

버섯 종균 기능사 실기시험 예제 1

1. (작업형) 톱밥종균배지 + 곡립종균배지 제조 (25분)
2. (작업형) 물한천배지(증류수한천배지) + 감자한천(PDA)배지 (25분)
3. 배지 재료 구분하기 (5분)
4. 배지의 오염 여부 판별하기 (5분)
 - 정상(우량), 미숙, 노화, 잡균발생

버섯 종균 기능사 실기시험 예제 2

1. (작업형) 클린벤치 사용 방법에 따른 작업 (오염되지 않도록 작업)
 - 1) 포자 수집 작업 (5분)
 - 2) 조직 분리 작업 (5분)
 - 3) 원균 이식 작업 (5분) (사면배지 시험관에서 사면배지 시험관으로)
 - 4) 시험관 분주 작업 (5분)
2. (작업형) 톱밥 배지 제조 및 살균 (20분)
3. 배지 재료 명칭 기재하기 (10분)
4. 버섯 정식 명칭 기재하기 (10분)

버섯균의 배양에 필요한 기구

1. 현미경(Microscope)
2. 고압살균기(Autoclave) → 배지 살균
3. 무균작업대(Clean Bench) → 균을 접종할 때 무균 환경 유지
4. 배양기(BOD Incubator) → 접종된 균을 배양, 보통 항온기(자연대류식)
5. 저온 보관고 또는 냉장고 → 균을 보관
6. 진탕기(교반기) → 액체배지 증식 배양
7. Waring Blender와 균질기(Homogenizer) 등 → 무균적으로 균을 갈아서 크기를 같게 하는 기기. 액체 배양할 때 또는 접종으로 사용되는 버섯균을 제조할 때 사용.
8. 초자류
 - 시험관(Test Tube)
 - 샤레(Petri Dish),
 - 이식기구 : 백금선(needle), 백금구(hook), 백금이(loop)
 - 피펫, 메스실린더, 삼각플라스크, 비이커, 피펫(Pipet)



고압살균기



무균작업대



배양기



진탕기



균질기

실험기구 살균법

1. 건열살균

→ 130~140°C에서 3~4시간, 160~180°C에서 0.5~1시간

2. 습열살균

1) 고압증기살균 → 배양 배지 살균에 주로 사용함. 121°C, 15~30분. 톱밥과 퇴비는 온도 도달 후 15~30분.

2) 상압살균 → 100°C 도달 후 5~8시간

3. 약품에 의한 살균

→ 70% 에탄올(손 소독, 실험기구 소독). 완전 살균 안 됨.

4. 화염 살균

→ 금속 기구나 시험관 입구를 알코올 램프 불꽃에 살균

5. 자외선 살균

→ 자외선 램프를 이용하여 공기, 물, 기구 표면을 살균

천연배지 제조법 / 감자배지

❖ 제조 순서

1. 감자를 씻고 껍질을 벗기고, 눈도 제거
2. 사방 1cm 크기로 자르고, **200g/L** 를 만든다.
3. 삼각플라스크(또는 용기)에 **증류수**(또는 수돗물) **1L** 채운다.
4. 감자를 넣고 30분 ~ 1시간 열을 가하여 전분을 추출한다.
5. 거즈(2~3겹)나 광목천으로 여과하여 별도 용기에 담는다.
6. 여과된 액체가 1L가 되도록 증류수(또는 수돗물) 보충한다.
7. **덱스트로스(또는 설탕) 20g, 한천 20g**을 넣는다.
8. 다시 끓여서 한천이 완전히 녹을 때까지 가열한다.
9. 분주기로 시험관에 적당량(10~15mL) 분주한다. → **실리스토퍼**로 막고 **알루미늄 호일**을 씌운다.
10. 고압살균(121℃, 15~20분) 후 굳기 전에 시험관인 경우 비스듬(15°)하게 사면시킨다.

