느타리버섯 자실체 생육 및 미세구조에 미치는 배지의 영향

주영철^{1,3*} · 윤선미² · 강희완³

¹경기도농업기술원 버섯연구소, ²(주)바이오미스트 테크놀로지, ³한경대학교 생물환경 · 정보통신전문대학원

Received August 2, 2007 / Accepted September 21, 2007

Effects of Different Substrate on the Growth and Microstructure of Fruit Body in the Basidiomycetes, *Pleurotus ostreatus*. Young-Cheoul Ju^{1,3*}, Seon-Mee Yoon² and Hee-Wan Kang³.

¹Mushroom Research Institute, Gyeonggido Agricultural Research and Extension Service, Gwangju, Gyeonggi 430-8, Korea, ²Biomist Technology Co., LTD, Sinjeong5-Dong, Yangcheon-Gu, Seoul, 912-4, Korea, ³Hankyung National University, Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Ansong, Gyeonggi 456-749, Korea. - Comparison of fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* cultivar chunchu No. 2 grown on the sawdust, rice straw and cotton waste substrates revealed differences in the pattern of differentiation of hyphal compartments. Required period for primordium induction of fruit bodies grown on sawdust substrate was 13 days. Physical structure shown as hardness of stipes grown on the sawdust substrate, fruit bodies were harder than control. Pileocystidia were well developed on the surface of pileus in the fruit body cultivated on rice straw. Microstructures of fruit body grown on the sawdust and cotton wastes substrates shown fast-discharge of basidiospore and symptoms ageing. Hyphae of fruit bodies formed on sawdust substrate had less stainable cytoplasmic material and many more vacuoles than hyphae of fruit bodies formed on synthetic substrate with 50% of pine sawdust, 30% of cotton seed hull and 20 of beet pulp(control).

Key words – Sawdust, rice straw, cotton waste, scanning electron microscope, transmission electron microscope, vacuolation, cytoplasmic material

서 론

버섯 자실체발생은 영양균사가 배지에서 왕성하게 성장하여 균총을 형성하는 것이 전제되어야만 한다. 또한, 균사체가 성장하여 배지의 영양소가 감소하면 자실체가 발생하기 쉬운 환경으로 변화한다고 한다. 배지중에 질소원이 다량으로 존재하면 자실체발생이 억제되지만, 탄소원, 질소원 모두 완전히 고갈하면 자실체발생이 억제되어, 자실체가 발육이 불량하게 된다. 자실체원기의 형성과 발육에는, 이동가능한 형태의 탄소원 및 질소원이 필요하다. 또한 버섯의 종류에 따라 요구되는 영양원은 조금씩 틀리기 때문에 배지에 쓰이는 재료도 차이가 난다. 배지의 재료를 선택함에 있어 탄소 : 질소의 양이 우선적으로 고려되어야 한다[10].

버섯의 대부분은 발효된 유기물이 퇴적된 곳에서 양분을 흡수 · 이용하여 성장하는 고등 균류의 일종으로 스스로의 양분을 합성할 수 없기 때문에 특수하게 제조된 배지에서 필요한 양분을 흡수하여 균사체가 성장된 후에 생식 생장기로 전화하여 자실체를 형성하게 된다. 그러므로 배지 속에 함유된 영양원의 양적, 질적 상태에 의하여 번식과 생육의 불량 정도가 수확량 및 안정생산을 결정짓는 중요한 요인인 것이다. 특히 느타리, 양송이 등과 같이 균상 재배를 실시하는 버

섯류는 대량의 배지를 제조하기 때문에 배지 제조 과정에서 잘못된 처리는 버섯의 발생과 품질에 직접적으로 영향을 주고 세균, 균류 등과 같은 생물적 원인에 의한 병의 발생을 초래하기도 한다[3,8].

