

버들송이(*Agrocybe cylindracea*)의 액체종균 배양조건과 접종량

정종천* · 홍인표 · 장갑열 · 박정식

농업과학기술원 응용미생물과

Culture Condition and Inoculum Volume of Liquid Spawn on the Bottled Cultivation of *Agrocybe cylindracea*

Jong-Chun Cheong*, In-Pyo Hong, Kab-Yeul Jang and Jeong-Sik Park

Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-707, Korea

(Received July 8, 2003)

ABSTRACT: In order to shorten cultivation periods of *Agrocybe cylindracea*, liquid spawn was used in place of sawdust spawn. Optimum culture condition of liquid spawn was PSB (potato extract sugar broth) medium, 25°C temperature and pH 7.0. And, optimum inoculum volume was 10~15 ml. Two grams per liter of dry weight of the fungal mycelia were obtained with 10 l of culture bottle with liquid spawn after 10 days. In 850 ml-bottle of sawdust media, cultivation period using liquid spawn (30 days) was five days shorter compared with the cultivation period in sawdust spawn (35 days). Also, complete growth of sawdust media was increased to 92% (liquid spawn) from 75% (sawdust spawn) and yield of fruiting bodies was increased to about 10%.

KEYWORDS: *Agrocybe cylindracea*, Culture condition, Liquid spawn

버들송이는 주름버섯목(Agricales), 소풍버섯과(Bolbitiaceae), 벗꽃버섯屬(*Agrocybe*)에 속하며, 활엽수의 고사목이나 그루터기에 다발지어 발생하는 사물기생균이다. 버섯 갓의 색깔은 어릴 때는 암갈색, 성숙하면 연노랑 또는 연갈색을 띤다(今關 & 本郷, 1958; Singer, 1949). 이 버섯의 학명은 *Agrocybe cylindracea*(DC. ex Fr.) Maire로 통용되고 있으나(今關 등, 1997; 이, 1988), 일부 학자들은 *Agrocybe aegerita*(Brig.) Singer{Syn. *Pholiota aegerita*} (1949, 1951)로 명명한 바 있다.

이 버섯은 한국, 日本, 北美, 유럽, 아프리카 등지에서 자생하고(今關, 1958), 우리 나라에서는 1987년 경기도 광릉에서 이 버섯을 채집하여 처음으로 분류동정 되었다(이, 1988). 1988년에는 이 균을 소나무톱밥에 밀기울을 첨가한 톱밥배지 병재배법으로 인공재배법을 개발하여, 1989년에 농가실증시험을 통하여 이 병재배법이 보급되었다(김 등, 1988, 1989).

이 버섯은 다른 버섯에 비하여 섬유질이 많아 씹으면 단맛이 있고 아삭아삭하여 독특한 촉감과 향이 있어 대중의 기호에 맞아 연중생산이 가능한 병재배 시설을 이용하여 확대재배하기에 유망한 버섯이다. 그러나 이 버섯은 균배양기간이 길고 종균 저장력도 약하며, 배양중에 잡균 오염율이 높아 농가에서 널리 재배되지 못하고 있는 실정

이다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 본 연구에서는 버들송이 액체종균 배양 및 이용에 관한 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 시험에 사용한 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에 보존하고 있는 버들송이 1호(*Agrocybe cylindracea*; ASI 19003)균을 사용하였다. 원균은 미리 준비된 PDA (potato dextrose agar) 사면배지에 이식하여 25°C에서 15일간 배양한 후 4±1°C의 냉장실에 보관하면서 사용하였다.

공시배지

본 시험에 사용한 기본배지는 감자추출배지로써 물 10 l당 껍질을 제거한 생감자 1 kg을 잘게 썰어 넣고 열수추출하여 가는 망사에 걸러서 설탕 200 g을 첨가한 후 거품방지제로 안티폼(Sigma Co., A-5551) 1 ml를 넣었다.

배지종류

액체종균 배양용 배지재료로써 감자추출배지(PSB)와 버들송이 병재배용 톱밥배지의 열수추출물(SMB)을 비교하였다. 감자추출배지는 감자 1 kg의 열수추출물 10 l에 설탕 200 g을 첨가하였고, 톱밥배지추출물은 버들송이 병

*Corresponding author <E-mail: jccheong@rda.go.kr>

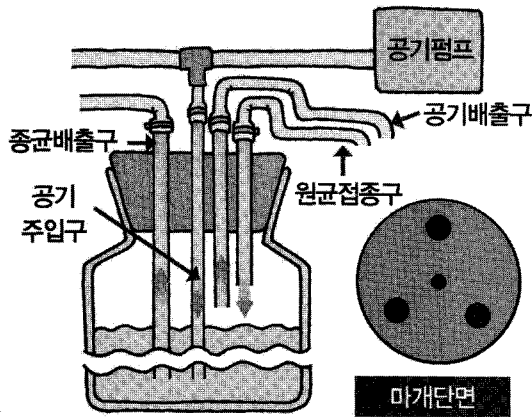


Fig. 1. Construction of the liquid culture apparatus of *Agrocybe cylindracea*.