- ① 감자 200g + 물 1L
- ② 전분 추출 후
- ③ 물 추가해서 1L에 맞추고
- ④ 덱스트로스(설탕) 20g
- ⑤ 한천(Agar) 20g

합성배지 제조법

- 감자한천배지(PDA, Potato Dextrose Agar) → 39g/L (대략 4%)
- 감자액체배지(PDB, Potato Dextrose Broth) → 24g/L (2.4%)
- 증류수한천배지(물한천배지) → 한천(Agar) 15~20g/L (2%)

❖ 제조 순서

1. 시약 개량 → 저울에 유산지 놓고, 영점 조정하고, 계량
2. 개량한 시약을 삼각플라스크(또는 비이커)에 넣는다.
3. 증류수를 메스실린더로 계량해서 넣는다.
4. 시약스푼이나 유리막대로 잘 섞어준다.
5. 가열하고 녹여준다. → Hot Plate, 전자레인지
6. 분주기로 분주한다. → 시험관 또는 샤퐀, 입구에 묻지 않도록 주의
7. 시험관을 실리스토퍼로 막는다. → 알미늄 호일 씌운다.
8. 고압 살균 → 121°C, 15~20분
9. 경사지게 놓고 냉각시키면서 굳힌다. → 1~1.5cm 나무나 유리봉 이용해서 사면배지 만든다.



PDA 분말



PDB 분말



Agar 분말

합성배지

- PDA

- ✓ 버섯 원균(느타리, 표고)의 증식을 위한 배지

- ✓ PDA 39g/L + 물 1L

- 퇴비추출배지

- ✓ 양송이의 원균 증식용

- 증류수한천배지

- ✓ 포자 발아용 배지

- ✓ 한천(Agar) 15~20g/L + 물 1L

- 버섯최소배지

- ✓ 돌연변이 균주용 배지

액체배지 제조법

- 천연배지나 합성배지에 **한천(Agar)**을 넣지 않고 조제한 것.

❖ 제조 순서

1. 메스실린더로 증류수를 계량하여 삼각플라스크에 넣는다.
2. 배지 성분을 넣고 가열 교반하면서 용해시킨다.
3. 배양 용기에 분주하고 실리스토퍼로 막는다. → 용기의 60% 정도로 분주.(1L용기에 600mL)
4. 고압 살균 → 121°C, 15~20분
5. 살균 후, 비타민과 같은 열에 약한 영양원을 첨가한다.

톱밥배지 제조법

1. 톱밥준비 → 벌채 후 1개월 방치하여 페놀 성분 방산 시킨 것.(침엽수는 0.5~1년)
2. 메쉬체(3~5mm체)로 걸러서 큰 입자를 제거한다.
3. 혼합 비율 계량하고 혼합한다. → **톱밥 : 영양원 = 4:1 (8:2)**
4. 물 첨가하여 혼합 → **수분 65%** (손으로 짰을 때 물이 스며 나오는 정도)
5. 삼각플라스크에 넣고 다져준다. → 뒤집어도 쏟아지지 않을 정도로. 1/3 채울 때 마다 다져준다.
6. 한 가운데 바닥까지 구멍을 만들어준다. → 1.5~2cm 직경의 천공막대 이용
→ **(목적)** 통풍, 입병 바닥까지 균형 있는 균사 성장, 배양기간 단축
7. 플라스크 입구를 깨끗이 씻고 실리스토퍼로 막는다. → 배지에 물이 들어가지 않게 씻는다.
→ 실리스토퍼는 2/3 깊이를 넣고, 1/3 이 밖으로 나오게 한다.
→ 알루미늄 호일을 덮어준다.
8. 고압살균 → **121°C, 40~90분**

