

세균을 이용한 수확후배지의 총질소 및 아미노산 증진 효과

백일선* · 김정환 · 이용선 · 신복음 · 이영순

경기도농업기술원 버섯연구소

Improvement effect of total nitrogen and amino acid content in spent mushroom substrates by bacterial treatment

Il-Sun Baek*, Jeong-Han Kim, Yong-Seon Lee, Bok-Eum Shin, and Young-Soon Lee

Mushroom Research Institute, Gyeonggi-do Agricultural Research & Extension Services, Gwangju 12805, Korea

ABSTRACT: This study was conducted to reuse spent mushroom substrates (SMS) of *Pleurotus ostreatus* and improve their nitrogen content by bacterial treatment. Two kinds of bacteria were used to investigate the increase in total nitrogen (T-N) content. *Bacillus* sp. (GM20-4) was isolated from SMS of oyster mushroom, and *Rhodobacter sphaeroides* (RS) was obtained from Gwangju Si Agricultural Technology Center. SMS samples were collected from three oyster mushroom cultivation farms located in Gyeonggi-do province, Korea. When dried SMS was inoculated with 30% culture broth of GM20-4 and RS and incubated at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) for 5 days, T-N content increased. To investigate the T-N content of other SMS, three dried SMS samples (A, B, and C) were treated by the same method using GM20-4 and RS. As a result, the T-N content of sample B was 20% higher than that of the control, whereas the T-N content of samples A and C increased to 17% and 12%, respectively. The change in T-N content by bacterial treatment of wet SMS was slightly higher than that of the control. The changes in amino acid content were also found to be higher than those in the control in all SMS samples by GM20-4 and RS treatment. Aspartic acid and glutamic acid contents were the highest among all amino acid compositions. Especially, the aspartic and glutamic acid contents of sample B increased by 2.9 folds higher than the control.

KEYWORDS: Amino acid, *Bacillus* sp.(GM20-4), *Rhodobacter sphaeroides* (RS), Spent mushroom substrates (SMS), Total nitrogen (T-N)

서 론

버섯 생산량은 재배기술 발달로 매년 증가하고 있으며 그에 따라 발생하는 버섯 수확후배지도 지속적으로 증가하고 있다. 버섯 수확후배지(spent mushroom substrates ; SMS)란 식용 가능한 버섯을 수확한 후 남겨진 배지를 말

하며, 느타리, 큰느타리, 팽이를 비롯하여 연간 167만톤의 수확후배지가 발생된다(Lee *et al.*, 2018). 그 중 느타리 수확후배지의 생산량은 연간 147(M/T)에 달하며 경기도에서 생산되는 양은 107(M/T)에 달한다.

버섯 배지는 톱밥, 비트펄프, 콘코브, 미강 등 농업가공 부산물이 주요 재료로 버섯균에 의해 1차 분해가 이루어지고(Moon *et al.*, 2012), 버섯이 생산되기까지 배지성분의 약 20~25%정도만 이용되기 때문에 수확 후 생산되는 배지는 영양가치가 높아 가축사료용 및 작물 퇴비로 사용되고 있다(Williams *et al.*, 2001). 또한 버섯 균사체가 분비한 생리활성물질을 다량 함유하고 있어 재활용 가치가 크다. 팽이 및 큰느타리버섯의 수확후배지는 톱밥 함량이 낮고 콘코브, 미강, 밀기울 등 사료원료로 사용되는 배지 원료의 함량이 높아 가축사료화로 재활용이 가능하지만, 느타리에서 생산되는 수확후배지는 톱밥의 함량이 높아 사료용으로 사용되기 어려워 그 재활용 빈도가 낮은 실정이다. 또한 60% 이상의 수분 함량을 가지고 있어 기온이 높은 여름철에는 부패가 쉽고(Kwak *et al.*, 2008) 침출수가 발생해 환경오염의 원인이 되기도 한다.

J. Mushrooms 2018 September, 16(3):225-230
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2018.16.3.225>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
 E-mail : bisun@gg.go.kr
 Tel : +82-31-229-6123

Received September 3, 2018
 Revised September 14, 2018
 Accepted September 19, 2018

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.

