

## 擔子菌을 利用한 醱酵 飼料에 관한 研究

洪載植 · 金中晩\* · 鄭鎮澈\*\* · 李泰圭\*\*\* · 金東翰 · 金明坤 · 李克魯  
全北大學校 食品加工學科, 圓光大學校 農化學科\* 및 林學科,\*\* 又石大學 食品營養學科\*\*\*

## Conversion of Fermented Feed by Basidiomycetes

Jae Sik Hong, Joong Man Kim,\* Jin Chul Jeong,\*\* Tae Kyu Lee,\*\*\*  
Dong Han Kim, Myung Kon Kim and Keug Ro Lee

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju 520  
Department of Agricultural Chemistry, Won Kwang University,\* I-Ri 510  
Department of Forestry, Won Kwang University,\*\* I-Ri 510, and  
Department of Food and Nutrition, College of Woo-Soug,\*\*\* Chonju 520, Korea

**Abstract:** To investigate nutritive values of a feed fermented with basidiomycetes, among the isolated strains, *Lyophyllum decastes* (Fr.) Sing. was found with the greatest enzyme productivity and rapid mycelial growth in rice straw medium. Optimum temperature, pH and moisture content for mycelial growth and enzyme production of the strain were 25~30°C, pH 4.0~7.0 and 70~75%, respectively. Fifteen days of culture were required for the highest enzyme productivity. Among the sub-materials added, 30~40% of rice bran and 10~20% of defatted perilla seeds were effective for the enzyme production, but caused a reduced mycelial growth. The greatest effect of an addition of inorganic salts was obtained with 0.36~0.72% of  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . When 40 mesh or smaller rice straw and steam treatment at 0.5 kg/cm<sup>2</sup> were used, the mycelial growth decreased, whereas the enzyme production increased. The mycelial growth and enzyme production increased when  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  was used as the alkali treatment, but decreased with increasing concentration of NaOH. As the fermentation proceeded, the amounts of ash, reducing sugar and total nitrogen increased, but cellulose, lignin and pentosan decreased. When the rice straw was treated with alkali, the amounts of ash, total nitrogen and lignin decreased, but reducing sugar and cellulose increased. At higher NaOH concentration, the variation become greater. The *in vitro* dry matter digestibility of the products increased from 55.03% at the beginning of the fermentation to 62.72% at 45 days after fermentation. The most effective alkali treatment on the digestibility of rice straw was KOH followed by NaOH. However, the digestibility increased with increasing concentration of NaOH. The digestibility of pretreated with alkali increased after fermentation as well.

**Keywords:** *Lyophyllum decastes*, Fermented feed, Dry matter digestibility, Protease, CMCase Xylanase.

현재 우리나라는 動物性 蛋白質 食品의 부족을 극복하기 위하여 畜産 振興에 힘쓰고 있으며 畜産 振興의 선결문제로 飼料의 자급자족이 시급한 실정이나 耕地 面積이 한정된 우리의 처지로는 飼料 作物의 栽培, 利

用만으로는 畜産業의 효율적인 발전을 기할 수 없으며 주위에 산재해 있는 纖維質 資源의 적극적인 활용이 바람직하다. 이런 의미에서 農家에서 매년 750만톤(姜, 1979) 이상 生産되는 芻草의 效果의인 利用이 중요한

이 研究는 韓國學術振興財團의 支援을 받아 遂行되었음.

문제로 대두되고 있으나 벚짚은 蛋白質이 낮고 lignin 및 silica 함량이 높아 消化率 및 嗜好성이 낮다(孟 등, 1979).

이러한 纖維質 資源의 飼料價値를 개선하기 위하여 物理化學的인 處理(Millett 등, 1970; Mandels 등, 1974; 孟, 1976, 1979a; Detroy 등, 1980; Fan 등, 1982; Playne, 1984)나 農産 副産物의 添加(姜, 1981) 및 곰팡이를 이용한 醱酵飼料(金 등, 1977; 金, 1983) 나 벚짚-鷄糞 싸일레지(Lee 등, 1980)를 製造한 바 있다. Peitersen(1975)은 *Trichoderma viride*를 이용하여 보리짚에서 Cellulase와 蛋白質을 生産한 바 있는 擔子菌을 이용하여 消化에 영향을 주는 lignin의 分解(Kirk, 1973; Eslyn 등, 1975; Milstein 등, 1983)에 대해서도 보고한 바 있으며 李 등(1982)은 느타리 버섯을 이용한 醱酵飼料 製造로 생벚짚에 비하여 粗蛋白質이 40% 증가하였고 嗜好성이나 增體量도 우수하였다고 발표하였으며 Hartley 등(1974)과 Reade 등(1983)도 white rot-fungi를 이용하여 *in vitro* 消化率 이 증가하였다고 보고한 바 있다.

이 實驗에서는 *Lyophyllum decastes*를 이용한 醱酵飼料 製造時 菌生育 및 酵素 生成 條件과 벚짚을 알칼리 處理하여 醱酵 飼料를 제조하고 處理 前 및 後의 化學成分의 變化和 *in vitro* 消化率을 조사하여 飼料의 價値에 미치는 영향을 규명하고자 이 研究를 수행하였다.

### 材料 및 方法

#### 使用 菌株

全北大學校 農大 醱酵微生物學研究室에서 보존중이거나 全北道 일원과 지리산 일대의 山野에서 分離, 同定하여 보관한 菌株를 供試 菌株로 使用하였다.

#### 벚짚의 처리

아기바레 벚짚을 2~2.5 cm로 절단한 후 cutting mill로 20 mesh 이상, 20~40 mesh, 40 mesh이하로 粉碎하였으며 알칼리 處理는 40 mesh 이하로 粉碎한 試料를 0, 4, 8, 12%의 NaOH溶液과 8%의 Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH, NH<sub>4</sub>OH 溶液을 벚짚에 대해 8배 가한후 100°C에서 1시간 處理하였다.

#### 使用 培地

1) 合成培地: Table I 과 같이 조제하여 사용하였다.

2) 벚짚培地

벚짚을 2~2.5 cm 크기로 잘라 米糠濃度 比較 實驗을 제외하고는 米糠을 10% 되게 가하고 水分含量은 水

Table I. Composition of synthetic medium.

Cellulose	10 g
Proteose peptone	1 g
Urea	0.3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.3 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.4 g
FeSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.6 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.4 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4 mg
pH	6.0
Distilled water	11

分 比較 實驗區를 제외하고는 70%되게 조정하였으며 培地의 pH는 pH 比較 實驗區를 제외하고는 pH 6.0으로 조정한 후 500 ml용 廣口培養瓶에 200 g씩 넣고 1.2 kg/cm<sup>2</sup> 壓力에서 1시간 殺菌하였다.