곡립종균배지 제조법

1. 밀을 1차 물로 세척
 - 끓는 물에 침지하거나 수증기로 찌서 수분함량 45~50%로 조절
 - 시험장에서는 침지할 때 밀이 물에 잠길 정도로 물을 넣어준다.
2. 밀의 수분을 제거한 후 석고(황산칼슘, CaSO_4)와 석회(탄산칼슘, CaCO_3)를 첨가한다.
 - 밀 : 석고 : 탄산칼슘 = 100 : 2 : 1 (g)
 - 석고 : 배지 내의 수분 조절, 곡립의 결착 방지 목적.
 - 석회 : 산도(pH) 조절 목적.(pH 6.2~6.8이 최적)
 - 석고와 탄산칼슘은 미리 잘 섞은 후에 곡립과 혼합.
3. 잘 섞어서, 1L 병에 750~800cc 입병한 후 휴지로 입구와 외부를 닦고, 실리스토퍼를 씌운다.
 - **흔들기 작업** : 덩어리를 낱개로 분리되도록 하고, 균사가 생장된 곡립이 배지 전체에 고르게 혼합되도록 섞어준다. 흔들기 후에 4~6일 후면 다시 균사가 생장하여 엉키므로, 배양 기간 중 3~4회 실시한다.
4. 121°C 40~90분간 살균 후 냉각
5. 무균실로 옮겨 접종원을 1~2스푼 접종한다.

증류수한천배지(물한천배지) 제조

✓ 물 : 한천 = 100 : 2, 즉 물 100g에 한천 2g, 물 1000g에 한천 20g.

1. 메스실린더에 문제에 주어진 양만큼 증류수 계량해서 비이커(or 삼각플라스크)에 담는다.
→ 메스실린더를 책상 바닥에 놓고, 눈 높이를 눈금의 높이와 수평으로 잘 보고 맞춰야 함.
→ 120ml, 140ml, 160ml 이런 식으로 문제 출제됨.
2. 유산지를 대각선으로 두 번 접고, 저울에 올리고 영점 조정
3. 한천 계량 (물 무게의 2%)
→ 물 120ml(120g)라면, 한천 2.4g
4. 비이커(or 삼각플라스크)에 있는 물에 한천 넣고 잘 섞는다. (시험장에서는 끓이는 과정은 생략)
5. 피펫으로 시험관에 분주한다.
→ ex. 12ml
6. 실리스토퍼를 막고 알루미늄 호일로 덮어서 살균한다. (시험장에서는 생략)
→ 고압 살균 121°C, 15~20분
7. 사면한다.
→ 15° 경사
→ (목적) 균사 생성 면적을 넓게 하여 많은 균을 확보하기 위함.