따라서 사료용으로 사용되기 어려운 느타리 수확 후 배지를 재활용하여 느타리 재배에 이용할 수 있다면 버섯농가의 배지 구입비용 절감에 기여할 뿐 아니라 환경오염을 저감할 수 있는 친환경적인 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 미생물 접종에 의한 질소원이 증진된 느타리 수확후배지의 재활용 가능성에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

수확후배지 수집

본 연구에 사용한 수확후배지는 경기도농업기술원 버섯연구소, 안성 1농가, 여주 2농가에서 수집한 느타리버섯 수확후배지를 사용하였다. 농가에서 수거한 배지는 농가별로 생배지 및 건조배지를 구분하여 사용하였으며 건조배지는 4일간 자연 건조하여 사용하였다.

시험균주 및 배양조건

수확후배지에 혼합한 미생물은 느타리 수확후배지로부터 분리한 균주 *Bacillus* sp. GM20-4와 경기도 광주시농업기술센터로부터 분양 받은 *Rhodobacter sphaeroides* (RS)를 사용하였다. GM20-4는 LB(Luria-Bertani) 또는 TSB(Tryptic soy broth)배지를 이용하여 30°C, 24시간 배양하였고 RS는 LB배지, 32°C에서 48시간 배양하였으며, 배양후 LB 배지에 희석평판법으로 도말하여 살아있는 균수를 측정하여 각각 GM20-4 10⁸ cfu/ml, RS는 10⁹ cfu/ml의 농도로 사용하였다.

수확후배지 미생물 처리조건 설정

미생물 첨가량 및 처리기간 설정을 위해 경기도농업기술원 버섯연구소로부터 수집한 수확후배지를 건조하여 사용하였으며 배지무게의 10, 30, 50%의 농도로 GM20-4, RS를 단일 혹은 혼합 처리하였으며 혼합 후 밀봉하여 상온(20~25°C)에서 15일간 배양하였다. 수확후배지 내 미생물의 증식을 위하여 당밀을 무게비의 3% 농도로 혼합 첨가하였다. 성분분석을 위하여 5일 간격으로 샘플링하여 121°C, 15분 동안 고압 멸균하였으며, 80°C에서 2일간 건조하여 분석시료로 사용하였다.

농가 수집 수확후배지 미생물 처리

생배지 및 건배지의 무게의 30%의 농도로 GM20-4와

RS를 혼합 처리하였으며 혼합 후 밀봉하여 상온(25±2°C)에서 5일간 배양하였다. 수확후배지 내 미생물의 증식을 위하여 당밀을 무게비의 3% 농도로 혼합 첨가하였다. 성분분석을 위하여 처리 후 0일, 5일차에 샘플링하여 121°C에서 15분 동안 고압 멸균하였으며, 80°C에서 2일간 건조하여 분석시료로 사용하였다.

수확후배지 성분 분석

수확후배지 수분함량은 건조 후 건조중량법으로 측정하였으며, pH는 건조배지 : 증류수를 1:10의 무게비로 혼합 후 1시간동안 정치 한 후 pH meter(Mettler toledo)로 측정하였다. 샘플링 된 배지의 T-N, T-C 분석을 위해 80°C에서 2일간 건조 후 분쇄기로 분쇄한 후 3 mg씩 정확하게 무게를 측정하여 CN elemental analyzer(Elementar) 자동분석기를 이용해 C와 N함량 및 조단백 함량을 정량 분석하였다.

수확후배지 아미노산 분석

미생물 처리된 느타리 수확후배지의 아미노산 함량 분석을 위해 아미노산 자동분석기(Hitachi, L-8800)로 아미노산 함량을 구하였다(Daniel *et al.*, 1993). 건조시료 0.1 g를 6N HCl 용액 25 mL를 가한 후 시험관은 밀봉해 110°C에서 24시간 가수분해 시켰다. 가수분해로 얻은 여액을 원심분리 후 상등액에 증류수 10 mL를 가하여 60°C에서 20 mM HCl을 사용하여 25 mL로 정용하였다. 정용한 여액을 0.2 um membrane filter로 여과 후 여액을 취하여 구성아미노산 분석에 사용하였다.