지금까지 버섯의 자실체 성장을 위한 영양요구도에 대한 연구가 오랜 동안 계속되어져 왔다[1,4,11,13]. 이에 반해, 버섯의 형태형성과 특성에 관한 연구로 실험적인 제어를 목적으로 기본배지로부터 유기체를 분리하기 위한 간단한 배지 상에서 시도[6,9]와 온도에 따른 느타리버섯 자실체의 생육 특성 및 미세구조만이 연구되었을 뿐이다[12]. 그러나, 이러한 시도에서도 생리적인 현상에 대한 명확한 해석은 이루어지지 않고 있으며, 균사상태에서의 핵의 분화와 동태에 관한 것들로 자실체에 관한 연구는 거의 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 각각의 배지재료들이 자실체의 형성과 균사의 분화에 어떠한 영향을 미치는지를 구명하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험균주 및 종균제조

본 시험에 사용된 균주는 경기도농업기술원 버섯연구소에서 보유하고 있는 춘추느타리2호를 PDA평판배지에 7일간 배양하고 톱밥과 미강이 80 : 20 (w/w) 비율로 혼합된 배지가 담긴 삼각플라스크에 이식하여 15일간 배양시킨 후 850

*Corresponding author

Tel : +82-31-764-0265, Fax : +82-31-229-6139

E-mail : jycheoul@hanmail.net

ml병으로 30일간 배양하여 종균으로 사용하였다.

배지제조 및 종균접종

본 시험에 사용한 배지는 톱밥배지의 경우 미송톱밥 : 미강을 80 : 20(w/w)의 비율로 혼합하여 사용하였고, 대조구로 사용된 배지는 미송톱밥, 비트펄프, 면실박을 부피비 50 : 30 : 20으로 혼합하여 수분함량을 65%내외로 조절하고 봉지직경 10 cm의 봉지에 배지량은 600 g을 입봉하였다. 배지 입봉 후 배지 중앙부위에 직경 3 cm 정도의 구멍을 뚫은 후 마개를 닫고 121℃에서 90분간 고압살균 후 냉각하여 미리 준비해둔 춘추느타리 2호 종균을 배지량의 무게비율 2%수준으로 접종하였다. 폐면배지의 경우 호기성발효용 파렛트 위에 나이론 망사를 깔고 폐면을 1 m이상의 높이로 쌓은 후 부직포로 피복하고, 충분히 공기가 공급되도록 3일 간격으로 9일간 뒤집기를 실시하며 야외에서 발효시켰다. 발효가 끝난 배지는 직경 10 cm의 봉지에 600 g을 입봉하여 65℃로 저온살균한 후 50℃에서 후발효 시킨 후 춘추느타리 2호 종균을 배지량의 2%수준으로 접종하였다. 벚지배지에 있어서는 벚지의 이삭 부분과 줄기 밑부분을 서로 엇갈려 놓고 벚지단의 직경을 10 cm정도 되도록 묶은 후 침수 하였다. 침수가 끝난 벚지은 과잉의 수분을 제거하기 위하여 1시간 정도 세워 둔 다음 야외에서 벚지단을 15 cm로 절단한 후 직경 10 cm 봉지에 입봉하여 65℃로 저온살균한 후 50℃에서 6일간 후발효 시킨 후 춘추느타리 2호 종균을 배지량의 2%수준으로 접종하였다.

발이 및 생육특성 조사

봉지 바닥까지 균사가 배양되면 뚜껑을 벗기고 온도 15±1℃, 습도 90~95%로 조절하여 버섯 발생을 유도하고 1~2 주기까지 생육조사하였다. 배양일수는 접종 후부터 봉지바닥까지 균사가 자란 봉지가 전체의 80%일 때까지의 소요일수, 초발이소요일수는 뚜껑을 제거하여 입상 후 원기가 고르게 형성된 봉지가 전체의 70%일 때까지의 기간, 생육일수는 초발이소요일부터 첫 수확일까지의 기간으로 나타내었다. 생육특성을 조사하기위해 생육일수, 유효경수, 갓크기, 대굵기, 대길이 등의 자실체 특성과 수량을 조사하였다.

물리적 특성 및 색도 조사

생육이 끝난 자실체의 대로부터 길이 20 mm, 두께 10 mm의 절편을 제작하고, 물성측정기 (SUN RHEO meter, Compac-100D, Japan)를 이용하여 경도 (Hardness), 응집성 (Cohesiveness), 검성 (Gumminess) 등을 측정하였다.