톱밥배지 재료 구분하기

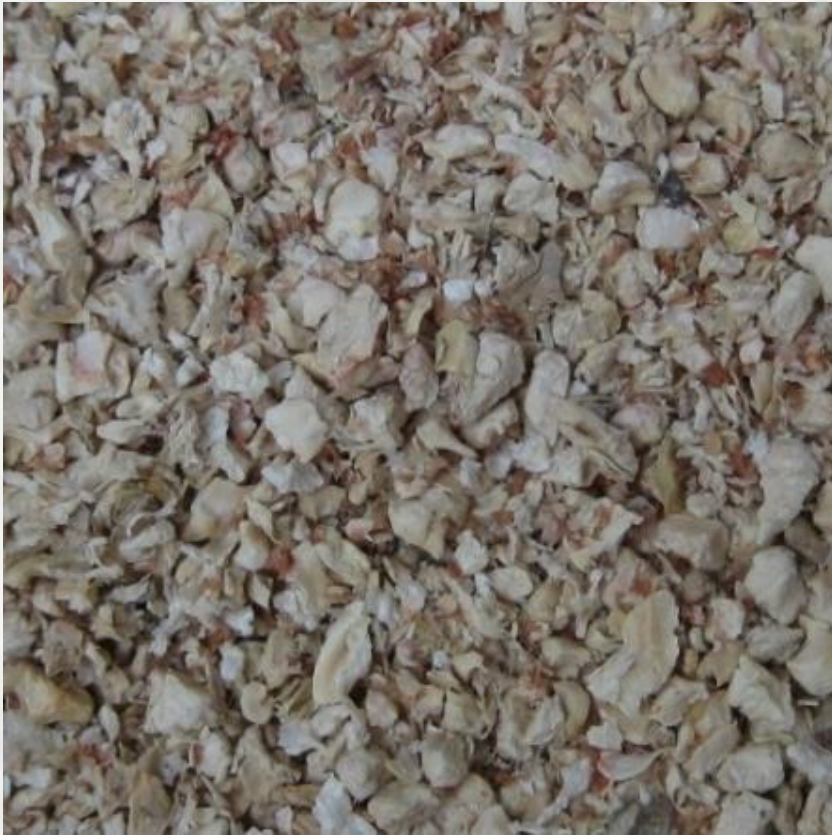


포플러(미루나무) 톱밥
옅은 색의 톱밥



참나무 톱밥

톱밥배지 재료 구분하기



콘코브 (Corn Cob)
→ 옥수수 대 분쇄/압축한 것



비트 펄프 (Beet Pulp)
→ 사탕무를 압축 분쇄한 것

툽뵡뵡지 재로 구분하기



밀기울
→ 밀 껍질



면싯피
→ 목화씨의 겉껍질

톱밥배지 재료 구분하기



미강
→ 쌀의 속겨



면실박 (Cotton Seed Meal)
→ 목화의 씨에서 기름을
짜내고 남은 찌꺼기

톱밥배지 재료 구분하기



미송 톱밥
→ 붉은색 기운을 띠

균 분리 방법

1. 포자수집법

✓ 자실체의 담자포자, 자낭포자에서 포자를 수집하는 방법. 신선하고 약간 어린 자실체를 사용.

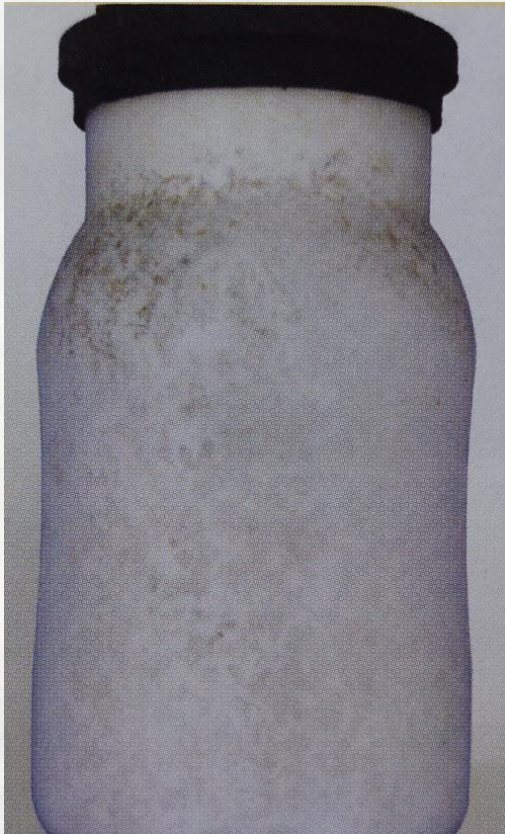
- 1) 재료 준비
- 2) 도구 화염살균
- 3) 거치대 화염 살균
- 4) 갓과 대의 접합부 절단 (바닥에 내려 놓으면 안 됨)
- 5) 거치대에 버섯갓을 올려 둔다. (거치대는 살레에 11자로 걸친다. 버섯갓은 아래로 향하게)
- 6) 뚜껑을 덮어준다. (바람의 영향 차단. **15~20°C에서 6~15시간**)

2. 조직분리법

✓ 자실체 조직에서 직접 분리하는 방법. 어리고 신선하고 청결한 것을 채집.

