

과제구분	IPET	수행시기		전반기	
연구과제 및 세부과제명		연구분야	수행기간	연구실	책임자
표고버섯 신품종 육성 및 안정생산 기술 개발		버섯	'15~	농업기술원 버섯연구소	김정한
표고버섯 병배양에 적합한 액체종균 제조 기술 개발		버섯	'16~'18	농업기술원 버섯연구소	김정한
색인용어	표고버섯, 병재배, 액체종균, 효소, 수량				

ABSTRACT

We have developed a liquid culture method for stable production of *Lentinula edodes*. When 0.3% and 0.6% of oak flour were added to soybean meal media(SMM), mycelial growth was high. When 0.3% oak flour was added to the carboxymethylcellulose(CMC) agar medium, mycelial growth was excellent at 26.4 mm, indicating high cellulase activity. During the liquid culture period, the amount of the medium decreased and the size of the mycelial particles decreased as the aeration amount increased. In addition, the dry weight of mycelia increased. The amount of aeration suitable for the *L. edodes* liquid spawn was 0.6 vvm, which showed a relatively low rate of medium reduction and high dry weight of mycelia. During the incubation period, the production of CO₂ increased until 7 days and then decreased. The dry weight of mycelia was the highest at 10 days of culture. The results of the productivity test of the *L. edodes* liquid spawn showed no significant difference from the sawdust spawn such as period of cultivation, yield, number of fruit body.

Key words : Bottle cultivation, *Lentinula edodes*, Liquid spawn, Oak powder, Yield

1. 연구목표

국내 표고 생산량은 2017년 현재 23,984MT이고 생산액은 2,118억원으로 버섯 가운데 단일 품목으로는 생산액이 가장 높다(산림청, 2018). 표고는 국내 수요에 비하여 공급이 부족하여, 중국으로부터 종균이 접종되어 균사배양이 완료된 배지가 2016년에만 43,904톤이 수입되었다(농식품수출정보, 2017). 따라서 국내 표고버섯의 자급률을 높이기 위해서는 생산 기반 확충이 시급한 실정이다.

버섯 종균은 종균을 구성하는 배지의 종류에 따라 크게 톱밥종균, 액체종균 등으로 나누어진다. 또한 버섯 재배에 영향을 미치는 여러 가지 환경요인 중 종균의 활력이 중요하며, 그 활력을 유지하는데 있어서 고체종균보다 액체종균이 유리하고(Hong 등, 2003), 액체종균은 톱밥종균에 비하여 배지에 균사를 신속하게 활착하게 하며, 균사생장을 균일하게 한다고 보고되고 있다(Shim 등, 2014).

표고 재배에서 액체종균은 톱밥배지중 균사생장속도가 빨라 톱밥종균 접종으로 120일 소요되는 톱밥배지 생산기간이 90일로 단축되었다고 보고되었으며(Kawai 등, 1996), Lee 등(2006)은 종균 종류에 따른 표고 생산성을 비교한 결과, 액체종균의 생산성이 떨어지는 것으로 나타났다고 하였다. 그럼에도 불구하고, 표고버섯 재배시 생력화와 생산량 증대를 위해서는 큰느타리, 팡이버섯 재배처럼 액체종균의 활용기술 개발이 필요할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 표고 병재배 자동화 시스템 개발의 일환으로 병재배에 적합한 액체종균을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 표고 액체종균용 참나무분 적정 첨가량 설정

본 연구에 사용한 시험균주는 산조701호로서 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 배양한 후 사용하였다. 액체종균은 물 1ℓ에 탈지 대두박분 3g, 설탕 30g, KH_2PO_4 0.5g, MgSO_4 0.5g에, 식용유 3ml을 첨가하여 대두박분 배지를 제조하였다. 여기에 입도가 $850\mu\text{m}$ 이하인 참나무분을 대두박분 배지에 0.3, 0.6, 0.9, 1.2%(w/v)를 첨가하고 121°C 에서 20분간 살균하였다. 배지가 식은 후 페트리디쉬에서 성장한 표고 균사체를 수술용 메스로 2~3mmmm의 사각형 크기로 잘라 접종한 후 진탕배양기에서 배양온도 25°C , 진탕속도 150 rpm으로 14일 동안 액체배양을 한 후 배양된 균사체는 80°C 에서 48시간 건조하여 건조중량을 측정하였다.