전자현미경 관찰

주사전자현미경용 시험편제작

자실체 수확 직후 갓의 표면, 주름, 대 부위에서 5×5×3

mm의 절편을 만들어 주사전자현미경 시료로 사용하였다. 각각의 절편을 Karnovsky's 고정액에 2시간 전고정한 뒤 0.05 M cacodylate buffer로 10분씩 3회 세척한 다음 1% osmic acid에 1시간 동안 후고정 시켰다. 후고정이 끝난 시험편에 대해 0.05 M cacodylate buffer로 10분씩 3회 수세한 뒤, 50% 알코올용액에서부터 100%용액까지 1시간씩 에탄올 시리즈로 탈수하고 초산 이소아밀용액으로 치환하여 임계점 건조 (HCP-2, Hitachi, Japan)를 실시하였다. 건조가 끝난 시험편을 시료대에 장착한 다음, ion sputter (E-1010, Hitachi, Japan)를 이용해 120초간 금증착을 하고, 주사전자현미경 (S-3000N, Hitachi, Japan)으로 가속전압 15 kV, WD 10 mm에서 관찰하였다.

투과전자현미경용 시험편 제작

갓의 표면, 주름, 대의 부위에서 1×1×3 mm의 절편을 만들고, 주사전자현미경 시험편 제작에 있어서 탈수 시리즈까지 동일하게 처리하였다. 탈수가 끝난 시험편에 대하여 propylene oxide 용액에 30분씩 2회 치환한 다음, EPON 812 포매용매로 서서히 농도를 높이면서 치환시켰다. 100% EPON 용액에 DMP-30 경화제를 1.5%가 되도록 혼합한 뒤 포매판에 시료를 넣어 40℃에서 24시간, 60℃에서 48시간 동안 경화시켜 블록을 제작하였다. 만들어진 블록을 실체현미경으로 관찰하면서 삭정한 다음 Ultramicrotome (Lieca Ultracut UCT, Austria)으로 300 nm의 절편을 제작하였다. 만들어진 절편을 Toluidine blue로 염색하여 광학현미경상에서 관찰하였다. 투과전자현미경으로 관찰하고자 하는 부위를 재조정하여 잘라내고 Ultramicrotome으로 80 nm의 연속된 절편을 제작하였다. Cu-grid (VECO Cu 200, Kkenshoji Co., Japan)에 연속된 절편을 얹어 실온에서 건조시킨 다음, 염색 키트에 담아 2% Uranyl acetate-lead citrate 용액으로 이중염색하고, 실온에서 건조하여 투과전자현미경 (H7500, Hitachi, Japan)으로 80 kV, High resolution mode에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

느타리버섯의 배지종류가 자실체의 특성 및 수량에 미치는 영향

배지종류에 따른 자실체의 특성 및 수량은 Table 1 및 Fig. 1에 나타내었다. 초발이 소요일수는 톱밥배지가 13일로 다른 처리구에 비해 2배 이상 길었다. 일반적으로 버섯이 영양생장에서 생식생장으로 전환되는 주요인으로는 영양결핍, 급격한 환경변화, 기계적인 상처, 화학적 처리 등을 들 수 있는데[5], 20%나 첨가된 미강의 영향으로 균사상태를 유지하기에 호적한 조건이 만들어져 자실체로 전환되는데 오히려 방해요인으로 작용했을 것으로 생각된다.

배지종류에 따른 자실체 특성중 갓의 크기는 큰 차이를

Table 1. Effect of different substrate on the fruit body development and yields of *P. ostreatus* cultivar chunchu No. 2.

