth of *Pleurotus* spp. incubated at 25°C, 120 rpm for 7 days

Mineral sources	Dry weight of mycelium (g/L)							
	PL.1	PL.2	PL.3	PL.4	PL.5	PL.6	PL.7	PL.8
Control	1.74	2.99	4.19	3.05	2.04	2.21	2.60	2.52
CaCl ₂	2.70	3.48	4.39	3.64	3.58	2.92	3.30	3.16
KH ₂ PO ₄ (A)	1.97	3.38	3.98	4.60	2.75	3.45	3.32	2.94
MgSO ₄ ·7H ₂ O (B)	2.41	3.26	4.46	4.23	3.09	3.49	3.65	3.46
(A)+(B)	2.73	4.16	4.65	5.10	4.30	3.86	3.98	3.44

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

Table 14. Composition of Brown sugar · soybean flour medium for the liquid spawn production of *Pleurotus* spp.

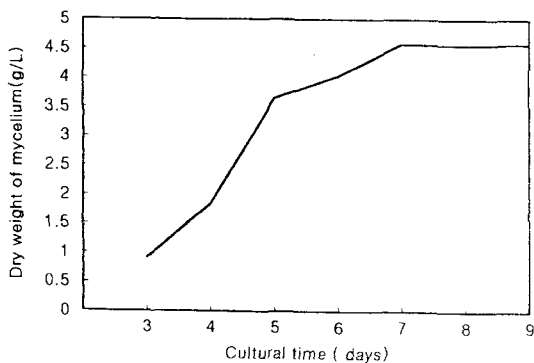
Ingredient	Concentration (g/L)
Brown sugar	30.0
Soybean flour	3.0
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5

(Table 12). 대부분의 첨가량 증가와 함께 건조균사체 생산이 증가하였으나 본 실험에서는 대부분의 첨가량을 0.3%로 하여 농업용 최적배지의 선발시험을 수행하였다.

또한 무기염의 첨가가 느타리버섯의 균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 영양원 선발시험에서 균사체의 신장직경을 조사한 Table 9의 실험 결과와는 달리 KH₂PO₄+MgSO₄·7H₂O의 1:1 혼합물을 0.1% 첨가한 처리구가 대조구에 비하여 건조균사체의 생산량이 높았다(Table 13).

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

액체종균의 생산을 위한 농업용 최적배지로 선발된 Table 14의 성분을 배지조성으로 하여 250 ml의 삼각플라스크에서 배양한 결과, 접종하여 배양 7일만에 stationary

**Fig. 8.** Time course of mycelial growth of PL.7 at the erlenmeyer flask, incubated at 25°C, 120 rpm for 7 days. Medium contents; Brown sugar 3%, Soybean flour 0.3%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%.

phase에 도달됨을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 따라서 본 실험의 병배양에 대한 접종원은 250 ml의 삼각플라스크에서 배양액량 100 ml로 25°C, 120 rpm으로 5일간 삼각플라스크에서 배양하여 사용하였다.

고 찰

균사체 생육에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, 공시균주인 느타리버섯 8품종의 균사생육에 적합한 온도는 원형느타리2호가 25°C인 것을 제외하면 나머지 7품종은 모두 30°C에서 균사생장이 가장 우수하였다. 느타리버섯의 균사생장 최적온도로 Chung *et al.*(1981)은 *Pleurotus ostreatus*에서 30°C라고 보고하였으며, Go *et al.* (1984)은 *P. sajor-caju*에 대해서 25°C가 균사생장에 대한 최적온도라고 보고하였고, Hong and Kang(1983)과 Zadrazil(1974)은 *P. florida*에서 30°C가 균사생장 적온이라고 보고하였다. 또한 균사체 생육에 미치는 초기 pH의 영향을 조사한 결과, 공시균주인 느타리버섯 8품종 중에서 애느타리버섯이 pH 5.5에서 균사생육이 우수한 것을 제외하고는 모두 pH 6.5에서 균사생장이 가장 우수함을 관찰할 수 있었다. 따라서 Zadrazil(1974)이 느타리버섯의 생육최적 pH로 5.5~6.5라고 보고한 것과 일치함을 알 수 있었다. 그러나 Hong *et al.* (1981)은 균사생장적온이 30°C인 균주를 25°C에서 균사배양하여 버섯을 발생시켰을 때 버섯 수량이 높았다고 보고하였다. 그리고 배지의 초기 pH 실험에서 pH의 적응범위가 넓음을 확인할 수 있었다. 액체종균의 배양온도 및 pH는 각각 25°C와 자연 pH로 하여 모든 실험을 수행하였다. 또한 본 연구의 액체종균 배양장치는 condenser가 없기 때문에 배양온도가 높을수록 배양액 손실이 커지게 되므로 종균으로서 가장 안정적인 배양온도인 25°C에서 배양하였다.

