

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
연구과제 및 세부과제명		연구분야	수행기간	연구실	책임자
잎새버섯 병재배 안정생산기술 확립 연구		버섯	'09	농업기술원 버섯연구소	김정한
3) 잎새버섯 병재배용 적합배지 pH 조절방법 개발		버섯	'09	농업기술원 버섯연구소	김정한
색인용어	잎새버섯, 배지, pH, 발이				

ABSTRACT

This study was carried out to develop a useful method for adjustment to the pH of substrate in bottle culture of *Grifola frondosa*. Four species of additives solution, which were citric acid, malic acid, tartaric acid and succinic acid, were added at level of 0.5% to 3.0%(w/v) into substrate. The substrate pH addition of all four additive solutions were showed suitable range 3.8 to 4.8 for mycelial growth of *G. frondosa* after sterilization. The supplementation of succinic acid and citric acid solutions at level of 0.5% were showed shorter cultivation period than control(non-addition) and higher consistent yields than other additives. Based on these results, we developed an benefit technique for higher production of *G. frondosa* with bottle cultivation.

Key words : bottle cultivation, *Grifola frondosa*, pH adjustable additives, yield

1. 연구목표

잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 민주름버섯목 구멍장이버섯과(Poyporaceae)에 속하는 담자균으로서 가을에 졸참나무, 물푸레나무의 뿌리 근처에 사물기생하여 다발로 발생하는 백색 목재부후균으로 한국, 동아시아, 유럽, 북미 등에 분포되어 있다. 또한 잎새버섯은 식용이면서 약리작용이 뛰어난 기능성 버섯으로 항암작용, 항바이러스작용, 혈당강화작용, 혈압강화작용 등의 기능성이 보고되어 주산지인 일본에서는 1990년대 후반부터 생산과 소비가 꾸준히 증가하고 있어, 현재 팽이, 만가닥, 표고버섯 다음으로 인기가 있는 버섯이다.

국내에서도 잎새버섯에 대한 관심이 증가하고 있는 가운데, 잎새버섯 세포외 다당체의 보습력과 자극완화 효과(이 등, 2005), 사람 섬유아세포에서 matrix metalloproteinase-1 발현저해효과(심 등, 2005), 잎새버섯의 고혈당 및 고지혈효과(이 등, 2007), 산화적 스트레스에 대한 잎새버섯 추출물 효과(이 등, 2007), 잎새버섯 조다당체 추출물의 항당뇨 효과(박 등, 2007) 등의 기능성에 관한 연구가 보고되었으며, 이 외에도 잎새버섯을 식품소재로 활용하기 위하여 기능성 음료제조(이 등, 2007), 스폰지 케익(이 등, 2007) 등의 연구보고도 있었다.

일반적으로 버섯의 균사생장에 적합한 pH는 버들송이 7.0(정 등, 2003), 느타리버섯 5.0~6.0(홍 등, 1978), 큰느타리버섯 6.0(강 등, 2000)으로 대부분 중성부근에서 균사생장이 우수하다고 알려졌으나, 잎새버섯과 꽃송이버섯은 pH 4.0~5.0로서 약산성 부근에서 균사생장이 우수한 것으로 보고되었다(심 등, 1998; 지 등, 2007). 또한 본 연구진은 잎새버섯 봉지재배법 개발 선행연구에서, 배지의 이화학적 중 버섯수량에 가장 큰 영향을 주는 요인을 분석한 결과 배지의 pH가 잎새버섯의 수량에 영향을 끼치는 것으로 나타났다(김 등, 2008). 그러나 현재 배지의 pH를 높일 수 있는 첨가제(탄산칼슘, 석회, 폐화석분 등)는 많이 알려져 있으나, pH를 낮출 수 있는 첨가제와 첨가방법에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 잎새버섯 안정생산을 위한 적정 pH 조절법을 개발하기 위하여 본 시험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 접종원 및 액체종균 제조

본 시험에 사용된 균주는 버섯연구소의 선발한 균주 ‘참’ 잎새버섯(*Grifola frondosa*, GMGF44009)을 시험균주로 PDB(Potato Dextrose Broth) 배지에서 증식시키면서 액체종균용 접종원으로 사용하였다. 액체종균은 PDB(potato dextrose broth, Difco)배지에 전 배양한 접종원을 액체 배지에 접종하여 약 10일간 배양하여 사용하였다. 종균용 액체배지는 증류수 10L에 대두박 15g, 설탕 200g, 밀가루 50g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ 5g, 식용유 10ml를 첨가하여 18L내열성 배양병에 담아 121℃에서 20분간 멸균한 후 병당 10 ml 접종하여 약 10일간 배양하여 액체종균으로 사용하였다.