재배용 톱밥배지를 건조중으로 300, 600, 900 g씩 물 10 l에 열수추출하여 살균 후 액체접종원을 주입하고 25°C에서 10일간 배양한 후 TOYO No. 6 여과지로 걸러서 건조균체량을 측정하였다.

액체배지의 살균은 10 l의 경우 살균기내의 온도 121°C, 압력 1.2 kg/cm²에서 60분간을 유지하였다. 접종원 증식 방법은 원균을 PDA 평판배지에 증식한 후 PDB(potato dextrose broth)배지를 100 ml씩 분주한 250 ml들이 삼각 플라스크에 직경이 5 mm인 코크보러를 사용하여 균사절편 1개씩을 접종하고 25°C에서 정치배양하면서 15일째에 사용하였다.

배지 pH 및 배양온도

액체배지의 산도는 1 N-HCl과 1 N-NaOH를 이용하여 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 조절하여 살균하고 배양후의 배지 pH, 균체량, Pellet size를 조사하였다.

배양 온도는 22, 25, 28°C로 설정하여 10일간의 균사생장량을 조사하였다. 배지산도와 배양온도 실험을 위한 배양병은 500 ml 용기에 감자추출배지 400 ml를 담아 30분간 살균하였다.

배양기간별 균체량 변화

액체종균의 배양기간을 4, 8, 12, 16일로 하여 경시적 균사생장량과 배양여액의 pH, T-C, T-N을 조사하였다. 이때 배양병 500 ml 용기에 배지산도를 조정하지 않은 감자추출배지(pH 6.3) 400 ml를 담아 30분간 살균하고 접종원을 1% 넣은 후 25°C에 배양하였다.

액체종균의 접종효과

미송톱밥에 밀기울 30%(v/v)를 첨가하여 수분을 65%로 조절한 톱밥배지 병(850 ml)당 액체종균을 5, 10, 15, 20, 30 ml씩 접종하여 20±1°C로 조정된 배양실에 넣고 배양완성기간을 조사하였다. 배양이 완료된 PP병은 자동

균급기 기계로 균급기를 실시하여 농촌진흥청 표준재배법(김 등, 1989)에 준하여 발아와 생육을 유도한 후 액체종균 접종량에 따른 자실체 수량을 조사하였다.

결과 및 고찰

액체배지 재료

액체종균 배양용 배지로써 감자추출배지와 버들송이 재배용 톱밥배지의 열수추출물을 이용하여 배양한 균사체의 건조중을 비교한 결과, 감자 1 kg의 열수추출물 10 l에 설탕 200 g을 첨가하여 25°C에서 10일간 배양시 17.4 g이었고, 버들송이 병재배용 톱밥배지를 건조중으로 300, 600, 900 g씩 물 10 l에 열수추출한 액체배지에서는 각각 8.9, 15.7, 15.5 g였다(Table 1). 톱밥배지 600 g과 900 g 추출구는 감자추출배지에 비하여 5% 수준에서 유의차는 없었으나 추출배지가 불투명하여 배양중의 오염 여부를 판단하기가 어려워서 이후의 실험에는 감자추출배지를 이용하였다.

배지산도

액체배양시에는 균생장에 따른 분비효소 등에 의하여 배지내의 산도 변화가 민감할 것으로 생각되어 추출배지는 1 N-HCl과 1 N-NaOH를 사용하여 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 각각 조절하여 살균하고 균배양후의 배지 pH와 균사체 건조중 및 균사체 Pellet의 크기를 조사하였다(Table 2). 버들송이의 액체종균 배양시 최적배지 산도

Table 1. Mycelial growth of *Agrocybe cylindracea* on liquid culture media with extracted materials

	Materials (kg/10 l)			
	Potato ^a 1.0	SM ^b 0.3	SM 0.6	SM 0.9
Dry weight of mycelia (g/10 l/10 days)	17.4 a ^c	8.9 b	15.7 a	15.5 a

^aaddition to sugar 200 g.

^bSM : Sawdust media for cultivation of *Agrocybe cylindracea* (dry-wt.); pine sawdust 70%, wheat bran 30% (v/v).

^cDifferent letters represent significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test.