#### 培養 方法

##### 1) 1次 菌株 選定 過程

PDA 培地를 직경 9 cm 사래에 20 ml씩 분주하여 사래 중앙에 7일간 前培養한 菌絲를 cork borer를 사용하여 일정한 크기로 接種하고 25°C에서 7일간 培養하여 生育環의 直徑과 菌絲 密度를 측정하였고 纖維素 分解力은 Table I의 培地를 250 ml Δ-flask에 50 ml씩 분주하여 일정량의 菌絲片을 接種한 후 7일간 振盪(100 rpm) 培養하고 培養 濾液을 酵素液으로 사용하여 濾紙崩壞力과 CMC 液化力을 측정하였다.

##### 2) 벚짚 培地에서의 培養

벚짚 培地에 일정량의 種菌을 배양병 상면 중앙에 接種하고 25°C에서 培養하면서 15일 후 菌生育 速度를 측정하고 培養期間 比較 實驗을 제외하고는 20일간 培養하였다.

#### 酵素液 調製

培養이 끝난 培養物을 乾物로 전환하여 10배량의 蒸溜水를 가한 후 Waring blender로 磨碎하여 냉장고에서 하룻밤 방치한 후 濾過하고 6,000 rpm에서 20분간 遠心分離하여 上澄液을 粗酵素液으로 사용하였다.

#### 酵素의 活性度 測定

##### 1) 濾過紙 崩壞法(裴 등, 1976)

L형 시험관에 0.1 M acetate buffer(pH 5.0) 5 ml와 酵素液 1 ml를 각각 넣고 whatman(No.1) 濾紙片(10

×60 mm) 2장을 넣어 가볍게 고무마개를 한후 40°C의 Monod 恒溫振盪水槽(60 rpm)에서 振盪하면서 濾紙의 崩壞하는 시간(분)을 측정하여 活性으로 표시하였다.

2) CMC 液化力(裴 등, 1976)

0.1 M acetate buffer(pH 5)에 4% CMC溶液을 만들어 내경 12.5 mm인 시험관에 10 ml씩 넣고 수직으로 세워 基質層을 만들고 그 위에 0.5 ml의 粗酵素液을 넣어 40°C 恒溫水槽에서 24시간 定置, 反應시켜 深化層의 길이를 mm로 표시하였다.

3) CMC 糖化力(Berghem 등, 1976)

0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.0)에 溶解시킨 1% CMC 溶液 2ml를 가하고 40°C 水槽에서 60분간 反應시킨 후 遊離되는 還元糖을 DNS法(Miller 등, 1960)으로 比色(파장 575 nm) 定量하고 酵素液 1ml로 生成된 還元糖(glucose)의 μM로 cellulase 糖化 活性의 比較單位로 하였다.

4) Xylanase의 活性(Matsuo 등, 1984)

Xylan을 0.5 N NaOH로 溶解한 후 糖量의 HCl로 中和하여 만든 0.5% xylan 溶液 2ml에 0.2 M acetate buffer(pH4.5) 1ml와 酵素液 1ml를 가하여 45°C의 水槽에서 30분간 反應시킨 후 DNS 法으로 還元糖을 定量하고 酵素液 1ml로 生成된 還元糖(xylose)의 μM로 酵素活性의 比較單位로 하였다.

5) Protease의 活性

Anson-荻原法(荻原, 1956)에 準했다. 즉, 2% casein 溶液(pH 7.0)에 粗酵素液 1ml를 가하여 45°C에서 10분간 反應시킨 후 0.1 M TCA溶液 5ml를 가하여 反應을 정지시키고 濾液에 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>液과 Folin 試藥을 가해 比色(660 nm) 定量하여 酵素液 1ml로 生成하는 tyrosine의 μM로 酵素活性의 比較單位로 하였다.

化學 分析

灰分, 總窒素는 AOAC法 (1980)으로 측정하였고 alcohol-benzene extract, 纖維素, pentosan, lignin은 JIS法(右田 등, 1968)으로, 還元糖은 lignin 定量時 濾液을 이용하여 Somogyi 變법으로 측정하였다.

In vitro dry matter 消化率

Rumen buffer 溶液은 Table II와 같다.

Table II의 rumen buffer를 사용직전에 5배로 희석하고 여기에 30분동안 CO<sub>2</sub>를 가하였다. in vitro dry matter 消化率은 Tilley와 Terry(1963)의 方法을 개량하여 50 ml 遠心分離 시험관에 試料 250 mg과 25 ml의 rumen buffer溶液과 소의 제 1위에서 채취한 내용물을 4겹의 cheese cloth로 걸른 것을 rumen inoculum으로

Table II. Rumen buffer solution.

NaHCO <sub>3</sub>	49.0	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhydrous	18.5	g
NaCl	2.35	g
KCl	2.85	g
CaCl <sub>2</sub> anhydrous	0.20	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.30	g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.063	g
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.006	g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05	g
Distilled water	1l	

5 ml 가한 후 10초 동안 CO<sub>2</sub>를 시험관 상부에 가하고 즉시 rubber policeman을 부착한 rubber stopper로 막았다(孟, 1976). 하루에 3번 흔들어 주면서 39°C의 water bath에서 48시간 培養하여 培養이 끝난 후 遠心分離機에서 3,000 rpm으로 15분동안 3번 蒸溜수로 씻은 후 80°C oven에서 24시간 乾燥시켜 다음과 같이 消化率을 구하였다.

Dry matter digestibility

$$= \frac{\text{Sample DM} - (\text{residue DM} - \text{blank DM})}{\text{Sample DM}} \times 100$$

結果 및 考察

菌株의 분리 및 選定

사리에 PDA培地를 분주하여 分離菌株를 중앙에 接種하고 7일간 培養하여 生育環의 직경과 菌絲密度를 측정하고 Table I의 培地에서 7일간 振盪培養하여 얻은 酵素液의 濾紙崩壞活性과 CMC 液化力을 측정한 結果는 Table III과 같다.

Table III과 같이 *P. sajor-caju*, *P. ostreatus*, *L. decastes*, *E. applanata*-1,2, *T. trogii* 등이 菌生育速度는 빨랐고 菌絲密度도 짙었으며 濾紙崩壞 時間은 *L. decastes*, *T. trogii*, *P. chrysosporium*, *E. applanata*-1,2, *P. sajor-caju*, *H. erinaceum* 등이 빨랐고 CMC 液化力도 *L. decastes*, *P. chrysosporium*, *T. trogii*, *I. lacteus*, *E. applanata*-1,2 등에서 우수하여 菌生育速度와 cellulase 活性을 고려하여 食用擔子菌中에서 *P. sajor-caju*, *H. erinaceum*, *L. decastes* 3菌株를 목재부후균중에서 *T. trogii*, *P. chrysosporium* 2菌株를 選別하였다.