결과 및 고찰

수집한 수확후배지의 C/N 및 배지조성

느타리버섯 재배 세 농가(A~C)에서 수집한 수확후배지의 T-C, T-N, C/N 및 pH 분석 결과 T-C는 47.4~47.8%로 차이가 없었으며, T-N 함량은 1.46~1.84%로 농가별로 다소 차이가 있었으며 이는 배지원재료의 첨가량과 종류에 따른 차이로 보여 진다. pH도 4.8~4.9로 세농가 간에 차이가 없었다(Table 1).

시험균주 배양

GM20-4는 수확후배지로부터 분리된 균주로 *Bacillus*

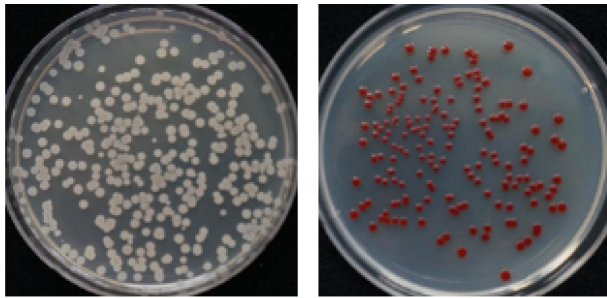
Table 1. Chemical properties and substrate composition in the spent mushroom substrates(SMS) collected from three oyster mushroom cultivation farms

Sample SMS	T-C (%)	T-N (%)	C/N	pH (10:1)	Substrate composition
A	47.5	1.84	25.8	4.9	poplar sawdust + beet pulp + kapok seed meal + cottonseed meal
B	47.4	1.46	32.5	4.8	poplar sawdust + beet pulp + kapok seed meal
C	47.8	1.62	29.5	4.9	poplar sawdust + beet pulp + cottonseed meal + cottonseed hull

Table 2. Cultivation condition of the two bacteria used in the spent mushroom substrates(SMS)

Bacteria ^a	Temperature (°C)	pH	Growth times (hr)	Media	Aeration (vvm/l/min)	Light	Living cell numbers (cfu/ml)
GM20-4	28~32	7	18~24	LB, TSB	0~0.2	-	10 ⁸
RS	30~35	6~7	48~60	LB	0.5	3~6um (300~680lux)	10 ⁹

^a GM20-4 : *Bacillus* sp., RS : *Rhodobacter sphaeroides*.
 - : do not needed.



Bacillus sp. GM20-4 *Rhodobacter sphaeroides*

Fig. 1. Colony morphology of the bacteria used in this study.

sp.이며, 적합배양 온도는 30°C, pH7, 적합배지로는 LB 또는 TSB 배지에서 24시간 배양으로 약 10⁸ cfu/ml의 생균수를 얻었으며, RS(*Rhodobacter sphaeroides*)는 LB배지, 32°C, pH6~7, 약0.5vvm의 aeration과 500Lux의 광을 사용하여 48시간 배양으로 10⁹ cfu/ml의 생균수를 얻었다 (Table 2). 두 미생물의 colony 형태는 Fig. 1.과 같다.