나. 배지의 pH 조절 및 접종

잎새버섯 재배를 위한 배지조성은 주재료로 참나무톱밥(80%)을 사용하였고 여기에 영양원으로 건비지와 밀기울을 부피비로 1:1로 첨가(20%)하여 수분함량을 60~65%로 조절하기 위한 물 투입량을 산출하여, 여기에 pH 조절제로 식품첨가용 구연산, 사과산, 주석산, 호박산을 이용하고, 첨가수준은 물 투입량의 0.5, 1, 1.5, 2, 3%가 되도록 농도를 조절한 뒤 잘 용해시켜 혼합배지에 첨가하였다. 그리고 850cc 병당 500g씩 충전하여, 121℃에서 90분간 고압살균 후 25℃이하로 냉각하여 액체종균 자동접종기를 이용하여 병당 10ml씩 접종하였다.

마. 배양 및 생육특성 조사

배양 및 생육특성은 느타리버섯의 배양 및 생육조사 기준과 농촌진흥청 표준조사법에 준하여 실시하되, 발이일수는 균사생장이 완료되어 입상한 시점에서 전체 발이물량의 70% 이상이 발이가 형성된 시점의 기간이며, 수확기간은 자실체 첫수확부터 끝날 때까지의 기간을 조사하였다. 또한, 자실체의 생육조사는 잎새버섯의 특성에 맞게 일부 변형하여 조사하였다(大森와 小出, 2006).

3. 결과 및 고찰

본 시험에 사용된 기본배지는 참나무톱밥+건비지+옥수수피(8:1:1, v/v)로서 살균전의 pH가 6.1, 조지방함량 2.4, C/N율 34로 측정되었다. pH 조절제 및 첨가농도에 따른 균사생장량을 컬럼테스트를 이용하여 측정한 결과(표 1), 0.5%의 모든 pH조절제 처리구가 대조구(pH조절제 무처리구)보다 균사생장이 우수하였으며, 그중에서도 호박산 처리구가 가장 우수하였다. 그러나, 전반적으로 pH조절제의 첨가농도가 높을수록 균사생장은 억제되는 경향이었으며 특히, 사과산과 주석산은 1.0%이상부터 균사생장이 억제되었다.

표 1. pH조절제 및 첨가농도에 따른 균사생장량(컬럼테스트) (단위: mm)

조절제	첨가농도 (%)	배양일수(일)			
		8	15	22	29
구연산	0.5	40	60	78	97
	1.0	26	48	74	90
	1.5	22	46	68	79
	2.0	13	31	45	54
	3.0	12	25	38	53
사과산	0.5	15	47	71	91
	1.0	18	40	60	79
	1.5	15	34	49	59
	2.0	13	29	43	57
	3.0	8	18	28	43
주석산	0.5	22	54	77	91
	1.0	15	40	56	69
	1.5	12	33	54	71
	2.0	13	25	40	51
	3.0	4	16	23	28
호박산	0.5	29	55	81	105
	1.0	18	50	82	100
	1.5	18	42	65	89
	2.0	15	31	50	63
	3.0	16	39	56	66
대조구		36	49	64	70

표 2는 배양과정중 pH조절제 및 첨가농도에 따른 배지의 pH 변화를 나타내었다. 배지혼합에 첨가 되는 물의 pH가 7.8이었는데, 여기에 pH 조절제를 첨가비율별로 용해시켜 용액을 제조했을때, pH조절제의 첨가농도가 높을수록 용액의 pH는 낮아지는 경향을 보여주었다. 대조구(pH조절제 무처리구)의 살균전 pH는 6.1이었으나 살균후에는 pH가 5.3으로 급격하게 떨어졌으며, pH조절제 처리구는 0.5% 수준에서는 pH가 4.8~5.0, 1%수준에서는 4.2~4.4, 1.5%수준에서는 3.8~4.3, 2%수준에서는 3.6~4.2, 3%수준에서는 3.2~3.9사이로 pH조절제의 첨가농도가 높을수록 혼합배지의 pH는 낮아졌다. 또한 pH조절제 처리구는 대조구와는 다르게 살균전과 후의 pH의 급격한 변화는 보이지 않았다. 배양경과에 따라 대조구의 pH는 6.1에서 4.8로 서서히 낮아지는 반면, pH조절제 처리구는 배양기간 중 큰 변화가 없었다.