Substrate	Primordium induction (days)	Characteristic of fruit body			Yield (g/P.P bag)
		Size of pileus (mm)	Diameter of stipes (mm)	Length of stipes (mm)	
Control ^a	6	35.6	11.2	80.1	265.5
Pine sawdust ^b	13	35.5	9.7	76.8	61.0
Rice straw	6	33.4	10.6	63.9	54.6
Cotton seed pulp	5	36.5	12.4	69.5	127.1

^apine sawdust : beet pulp : cotton seed pomace = 50 : 30 : 20,^bpine sawdust : rice bran = 80 : 20 Fig. 1. Morphological characteristics of *P. ostreatus* cultivar chunchu No. 2 cultivated at different substrate. A: pine sawdust : beet pulp : cotton seed pomace = 50 : 30 : 20, B: pine sawdust : rice bran = 80 : 20, C: Rice straw, D: Cotton seed pulp.

보이지 않으나 대굵기에 있어서는 톱밥 단독처리가 9.7 mm로 다른 처리구에 비해 작게 나타났다. 수량성은 대조구가 265 g으로 다른 처리구의 61 g, 54 g, 127 g보다 수량이 높은 것으로 미루어보아 배지의 혼합비율 및 영양원의 조건이 자실체 조직에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

배지 종류에 따른 느타리자실체 대(stipe)의 물리적 특성

Table 2는 각각의 배지에서 생육한 느타리 자실체의 대부분으로부터 시료를 채취하여 물리적 특성을 조사한 결과이다. 표에서 보는 바와 같이 볏짚과 폐면에서 생육한 느타리의 경도는 대조의 5715.4 g/cm²에 비해 낮게 나타났다. 그러나 톱밥 단독배지에서 생육한 느타리버섯의 경도는 대조에 비해 3배 이상인 17067.3 g/cm²으로 나타나 톱밥이 느타리버섯의 경도를 유지하는데 중요한 재료임을 알 수 있었다. 표에는 나타내지 않았지만 톱밥단독배지의 경우 생육과정 중 배지 자체의 밀도가 상당히 높았고, 배지에 첨가된 미강이 영양생장에서 생식생장으로의 전환에 방해가 되었을 것으로 생각된다.

Table 2. Effect of different substrate on the physical characteristics of fruit bodies of *P. ostreatus* cultivar chunchu No. 2.

Substrate	Hardness (g/cm ²)	Cohesiveness (%)	Gumminess (g)
Control ^a	5715.4	58.5	836.4
Pine sawdust ^b	17067.3	73.7	471.3
Rice straw	2113.6	73.9	380.4
Cotton seed pulp	2851.9	67.5	469.7

^apine sawdust : beet pulp : cotton seed pomace = 50 : 30 : 20,^bpine sawdust : rice bran = 80 : 20

배지재료에 따른 느타리버섯 자실체의 미세구조

Fig. 2는 배지재료에 따른 느타리버섯 자실체의 갓부위를 비교한 사진이다. 그림에서 볼 수 있듯이 대조구와 톱밥배지의 경우 갓부위의 균사상태는 큰 차이를 보이지 않지만, 톱밥배지의 경우 대조구에서 볼 수 있는 균사막(hyal sheet)이 관찰되지 않았으며, 다른 자실체의 주름으로부터 비산된 담자포자가 갓부위에 대량으로 떨어져 있는 것이 관찰되었다. 볏짚배지에서 생육된 느타리자실체의 갓부위에는 다른 처리

Fig. 2. Scanning electron micrographs of pileus surface of fruit body grown at different substrate. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

와는 달리 갯낭상체가 관찰되었는데(Fig. 2C), 이 낭상체(pileocystidia)는 포자를 형성하지 않는 자실체의 말단세포로서 수분 및 휘발성물질의 증발을 돕고, 주름부분을 지지하는 역할과 공기의 통풍구로서의 역할을 담당하는 세포로 알려져 있다[2]. 폐면에서 생육한 느타리자실체의 갯의 노화가 다른 처리구에 비해 빠른 편이었다(Fig 2D). 갯의 두께를 나타내는 갯의 능 부분에서는 큰 차이를 나타내지 않으나(Fig. 3A~3D), 주름부위에서 톱밥 및 폐면에서 생육시킨 느타리자실체의 담자기의 자가분해 및 담자포자의 비산이 빠른 것이 관찰되었다. 폐면에서 생육시킨 느타리자실체의 담자기에서도 담자기의 자가분해가 확인 되었으나, 다른 처리에 비해 담자기의 형성 수가 상대적으로 적은 편이다(Fig. 4A~4D). Fig. 5는 각각의 배지에서 생육시킨 느타리자실체의 대부위를 관찰한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 각각 다른