느타리버섯 8품종의 균사체 생육이 우수할 뿐만 아니라 공업생산용 배지의 구비요건(김·공, 1993)에 적합하여 농업적으로 이용이 가능한 영양원의 선발시험을 수행한 결과, 탄소원의 선발시험에서는 glucose에서 보다는 황백당, 밀가루와 옥수수가루 등에서 균사생장이 더욱 우수한 것을 확인할 수 있었다. 질소원의 선발시험에서는 실험실에서 질소원으로 사용하는 yeast extract나 malt extract에서 보다는 대두분에서 공시균주 모두 균사생장이 가장 우수하였다. 또한 무기염류의 첨가가 공시균주의 균사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CaCl₂, CaSO₄·2H₂O, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O를 각각 0.1%(w/v)씩 첨가하여 페트리디쉬 배양한 결과 뚜렷한 첨가의 효과를 확인할 수 없었다. 그러므로 공시균주인 느타리버섯 8품종의 균사체 생육이 우수하면서 가격이 저렴하고 구입이 용이한 황백당과 대두분을 각각 탄소원과 질소원에 대한 최적 영양원으로 선발하였다.

농업용 액체배지의 영양원으로 선발된 황백당의 첨가농도를 3%로 고정하여 대부분의 첨가가 공시균주의 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 대부분의 첨가량이 증가할수록 건조균사체 생산 또한 증가하였다. 또한 무

기염의 첨가가 느타리버섯의 균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 영양원 선발시험에서 균사체의 신장직경을 조사한 실험 결과와는 달리 KH_2PO_4 과 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 1:1 혼합물을 1% 첨가한 처리구가 무첨가구에 비하여 건조균사체 생산량이 높았다. 그러므로 농업용 최적배지의 선발시험에서는 황백당 3%, 대두분 0.3%, 그리고 KH_2PO_4 과 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 0.05%의 배지조성을 갖는 액체배지를 선발하였다.

접종원의 배양을 위한 삼각플라스크의 배양환경을 조사하기 위하여 접종량, 배양액량, 삼각플라스크의 형태 배양방법이 균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 균사절편의 접종량이 증가할수록 초기 균사체 증식은 왕성하지만 건조균체량 생산은 직경 6 mm의 균사절편을 4개 접종했을 때 가장 우수하였다. 배양액량 및 삼각플라스크의 형태에 따른 균사배양 실험에서는 250 ml의 shake flask에서 배양한 것이 erlenmeyer flask에서 보다 건조균사체의 생산이 우수하였다. 일반 삼각플라스크에서 배양방법을 달리하여 건조균사체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조구에 비하여 45° 경사배양과 직경 5 mm의 유리막대를 넣고 배양한 처리구에서 균사생육이 우수하였다. 그리고 직경 10 mm의 유리막대를 넣은 처리구는 대조구에 비하여 건조균체량은 감소하였으나 균사체의 생육형이 펄프형이었다. 따라서 액체종균의 병배양에 대한 접종원 배양은 250 ml의 삼각플라스크에서 배양액량은 100 ml로 하였으며, 직경 6 mm의 균사절편을 2개 접종하여, 25°C, 120 rpm에서 배양하였다.

적 요

느타리버섯 8품종의 균사생장은 25~30°C의 온도 범위와 5.5~6.5의 pH 범위에서 가장 우수하였다. 영양원의 선발시험에서 탄소원으로는 황백당, 밀가루 및 옥수수가루가, 그리고 질소원으로는 대두분이 공시균주의 균사생장이 가장 우수하였다. 농업적으로 이용성이 우수한 황백당 3%, 대두분 0.3%, 인산칼륨 0.05%, 황산마그네슘 0.05%를 배지 조성으로하는 농업용 액체배지를 선발하였다.