잎새버섯은 일반적으로 균사생장 최적 pH범위가 계통간의 차이는 있지만 pH 4~5범위의 약산성으로 알려져 있는데(지 등, 2007), 본 실험에서는 혼합배지의 살균후 pH를 기준으로 했을때, 구연산은 0.5~3%, 사과산은 0.5~2%, 주석산은 0.5~1.5%, 호박산 0.5~3%로 첨가했을때 잎새버섯의 최적 pH 범위내로 혼합배지의 pH가 조절된 것으로 나타났다.

표 2. pH조절제 및 첨가농도에 따른 pH 변화

조절제	첨가농도 (%)	용액	살균전	살균후	배양기간(일)					
					5	10	15	20	25	30
구연산	0.5	2.5	5.0	4.8	4.7	4.7	4.8	4.9	5.3	5.2
	1	2.1	4.4	4.4	4.4	4.4	4.3	4.7	4.6	4.5
	1.5	2.0	4.2	4.2	4.3	4.1	4.2	4.3	4.7	4.4
	2	2.0	3.9	4.1	4.1	3.9	3.9	4.1	4.2	4.1
사과산	0.5	2.5	4.8	4.7	4.6	4.7	4.7	4.9	5.4	4.8
	1	2.3	4.2	4.3	4.3	4.3	4.2	4.9	5.0	5.1
	1.5	2.2	4.0	4.2	4.2	4.1	4.0	4.1	4.9	4.2
	2	2.2	3.8	4.0	4.0	3.9	3.8	3.9	4.2	4.1
주석산	0.5	2.5	4.7	4.6	4.7	4.5	4.5	4.7	4.9	4.7
	1	2.3	4.2	4.3	4.3	4.2	4.2	4.2	4.4	4.2
	1.5	2.1	3.8	4.2	4.0	3.9	3.8	4.0	4.1	3.9
	2	2.0	3.6	3.9	3.8	3.7	3.4	3.8	3.8	3.8
호박산	0.5	2.8	4.9	4.7	4.6	4.6	4.7	4.6	5.0	4.9
	1	2.6	4.4	4.5	4.6	4.5	4.5	4.7	4.9	4.9
	1.5	2.5	4.3	4.3	4.4	4.3	4.4	4.5	5.1	5.1
	2	2.5	4.2	4.4	4.3	4.2	4.2	4.4	4.4	5.1
대조구		7.8	6.1	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.1	4.8

pH조절제 및 첨가농도에 따른 발이율을 나타낸 결과(표 3), 대조구는 발이개시일이 7일로 나타났으나, 0.5%의 구연산, 사과산, 호박산 처리구에서는 6일에 발이가 개시되었다. 그러나 1.0% 이상의 pH 조절제 처리구 모두 발이개시일이 지연되거나 발이율이 현저하게 떨어지는 경향이었으며, 특히 사과산과 주석산 처리구의 발이억제 현상이 두드러지게 나타났다. 발이경과일수가 늘어남에 따라 발이율은 서서히 증가하다가 발이16일에 대조구의 발이율이 60%인 반면 0.5% 호박산 처리구는 95%, 0.5% 구연산 처리구는 92.5%, 0.5%의 주석산과 사과산 처리구는 80%로 각각 나타났다.

표 3. pH 조절제 및 첨가농도에 따른 발이율 (단위: %)

조절제	첨가농도 (%)	발이일수(일)										
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
구연산	0.5	12.5	25	35	37.5	37.5	55	67.5	67.5	85	92.5	92.5
	1.0		12.5	15	17.5	17.5	25	22.5	25	32.5	35	35
	1.5					5	5	7.5	7.5	7.5	15	15
	2.0						미발이					
	3.0						미발이					
사과산	0.5	5	32.5	45	45	47.5	52.5	60	70	72.5	80	80
	1.0				15	15	17.5	20	22.5	30	40	40
	1.5						미발이					
	2.0						미발이					
	3.0						미발이					
주석산	0.5		15	30	35	50	55	57.5	60	65	72.5	80
	1.0						미발이					
	1.5						미발이					
	2.0						미발이					
	3.0						미발이					
호박산	0.5	10	35	35	45	57.5	75	85	92.5	95	95	95
	1.0				15	20	20	27.5	27.5	30	30	30
	1.5				5	10	10	10	15	15	15	15
	2.0						미발이					
	3.0						미발이					
대조구			10	15	20	20	30	35	45	50	57.5	60