Fig. 3. Scanning electron micrographs of margin of pileus of fruit body grown at different substrate. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

Fig. 4. Scanning electron micrographs of margin of gill of fruit body grown at different substrate. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

형태의 균사밀도 및 배열을 나타내고 있는데, 병재배에서 볼 수 있었던 그물구조의 균사배열은 확인 할 수 없었다[12]. 그러나 균사의 다발과 결합균사의 배열이 규칙으로 배열되어 있다. 대의 발달보다는 갯의 발달이 두드러졌던 톱밥배지에 있어서는(Fig. 5B) 두꺼운 균사다발층이 전체적으로 대표면을 덮고 있는 것이 확인 되었다. 이러한 균사다발층이 대의 경도를 높이는 원인으로 작용했을 것으로 판단된다. 벚짚과 폐면에서 생육시킨 느타리자실체의 대부위는 주름의 부위가 대에 까지 이어지는 전형적인 내린주름의 형태로 대부위에서 주름부위에서 볼 수 있는 낭상체가 관찰되었다.

배지재료에 따른 느타리버섯 자실체의 세포학적 특성

Fig. 6은 톱밥, 벚짚, 폐면에서 생육시킨 느타리버섯 자실체의 단면을 투과전자현미경으로 관찰한 사진이다. Fig. 6A에서 보는 바와 같이 대조구에서는 풍부한 세포질 물질을 갖는 균사들이 관찰되었으며, 일부 균사에서 액포화되어 있는 경향으로 나타나 세포의 노화가 진행됨을 알 수 있었다[7]. 또한 톱밥에서 생육시킨 느타리자실체의 균사는 다른 처리에 비해 착색이 많이 되어 있는 균사의 발달이 두드러졌다(Fig. 6B). 폐면에서 생육시킨 느타리자실체의 균사의 크기는 대조구나 톱밥에서 생육시킨 것에 비해 크기가 큰 편이나 액포화하는 경향이였다. Fig. 6E~6H는 각각의 배지에서 생육시킨 느타리자실체의 균사의 세포벽을 관찰한 사진이다. Fig. 6F에서 보는 바와 같이 톱밥에서 생육시킨 자실체의 균사의 세포벽이 가장 두꺼웠으며 폐면, 벚짚, 대조구 순으로 세포벽이 두꺼웠다. 배지에 따라 자실체를 형성하는 균사간의 미세구조는 세포질 물질에서 차이를 보이고 있다. 배지에 느타리버섯 자실체의 생육에 미치는 영향은 액포화된 균사에서 세포질물질이 적게 발달하고 배지에 따라 그 정도에 차

Fig. 5. Scanning electron micrographs of stipe surface of fruit body grown at different substrate. Abbreviations are the same as in Fig. 1. A small letter, a and b, showed the partially enlarged picture.

Fig. 6. Transmission electron micrographs of stipes grown at different substrate. Micrograph. A,E: pine sawdust : beet pulp : cotton seed pomace = 50 : 30 : 20, B,F; pine sawdust : rice bran = 80 : 20, C,G: Rice straw, D,H: Cotton seed pulp.

이를 보이는 것으로 보아 형태보다는 세포질 형성쪽에 영향이 더 큰 것으로 생각된다. 이러한 생리적인 차이는 아직 잘 알려져 있지 않고 기질에 따라 균사의 분화에 차이를 보인 명확한 해답은 찾기 어렵기 때문에 각각의 배지의 성분과 생리적인 특징들에 대해서 다른 측면에서 접근하여 재검토가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