삼각플라스크 배양에서는 250 ml의 erlenmeyer flask에서 보다는 250 ml의 shake flask에서 직경 6 mm의 균사절편을 2개 접종하여 배양액량 100 ml에서 배양했을 때 공시균주의 균사체 생산이 우수하였다. 그리고 erlenmeyer flask에서 배양방법을 달리하여 느타리버섯의 균사를 배양하였을 때, 45° 경사배양한 처리구에서 균사체 생산이 가장 우수하였으며, 길이 50 mm × 직경 10 mm의 유리막대를 넣고 배양한 처리구에서는 균체량이 가장 적었지만 펄프형의 균사생육을 유도할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 1994-1997년에 걸쳐 농림수산기술센터 현장에 로 연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과로 농림수산기술

센터에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Chang, S. T., Buswel, J. A. and Chiu, S. W. 1993. Mushroom Biology and Mushroom Products. The Chinese University Press.
- Chang, S. T. and Hayes, W. A. 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press. New York.
- Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press, Inc., 27-40, 185.
- Chung, H. C., Park, Y. H. and Kim, Y. S. 1981. Basic informations on the characteristics of strains of oyster mushroom. *Kor. J. Mycol.* 9(3): 129-132.
- Ganeshan, G., Tewari, R. P. and Bhargava, B. S. 1989. Influence of residual vegetable crop biomass on yield and mineral content of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Mushroom Sci.* 12(2): 91-97.
- Go, S. J., You, C. H. and Park, Y. H. 1984. Effects of temperature, pH, carbon and nitrogen nutrition on mycelial growth of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. and *P. ostreatus* (Fr.) Quel. *Kor. J. Mycol.* 12(1): 15-19.
- Goltapeh, E. M. and Kapoor, J. M. 1989. New substrates for spawn production of button mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Singer. *Mushroom Sci.* 12(1): 281-285.
- Hadar, Y. and Cohen-Arazi, E. 1986. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl. Environm. Microbiol.* 51(6): 1352-1354.
- Hasimoto, K. and Takahashi, Z. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Sci.* 9(1): 585-593.
- Hong, J. S. and Kang, K. H. 1983. Fruit-body formation of *Pleurotus florida* on the synthetic medium. *Kor. J. Mycol.* 11(3): 121-128.
- Hong, J. S., Lee, K. S. and Choi, D. S. 1981. Studies on Basidiomycetes(I). On the mycelium growth of *Agaricus bitorquis* and *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 9(1): 19-24.
- Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Science* 107: 373.
- Jandaik, C. L. and Rangad, C. O. 1978. Biochemical changes in *Pleurotus* species with respect to different growth stages. *Mushroom Sci.* 10(1): 419-426.
- Khanna, P. and Garcha, H. S. 1981. Nutritive value of mushroom *Pleurotus florida*. *Mushroom Sci.* 11(2): 561-572.
- Lee, J. Y., An, W. G. and Lee, J. D. 1994. Studies on the submerged culture of *Lentinus edodes* mycelia in Brewer's yeast extract medium. *Kor. J. Mycol.* 22: 266-275.
- Lee, T. S. 1990. The full list of recorded mushrooms in Korea. *Kor. J. Mycol.* 18(4): 233-259.
- Martinez-Correra, D. 1989. Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffee pulp in the tropics. *Mushroom Sci.* 12(2): 169-178.
- Mori, K., Toyomasu, T., Nanba, H. and Kuroda, H. 1989. Anti-

- tumor action of fruit bodies of edible mushrooms orally administered to mice. *Mushroom Sci.* **12**(1): 653-660.
- Shiio, T., Okunishi, M. and Okumura, S. 1974. Fundamental studies on the large-scale cultivation of edible fungi. *Mushroom Sci.* **9**(1): 799-808.
- Torev, A. 1968. Submerged culture of higher fungi mycelium on industrial scale. *Mushroom Sci.* **7**: 585-593.
- Yang, Q. Y. and Jong, S. C. 1989. Medical mushrooms in China. *Mushroom Sci.* **12**(1): 630-643.
- Yoshioka, P., Ikikawa, T., Noda, M. and Fukuoka, F. 1972. Studies on antitumor activity of some fractions from Basidiomycetes I, An antitumor acidic polysaccharide fraction from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel. *Chem. Pharm. Bull.* **20**: 1175-1180.
- Yoshioka, Y., Tabeta, R., Saito, H., Ueharo, N. and Fukuoka, F. 1985. Antitumor polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel.; Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research* **140**: 93-100.
- Zadražil, F. 1974. The ecology on industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*. *Mushroom Sci.* **9**(1): 621-652.
- 姜安錫 外 12名. 1989. 最新버섯재배기술. 圖書出版 常綠社. 서울.
- 古川 久彦. 1992.きのこの學, 7章 菌絲體生産, 10章 菌體利用. 共立出版株式會社. 東京.
- 金洪基, 孔在烈. 1993. 4-1 공업생산의 배지, 5장 발효조. 微生物工學(基礎와 應用). 圖書出版 東和技術. 서울.
- 산림청. 1993(제 23호). 임업통계연보, IV. 임업생산 및 공급, 1. 임산물 생산량.