이들 選別菌株를 變질培地에서 15일간 培養하여 菌

Table III. Mycelial growth rate and cellulase activities of basidiomycetes at the first selection.

Strains	Mycelial growth rate(mm)	Mycelial density*	Filter paper degradation (min)	CMC liquefaction (mm)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	90	S C	180	13
<i>Pleurotus ostreatus-1</i>	80	S T	220	9
<i>Pleurotus ostreatus-2</i>	88	S T	240	10
<i>Lyophyllum decastes</i>	82	C	130	18
<i>Hericium erinaceum</i>	71	S T	180	12
<i>Lentinus edodes-1</i>	65	S T	200	11
<i>Lentinus edodes-2</i>	70	T	210	10
<i>Amanita rubescens</i>	72	S T	250	10
<i>Grifola frondosa</i>	55	T	190	12
<i>Armillariella mellea</i>	40	T	250	5
<i>Flammulina velutipes</i>	75	T	240	8
<i>Elfvigia applanata-1</i>	90	C	180	16
<i>Elfvigia applanata-2</i>	86	S C	170	16
<i>Irpeex lacteus</i>	89	S T	160	17
<i>Trametes trogii</i>	90	C	130	17
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	90	T	140	18

\* T: thin, S T: somewhat thin, S C: somewhat compact, C: compact

Table IV. Mycelial growth rate and enzyme activities of basidiomycetes at the second selection.

Strains	Mycelial growth rate(mm)	CMCase	Xylanase	Protease
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	140	7.86	9.42	0.73
<i>Lyophyllum decastes</i>	135	19.27	7.68	1.82
<i>Hericium erinaceum</i>	80	8.58	5.24	2.00
<i>Trametes trogii</i>	145	19.15	6.05	0.99
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	125	18.53	8.05	1.88

生育速度를 측정하고 20일 培養後 CMCase, xylanase 및 protease 生産力을 檢討한 結果 Table IV와 같이 菌生育速度는 *T. trogii*, *P. sajor-caju*, *L. decastes*, 가 빨랐고 CMCase는 *L. decastes*, *T. Trogii*, *P. chrysosporium* 순 이었고 xylanase는 *P. sajor-caju*, *P. chrysosporium*, *L. decastes* 순이였으며 protease 는 *H. erinaceum*, *P. chrysosporium*, *L. decastes* 순 으로 酵素活性이 높아 菌生育速度나 이들 酵素活性에서 대체적으로 우수하며 식용버섯인 *L. decastes*를 醱酵飼料 製造用 菌株로 選定하였다.

培養條件의 影響

培養溫度를 15~35°C로 달리하여 培養하며 菌生育과 酵素生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 1과 같

이 菌生育은 25°C에서 제일 우수하였고 35°C에서는 매우 빈약하였으나 CMCase와 xylanase는 30°C에서 제일 우수했고 菌生育이 매우 빈약했던 35°C에서 다음으로 높아 菌生育과는 대조적이었으며 protease는 15°C에서 酵素生産이 제일 높고 培養溫度가 상승할수록 酵素生産은 減少하여 洪 등 (1981)의 *P. ostreatus*과 *L. edodes*의 버섯 培養時 25°C에서 제일 生育이 왕성했던 경우와 유사하나 protease의 生産適溫이 25°C였던 報告와는 差異가 있었다.

버섯 培地の pH에 의한 影響은 Fig. 2와 같이 菌生育은 pH 7.0에서 제일 우수하였고 이 범위를 벗어나면 점차 減少하였으며 酵素生産은 세 酵素 모두 pH 6.0에서 제일 良好하였고 그 다음으로 CMCase와 protease

는 pH 7.0, xylanase는 pH 5.0 순이어서 대체적으로 pH 6.0~7.0 범위에서 培養하는 것이 좋았다.

培地의 水分含量에 의한 影響은 Fig. 3과 같이 菌生育은 水分量이 增加함에 따라 增加하여 75%에서 제일 좋았고 80%에서는 오히려 減少하였으며 CMCase

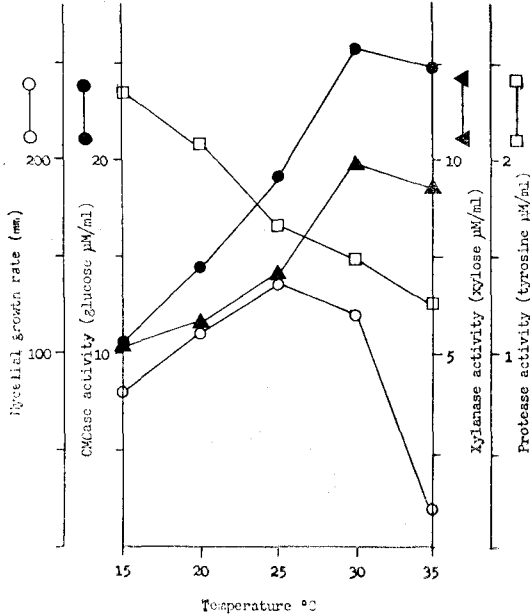


Fig. 1. Effect of cultural temperature on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

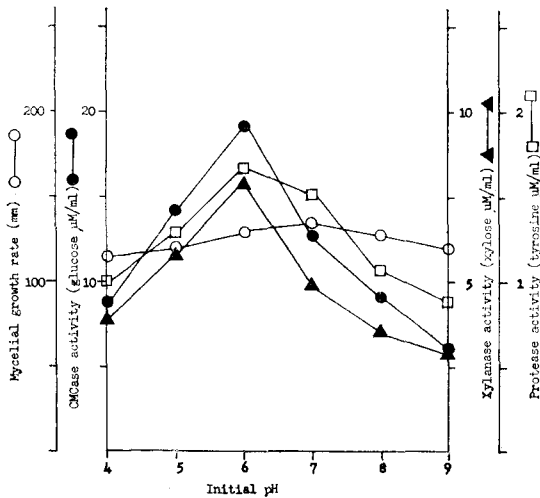


Fig. 2. Effect of initial pH to the rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

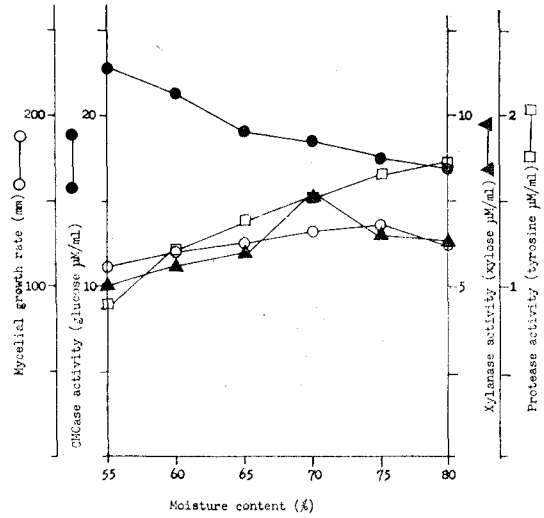


Fig. 3. Effect of moisture content to rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