느타리버섯 자실체의 형성과정에서 생육 및 미세구조에 미치는 배지기질의 영향을 검토한 결과, 배지의 종류에 따른 초발이소요일수는 폐면이 5일로 가장 빨랐고 벧짚은 대조와 같이 6일이었다. 벧짚과 폐면에서 생육한 느타리의 경도는 대조의 5715.4 g/cm^2 에 비해 1/2정도로 낮게 나타났으나 톱밥 단독배지에서 생육한 느타리의 경도는 17067.3 g/cm^2 으로 3배이상의 높은 경도를 나타내어 톱밥이 느타리버섯의 경도에 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 배지별 느타리자실체의 갓부위를 관찰한 결과, 톱밥배지의 경우 다른 자실체의 주름으로부터 비산된 담자포자들이 대량으로 떨어져 있는 것이 관찰되었으며, 벧짚배지의 경우 갓낭상체의 발달이 관찰되었으며 폐면에서 생육한 자실체의 갓의 균사의 노화가 다른 처리에 비해 빠르게 진행되어 있는 것이 관찰되었다. 또한, 톱밥 및 폐면에서 생육시킨 느타리자실체의 담자기의 자가분해 및 담자포자 비산이 빠르게 진행되었음을 확인하였다. 톱밥배지에서 생육시킨 느타리자실체의 대부위의 균사의 생육상태는 두꺼운 균사다발이 대부위 전체를 피복한 듯한 형태가 관찰되어 이러한 균사다발층이 대의 경도를 높

이는 요인으로 작용했을 것으로 판단되며, 대조구에서는 풍부한 세포질 물질을 갖는 균사들이 관찰된데 반해, 톱밥에서 생육시킨 느타리자실체의 균사는 다른 처리에 비해 착색이 많이 되어 있는 균사와 액포화된 균사의 발달이 두드러짐을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Chang, S. T. and P. G. Miles. 1989. *Mushroom Science : Edible mushrooms and their cultivation*, pp. 3-25, CRC Press, Inc., New York.
2. David, L. L. 1986. How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features, Mad River Press, Inc., 71-72.
3. Go, S. J., D. Y. Cha and J. G. H. Wessels. 1992. Symptoms of virus infected oyster mushroom, *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* **20**, 229-233.
4. Hong, B. S., S. J. Kim, C. H. Song, S. Y. Hwang and H. C. Yang. 1992. Development of substrate and cultural method for the cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. *Kor. Mycol.* **20(4)**, 354-359.
5. Hurukawa, H. 1992. *Mushroom Science*, Kyouritzu press. 103-106 (in Japanese).
6. Moore, D. 1998. Tolerance of imprecision in fungal morphogenesis. In L. J. L. D. Van Griensven and Visser (ed.) *Proceedings of the Fourth Conference on the Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes*: pp. 13-19, Horst, The Netherlands: The Mushroom Experimental Station.
7. Rokuo, U. 1979. *Fermentation and technology*. 137(6), 534-548 (in Japanese).
8. Samuels, G. J., S. L. Dodd, W. Gams, L. A. Castlebury and O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with

- the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **94**(1), 46-170.
9. Sanchez, C. 2000. Science and cultivation of edible fungi, Van Gnesven(ed.) Cultivation substrate determines hyphal ultrastructure during development of *Pleurotus pulmonarius* fruit bodies. Balkema, Rotterdam.
 10. Seo, G. S. 2004. Effect of environment on the mycelial growth and fruit body development of *Basidiomycetes*. Monthly Mushroom. **9**, 84-86 (in Korean)-5.
 11. Shin, G. C., S. M. Cho, N. N. Jeon and J. H. Ku. 1994. Effect of sodium hypochlorite(NaOCl) treatment on bacterial yellow blotch in oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Kor. Mycol.* **22**(2), 190-195.
 12. Yoon, S. M., Y. C. Ju, G. S. Seo and J. H. Chi. 2006. Effect of temperature on the growth and microstructure of fruit body in the *Basidiomycetes*, *Pleurotus ostreatus*. *J. Life Sci.* **16**(2), 225-230.
 13. Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus* : The biology and cultivation of edible mushrooms, Eds. S. T. Chang and W. A. Hayes, pp. 521-554. Academic Press. New York.