Table 2. Mycelial growth of *Agrocybe cylindracea* on potato extract media at different pH

Initial pH	Final pH	Dry weight of mycelia (mg/400 ml/7 days)	Pellet size (mm)
4.0	4.9	30 d ^a	-
5.0	6.4	59 d	1.46
6.0	7.5	309 c	1.45
7.0	7.6	446 a	1.47
8.0	7.5	382 b	1.85

^aDifferent letters represent significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test.

Table 3. Mycelial growth of *Agrocybe cylindracea* on potato extract media at different temperatures

Temperature (°C)	Dry weight of mycelia (g/10 l) ^a
22	11.5
25	21.8
28	20.2

^aMeasurement was made 10 days after inoculation.

는 7.0이었으며 이때의 균사체 건조중은 446 mg/400 ml/7 일로 가장 많았으며 배양후의 배지 산도는 7.5 정도였다. 김 등(1989)은 Glucose peptone 액체배지에 McIlvaine buffur solution을 첨가하여 배지 산도를 조절하고 정치배양 하였을 때 버들송이의 균사생장에 알맞은 pH는 4.0이었다고 하였고, 박 등(1987)은 Potato dextrose 액체배지에서 pH 6.0이라고 하였는데 본 시험의 결과는 달라서 이후 충분한 검토가 필요하다고 본다.

배양온도

여과된 공기를 이용하여 배양액과 균사체를 교반하여 주는 액체종균 배양에서 버들송이의 배양적온에 관한 실험 결과, 배양실의 온도가 25°C일 때 10 l 배양병에서 10 일간 배양한 균사체의 건물중은 21.8 g으로 가장 많았다 (Table 3). 김 등(1989)과 박 등(1987)은 PDA 평면배양에서 버들송이의 최적배양온도는 25°C라고 하였다. 그리고 北本(1991)과 中村(1999)는 팽이버섯의 평면배양시 배양적온은 22~24°C이나 대량 병재배에 있어서는 균 배양시 균사생장에 따라 호흡열이 발생하는데 톱밥배지의 양과 병의 구조, 배양실의 밀폐도 등에 의하여 호흡열의 방출이 제한을 받으므로 이를 감안하여 배양실의 실내온도를 배양최적온도보다 6~8°C 낮게 유지해야 한다고 하였다. 이에 비하여 액체종균 배양시는 공기의 흐름에 의하여 호흡열의 방출이 잘 이루어지므로 균사생장 최적온도에서 균을 배양함으로써 균 배양기간을 단축할 수 있을 뿐만 아니라 종균의 활력도 높게 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

배양기간별 균체량 변화

삼각플라스크 100 ml의 PDB 배지에 15일간 배양한 공시균의 접종원을 10 l들이 액체종균용 배양병의 감자추출 배지에 1%로 접종하여 25±1°C로 조정된 배양실에 두고 경시적 배양기간에 따른 균체량과 배양후 여과액의 pH 및 전탄소, 전질소량을 측정된 결과, 배양 12일째까지는 균생장량이 급속하게 증가하고 기간이 경과함에 따라 배지의 pH는 상승하였으며 전탄소와 전질소의 양은 계속 감소하였다(Table 4). 12일 이후에는 균생장량의 증가폭이 둔화되고 pH는 오히려 낮아지는 경향이었으며 전질소량은 유효숫자 범위 내에서 변동이 없었다. 버들송이 액체종균의 최적 사용시기는 1일 균체건조중의 증가량이 최

Table 4. Mycelial growth of *Agrocybe cylindracea* and change of total carbon and nitrogen in potato extract medium during liquid culture period

^a Culture day	Final pH	T-C ^b (%)	T-N ^c (%)	Dry weight of mycelia (g/10 l)
0	6.3	1.57	0.09	-
4	6.5	1.47	0.07	0.4
8	7.0	1.32	0.05	10.4
12	7.8	1.30	0.04	21.6
16	7.4	1.28	0.04	22.2

^aCulture condition : 25°C, pH 6.3 (initial pH).

^bTotal carbon content.

^cTotal nitrogen content.

대이고 배양여액의 성분변화가 적어지는 때인 8~12일이 균의 활력이 높아 좋을 것으로 본다.