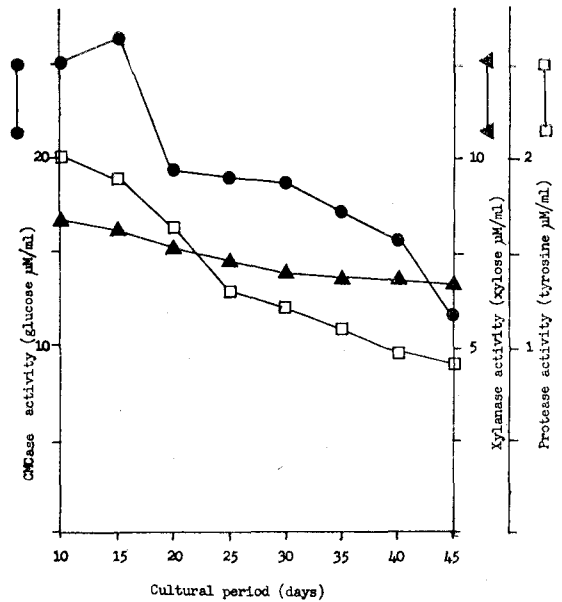


Fig. 4. Effect of cultural period on the enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

는 菌生育에 관계없이 水分量 55%에서 제일 높았으며 水分量이 增加함에 따라 減少하였고 xylanase는 70%, 75% 순이었으며 protease는 CMCase와는 반대로 水分量이 增加함에 따라 增加하여 80%에서 제일 우수하여 水分含量 75%에서 *P. ostreatus*와 *L. edodes* 두 菌株

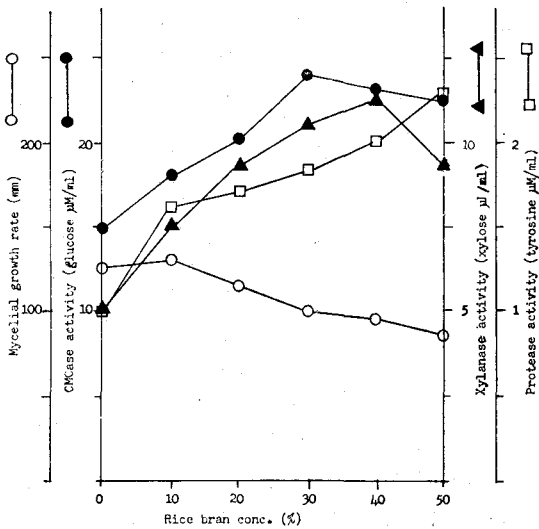
**Table V.** Effect of sub-materials added to rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

Materials	Mycelial growth rate(mm)	CMCase	Xylanase	Protease
None	126	13.95	5.15	0.98
Rice bran	130	18.03	7.24	1.83
Defatted rape seeds	85	19.08	7.14	1.64
Defatted perilla seeds	90	25.86	10.12	2.00
Wheat bran	105	21.31	7.13	1.11
Starch sludge (sweet potato)	96	14.31	5.81	0.96
Defatted sesame seeds	96	19.53	5.27	1.80

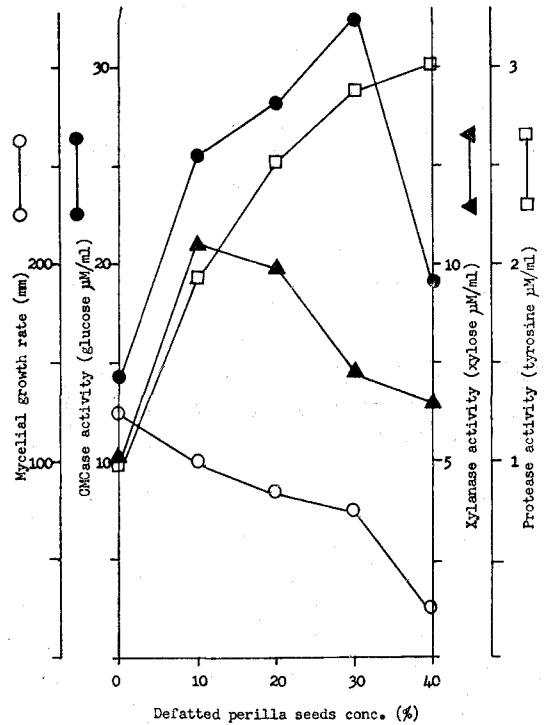
모두 이들 酵素生産이 높았던 洪 등(1981)의 報告와는 큰 차이가 있었다.

培養期間이 酵素生産에 미치는 影響을 알기 위하여 10~45일간 期間을 달리하여 酵素活性을 檢討한 結果는 Fig. 4에서와 같이 CMCase는 15일, xylanase와 protease는 10일인 培養初期에 酵素活性이 높은 것으로 보아 *L. decastes*는 生育初期에 酵素生産이 왕성하였으며 培養期間이 길어짐에 따라 增加하여 *P. ostreatus*는 30일, *L. edodes*는 35일에 酵素生産이 제일 높았던 洪 등 (1981)의 報告와는 相異하였으며 xylanase는 CMCase나 protease에 비해 酵素活性의 減少는 완만하였다.

副原料의 影響



**Fig. 5.** Effect of the amount of rice bran added to rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.



**Fig. 6.** Effect of the amount of defatted perilla seeds added to rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

벼짚培地에 각종 副原料를 10% 添加하여 菌生育과 酵素生産을 比較한 結果는 Table V와 같이 米糠을 제외하고는 副原料 添加時 生育速度는 減少하였으며 CMCase는 들깨묵, 밀기울, 찹깨묵 순이었으며 xylanase는 들깨묵, 米糠, 淸종박 순이며, protease는 들깨묵, 米糠, 찹깨묵 순으로 效果의이어서 高구마 澱粉廢液

**Table VI.** Effect of inorganic salts added to rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

Inorganic salt	Conc. (%)	Mycelial growth rate(mm)	CMCase	Xylanase	Protease
Control	0	130	18.02	6.94	1.66
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.72	135	19.35	8.29	1.10
NaNO <sub>3</sub>	0.72	115	19.65	6.16	1.57
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.72	130	23.35	9.28	1.80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00	125	22.67	8.59	1.98
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00	125	21.58	7.55	2.10
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.10	115	18.53	7.46	1.87
CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.50	125	20.72	8.09	2.10
CaCO <sub>3</sub>	1.00	118	19.08	7.50	1.77

에서의 protease를 제외하고는 이러한 副原料의 添加가 酵素生産에는 效果的이었다.