미생물 첨가량 및 처리 기간에 따른 수확후배지의 T-N 변화

시험처리는 건조된 수확후배지 2 kg를 사용하였으며 무

처리구에는 수돗물을 배지무게의 1.5배(3 L) 첨가하였으며, 처리구에는 미생물을 각각 10%, 30% 50%로 단일 혹은 혼용하여 첨가하였다. 처리구에는 무처리구의 첨가된 수돗물의 양을 기준으로 미생물과 함께 수돗물을 첨가하여 15일 동안 상온(25°C)에서 보관하여 0, 5, 10, 15일차에 샘플링을 실시하였다. 당밀은 모든 처리구 및 무처리구 무게비의 3% 농도로 첨가하였다. 분석을 위한 샘플은 121°C, 20분간 살균 후 80°C에서 2일간 열풍 건조하여 분쇄기로 분쇄 후 T-N 함량을 측정하였다. 미생물 단일처리에서는 GM20-4 50%가 첨가된 D-SMS + GM20-4 50%의 5일차에서 3.07%로 무처리구 2.54%보다 21%p로 T-N 함량이 가장 크게 증가하였지만 D-SMS + GM20-4 30%의 5일처리시의 T-N함량 3.05%와 차이가 없었으며, 혼합 처리에서는 D-SMS + GM20-4 50% + RS 50%에서 3.16%로 T-N함량이 가장 높았지만 GM20-4 30% + RS 30%에서의 T-N 함량과 차이가 없었다. 미생물 혼합처리와 단일처리를 비교하면 단일처리보다 혼합처리시 질소원 증진 효율이 더 높은 결과를 보였다. 따라서 질소원 증진을 위한 미생물은 GM20-4와 RS를 혼합 처리하여 사용하는 것이 적합하며 그 양은 각각 배지량의 30% 비율로 첨가하여 5일간 처리 시 T-N함량을 증진시키는 것으로 조사되었다(Table 3).

Table 3. Change of T-N content according to the addition amount of bacteria and treatment days in dried SMS

Treatment ^a	T-N (%/days)			
	0	5	10	15
C	2.55 c	2.54 a	2.59 c	2.33 c
D-SMS + GM20-4 10%	2.66 b	2.98 bc	2.59 c	2.34 c
D-SMS + GM20-4 30%	2.77 a	3.05 b	2.72 b	2.31 c
D-SMS + GM20-4 50%	2.79 a	3.07 b	2.65 bc	2.32 c
D-SMS + RS 10%	2.60 bc	2.71 d	2.70 b	2.63 a
D-SMS + RS 30%	2.63 bc	2.80 cd	2.79 ab	2.58 a
D-SMS + RS 50%	2.68 b	2.85 c	2.87 a	2.60 a
D-SMS + GM20-4 10% + RS 10%	2.62 bc	2.82 c	2.55 c	2.26 d
D-SMS + GM20-4 30% + RS 30%	2.79 a	3.13 a	2.82 ab	2.61 a
D-SMS + GM20-4 50% + RS 50%	2.79 a	3.16 a	2.74 b	2.45 b

^a D-SMS : dried SMS.

^b Values with different letters are significantly different at p<0.05 by DMRT.

Table 4. C/N ratio according to the treatment of bacteria in wet SMS(A, B and C)

Sample ^a	Treatment ^b	T-C (%)	T-N (%)	C/N	Crude protein (%)
SMS A	C	47.5	1.85	25.7	11.6
	T	47.1	1.92	24.5	12.0
SMS B	C	47.4	1.46	32.6	9.1
	T	46.9	1.58	29.7	9.9
SMS C	C	47.8	1.62	29.6	10.1
	T	47.5	1.73	27.5	10.8

^a Sample : collected SMS from three different oyster mushroom cultivation farms.

^b C: dried SMS + molasses 3%.

T: wet SMS + GM20-4 30% + RS 30% + molasses 3%.

수확후배지 미생물 처리에 의한 T-N, T-C 함량 변화

수집된 농가별로 미생물에 의한 T-N 변화 조사를 위해 세 농가에서 수집한 생수확후배지에 Table 3의 결과를 적용하여 GM20-4 30%와 RS 30%, 당밀 3%를 넣어 혼합 후 5일간 처리하였다. 그 결과 A는 T-N함량이 1.85에서 1.92, B는 1.46에서 1.58, C는 1.62에서 1.73으로 약간 증가하였고 그로 인해 C/N비도 5~10% 정도 낮아졌다(Table 4). 미생물 처리에 따른 T-N량의 변화로 조단백 함량도 약간 증가되는 결과를 보였지만 A, B, C에서 모두 무처리구와 처리구사이에 큰 차이는 없었다.