pH조절제 및 첨가농도에 따른 생육단계별 소요기간을 측정한 결과(표 4), 배양일수는 대조구가 35일인데 비해 0.5%의 구연산, 호박산, 사과산 처리구는 30~31일로 대조구보다 4~5일 단축되었다. 또한 발이일수는 대조구가 13일인데 비해 호박산이 11일로 가장 빠르고, 구연산은 12일로 나타났으며, pH조절제의 첨가농도가 높을수록 발이일수는 지연되는 경향을 보여주었다. 전체 재배기간은 0.5% 호박산이 52일, 0.5% 구연산과 사과산 처리구가 54일, 0.5%의 주석산과 1%의 호박산 처리구가 58일로 나타났으나, 그 외의 처리구는 대조구(59일) 보다 지연되는 것으로 나타났다.

표 4. pH 조절제 및 첨가농도에 따른 생육단계별 소요기간 (단위: %)

조절제	첨가농도(%)	배양일수	발이일수 ¹	생육일수	재배기간
구연산	0.5	31	12	11	54
	1.0	36	13	11	60
	1.5	38	15	12	65
	2.0			미발이	
	3.0			미발이	
사과산	0.5	31	12	11	54
	1.0	35	14	11	60
	1.5			미발이	
	2.0			미발이	
	3.0			미발이	
주석산	0.5	34	12	12	58
	1.0			미발이	
	1.5			미발이	
	2.0			미발이	
	3.0			미발이	
호박산	0.5	30	11	11	52
	1.0	35	12	11	58
	1.5	40	13	12	65
	2.0			미발이	
	3.0			미발이	
대조구		35	13	11	59

¹ 발이일수 : 전체 발이물량의 70%이상이 발이가 형성된 시점의 기간

pH조절에 따른 버섯 자실체의 생산성을 조사하기 위하여 3회 재배시 평균 수량을 조사한 결과(표 5), 대조구의 병당 수량이 87.5g인데 비해 0.5% 호박산 처리구가 121g, 0.5% 구연산 처리구가 107g 순으로 나타났으며, 두 처리간의 유의성은 없었다. 또 0.5% 사과산 처리구는 병당 수량이 95.7g으로 대조구와 비슷한 수량을 보여주었으나, 0.5% 주석산 처리구는 73.4g으로 대조구보다 수량이 낮게 나타나 이 두 종류의 유기산은 잎새버섯의 생산에 적합하지 않는 것으로 판단된다. 또한, 1.0% 이상의 모든 pH 조절제 처리구에서 발이가 억제되거나 버섯 발생이 되지 않는 것으로 나타나 일정 수준이상의 유기산 첨가는 자실체 발생을 오히려 방해할 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면, 잎새버섯의 안정생산을 위해 배지의 pH를 조절하기 위해서 구연산과 호박산을 0.5% 농도로 첨가하면 혼합배지의 pH가 4.7~4.8로 조절되며 균사생장과 발이가 촉진되어 자실체 생산성을 향상시키는 것으로 나타났다.

표 5. pH 조절제 및 첨가농도에 따른 자실체 수량

조절제	첨가농도 (%)	수량 ¹⁾			평균수량	CV(%)
		1회	2회	3회		
구연산	0.5	100.3	104.7	116.0	107.0 ab ²⁾	7.6
	1.0	66.0	75.0	56.3	65.7 de	14.2
	1.5	42.6	9.6	47.6	33.3 f	62.1
사과산	0.5	89.9	104.1	93.1	95.7 bc	7.9
	1.0	72.0	101.0	83.2	85.4 bcd	17.1
주석산	0.5	85.3	58.4	76.6	73.4 cde	18.7
호박산	0.5	107.2	125.5	130.3	121.0 a	10.1
	1.0	32.1	52.3	65.3	49.9 ef	33.5
	1.5	62.0	48.3	47.2	52.5 ef	15.7
대조구		62.0	90.4	110.0	87.5 bcd	27.6

¹⁾ 수량 : 병당 생중량×수확률

²⁾ DMRT(95%)

4. 적 요

잎새버섯 안정생산을 위하여 배지의 pH를 적정하게 조절할 수 있는 방법을 개발하고자 pH 조절제 선별 및 적정 첨가농도를 구명하기 위하여 수행한 연구결과는 다음과 같다.