Table V와 같이 菌生育이 빠르고 酵素生産도 良好하였던 米糠과 菌生育은 늦은 편이나 酵素生産에 效果的이었던 들깨묵을 濃度別로 添加한 結果는 Fig. 5 및 6과 같다.

Fig. 5에서와 같이 米糠 10% 이상에서는 米糠 添加量이 增加할수록 菌生育速度는 減少하였고 이것으로 미루어보아 菌生育에는 米糠濃度增加에 따른 蛋白質이나 脂肪成分의 增加로 오히려 저지를 받는 것으로 思料된다. 酵素生産의 경우는 CMCase는 30%, xylanase는 40%, protease는 50% 添加에서 酵素活性이 제일 높아 洪 등 (1981)의 報告와 대체로 유사한 傾向을 보였다. 들깨묵의 경우는 Fig. 6에서와 같이 菌生育은 들깨묵의 濃度가 增加함에 따라 減少하였으며 40% 添加時는 生育이 아주 빈약했고 酵素生産에서는 CMCase는 30%, xylanase는 10%, protease는 40%에서 우수하였다. xylanase는 米糠의 경우 40% 添加時 제일 좋았던 것에 比하여 對照의이나 protease生産은 培地中の 蛋白質의 增加와 더불어 增加하는 것으로 생각된다.

**無機鹽類의 影響**

벗짚에 각종 無機鹽類 溶液을 만들어 水沈한 후 米糠 10%를 添加한 培地에서 菌生産과 酵素生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table VI과 같다.

Table VI과 같이 菌生育速度는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 添加의 경우 약간 增加하나 나머지 鹽類들은 無添加에 比해 오히려 약간씩 減少하였으며 酵素生産은 CMCase에서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 순으로 效果的이었고 xylanase는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 순이며 protease는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

**Table VII.** Effect of particle size of rice straw on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

Particle size (mesh)	Mycelial growth rate (mm)	CMCase	Xylanase	Protease
Control	130	17.82	7.29	1.61
20	130	17.85	7.33	1.69
20-40	125	19.02	8.05	1.77
40	115	19.53	8.76	1.89

**Table VIII.** Effect of steam pressure of rice straw medium on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

Steam pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Mycelial growth rate (mm)	CMCase	Xylanase	Protease
0.5	125	23.04	7.99	1.43
1.0	130	22.80	7.44	1.53
1.5	133	18.93	6.66	1.64
2.0	133	15.21	6.66	1.58

순으로 좋았으며 xylanase에서 NaNO<sub>3</sub>, protease에서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 NaNO<sub>3</sub>를 제외하고는 이들 無機鹽의 添加는 酵素生産의 增加를 가졌었다. 洪 등 (1981)은 *P. ostreatus*와 *L. edodes*의 培養에서 CaCO<sub>3</sub>와 CaSO<sub>4</sub>의 添加가 菌生育이 제일 빠르고 酵素生産도 *L. edodes*의 xylanase에서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, protease에서 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 添加가 좋았던 경우를 제외하고는 CaCO<sub>3</sub>와 CaSO<sub>4</sub>의 添加가 우수했다고 報告한 바 있

나 본 실험과는 차이가 있었다.

이들鹽類中 酵素生産에 제일 效果的이었던 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 濃度를 달리하여 培養한 結果 Fig. 7과 같이 菌生育은 0.36%에서 좋았고 그 이상의 濃度에서는 減少하였으며 酵素生産에는 CMCase와 xylanase는 0.36%, protease는 1.08%에서 제일 우수하였으며 그 이상에서는 減少하였다.

**粉碎의 影響**

볍짚을 milling 處理하여 볅짚培地의 입자크기가 菌生育과 酵素生産에 미치는 影響을 比較한 結果는 Table VII과 같이 菌生育에는 입자의 크기가 적은 즉 粉碎가 심한 경우가 입자가 큰 경우에 比하여 菌生育이 늦었으며 酵素生産에는 입자가 작을수록 酵素活性이 점차 높아 갔는데 이는 입자가 작을수록 培養瓶에 黴해하게 충전되므로 空氣의 流通이 不良하여 生育에는 阻害를 주나 菌絲가 볅짚 組織사이로 쉽게 침투할 수 있으므로 酵素生産이 增加하였던 것으로 思料되며 Mandels 등 (1974)의 milling 處理時 時間을 연장하거나 입자를 작게 할 수록 cellulase 活性이 높았던 報告와 유사하였다.

**蒸氣壓의 影響**

볍짚培地 殺菌時 蒸氣壓을 달리하여 1시간 處理하고 이때 蒸氣壓의 效果를 檢討한 結果 Table VIII과 같이 蒸氣壓이 높을 경우 菌生育이 약간 增加한 것은 볅짚 組織이 軟化되기 때문이 아닌가 생각되며 酵素生産은 CMCase와 xylanase는 오히려 蒸氣壓이 낮을수록 그 活性이 높았으나 protease는 1.5 kg/cm<sup>2</sup>의 處理에서 제일 높고 그 이상과 이하에서는 이보다 낮았다.

**알칼리 處理의 影響**

알칼리 前處理한 볅짚培地에서 菌生育과 酵素生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table IX와 같다.

Table IX와 같이 전반적으로 알칼리 處理時 菌生育은 약간씩 減少하여 12% NaOH 處理時 제일 生育이 不良하였으며 같은 8% 濃度에서는 NH<sub>4</sub>OH의 處理가 제일 生育이 좋았다. 酵素의 生産은 CMCase는 NH<sub>4</sub>OH 處理時 제일 높고 다음에 Ca(OH)<sub>2</sub> 處理이며 나머지 處理時는 오히려 對照區에 比하여 減少하여 12% NaOH 處理時 제일 낮았으며 xylanase는 Ca(OH)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH 순이었고 NaOH 處理는 4% 處理를 제외하고는 對照區보다 낮았다. protease는 12% NaOH 處理를 제외

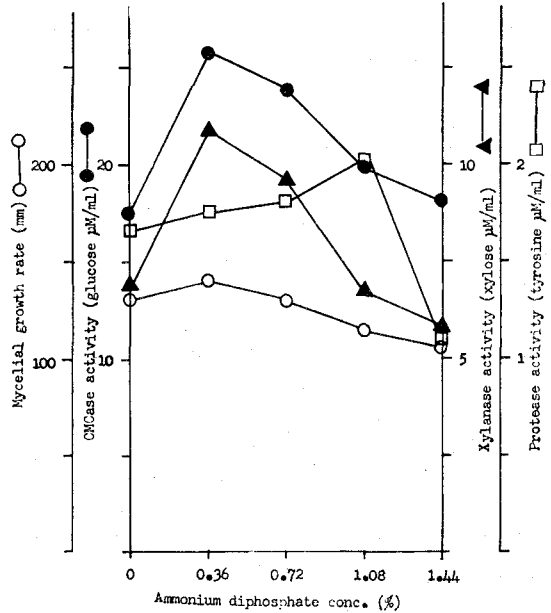


Fig. 7. Effect of the amount of ammonium diphosphate added to rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

Table IX. Effect of alkali treatment of rice straw media on the mycelial growth and enzyme production by *Lyophyllum decastes*.