- 1) 재료 준비 (배지는 시험관 사면배지나 살레 평판배지 사용)
- 2) 도구 화염살균 (자실체 표면은 무균상에서 자외선 살균)
- 3) 버섯에 세로로 칼집을 내고, 세로로 가른다.
- 4) 갓과 대가 만나는 부위의 조직을 자른다. (**사방 3~5mm, 두께 2~3mm**)
- 5) 자른 조직을 백금구(hook)로 옮긴다.
- 6) 조직을 배지 중앙 부위에 접종한다.
- 7) 수평을 유지하며 밀봉한다. (시험관은 마개로 막고, 살레는 파라필름 등으로 밀봉)
- 8) 균사가 자라면, 오염 없는 것을 선택하여, 새로운 한천배지에 재분리하여 2~3회 반복 배양

종균 사진 판별하기 / 배지 오염 여부 판별



정상(우량) 종균
→ 전체적으로 흰색
균사가 생장

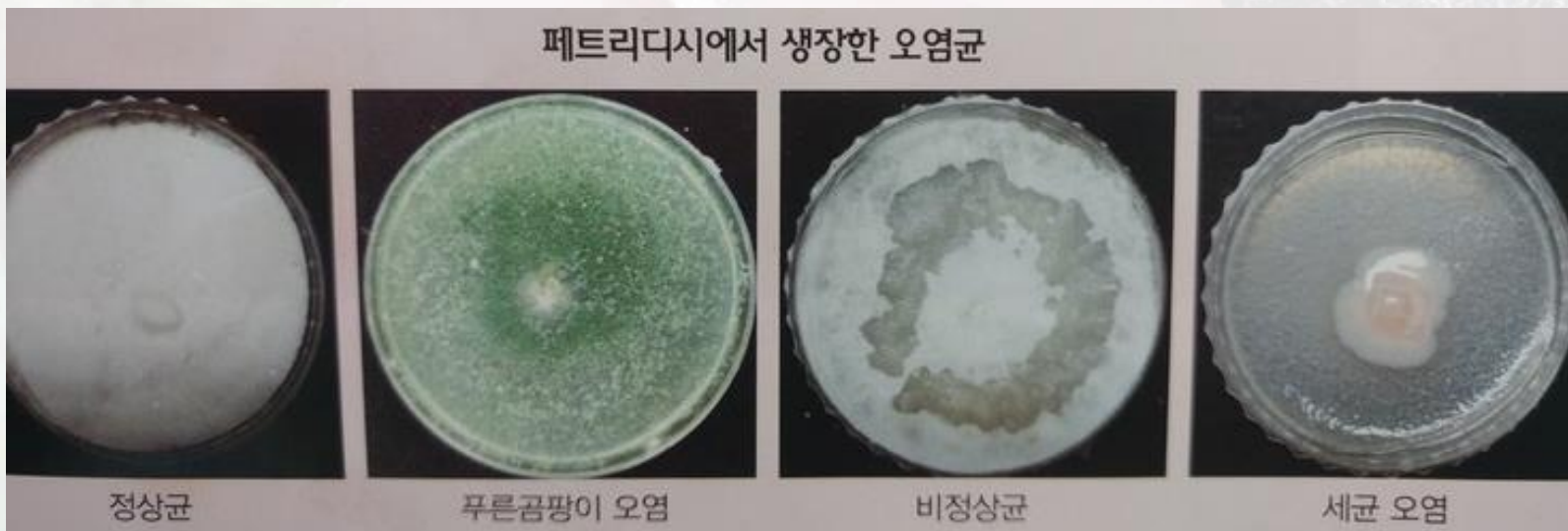


미숙 종균
→ 흰색 균사가
전체적으로 생장하지
못 함



잡균 발생 종균
→ 잡균 발생으로
얼룩덜룩 함.

종균 사진 판별하기 / 배지 오염 여부 판별



버섯의 종류 (일부만 정리함)



표고



새송이 (큰느타리)



목이



불로초 (영지)



양송이



노루궁뎅이

버섯의 종류 (일부만 정리함)



목질열대구멍버섯(상항)



느타리



말굽버섯



능이



송이



동충하초