수집된 생수확후배지의 미생물 처리에 의한 T-N 증진 효과가 크지 않아 수확후배지를 4일 동안 자연건조한 후 Table 3의 결과를 적용하여 GM20-4 30%와 RS 30%, 당밀 3%를 넣어 혼합하였다. 상온에서 5일간 처리 후 T-N 함량의 변화를 조사한 결과 A는 1.85%에서 2.16%로 17%p 증가하였고 B는 1.43%에서 1.72%, C는 1.63%에서 1.82%로 각각 20%p, 12%p 증가되었다. 그로 인해 C/N비가 13%~19% 감소하였고, 조단백 함량도 T-N함량 증가로 인해 A는 16%p, B는 21%p, C는 12%p 증가되었다(Table 5).

Table 5. C/N ratio according to the treatment of bacteria in dried SMS(A, B and C)

Sample ^a	Treatment ^b	T-C (%)	T-N (%)	C/N	crude protein (%)
SMS A	C	47.7	1.85	25.8	11.6
	T	46.4	2.16	21.5	13.5
SMS B	C	47.7	1.43	33.4	8.9
	T	46.2	1.72	26.9	10.8
SMS C	C	48.2	1.63	29.6	10.2
	T	46.9	1.82	25.8	11.4

^a Sample : collected SMS from oyster mushroom cultivation farm

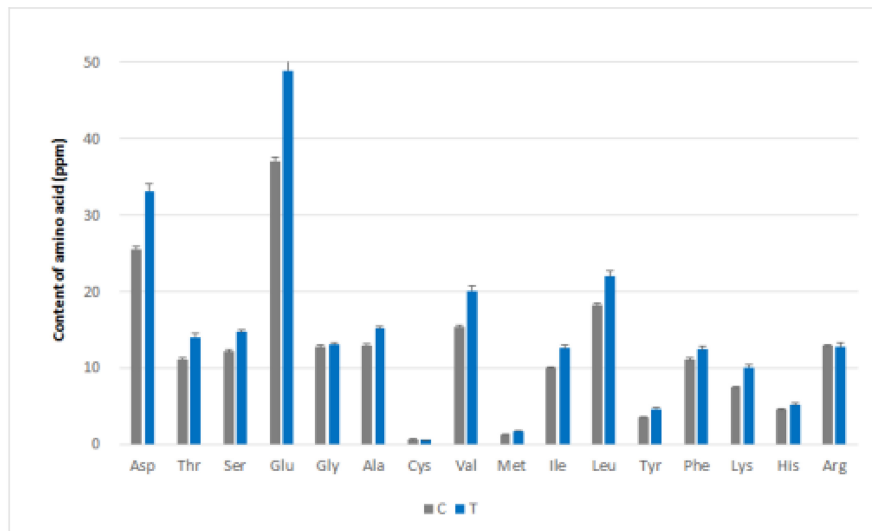
^b C: dried SMS + molasses 3%

T: dried SMS + GM20-4 30% + RS 30% + molasses 3%

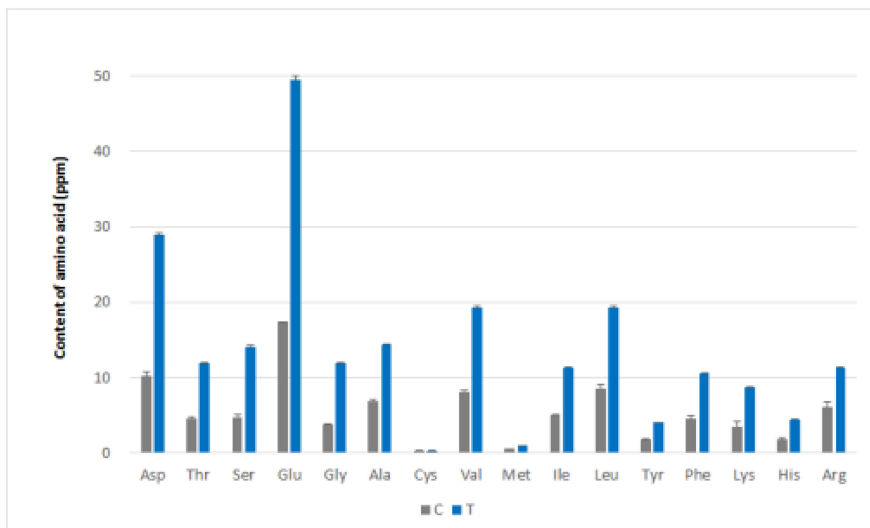
건조된 수확후배지 미생물 처리에 따른 아미노산 분석

세 농가에서 수집한 수확후배지를 건조한 후 GM20-4와 RS를 각각 30% 첨가하고 당밀을 3% 첨가한 처리구의 질소 함량 증가(Table 5)에 따른 아미노산 변화를 분석한 결과는 Fig 2와 같다. 총 16종의 아미노산의 검출되었으며, 수집한 수확후배지 A에서는 처리구의 aspartic acid가 무처리구 25.6 ppm 보다 30% 증가하여 33.2 ppm으로 조사되었으며, glutamic acid도 처리구에서 무처리구보다 32%증가하여 37.1 ppm에서 49 ppm으로 조사되었다. valine도 처리구에서 무처리구보다 31% 증가하였으며, isoleucine과 leucine 역시 처리구에서 각각 26%, 21% 증가하였다. 