

양송이 액체접종원을 이용한 종균 제조 방법 개발

오연이* · 장갑열 · 오민지 · 임지훈

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Development of a spawning method using liquid inoculum of *Agaricus bisporus*

Youn-Lee Oh*, Kab-Yeul Jang, Min Ji Oh, and Ji-Hoon Im

Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Korea

ABSTRACT: Currently, the spawn of the mushroom *Agaricus bisporus* is produced by a method developed in the 1980s, and anew spawning method needs to be developed to improve the quality of the spawn. In this study, the condition for a maximum mycelium weight (5.92 ± 0.52 g/L) was shaking culture (24 hours/day) at 24°C and 120 rpm in CDB (compost dextrose broth). Based on this, the ventilated liquid culture method (2.5 L/min) was cultured for 10 days. This method was appropriate, and when the inoculum was cultured at 50 g/mL for about 10 days, it was cultured well without agglomeration and shaking of seed.

KEYWORDS: Button mushroom, *Agaricus bisporus*, Spawn, Liquid inoculum

세계 버섯 생산량은 약 34백만톤('13)이며, 그 가운데 양송이는 네번째로 많은 15%를 점유한다. 국내 버섯 총 생산량 178,346톤('19) 중 양송이는 21,913톤으로 12.3%를 차지하지만, 판매 단가가 높기 때문에 생산액은 149.6 억원으로 20.8%에 해당된다. 재배농가수는 526호로서 느타리 농가 다음 두번째로 많은 실정이다(Royse *et al.*, 2017; MAFRA, 2020).

양송이 종균은 마분퇴비 중 균사가 자란 부분을 버섯 재배용 퇴비에 접종을 하는 방식으로 시작하였으며, 순수 배양종균은 1918년 미국에서 살균된 마분퇴비를 이용하

여 처음으로 제조되었다. 이후 양송이 곡립종균 제조방법은 1932년 Sinden에 의하여 개발된 이래 대부분의 나라에서는 밀, 호밀, 수수 등을 종균 배지로 이용하고 있다. 우리나라에서도 1968년부터 1980년대까지 종균제조법이 연구되었으며, 현재까지 그 방법이 이용되고 있다(Cha *et al.*, 1989).

외국에서는 글로벌 종균업체인 Sylvan, amycel, italspawn 등의 업체들이 종균을 생산하고 있다. 규모가 가장 큰 Sylvan의 경우 우리나라 60평 기준으로 600개 재배사에 접종할 수 있는 종균량을 일주일에 생산하는 업체로서 자동생산시스템으로 종균을 제조한다. 종균 제조시 브이 블렌딩(v-blending, 글리콜로 온도 조절 가능) 기계에서 밀, 조 등의 곡립을 삶고, 석고를 처리하여 살균한다. 미국/프랑스 연구소에서 전달된 액체접종원을 곡립 배지에 접종하고, 연결된 클린룸(제약회사기준)에서 필터가 있는 멸균된 백에 약 8 kg 내외로 종균을 넣는다. 흔들기 등 균사 생장 촉진작업 없이 25°C에서 14~16일 정도 배양하여 생산한다. 이 정보는 현장 방문을 통해 관련 담당자에게 들은 정보이며 액체접종원 조성 등에 대한 정확한 정보는 수집하지 못하였음을 밝혀둔다.

지금까지 양송이 액체 종균에 대한 연구는 malt를 이용한 액체배지에서 10 mm 구슬을 넣은 300 rpm 진탕배양(1시간/일)과 정치배양(23시간/일) 하는 혼합 배양이 방법이 Friel과 McLoughlin (2000)에 의해 설정되었고, Kim (2009)

J. Mushrooms 2021 June, 19(2):109-113
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2021.19.2.109>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Youn-Lee Oh(Agricultural researcher), Kab-Yeul Jang(Agricultural senior researcher), Min Ji Oh(Agricultural researcher), Ji-Hoon Im(Agricultural researcher)

*Corresponding author

E-mail : o5ne2@korea.kr

Tel : +82-43-873-5712, Fax : +82-43-873-5702

Received March 12, 2021

Revised April 18, 2021

Accepted June 16, 2021

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Agar^a media composition

Nutritional reagents	Medium(g/L)							
	BM	CDA	CDY	HA	MCM	MMM	MYA	PDA
Compost extract		1,000 ^b						
Dextrose	30	10				20		20
DL-Asparagin						2		
FeSO4			0.01					
Glucose			10	20	20			
K2HPO4					1	1		
KCl			0.5					
KH2PO4	1		1	1	0.46	0.46	1	
malt extract		7	3				20	
MgSO4	1		0.5	0.5	0.5	0.5		
NaNO3			2					
peptone					2			
Potato								200
Thiamine HCl						0.00012		
Yeast extract	3	?	3	3	2		2	

^a All media was composed of 0.2% agar.

