

RESEARCH ARTICLE

양송이 재배에서 벚짚 배지의 발효 단계별 관여 미생물의 분포양상 및 특성

이찬중^{1*}, 유영미¹, 문지원¹, 정종천¹, 공원식¹, 김용균², 이병의³, 윤민호⁴, 사동민⁵

¹국립원예특작과학원 버섯과, ²충청남도농업기술원 원예연구과, ³순천향대학교 화학과, ⁴충남대학교 생물환경화학과, ⁵충북대학교 환경생명화학과

Characteristics and Distribution of Microorganisms in a Rice Straw Compost for Cultivation of Button Mushrooms (*Agaricus bisporus*)

Chan-Jung Lee^{1*}, Young-Mi Yoo¹, Ji-Won Moon¹, Jong-Chun Cheong¹,
Won-Sik Kong¹, Yong-Gyun Kim², Byung-Eui Lee³, Min-Ho Yoon⁴, Tong-min Sa⁵

¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Eumseong 55365, Korea

²Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services, Yesan 32425, Korea

³Department of Chemistry, Soonchunhyang University, Asan 31538, Korea

⁴Department of Bio Environmental Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

⁵Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

*Corresponding author: lchanj@korea.kr

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 March, 45(1): 43-53
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170005>

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: 7 September, 2016

Revised: 27 September, 2016

Accepted: 28 September, 2016

© The Korean Society of Mycology



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

In this study, we analyzed the densities and taxonomic characteristics of various microorganisms that play important roles in *Agaricus bisporus* culture medium composting, and examined changes in the levels of decomposition-related enzymes secreted by these microorganisms. Various microorganisms such as thermophilic bacteria, actinomycetes, fluorescent *Pseudomonas* spp., and filamentous bacteria are closely associated with culture medium composts of *Agaricus bisporus*. The population densities of microorganisms change, and harmful bacteria disappear during thermophilic composting. *Psychrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., and *Pseudoxanthomonas* sp. accounted for the highest proportion of bacteria in the culture media during outdoor composting, whereas *Bacillus* sp. and *Psychrobacillus* sp. were dominant after pasteurization. Cellulose and hemicellulose enzymes of the microorganisms were important at an early stage of rice straw composting and after decomposition of carbon sources, respectively. Microorganisms that secreted these enzymes were present in the second and third turning stage of composting.

Keywords: *Agaricus bisporus*, Composting, Microorganism, Rice straw

서론

양송이(*Agaricus bisporus* Sing.)는 우리나라의 대표적인 식용버섯으로 2012년도에는 국내 버섯 총생산량의 6.9%인 일만 삼천톤이 생산되었다[1]. 양송이는 독특한 향과 맛, 조직감 뿐만 아니라 영양소를 고루 함유하고 있어 식품소재로 비교적 많이 이용되고 있다[2, 3]. 양송이는 사물기생균으로써 생육에 필요한 질소·인산·칼리·칼슘 등 각종 영양분을 배지로부터 얻는다. 따라서 배지의 양호한 발효가 양송이 균사생장 및 자실체의 수량과 직접적으로 연관되고 버섯의 생산량에 결정적인 영향을 미친다. 양송이 배지의 주재료는 탄소원으로 서양에서는 주로 마분과 밀짚이 사용되었고, 쌀이 주식인 우리나라는 벼짚을 이용한 배지를 개발하여 사용하고 있다. 벼짚의 세포벽을 분해하기 위해 퇴비 발효 단계에 있어 주로 암모니아 처리로 질소 성분인 계분 및 마분을 처리하여 미생물이 보다 쉽게 벼짚을 분해하면서 퇴비화 과정을 거치게 된다. 벼짚은 벼농사의 부산물로 여러 분야에 많이 이용되는 재료로 식물세포벽의 기본 구성 성분인 cellulose, hemicellulose, lignin 등 견고한 조직으로 이루어져 있다[4]. 일반적으로 식물체에는 난소화성 탄수화물이 다량 함유되어 있는데, 그 중에서도 cellulose는 glucose가 β -1, 4-glycosidic 결합에 의해 이루어진 고분자 물질이며, 식물체뿐만 아니라 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium* 등 미생물에 의해서도 생산된다고 알려져 있다[5]. 이러한 cellulose 분해 효소는 퇴비화 촉진 등 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있다[6]. 또한, hemicellulase는 섬유성 바이오매스에 포함된 hemicellulose를 분해하여 cellulase에 의한 cellulose의 분해 작용을 향상시킨다[7].

양송이 재배 과정은 일반적으로 벼짚 발효, 균사 배양 및 자실체 수확의 세 단계로 구분된다. 이 중 벼짚 발효 단계는 야외발효와 후발효 단계를 거치면서 다양한 미생물의 작용으로 물리·화학적 변화가 일어나게 된다. 양송이의 균사생장과 자실체 형성에 알맞은 퇴비의 C/N율은 17 정도이며[8], 배지 퇴적시 C/N율은 15~20으로 낮아지는데 이는 주로 벼짚 내 미생물의 작용에 의해 cellulose와 hemicellulose의 감소에 의한 것이다[9]. 벼짚의 야외발효 및 후발효 과정이 고품질의 버섯 생산을 위한 가장 중요한 단계이며, 이 과정은 수분과 온도 및 산소 농도의 제어를 통해 배지의 물성을 변화시켜 유용 미생물 증가 및 유해 미생물 제거 등에 관여한다. 또한 후발효 과정에서 증가된 유용 미생물에 의해 배지가 분해되어 안정화되는 과정으로 양송이 생장에 필요한 영양원이 되고 있다[10].