Alkali	Conc. (%)	Mycelial growth rate (mm)	CMCase	Xylanase	Protease
Control	0	110	18.08	6.53	1.46
NaOH	4	106	12.14	6.72	1.71
NaOH	8	100	9.68	5.83	1.51
NaOH	12	90	8.78	4.65	1.22
Ca(OH) <sub>2</sub>	8	105	20.58	9.57	2.04
KOH	8	103	13.33	6.85	1.82
NH <sub>4</sub> OH	8	107	18.08	9.32	2.10



**Table X.** Changes in chemical components of rice straw during the fermentation periods.

Days	Ash	Reducing sugar	Total nitrogen	Alcohol-benzene extract	Cellulose	Pentosan	Lignin
0	14.28	36.17	2.75	3.09	35.50	25.58	17.36
15	14.35	36.72	2.91	3.65	35.40	22.45	16.69
20	14.46	37.64	3.14	4.56	33.75	19.98	14.51
25	14.47	38.70	3.18	5.65	32.82	18.92	13.78
30	14.55	38.83	3.22	8.46	32.60	18.53	12.62
35	14.85	39.42	3.30	7.83	32.30	18.42	12.56
40	15.12	39.95	3.37	7.03	31.46	18.40	12.50
45	15.15	41.63	3.42	6.86	31.32	18.00	12.06

하고는 전반적으로 증가하나 이 중에서도  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 의 처리가 효과의이어서 菌生育이나 酵素生産에는  $\text{NaOH}$  처리보다  $\text{NH}_4\text{OH}$ 나  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 의 처리가 좋았다.

**培養 期間 中의 成分 變化**

볏짚培地에서 培養期間中 成分의 變化를 보면 Table X 과 같이 灰分, 還元糖, 總窒素는 서서히 增加하여 還元糖은 45일 培養後 5.46% 增加하였고 alcohol-benzene 抽出物은 培養 30일까지 增加하다 그후 약간 減少하였다. 纖維素, pentosan, lignin은 培養 全期間을 통하여 減少하여 느타리버섯을 利用한 醱酵飼料 製造時 期間이 經過함에 따라 粗蛋白과 灰分은 增加하나 粗纖維와 lignin은 減少하였던 李 등(1982)과 Detroy 등(1980)의 報告와 유사하였다.

**알칼리 處理 볏짚의 培養前 및 後 成分 變化**

알칼리 處理 볏짚의 成分含量은 Table XI 과 같이 灰分과 總窒素는 알칼리 處理時 對照區에 比하여 전반적으로 減少하며  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  處理時 減少가 심하였고  $\text{NaOH}$ 는 濃도가 增加할 수록 減少폭이 컸다. 還元糖과 纖維素는  $\text{NaOH}$  處理時 제일 크게 增加되었으며

알칼리 種類로는  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  순이었고 alcohol-benzene 抽出物은  $\text{NaOH}$ 와  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  處理時는 減少하였으나  $\text{NH}_4\text{OH}$ 는 對照區의 2배 이상 增加하였다. pentosan은  $\text{NaOH}$  處理時 濃도가 增加할수록 增加하였으나  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  處理時는 減少하여 對照의이었고 lignin은 전반적으로 減少하여  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  순으로 減少하며  $\text{NaOH}$  處理時 濃도가 增加할 수록 심하게 減少하여 12%  $\text{NaOH}$  處理時 對照區에 比하여 2.4배정도 減少하여 孟 등(1979-1)의 경우와 hemicellulose, lignin은 유사하나 cellulose는 4% 處理를 제외하고는  $\text{NaOH}$  處理濃도가 增加하면 減少하였던 報告와는 相異하였다.

이러한 알칼리 處理 볏짚을 培養한 結果 Table XII 와 같이 灰分, 還元糖, 總窒素, alcohol-benzene 抽出物은 還元糖의 12%  $\text{NaOH}$  處理를 제외하고는 培養時에 比해 增加하였으며 纖維素, pentosan, lignin은 減少하여 알칼리 前處理볏짚의 醱酵飼料 製造도 Table X 에서와 같이 處理하지 않은 경우와 유사한 경향을 보였다.

**In vitro dry matter 消化率**

**Table XI.** Changes in chemical components of rice straw after alkali treatment at 100°C for 1 hour(unit: %).

Alkali	Conc. (%)	Ash	Reducing sugar	Total nitrogen	Alcohol-benzene extract	Cellulose	Pentosan	Lignin
Control	0	8.64	36.97	1.19	3.20	34.97	22.48	15.30
$\text{NaOH}$	4	7.09	53.49	0.99	3.20	38.63	15.17	10.59
$\text{NaOH}$	8	3.87	60.62	0.74	1.20	51.87	19.57	8.53
$\text{NaOH}$	12	2.14	80.97	0.54	0.37	75.04	23.68	6.51
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	8	8.95	50.44	1.10	2.53	41.55	18.27	12.50
$\text{KOH}$	8	7.00	56.50	0.85	3.49	44.29	22.67	10.31
$\text{NH}_4\text{OH}$	8	8.25	45.54	1.12	6.55	42.72	21.34	12.25

Table XII. Changes in chemical components of fermented rice straw\*.