^b Compost extract was 1,000 ml of liquid reagents.

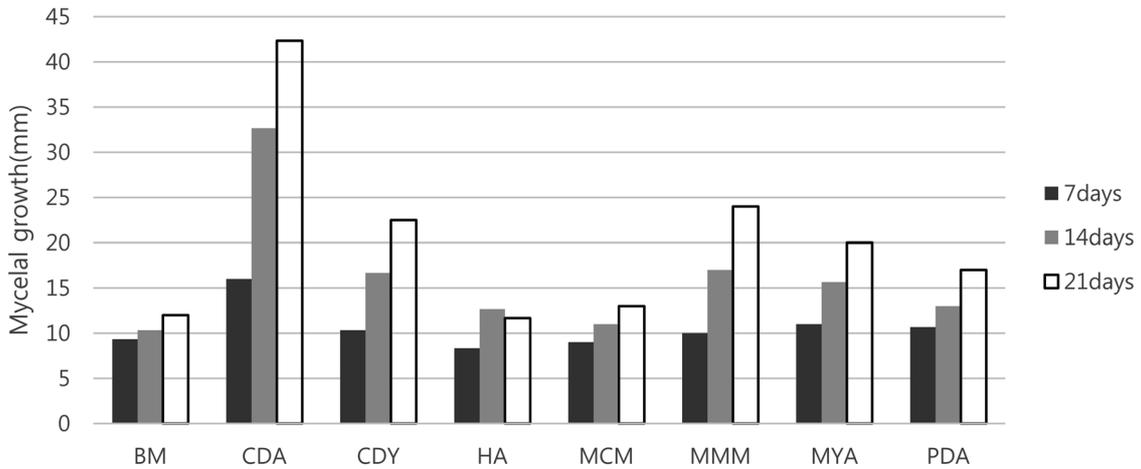
등은 20 g/L PDB, 10 g/L yeast extract, 5 g/L malt extract, 5 g/L soytone, 10~20 g/L 사탕수수, 10 g/L 질산 나트륨이 포함된 액체 배지에 1%(v/v)의 접종원을 넣어 바이오리액터(산소 공급(0.25 v/v/m), 200rpm)을 사용하는 방법을 개발하였다.

완성형배지와 종균의 수입이 늘어나면서, 국산 품종의 보급확대를 위한 국내 종균의 품질향상에 대한 연구필요성이 대두되었다. 따라서 본 연구에서는 현재의 양송이 종균 제조방법을 개선하고자 액체 접종원을 이용한 종균 제조 방법을 연구하였고 그 결과를 바탕으로 논하고자 한다.

시험에 사용한 품종은 국립원예특작과학원에서 육성한 ‘새도’ 이며 적정 균사 배양 배지를 선발하기 위해 Table 1과 같이 BM (basal medium agar), CDA(compost dextrose agar), CDY(Czapek-Dox medium), HA(Hamada agar), MCM(Mushroom complex medium), MMM (Mushroom minimal medium), MYA(malt-extract yeast-extract agar), PDA(potato dextrose agar) 8종의 고체 배지(90 × 20 mm)에 plug(Cork borer, 7 mm) 형태로 접종한 후 24°C에서 21일간 배양 후 3반복으로 균사 성장량을 조사하였다(Choi *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2010). 양송이 균주는 초기 배양(7일차)에는 CDA>MYA>PDA>CDY>MMM>BM>MCM>HA 순으로 빠르게 성장하였고, 완전 배양(21일차)에서는 CDA>MMM>CDY>MYA>PDA>MCM>BM>HA 순이었다. 특히 CDA 배지에서 배양이 상당히 빨랐는데, 초기 배양은 16.0±1.0 mm이었으며, 완전 배양은 42.3±1.2 mm 이었다. BM배지보다 초기