고체배지에서의 균사생장속도 조사는 참나무톱밥과 미강을 80:20(v/v)으로 혼합하고 수분함량이 60% 되도록 조절한 후 직경 20mm, 길이 200mm되는 유리시험관에 넣어 121°C 에서 40분간 살균한 다음 참나무분 첨가 액체종균 처리별로 접종한 후 $21\pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온실에서 20일간 배양시키면서 균사생장 길이를 측정하였다.

Laccase활성은 무기물 혼합 농축액(K_2HPO_4 2.0g, KCl 2.0g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g, 증류수 1ℓ, pH 6.0) 50ml와 ABTS(2,2'-azino-bis-3-ethylbethiazoline -6-sulfonic acid) 0.5487g, Bacto Agar 15.0g을 혼합한 후, 증류수를 가해 배지 1ℓ를 제조하고 높이 15mm, 직경 85mm 되는 페트리디쉬에 20ml씩 분주하여 ABS Agar Plate를 제조하였다. 여기에 액체종균 처리별로 Plate 중앙에 표고 시험균주를 접종한 후, 25°C 에서 5일간 암조건에서 배양한 후 시험균주를 중심으로 청록색으로 나타나는 발색환의 직경을 측정하였다.

셀룰로오스 분해 효소의 활성은 Jeon과 Ka(2014)의 방법에 따라 직경이 85mm 되는 CMC Agar Plate(NaNO_3 2.0g, K_2HPO_4 1.0g, MgSO_4 0.5g, KCl 0.5g, Carboxymethylcellulose sodium salt 2.0g, Peptone 0.2g, Agar 15.0g, 증류수 1ℓ, pH 6.0)를 제조한 후 CMC Agar

Plate 중앙에 시험 균주를 접종하여 25°C에서 8일간 배양하고, Gram's Iodine Solution(KI 2.0g, I2 1.0g, 증류수 300ml)을 배지 중앙에 3ml씩 떨어뜨려 고르게 분산시킨 후, 암조건에서 2시간 동안 상온에 방치 한 후 투명한 직경을 측정하였다.

나. 액체종균 적정 통기량 설정

표고 액체종균 배양에 필요한 적정 통기량을 조사하기 위하여 Jang 등(2010)의 방법에 따라 실시하였다. 액체종균 제조는 대두박분 배지에 참나무분을 부피대비 중량비로 0.3%를 첨가하고 121°C에서 60분간 살균 한 후 배지를 냉각시킨 다음 시험균주 접종원을 부피대비 중량비로 배지량의 2%로 접종한 후 통기량을 유량계를 이용하여 분당 0.3, 0.6, 0.9, 1.2vvm(vessel volume per minute)으로 조절한 후 25°C에서 12일간 3반복으로 배양하였으며 처리구별 이산화탄소 발생량은 액체배양 중 공기가 배출되는 부분에 Gas Data PAQ(Gas data Ltd.)를 부착하여 배양일별로 조사하였다. 통기량에 따른 액체종균의 배지증발량을 조사하기 위하여 시험균주 접종원을 접종한 직후의 액체종균 배지량을 측정하고, 균사배양이 완료되는 시점의 배지량을 측정하여 그 차이를 산출하였으며, 균사배양 완료 후의 건조균사체량은 80°C에서 48시간 건조하여 건조중량을 산출하였다.

다. 액체종균 적정 배양기간 설정

참나무분을 첨가한 표고 액체종균의 적정 배양기간을 구명하기 위하여 대두박분 배지에 참나무분 0.3%를 첨가하고 통기량을 0.6vvm으로 조절하여 25°C에서 배양기간을 3, 7, 10, 14, 17, 21일째로 구분하여 배양하며 이산화탄소 발생량과 건조균사체량을 조사하였다. 이산화탄소 발생량은 액체배양 중 공기가 배출되는 부분에 Gas Data PAQ(Gas data Ltd.)를 부착하여 측정하고, 건조균사체량은 80°C에서 48시간 건조하여 건조 중량을 산출하였다.