(unit: %)

Alkali	Conc. (%)	Ash	Reducing sugar	Total nitrogen	Alcohol-benzene extract	Cellulose	Pentosan	Lignin
Control	0	9.81	38.87	1.79	5.75	32.38	17.17	13.53
NaOH	4	9.87	54.38	1.50	3.47	35.63	9.93	8.90
NaOH	8	5.03	61.40	1.12	1.46	50.79	12.57	7.88
NaOH	12	2.48	78.15	0.61	0.43	69.20	18.03	6.05
Ca(OH) <sub>2</sub>	8	10.40	59.52	1.46	2.91	40.63	11.69	10.42
KOH	8	9.70	57.16	1.19	3.85	39.09	13.67	7.95
NH <sub>4</sub> OH	8	9.99	58.97	1.54	7.52	40.81	14.48	9.66

\* Pretreated with alkali at 100°C for 1 hour

培養期間에 따른 볏짚의 dry matter 消化率은 Fig. 8 에서와 같이 對照區의 55.03%에 比하여 培養 15 日 後에는 약간 減少하여 54.30% 였으며 20日에는 58.75%로 그 이후 培養期間이 길어짐에 따라 전반적으로 增加하여 45日 培養後 62.72%로 對照區보다 7.69% 增加하였으며 Fig. 4에서 培養期間이 길어짐에 따라 전반적으로 酵素活性이 減少하였음에도 불구하고 消化率이 增加하는 것은 Table X에서 처럼 이들 酵素가 볏짚을 서서히 分解하여 醱酵飼料 製造時 消化에 저해

를 주는 lignin등을 分解시키고 窒素含量을 높여주며 纖維素量이나 pentosan이 減少함에도 불구하고 還元糖이 增加하였던 것으로 미루어 보아 飼料 攝取時 쉽게 分解될 수 있는 상태로 전환되는 것으로 思料되며 金 등 (1983)의 곰팡이를 이용한 醱酵飼料 製造時 消化率 이 제일 높았던 *A. kawachii*에서 對照區에 比하여 dry matter 消化率이 2.64% 增加하였던 報告와 Hartley 등 (1974) 등의 *Polytictus sanguines*의 보리짚 醱酵에서 49%로 對照區의 46%에 比하여 3% 增加하였던 것에 比하여 20日 이후에는 이 보다 增加하였으며 포 플라 톱밥의 8주 醱酵時 *Polyporus versicolor*는 72%, 4주 醱酵時 *Ganoderma applanatum*는 64%, *Phanerochaete chrysosporium* 62%였던 Reade(1983)의 報告에 比해서는 낮은 편이었다.

알칼리 處理 볏짚의 醱酵前, 後 消化率을 比較하여 보면 Fig. 9와 같이 alkali 處理時 對照區에 比하여 현저히 dry matter 消化率이 增加하며 같은 濃度에서는 KOH가 76.45%로 제일 좋았으며 다음으로 NaOH의 75.46%, Ca(OH)<sub>2</sub>의 63.69%, NH<sub>4</sub>OH의 63.14% 순으로 bagasse에서 NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH 순이었던 Playne(1984)의 報告와 유사하나 보리짚에서 NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, Ca(OH)<sub>2</sub> 순이었던 孟 등(1979 a)의 報告와는 차이가 있었고 NaOH의 濃度가 增加하면 이에 比例하여 消化率도 增加하여 0, 4, 8, 12% NaOH 濃度에서 dry matter 消化率이 46.97, 68.34, 75.46, 81.68%로 孟 등(1979 b)의 51.01, 67.29, 78.74, 80.56%와 대체로 유사하였다. alkali前處理 後의 醱酵時에도 Ca(OH)<sub>2</sub> 處理時 63.69%에서 68.76%, NH<sub>4</sub>OH는 63.44%에서 68.49%, KOH 處理時는 76.45%에서 81.48%로 增加하였으며 NaOH 處理時도 정도의 차이는 있으나 전반적으로 消化率의 상승을

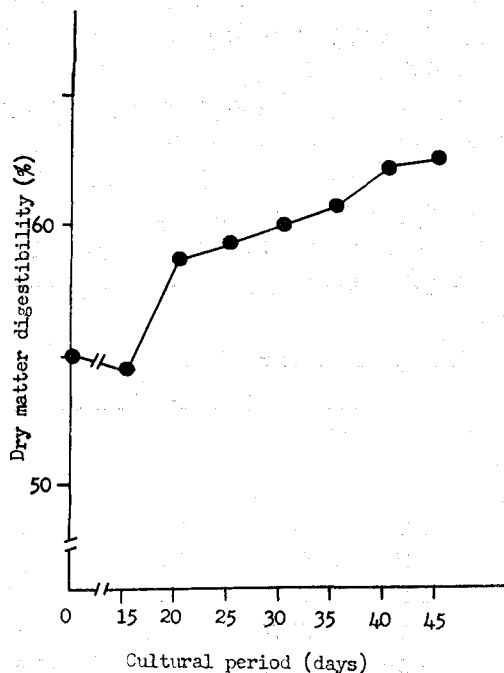


Fig. 8. Changes in vitro dry matter digestibility during the fermentation of rice straw by *Lyophyllum decastes*.

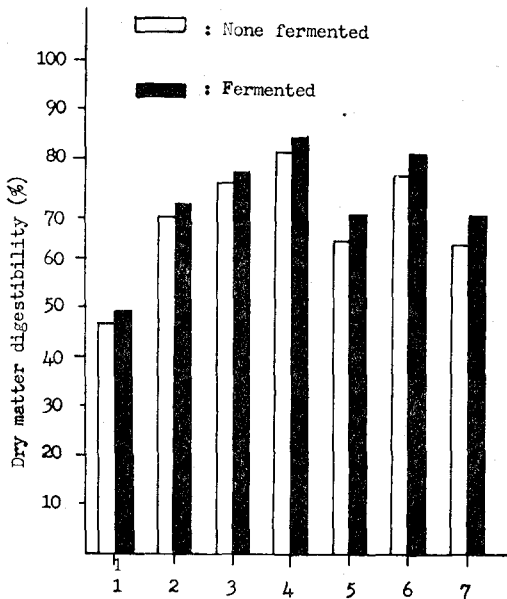


Fig. 9. Changes in vitro dry matter digestibility of alkali pretreated rice straw by *Lyophyllum decastes*.

1. Control
2. 4% NaOH
3. 8% NaOH
4. 12% NaOH
5. 8% Ca(OH)<sub>2</sub>
6. 8% KOH
7. 8% NH<sub>4</sub>OH

가져왔는데 보리짚에서 對照區 46%, 10% NaOH 處理後 82%이나 10% 알칼리 前處理後 *Polystictus sanguineus*의 醱酵時 80%로 오히려 알칼리 단독 處理보다 떨어졌던 Hartley등 (1974)의 報告와는 相異하였다.

이상을 종합하여 불매 벚짚의 醱酵飼料化는 消化率面에서 알칼리處理에 比하여 效果는 낮지만 窒素成分의 增加로 蛋白質의 공급원이 될 수 있으며 嗜好性의 增加를 가져올 수 있다고 보기 때문에 (李 등, 1982) 알칼리 處理와 병행하면 상당한 效果를 얻을 수 있다고 思料된다.

### 摘 要

擔子菌을 이용한 醱酵飼料를 製造할 目的으로 分離한 菌株의 菌生育 速度와 纖維素分解能(濾過紙 崩壞法과 CMC 液化法)을 比較하여 1차 5菌株을 選別하였고 1차 選別된 菌株을 벚짚培地에서 生育 速度와 CMCase, xylanase, protease 活性을 比較하여 *Lyophyllum deca-*

*stes*를 選定하였다.