액체종균의 접종량

버섯 병재배 시설에서 액체종균을 활용한 버들송이의 연중 생산을 위한 기초자료로 활용하기 위하여 감자추출 배지 10 l에 10일간 배양한 액체종균의 접종량을 850 ml들이 PP병의 톱밥배지에 5, 10, 15, 20, 30 ml씩 주입하고 균배양 완성기간과 버섯 발생병비율 및 자실체 수량을 비교하였다. 균배양 완성기간은 액체종균 20 ml 접종시 27일으로써 톱밥종균의 35일보다 8일이 빨랐으나 버섯 발생을 및 자실체 수량은 톱밥종균의 75%와 111 g/850 ml임에 비하여 액체종균 10 ml 접종시 92%와 122 g으로 가장 높았고, 이 때의 균배양기간은 30일으로써 톱밥종균보다 5일이 빨랐다(Table 5). 또한 5 ml 접종시는 균배양 기간이 35일로 톱밥종균의 경우와 같았으며 자실체 수량은 오히려 낮았다. 액체종균을 톱밥배지에 접종하였을 때 균배양 완성기간이 단축되는 것은, 톱밥종균의 경우 PP병의 내부 공간을 접종한 종균이 매우므로 병내의 기상(氣相) 조건이 좋지 않음에 비하여, 액체종균 접종시는 병내의 공간이 입병후 타공된 상태로 남아 있으므로 호흡열의 방냉효

Table 5. Yield of fruit body of *Agrocybe cylindracea* by inoculation amounts of liquid spawn

Inoculation amount (ml/850 ml)	Incubation period (day)	Formation of fruit body (%)	Yield of fruit body (g/850 ml)
5	35	85	108 b ^b
10	30	92	122 a
15	28	90	121 a
20	27	88	109 b
30	30	85	109 b
Control ^a	35	75	111 b

^aSawdust spawn (10 g/850 ml).

^bDifferent letters represent significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test.

과가 좋고 미세기상이 버섯균의 생장에 유리한 조건에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 安川(1982)은 고압살균시 톱밥배지의 표면은 수분이 2~4% 증발한다고 하였는데 적당한 양의 액체종균 주입은 배지표면의 수분을 보충해 주는 효과도 있으나 850 ml PP병당 20 ml 이상 너무 많은 양을 주입하면 배지 표층 및 병 하단의 과습에 의한 통기성 불량으로 배양 후기의 균 생육지연 또는 노화의 원인이 될 것으로 사료된다.

적 요

버들송이의 액체종균 제조를 위한 배양조건과 종균으로 사용시의 접종량을 검토하기 위한 시험 결과 배지 종류로는 감자추출배지(PSB)가 가장 좋았으며 온도는 25°C, pH는 7.0에서 좋았다. 접종량별로는 10~15 ml 접종한 것이 우수하였다. 버들송이의 액체종균은 13 l들의 간이배양장치를 제작하여 감자추출배지 10 l에 10일간 배양후 균체건조량 21.8 g을 얻었다. 이를 병재배용 850 ml PP병의 톱밥배지에 10 ml(균체량 21.8 mg상당)씩 접종한 결과 배지 배양기간은 30일로써 톱밥종균을 사용할 때 보다 5일이 단축되었다. 또한 버섯발생병은 톱밥종균을 사용할 때의 75%에 비하여 92%로 높아졌고 자실체 수량도 122 g으로 톱밥종균보다 10% 증수되었다. 따라서 본 액체종균 배양기술은 버섯 병재배 시설을 활용한 버들송이의 연중

재배에 도입함으로써 안정된 버섯생산으로 농가소득 증대에 기여할 것으로 본다.

참고문헌

- 今關六也, 本郷次雄. 1958. 原色日本菌類圖鑑(I). p 58. 保育社. 大阪.
- 今關六也, 大吉雄, 本郷次雄. 1997. 日本のきのこ. p 218. 山と溪谷社. 東京.
- 김한경, 박정식, 김양섭, 차동열, 박용환. 1988. 버들송이(*A. aegerita*) 균사생장 조건에 관한 연구. 농사시험연구논문집 30(3): 41-50.
- 김한경, 박정식, 김양섭, 차동열, 박용환. 1989. 소나무 톱밥을 이용한 버들송이 인공재배에 관한 연구. 한국균학회지 17(3): 124-131.
- 박찬준, 김교수, 전계상. 1987. 버들송이의 인공재배에 관한 연구. 임업연구연보 35: 104-107.
- 北本豊. 1991. えのきたけ その總合生産技術. 「きのこの基礎科學と最新技術」 pp. 221-229. 農村文化社.
- 安川仁次郎. 1982. エノキダケ-どこでもできるビン栽培. p 100. 農山漁村文化協會. 東京.
- 이지열. 1988. 「원색한국버섯도감」 p 137. 아카데미서적. 서울.
- 정종천, 김한경, 김광포. 1997. 느타리버섯 액체종균 제조 및 이용기술 개발. '97시험연구사업보고서(생물자원부편): 1007-1011.
- 中村公義. 1999. きのこ栽培の最新技術-えのきたけ. 「200年版きのこの年鑑」 pp 161-166. 農村文化社.
- Singer, R. 1949, 1951. The Agaricales in modern taxonomy. *Lil- loa* 22: 493.