배양 1.9배, 완전 배양 때는 3.6배 정도 빨랐다. 따라서 배양 속도가 빠른 CDA배지를 최적 배양배지로 선발하였고 (Fig. 1), 이후 CDB(compost dextrose broth)를 이용하여 액체배양을 수행하였다. 500 ml 시약병에 100 ml 정도의 선발된 CDB(compost dextrose broth)배지와 1/12 plate(90 × 20 mm)의 균사체를 넣어 호모게나이저(Mitsui, SX10)로 균질화 한 뒤, 배지를 더 넣어 250 ml로 조정하였다. 그 다음 직경 10 mm 유리구슬을 넣고 24°C에서 120 rpm으로 4주간 진탕 및 정치배양을 시간별로 처리하였다. 24시간/일 진탕배양, 24시간/일 정치배양, 1시간/일 진탕·23시간/일 정치배양을 진행하고, funnel과 원형 여과지(Whatman® qualitative filter paper, diameter 150 mm)를 이용하여 균사체만을 걸러낸 다음 55°C 3시간 건조한 뒤 균체량을 측정하였다. 그 결과, 지속적으로(24시간/일) 진탕배양한 처리에서 균체량이 5.92±0.52 g/L로 가장 많았다. Friel과 McLoughlin (2000) 논문에 의하면, 정치 배양이 균체량이 높았는데 이때는 300 rpm의 높은 회전수로 진탕 배양하였기 때문에 균체량이 적었던 것으로 생각된다. 본 실험에서도 직경 10 mm의 유리구슬을 넣고 300 rpm으로 진탕배양하였는데, 회전수가 너무 많아서 안정적인 균사 생장이 어려울 것으로 판단되어 120 rpm으로 낮추었다. 또한 사진에서 보는 것처럼 정치 배양은 균사체가 하나의 덩어리로 배양되어 접종하기 어렵다고 판단하였다(Fig. 2).

진탕배양이 정치배양보다 균체량을 많이 확보할 수 있다는 것을 확인한 후, Kim(2009) 등이 사용한 바이오리액



* BM, basal medium agar; CDA, compost dextrose agar; CDY, Czapek-Dox medium; HA, Hamada agar; MCM, Mushroom complex medium; MMM, Mushroom minimal medium; MYA, malt-extract yeast-extract agar; PDA, potato dextrose agar.

Fig. 1. Mycelial growth of *A. bisporus* on various solid medium at 24°C for 21 days.

터와 같이 통기배양으로 균을 증식하기 위해 다른 버섯에서 접종원 제조시 사용하는 Cheong 등(1996)의 방법인 통기식 액체배양법으로 배양하였다. 양송이 균사체 대량 배양을 위하여 5 L들이 vial(Duran Scott)로 제작한 통기식 액체배양병을 에어펌프(2.5 L/min, 대광 DK-8000)에 연결하여 배양하였다(Cheong *et al.*, 1996). 100 ml 정도의 CDB(compost dextrose broth)배지와 1 plate(90 × 20 mm)의 균사체를 넣어 호모게나이저로 균질화 한 뒤, 배지량을 3 L로 조정하였다. 그 후 5일 간격으로 배양한 배양액에서 funnel과 여과지를 이용하여 균사체만 채취하여 55°C 3시간 건조한 뒤 균체량을 측정하였다. 이 실험에서는 종균업체의 실제적인 적용을 위한 대량배양으로 진행하였는데, 기존 액체 배양 실험에서 12배인 3 L의 배지에 같은

비율로 균사체를 접종한 뒤 배양 기간별 균체량의 변화를 확인하였다. 그 결과 10일까지 급격하게 균이 배양되다가 그 이후에 완만하게 균이 배양되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 또한, 배양 기간이 15일 이상 되면 균체량이 너무 많아 접종하는 튜브에 균이 막혀 접종이 원활하지 않아, 적정 배양 기간은 10일로 설정하였다.