수확후배지B는 미생물 처리구에서 무처리구보다 전체적으로 아미노산 함량이 크게 증가하였는데, 이는 수확후배지의 원재료 종류와 첨가량에 따른 결과라고 생각된다. aspartic acid는 처리구의 경우 28.9 ppm으로 무처리구 10.2 ppm보다 2.9배 증가하였다. glutamic acid도 무처리구 17.3 ppm에서 처리구 49.5 ppm으로 2.9배 증가하였다. 다른 나머지 아미노산들도 각각 처리구에서 2배 이상 증가하였다. 수확후배지 C의 결과도 A, B와 같은 경향치를 보이며 처리구에 의한 aspartic acid 34%, glutamic acid 40%가 증가되었다.

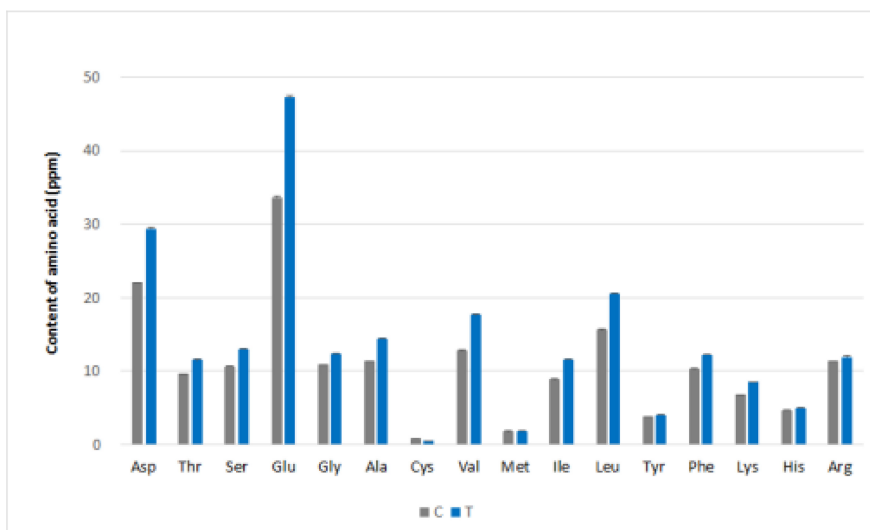
수집된 3종류의 수확후배지의 아미노산분석 결과는 GM20-4와 RS균주를 각각 30%씩 혼합 첨가한 처리구에서 아미노산이 함량이 증가하였고, 그 중 aspartic acid, glutamic acid, valine, isoleucine, leucine 함량의 증가 폭이 컸다. 미생물 발효에 의한 아미노산 증진 효과는 많이 알려져 있으며, 청국장 콩에서 *Bacillus* sp.에 의해 발효 후 필수아미노산이 증가되었으며(Lee *et al.*, 2012), 볶짚에 존재하는 *Bacillus* sp.에 의해 청국장 발효 제품의 유리아미노산 함량은 원료콩의 것 보다 많아졌다고 하였다(Kim *et al.*, 1982). *Bacillus subtilis*에 의한 죽순발효액의 구성아미노산을 분석한 결과 역시 발효 후 시료의 총 구성아미노산이 발효 전 시료보다 2배 이상 증가하였다고 보고하였다(Baeg *et al.*, 2015). 따라서 GM20-4(*Bacillus* sp.)와 *Rhodobacter sphaeroides*에 의한 수확후배지의 아



A



B



C

Fig. 2. Analysis of amino acid content according to the treatment of GM20-4 and RS in dried SMS.