라. 액체종균 생산성 분석

표고 액체종균의 생산성을 톱밥종균과 비교하기 위하여 병 용기의 배지는 주재료로 참나무톱밥과 참나무칩을 42.5%씩 동량의 비율로 사용하였고, 영양원으로 미강과 옥분을 각각 7.5%씩 첨가하였다. 이때 혼합배지의 수분함량은 58.2%이며 pH 5.57, CN율은 72.9로 나타났다. 참나무톱밥과 미강을 부피비율로 85:15로 혼합하여 배지수분을 60%로 조절한 다음 polypropylene 병에 2.5kg씩 충전하여, 121°C에서 90분간 살균, 냉각 후 액체종균과 톱밥종균을 접종하였다. 이 때 사용한 액체종균은 대두박분 배지에 참나무분 0.3%를 첨가하여 통기량 0.6vvm에서 10일간 배양하여 사용하였고, 톱밥종균은 참나무톱밥과 미강을 부피비율로 80:20으로 혼합한 배지에 표고 균을 접종한 다음 약 30일간 배양한 종균을 사용하였으며 접종량은 두 처리 모두 배지 무게의 2%를 접종하였으며 20±1°C로 조절된 배양실에서 배양하면서 배양소요일수를 조사하였다. 갈변 유도를 위하여 200lux 이상의 명배양을 실시하였으며 병 용기의 하단부위까지 갈변이 완료된 시점을 갈변기간으로 산출하였다. 생육기간은 갈변이 완료된 배지가 17±3°C로 조절된 생육실로 옮겨진 후 부터 수확시까지를 산출하고 총

재배기간은 군사배양, 갈변, 생육기간을 합쳐 산출하였다. 자실체 개체수는 병당 유효 발생수를 조사하고, 수량은 각 처리당 트레이(9병)당 3주기 조사를 통하여 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 표고 액체종균용 참나무분 적정 첨가량 설정

참나무분 첨가율별 표고 액체종균의 군사생장 속도를 톱밥배지를 이용한 시험관에서 시험한 결과는 표 1과 같다. 종균접종 후 군사배양 20일째 군사생장 속도는 PDB배지 종균은 117.1mm, 대두박분 액체종균(SMM)은 112.7mm, 참나무분 첨가 대두박분 액체종균은 112.0~119.0mm으로 나타났다. 참나무분 첨가에 따른 액체종균의 군사생장 속도는 톱밥배지를 이용한 시험관에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 1. 참나무분 첨가에 따른 액체종균의 표고 군사생장 속도

처리내용	군사생장길이(mm)
Potato Dextrose Broth(PDB)	117.1±6.65
대두박분배지	112.7±5.65
참나무분 0.3% + 대두박분배지	114.8±3.51
참나무분 0.6% + 대두박분배지	119.0±9.40
참나무분 0.9% + 대두박분배지	113.0±3.58
참나무분 1.2% + 대두박분배지	112.0±5.60

참나무분 첨가 수준별 표고 대두박분 액체종균 pH 변화 및 군사생장량을 측정하였다(표 2). pH 변화를 살균 전과 후에 조사한 결과, Potato Dextrose Broth(PDB) 배지는 5.08로 변화가 없었고 대두박분 액체종균은 살균 전 5.77 에서 살균 후 5.91로 약간 높아졌다. 참나무분 첨가 액체종균은 참나무분 첨가량이 많을수록 살균 전과 후의 pH 낮아지는 경향이 있었으며 또한, 살균 전에 비하여 살균 후가 다소 낮았다.

군사체 건조량은 참나무분 0.6%와 0.3% 첨가구가 각 553mg, 457mg으로 높게 나타났으며, PDB배지와 대두박분 액체종균은 각 230mg, 279mg으로 다소 낮았다. 참나무분이 0.9% 이상 첨가시 군사체량이 급격히 감소되었는데 이는 액체종균 배양 시 적정 비율 이상의 참나무분은 오히려 군사의 성장을 방해하는 것으로 판단된다.