양송이 액체 접종원의 적정 접종량 설정을 위해 Oh 등(2015) 방법에 따라 500 g의 밀 배지를 제조하고 500 ml 삼각플라스크에 넣어 살균한 뒤 배양된 액체접종원을 10 ml, 12.5 ml, 20 ml, 25 ml로 접종하여 12일 간 배양 정도를 관찰하고, 균사가 완료되었을 때 전체 무게를 잰 후 밀 배지 500 g을 빼서 균체량을 측정하였다. 그 결과 균사체량은 접종량이 증가될수록 증가하였지만, 접종량이 증가할수록

Condition	Culture agitated continuously at 120rpm	Culture agitated 1hr/day at 120rpm	Stationary culture
Mycelial dry weight(g)	1.48±0.13	0.97±0.29	0.81±0.00



*left : culture agitated continuously at 120 rpm, center; Culture agitated 1 hr/day at 120 rpm; right, Stationary culture

Fig. 2. Effect of agitation on the growth of *A. bisporus* in 500 ml CDB (compost dextrose broth).

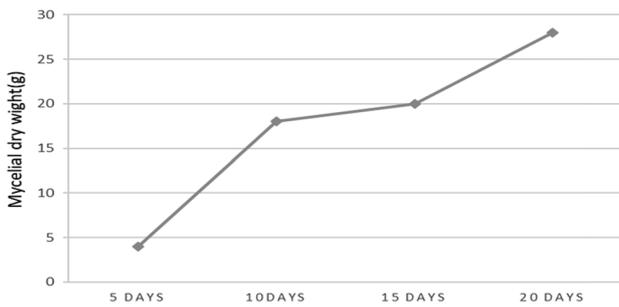


Fig. 3. Mycelial dry weight on culture period using aeration culture with liquid media.

행되는 원인으로 추론된다. 10 ml/ 접종한 것이 몽침없이 균일하게 배양되었으며, 10 ml/ 접종한 종균도 10일 이후부터 점점 배양된 곡립 종균이 몽치는 것을 볼 수 있다 (Fig. 4). 배지 500 g에 접종량 10 ml/을 계산하여 배지 50g당 1 ml/을 적정 접종량으로 설정하고 10일 배양하면, 흔드는 작업없이 종균을 균일하게 배양할 수 있다는 것을 확인하였다. 접종원의 적정 접종량과 배양기간의 설정은 양송이 종균 제조 과정에서 종균을 흔드는 과정을 줄여주어 업체의 인건비 절감뿐만 아니라, 흔들기 작업으로 발생하는 오염 문제도 줄 것이라고 사료된다.

배양된 종균의 몽침 현상도 증가 하는 것을 볼 수 있었다. 균사 배양은 곡립에 코팅처럼 입혀지면서 배양이 되는데, 균체량이 배양일 수가 지남에 따라 미미하게 변하는 것은 균사체량 증가와 함께 곡립내 수분 감소 또한 동시에 진