미노산 증진 효과는 미생물의 발효에 기인한 것으로 판단된다.

수확후배지에 GM20-4, RS 처리로 감칠맛을 좌우하며 당의 대사 및 해독작용을 돕는다고 알려진 glutamic acid와 중금속 제거 효과가 있는 aspartic acid(Hong *et al.*, 1989)의 함량 변화는 다른 아미노산과 비교해 눈에 띄게 증가되었는데 이 성분들이 버섯으로 전이되는지 추후 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 느타리버섯 수확후배지를 배지자원으로 재사용하기 위하여 미생물처리에 의한 수확후 배지의 총질소 함량 증진효과를 조사하였다. *Bacillus* sp. GM20-4와 *Rhodobacter sphaeroides*(RS) 배양액 30%를 함께 접종하여 5일간 상온에서 배양 시 총질소 함량이 가장 크게 증가하였다. 농가의 수확후배지 조성에 따른 GM20-4와 RS 처리에 의한 T-N함량 변화를 조사하기 위하여 경기 지역 버섯재배농가 세 곳의 수확후배지(spent mushroom substrates, SMS A, B, C)를 수집하여 GM20-4와 RS 배양액 30%를 처리한 결과, 무처리구에 비해 건조 SMS B에서 T-N함량이 20%p로 가장 크게 증가하였고, 건조 SMS A는 17%, C는 12% 증가하였다. 반면에 생수확후배지에서는 미생물 처리에 의한 T-N 함량 증가 효과가 크지 않았다. 또한 아미노산 조성별 함량 변화는 건조된 SMS A, B, C 모두 GM20-4와 RS 처리로 aspartic acid와 glutamic acid가 상대적으로 높게 증가한 결과를 보였고, 특히 건조 SMS B의 처리구에서 두 아미노산의 함량이 무처리구보다 2.9배 증가를 보임으로서 미생물처리가 수확후배지의 총질소 및 아미노산 함량의 증진효과를 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 지역특화작목과제(PJ011846)의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Baeg BG, Cho JG, Moon EW, Park JS. 2015. Quality Characteristics of Bamboo Shoot Liquid Fermented by *Bacillus subtilis* Strain. *J Korean Soc food cult.* 30:233-240
- Daniel JS, Steven AC. 1993. Sensitive analysis of cystine/cysteine using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidy carbamate(AQC) derivatives. *Techniques in protein Chemistry.* 4: 299-306
- Hong JS, Kim YH, Kim MK, Kim YS, Sohn HS, 1989. Contents of free amino acid and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean Society of food Science and Technology.* 21:58-62
- Kim KJ, Ryu MK, and Kim SS. 1982. *Cheongkookjang Koji* fermentation with rice straw. *Korean J food Sci Technol.* 14:301-308
- Kwak WS, Jung SH, and Kim YI. 2008. Broiler litter supplementation improves storage and feed-nutritional value of sawdust-based spent mushroom substrate. *Bioresource Technol.* 99:2947-2955.
- Lee SH, Beak LM, Kang KM and Park LY. 2012. Fermentation and Quality Characteristics of Cheongkookjang Prepared with Germinated Soybean. *Korean J Food Preserv.* 19:547-553
- Lee SH, Park JR, Oh SR, Ryu SY, Ryu YH, Kang MG, Lee SH, Jo WS. 2018. Production and utilization of organic compost from spent mushroom(*Pleurotus eryngii*) substrate. *J Mushrooms* 16:39-44
- Moon YH, Shin PG, Cho SJ. 2012. Feeding value of spent mushroom(*Pleurotus eryngii*) substrate. *J Mushrooms Sci. Prod.* 10:236-243
- Williams BC, McMullan JT, McCahey S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Bioresour Technol* 79:227-230