- 가. 혼합배지에 4종의 pH조절제(구연산, 호박산, 사과산, 주석산)를 5수준(0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3%)으로 처리하여 균사생장정도를 측정된 결과 0.5% 수준의 pH 조절제 처리구의 균사생장이 빨랐으며, 그중에서도 호박산이 가장 빠른 것으로 나타났다.
- 나. pH조절제의 첨가농도가 높을수록 혼합배지의 pH는 낮아지는 경향을 보여주었으며, 배양기간 경과에 따라 대조구는 서서히 낮아지는 경향을 보인 반면 pH조절제 처리구는 유지되는 경향을 보여주었다.
- 다. 발이율은 0.5%의 호박산(95%), 구연산(92.5%), 사과산과 주석산(80%)로 대조구의 60%보다 우수하였으나, 1% 이상의 농도에서는 발이가 지연되거나 억제되는 경향을 보여주었다.
- 라. 배양기간은 0.5% pH조절제 처리시 30~34일로 대조구의 35일보다 빠른 것으로 나타났으며, 전체배기기간은 0.5% 호박산이 52일, 0.5%의 구연산과 사과산이 54일, 0.5%의 주석산이 52일로 대조의 59일보다 빠른 것으로 나타났다.
- 마. 병당 수량성은 0.5%의 호박산과 구연산 첨가시 각각 121g, 107g으로 가장 우수하였고 대조구의 87.5g에 비해 21~37% 증수되었다.

5. 인용문헌

- 강미선, 강태수, 강안석, 손형락, 성재모. 2000. 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)의 균사배양 및 인공재배에 관한 연구. 한국균학회지 28(2), 73-80
- 김정환, 최종인, 지정현, 원선이, 서건식, 주영철. 2008. 잎새버섯 봉지재배에 적합한 배지조성 연구. 한국균학회지 36(1), 26-30
- 박금주, 오영주, 이상운, 김현수, 하효철. 2007. 3T3-L1지방세포 및 제2형 당뇨병모델(KK-Ay)에서 잎새버섯(*Grifola frondosa*) 조다당체 추출물의 항당뇨 효과. 한국식품과학회지 39(3), 330-335
- 심관섭, 배준태, 이동환, 김진화, 이범천, 최태부, 표형배. 2005. 잎새버섯이 생산하는 세포외 다당체의 사람 섬유아세포에서 Matrix Metalloproteinase-1 발현저해 효과. 대한화장품학회지 31(2), 161-167
- 심재욱, 손서규, 윤상욱, 이운수, 이태수, 이상선, 이갑득, 이민웅. 1998. 꽃송이 버섯의 균사생장을 위한 최적요인. 한국균학회지 26(1), 39-46
- 이범천, 김진화, 배준태, 이동환, 심관섭, 표형배, 최태부. 2005. 잎새버섯이 생산하는 세포외 다당체의 보습력과 자극완화 효과. 대한화장품학회지 31(1), 35-41
- 이순이, 박영철, 김종봉. STZ 및 고지방식이 의해 유도된 흰쥐의 고혈당 및 고지혈에 대한 함박잎새버섯분말의 효능. 생명과학회지 17(10), 1387-1393
- 이재성, 이종숙. 2007. 잎새버섯 추출물의 생리 기능 및 음료 제조. 한국식품영양과학회지 36(10), 1241-1247
- 이종숙, 김한섭, 이운주, 정인창, 배종호, 이재성. 2007. 잎새버섯(*Grifola frondosa*) 분말 첨가가 sponge cake의 품질 특성에 미치는 영향. 한국식품과학회지 39(4), 400-405
- 정중천, 홍인표, 장갑열, 박정식. 2003. 버들송이(*Agrocybe cylindracea*)의 액체종균 배양조건과 접종량. 한국균학회지 31(2), 94-97
- 지정현, 김정환, 원선이, 서건식, 주영철. 2007. 잎새버섯 균주의 균사체 생육 최적조건. 한국균학회지 35(2), 76-80
- 홍재식. 1978. 느타리버섯 생리화학적성질 및 재배에 관한 연구. 한국농화학회지 21(3), 150-184
- 大森清壽, 小出博志. 2006.キノコ栽培全科. pp. 97-109. 社団法人 農山漁村文化協會

6. 연구결과 활용제목

- 잎새버섯 배지용 적정 pH조절 방법(영농활용)

7. 연구원 편성

세부과제	구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도
						'09
잎새버섯 병재배용 적합배지 pH 조절 방법 개발	세부과제 책임자	농업기술원 버섯연구소	농업연구사	김정한	과제수행	○
	공동연구자	”	농업연구사	이윤희	결과분석	○
		”	”	이한범	분석지원	○
		”	교수	서건식	과제자문	○
		”	농업연구관	주영철	결과검토	○