적 요

현재 양송이 종균은 1980년대 개발된 방법으로 제조되고 있어, 양송이 종균 품질 향상을 위한 새로운 제조 방법

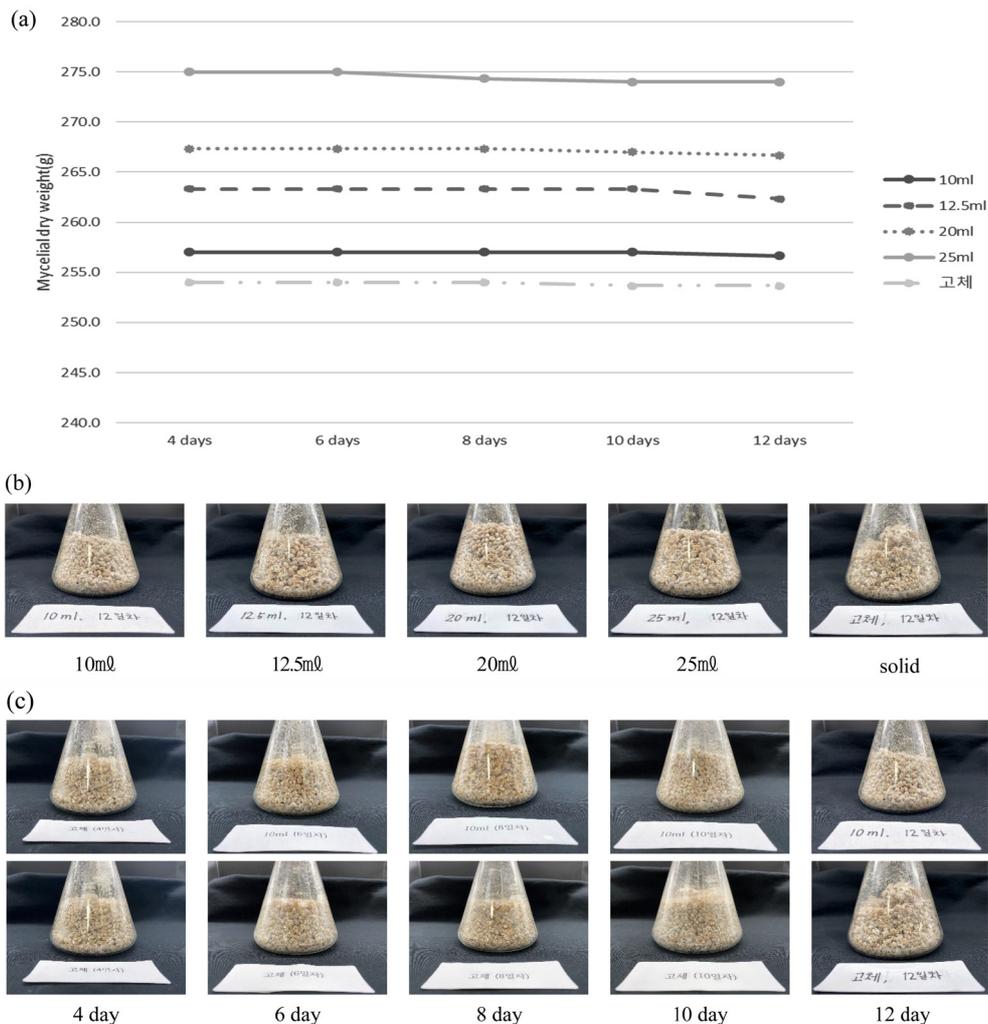


Fig. 4. Effect on amount of inoculation and period in aeration culture with liquid media. (a) mycelial dry weight; (b) picture of spawn on amount of inoculation; (c) upper picture of spawn on culturing period in 10 ml inoculum, under picture of spawn on culturing period in solid inoculum)

을 개발하였다. 그 결과 균사체량이 5.92 ± 0.52 g/L로 가장 많이 배양된 CDB(compost dextrose broth) 배지에서 24°C에서 120 rpm으로 진탕 배양(24시간/일) 하는 통기식(2.5 L/min) 액체배양법으로 배양기간 10일이 액체 접종원 사용으로 양호했으며, 양송이 밀 배지 종균 생산은 밀 배지 50 g당 액체 접종원 1 ml을 적정 접종량으로 하여 10일 배양하면 종균의 뭉침과 혼드는 작업없이 적절하게 배양되었음을 보고한다.

감사의 글

본 결과물은 농촌진흥청 ‘수출용버섯 종균제조 기술개발(PJ01341101)’ 주관과제의 예산을 지원받았습니다.

REFERENCES

- Cha DY, Yu CH, Kim GP. 1989. *Current mushroom cultivation technology*. 67-69.
- Cheong JC, Kim HG, Kim GP. 1996. *Development of liquid spawn for manufacturing bottle mushroom medium*. *Agricultural Science and Technology Institute test research project report* (Ministry of Biological Resources): 635-644.
- Choi SJ, Kim SJ, Han YH. 2004. Physiological characteristics and optimized culture condition of the mycelia of *Inonotus mikadoi*. *Korean J Microbiol* 40: 100-103.
- Friel MT, McLoughlin AJ. 2000. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. *Biotechnol Lett* 22: 351-354.
- Kim YD, Kim YH. 2009. Method of culturing *Agaricus bisporus* mycelium and medium for culturing the same. Patent WO2007139322A1. PCT/KR2007/002555.
- MAFRA. 2020. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs 2019. 64-67.
- Oh YL, Jang, KY, Kong WS, Shin, PG, Kim ES, Oh MJ, Choi IG. 2015. Development of a new brown button mushroom cultivar ‘Hogam’. *J Mushrooms* 13: 237-242.
- Royse DJ, Baars J, Tan Q. 2017. Current Overview of Mushroom Production in the World. *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications* 5-13.
- Sung GH., Shrestha B, Park KB, Sung JM. 2010. Cultural Characteristics of *Shimizuomyces paradoxus* Collected from Korea. *Mycobiology* 38: 189-194.