*Lyophyllum decastes*의 菌生育과 酵素生産을 위한 培養 最適 條件은 25~30°C, pH 6.0~7.0, 水分 70~75% 범위였으며 酵素生産은 15일 培養時 좋았다.

副原料로 米穀 30~40%, 들깨묵 10~20%의 添加로 酵素生産은 增加되나 菌生育은 낮았으며 無機鹽으로 0.36~0.72%의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 添加가 效果의이었다.

벚짚을 40 mesh 이하로 粉碎하거나 0.5 kg/cm<sup>2</sup>의 蒸氣壓으로 處理하던 菌生育은 조금 낮으나 酵素生産에는 效果的이었다.

알칼리 處理中 Ca(OH)<sub>2</sub> 處理가 菌 生育이나 酵素生産에 좋았고 NaOH의 濃度가 增加하면 菌生育이나 酵素生産은 낮았다.

벚짚醱酵時 醱酵가 진행됨에 따라 灰分, 還元糖, 總窒素은 增加하였고 纖維素, lignin, pentosan은 減少하였다. 알칼리 處理時 灰分, 總窒素, lignin은 減少하였고 還元糖과 纖維素는 增加하였으며 NaOH의 濃度가 增加할수록 變化는 심하였다.

醱酵가 진행됨에 따라 in vitro dry matter 消化率은 增加하여 醱酵初期 55.03%에서 45일 醱酵後는 62.72%로 增加하였다.

알칼리 處理時는 KOH, NaOH의 處理가 效果的이었으며 NaOH의 濃度가 增加하면 消化率은 增加하였고 알칼리 前處理 벚짚의 醱酵飼料 製造時도 消化率의 향상을 가져왔다.

### 文 獻

- AOAC (1980): *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Washington, D.C.
- Berghem, L.E.R., Pettersson, L.G. and Fredriksson, B.A. (1976): The mechanism of enzymatic cellulose degradation (Purification and some properties of two different 1,4-β-glucan glucanohydrolases from *Trichoderma viride*). *Eur. J. Biochem.* 61:621~630.
- Detroy, R.W., Lindenfelser, L.A., Julian, G.ST. JR, and Orton, W.L. (1980): Saccharification of wheat-straw cellulose by enzymatic hydrolysis following fermentative and chemical pretreatment. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 10:135~148.
- Eslyn, W.E., Kirk, T.K. and Effland, M.J. (1975): Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. *Phytopathology* 65:473~476.
- Fan, L.T., Lee, Y.H. and Gharpuray, M.M. (1980):

- The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering* 23:157~187.
- Hartley, R.D., Jones, E.C., King, N.J., and Smith, G.A. (1974): Modified wood waste and straw as potential components of animal feeds. *J. Sci. Fd. Agric.* 25:433~437.
- Kirk, T.K. (1973): Polysaccharide integrity as related to the degradation of lignin in wood by white-rot fungi. *Phytopathology* 63:1504~1507.
- Lee, N.H. and Kim, C.S. (1980): Replacement of wheat bran by yellow corn or whole fat rice bran and their effects on the quality of straw-manure silage. *Korean J. Anim. Sci.* 22:382~385.
- Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J. (1974): Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 16:1471~1493.
- Matsuo, M. and Yasui, T. (1984): Purification and some properties of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.* 48:1845~1852.
- Miller, G.L. (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:426~428.
- Millett, M.A., Baker, A.J., Feist, W.C., Mellenberger, R.W. and Satter, L.D. (1970): Modifying wood to increase its *in vitro* digestibility. *J. Animal Sci.* 31:781~788.
- Milstein, O.A., Vered, Y., Sharma, A., Gressel, J. and Flowers, H.M. (1983): Fungal biodegradation and biotransformation of soluble lignocarbhydrate complexes from straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:55~61.
- Peitersen, N. (1975): Production of cellulase and protein from barley straw by *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 17:361~374.
- Playne, M.J. (1984): Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* 26:426~433.
- Reade, A.E. and McQueen, R.E. (1983): Investigation of white-rot fungi for the conversion of poplar into a potential feedstuff for ruminants. *Can. J. Microbiol.* 29:457~463.
- Tilley, J.M.A. and Terry, R.A. (1963): A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18:104.
- 姜泰洪(1979): 低質 粗飼料의 飼料價値改善. 韓國營養飼料研究會 技術報告 3:21~36.
- 姜泰洪, 車英鎬, 裴東鎬, 蔣潤煥(1981): 벗짚 싸이레지 製造試驗(第2報). 農産副産物 添加에 依한 싸이레지 製造試驗. 韓畜誌, 23:92~102.
- 金範泰(1983): 醱酵處理 벗짚과 alkali 處理 벗짚의 *in vitro* 消化率에 關한 試驗. 韓畜誌, 25:90~94.
- 金春洙, 裴武, 李南珩(1977): 벗짚의 飼料價値 增進에 關한 研究, (第1報). 醱酵벗짚 飼料의 消化率 檢定 試驗. 韓畜誌 19:356~362.
- 孟元在(1976): 低質粗飼料의 飼料價値 改善에 關한 研究, 1. 알칼리 處理에 依한 보리짚의 消化率 改善과 化學的 成分의 變化. 韓畜誌 18:499~504.
- 孟元在, 吳世正, 崔秉翼(1979 a): 벗짚의 飼料價値 改善에 關한 研究. I. 알칼리 처리가 통일 벗짚의 化學的 成分과 *in vitro* 消化率에 미치는 영향. 韓畜誌 21:343~349.
- 孟元在, 尹光老, 辛炯泰(1979 b): 飼料資源 開發에 關한 研究, 1. 보리짚의 飼料價値改善. 韓畜誌 21:147~152.
- 裴武, 金炳弘, 李啓準(1976): 農産廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究 (第五報), 纖維素 分解酵素 生産 곰팡이의 分離 및 選別. 韓産微誌 4:105~110.
- 右田仲彦, 米澤保正, 近藤民雄 (1968): 木材化學(下), 共立出版株式會社, 東京.
- 李澤遠, 金法會(1982): 느타리버섯 種菌의 接種에 의 한 벗짚의 飼料價値 改善에 關한 研究. 韓畜誌 24:476~481.
- 萩原文二(1956): 酵素研究法 (2). 赤堀編, 朝食書店, 東京, p. 240.
- 洪載植, 金東翰(1981): 擔子菌이 生産하는 酵素에 關한 研究, 第一報 粗酵素의 生産에 關하여. 韓農化誌 24:7~14.

<Received July 25, 1985; Accepted August 22, 1985>