표 2. 참나무분 첨가 액체종균의 pH 변화 및 건조 균사체량

처리내용	살균전 pH	살균 후 pH	건조 균사체량(mg) [↓]
Potato Dextrose Broth(PDB)	5.08	5.08	230 bc
대두박분배지	5.77	5.91	279 b
참나무분 0.3% + 대두박분배지	5.83	5.73	457 ab
참나무분 0.6% + 대두박분배지	5.76	5.58	553 a
참나무분 0.9% + 대두박분배지	5.67	5.48	151 c
참나무분 1.2% + 대두박분배지	5.63	5.35	189 c

↓ DMRT at 5%

버섯균은 대부분은 목재 부후성 균으로 Lignin과 Cellulose를 분해하여 생육에 필요한 영양분을 얻으며 살아가며, 이때 Laccase와 Cellulase는 매우 중요한 효소로 작용한다. 참나무분 첨가에 따른 표고 액체종균의 리그닌 분해력을 알아보기 위하여 ABTS Agar Plate에서 Laccase 활성을 발색환으로 측정하였다(표 3). 참나무분 첨가구의 발색환은 49.7~50.3mm로 첨가율에 따른 차이는 없었으나, 대두박분(53.6mm) 보다 낮고, PDB배지(40.4mm) 보다 높은 것으로 나타났다.

섬유소 분해력 조사를 위하여 Carboxymethylcellulose(CMC)를 기질로 한 고체 평판배지(CMC Agar Plate)에 CM-cellulase 활성을 투명환으로 측정한 결과(표 3), 참나무분 0.3% 첨가구가 투명환이 26.4mm로 가장 우수하였고, 참나무분 0.9%와 대두박분배지가 22.0mm, 참나무분 0.6% 및 1.2% 첨가구가 약17mm순으로 나타났다. 그러나 PDB배지는 laccase 뿐만 아니라 cellulase 활성도 다른 처리구보다 낮았는데, 이는 버섯균의 균사 생장에 필요한 영양소를 PDB(주재료: 감자)에서는 효소 분비 없이도 이용 가능 하나, 대두박분 및 참나무분 첨가 액체종균들은 laccase와 cellulase의 분비가 있어야만 버섯균의 이용이 가능하기 때문일 것으로 생각된다.

표 3. 참나무분 첨가 액체종균의 Laccase 및 CM-cellulase 활성

처리내용	Laccase activity (mm/5days)	CM-cellulase activity(mm/8days)
Potato Dextrose Broth(PDB)	40.4±2.67	15.3±1.10
대두박분배지	53.6±1.44	22.8±2.71
참나무분 0.3% + 대두박분배지	49.7±1.27	26.4±1.33
참나무분 0.6% + 대두박분배지	50.1±1.58	17.9±1.57
참나무분 0.9% + 대두박분배지	50.7±3.27	22.0±2.52
참나무분 1.2% + 대두박분배지	50.3±3.16	17.2±2.89

나. 액체종균 적정 통기량 설정

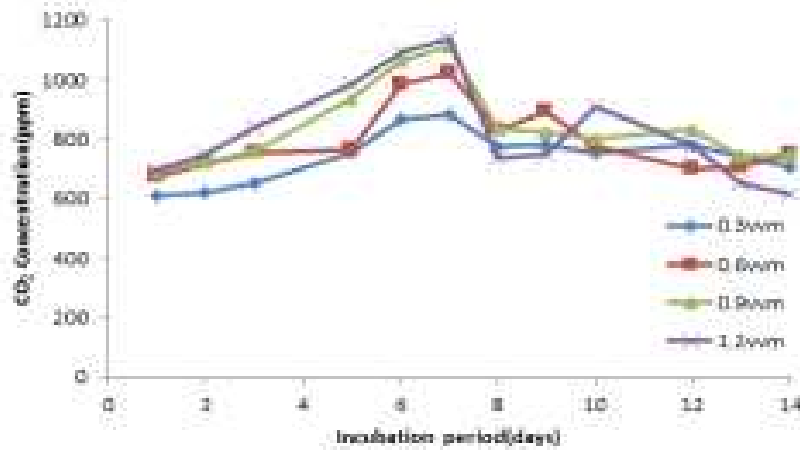


그림 1. 통기량에 따른 표고 액체종균의 CO₂ 농도 변화

대두박분 배지에 참나무분 0.3%를 첨가한 표고 액체종균을 사용하여 배양일수 경과에 따른 통기량별 이산화탄소 발생량을 조사한 결과는 그림 1과 같다. 모든 통기량 처리구에서 배양 7일째 까지 이산화탄소 농도가 증가하다가 그 이후에 감소하는 경향을 나타내었으며 통기량이 증가할수록 이산화탄소 발생량도 증가한 것으로 나타났다. Jang 등(2010)은 잣버섯 액체배양시 배양일수가 경과할수록 이산화탄소 발생량이 증가하고 6~7일경에 최고치에 도달한다고 하였는데 본 시험에서도 비슷한 경향으로 표고 액체종균의 균사생장은 배양 6~7일경에 가장 활발하게 이루어지는 것으로 판단되었다.

표 4. 통기량에 따른 표고 액체종균의 수분증발율, 균사체 입자크기, 건조 균사체량

통기량(vvm)	수분증발율(%) ^a	균사체 입자크기(mm)	건조 균사체량(g/l)
0.3	18.2±1.52	4.9±0.27	2.7±0.10
0.6	32.3±1.74	3.2±0.59	3.5±0.11
0.9	46.0±2.31	3.2±0.08	3.9±0.06
1.2	56.9±0.76	2.7±0.33	4.3±0.17

a 초기 액체종균 배지량/최종 액체종균 배지량×100

대두박분 배지에 참나무분 0.3%를 첨가한 표고 액체종균을 통기량별 배지 수분 증발량, 균사체 입자크기, 건조균사체 중량을 조사한 결과(표 4), 통기량이 많을수록 배지 수분 증발도 증가하였으며, 특히 1.2vvm 처리구는 수분 증발과정에서는 배지 고형분이 배양 용기 내부에 많이 부착되었다. 균사체 입자크기는 통기량이 증가할수록 작아지는 경향이였다. 건조 균사체량은 통기량이 높을수록 많아져 0.3vvm 처리시 2.7g이 1.2vvm 처리시에는 4.3g으로 높아졌다. Jang 등(2010)은 잣버섯 액체종균 배양 시 통기량이 낮을수록 균사체량도 감소하였는

데 이는 배양액내의 용존산소의 부족으로 인한 것으로 보고하였는데 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 0.9vvm 이상의 통기량은 배지의 수분을 과도하게 증발시켜 액체종균 배지를 크게 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 표고 액체종균의 적정 통기량으로 액체종균 배지의 손실이 적으면서 1당 균사체 생산량이 높은 0.6vvm 처리구를 선발하였다.

다. 액체종균 적정 배양기간 설정

표고 액체종균의 적정 배양기간을 구명하기 위하여 배양기간에 따른 이산화탄소 발생량과 균사체 건조량을 측정한 결과 표 5와 같다. 이산화탄소 발생량은 배양 7일째에 1,297ppm으로 최대치를 나타내다 14일째까지 1,000ppm 이상으로 유지되다 그 이후에 낮아지는 것으로 나타났다. 균사체 건조량은 7일째 급격히 증가하기 시작하여 배양 10일째 3.0g으로 최대치를 보이다가 배양 17일째 이후 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 표고 액체종균의 적정 배양일수로서 균사체 건조량이 가장 많은 10일을 선발 하였다.

표 5. 배양기간에 따른 표고 액체종균의 CO₂ 농도 변화 및 건조 균사체량

배양기간(days)	CO ₂ 농도(ppm)	건조 균사체량(g/l)
0	772	0
3	890	1.4
7	1,297	2.3
10	1,115	3.0
14	1,039	2.4
17	895	1.8
21	700	1.8

라. 액체종균 생산성 분석

표 6은 병 배양시 종균 종류별 재배특성을 나타내었다. 두 처리구 모두 배양기간과 갈변기간은 각각 34일, 171일로 나타났다. 갈변기간은 171일로 봉지 배지의 60~80일에 비해 많이 지연되었는데, 이는 병 용기 특성상 통기가 부족하여 병 하단까지 산소가 부족하여 나타난 것으로 판단된다. 초발이기간은 톱밥종균이 3일로 액체종균에 비해 1일 빠른 것으로 나타났다. 전체적으로 재배기간은 톱밥종균이 213일로 액체종균에 비해 1일 빨랐다.

표 6. 병 배양시 종균 종류별 재배특성

처리내용	배양기간(일)	갈변기간(일)	초발이기간(일)	생육기간(일)	재배기간(일)
액체종균 (2.5kg병)	34	171	4	5	214
톱밥종균 (2.5kg병)	34	171	3	5	213

표 7은 종균 종류별 자실체 수량을 나타내었다. 개체중은 액체종균이 26.9g으로 톱밥종균의 19.6g보다 높았다. 또한 자실체 특성도 액체종균이 갓 두께, 갓 직경, 대 굵기가 톱밥종균보다 약간 높은 것으로 나타났다(표 8). 1주기 수량은 톱밥종균이 333.7g으로 액체종균보다 높았지만, 3주기 수량은 반대로 액체종균이 높았다. 따라서 전체 3주기 수량은 액체종균이 511.6g, 톱밥종균이 507.0g으로 유의차 없이 나타났다.

표 7. 종균 종류별 자실체 수량

처리내용	개체수 (개)	개체중 (g)	수량(g/병)			
			1주기	2주기	3주기	합계
액체종균 (2.5kg병)	11.7	26.9	314.3	113.3	84.0	511.6 a [↓]
톱밥종균 (2.5kg병)	17.0	19.6	333.7	116.6	56.7	507.0 a

↓ DMRT at 5%

표 8. 종균 종류별 자실체 특성

처리내용	갓두께 (mm)	갓 직경 (mm)	대길이 (mm)	대굵기 (mm)	색도 [↓]		
					L	a	b
액체종균 (2.5kg병)	14.8	58.9	56.0	14.6	37.7	11.3	21.2
톱밥종균 (2.5kg병)	12.8	51.5	57.9	12.5	37.9	10.4	17.9

↓: L(명도), a(적색도), b(황색도)



액체종균 처리구



톱밥종균 처리구

그림 2. 종균 종류별 자실체 생육특성

4. 적 요

표고버섯 병재배를 위한 액체종균 제조기술 개발 연구 결과는 다음과 같다.

- 가. 표고 재배용 액체종균 배지조성은 대두박분 배지에 입도가 850 μm 이하의 참나무분 0.3% 첨가시 균사체 건조량이 457mg으로 높고, CMC Agar Plate에서의 cellulase활성이 26.4mm로 높았다.
- 나. 액체종균 배양시 통기량이 높을수록 CO₂ 발생량도 증가하고 건조 균사체량도 증가하는 경향으로, 액체종균 배지의 소모가 낮으면서 건조 균사체량도 양호한 0.6vvm처리구를 선발하였다.
- 다. 액체종균 배양기간중 CO₂ 발생량은 7일째 최대치를 나타내다 감소하는 경향으로, 균사체 함량은 10일째에 건조량이 3.0g/l로 가장 높았다.
- 라. 선발된 액체종균을 톱밥 종균과 생산성 비교를 위하여 병 용기에서 2.5kg 톱밥재배를 실시한 결과, 액체종균의 생육기간이 톱밥종균에 비해 1일 지연되었으나, 봉지당 유효 개체수와 수량에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

5. 인용문헌

2017 임업통계연보, 산림청

2017 농식품수출정보(KATI), 버섯의 종균

Hong SJ, Lee WH, Shin BS, Sung JM. 2003. Production of *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* using liquid spawn inoculation system. Kor. J. Mycol. 31:22-27.

Jang MJ, Lee YH, Ju YC, Koo HM. 2010. Cultural characteristics by sawdust and liquid spawn for the cultivation of *Neolentinus lepideus*. Kor. J. Mycol. 38:125-129.

Joen SM, Ka KH. 2014. Mycelial growth and extracellular enzyme activities of wood-decaying mushroom strains on solid media. Kor. J. Mycol. 42:40-49.

Kawai G, Kobayashi H, Fukushima Y, Ohsaki K. 1996. Effect of liquid mycelial culture used as a spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). Mycosci. 37:201-207.

Lee BH, Bak WC, Yoon KH. 2006. Comparison of shiitake productivity in sawdust media according to the use of sawdust, plug-shaped and liquid spawn. Kor. J. Mycol. 34:79-83.

Shim KK, Yoo YJ, Koo CD, Kim MK. 2014. Changes of nutrients in media and mycelia on liquid spawn culture of *Lentinula edodes*. Kor. J. Mycol. 42:144-149.

6. 연구결과 활용제목

○ 표고 액체종균 배지조성 및 배양조건(영능활용, 2017)

7. 연구원 편성표

세부과제	구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도
						'17~'18
표고버섯 병배양에 적합한 액체종균 제조 기술 개발	책임자	농업기술원 버섯연구소	농업연구사	김정한	시험수행	'17~'18
	공동연구자	"	"	백일선	생육조사	"
		"	"	신복음	성분분석	'18
		"	"	이윤희	성적검토	"
		"	농업연구관	이용선	자료정리	'17~'18
"	"	"	이영순	시험자문	'18	