본 연구는 양송이 재배에서 벼짚 배지의 발효 단계별 관여 미생물의 분포양상 및 그 특성을 조사하여 배지발효의 안정성 확보를 통한 고품질의 양송이를 생산하기 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

양송이 배지 발효

본 실험은 양송이 재배 농가(충남 부여군 석성면)에서 직접 수행하였으며, 버섯 재배용 배지는 벼짚(7.0 톤), 계분(1.4 톤), 요소(0.1 톤)를 혼합하여 사용하였다. 주재료인 벼짚의 수분 함량을 75% 내외로 조절하고 유기태 급원(요소, 계분)을 첨가하여 벼짚과 골고루 혼합하여 일정한 높이로 퇴적하여 야외발효를 실시하였다. 배지의 온도가 80°C에 도달할 때 산소의 원

활한 공급과 균일한 배지발효를 유지하기 위하여 4번 뒤집기를 하였다. 야외발효 4차 뒤집기 후 벚짚의 물리성을 좋게 하기 위해 석고를 첨가하였고, 후발효를 실시하기 위하여 재배사에 균일하게 입상하였다. 입상이 끝난 후 재배사의 문과 환기구를 닫고 배지의 온도를 높이기 위하여 재배사를 가온한 뒤 배지의 온도를 60°C에서 8시간 유지한 후 55~58°C에서 4일, 45~50°C에서 2일후 발효를 완료시켰다.

실험재료 및 채취 방법

시료채취는 야외발효(1차, 2차, 3차, 4차 뒤집기)와 후발효 완료 배지에서 채취하였다. 야외발효 단계에서 시료 채취는 배지더미를 반으로 나눈 뒤 단면의 상층, 중간층, 하층에서 3곳 이상의 시료를 채취하여 골고루 섞은 후 실험에 사용하였다.

미생물의 분리

미생물의 분리는 R2A 배지[11]에 단계별로 희석 배양하여 50~60개의 colony를 형성한 plate로부터 독립적으로 분리하였다[12]. 순수 분리한 미생물은 R2A 배지에서 2일 동안 배양한 후 균체를 모아서 20%(v/v) 글리세롤을 포함하는 -70°C에 보존하면서 검정용 시료로 사용하였다.

미생물 밀도조사

양송이 복토내 미생물의 밀도는 희석평판법으로 조사하였다. 시료 10 g을 멸균수 90 mL에 첨가하여 진탕배양기에서 200 rpm으로 30분간 진탕하여 $10^2 \sim 10^7$ 배가 되도록 희석액을 만들어 이를 미생물 수 측정에 사용하였다. 호기성 세균은 R2A agar[11], 사상균은 streptomycin-rose bengal agar[13], 중온성 방선균은 starch casein agar[14]을 사용하였고, 고온성 방선균은 1/2 nutrient agar 배지(1/2 NA, 0.2% casein, 10g agar)를 사용하였다. *Trichoderma*속은 THSM 배지[15]를 사용하였고, *Pseudomonas*속은 P-1 agar[16]를 각각 선택 배지로 사용하였다. *Bacillus*속 검출을 위해서는 희석액을 80°C 열수에서 10분간 처리 후 yeast glucose agar 배지[17]에 배양하였다. 폐상퇴비내 미생물 수는 각각의 선택 배지 3개의 평판 배지에 나타난 colony를 계수한 후 평균값을 콜로니 형성단위(colony forming unit, cfu)로 표시하였다. 배양은 세균과 곰팡이는 28°C 항온기에서 2~7일간 배양하면서 계수하였고, 방선균의 경우 중온성(28°C)과 고온성(45°C)으로 나누어 항온기에서 7일간 배양하면서 계수하였다.

분리 미생물의 분포조사

배지발효 단계별 분리한 미생물의 분포조사를 위하여 16S rDNA 염기서열 분석을 실시하였다[18]. DNA는 Qiagen Genomic DNA Isolation Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)을 사용하여 분리하였고, PCR 증폭은 Techne thermocycler (Bibby Scientific Limited, Stone, UK)로 수행하였다. PCR 반응혼합액은 1 x buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin and 0.1% Triton X-100), 최종농도 200 μm의 deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dCTP, dTTP), 0.6 U Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 최종농도 2 μm의 정, 역방향의 primers [fD1

(5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')와 rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3')] 그리고 10 ng template DNA로 이루어졌다. PCR은 94°C에서 1분, 56°C에서 1분 그리고 72°C에서 2분간 30 cycles로 수행하였고, 반응 후 primer와 dNTP는 High Pure PCR Product Purification Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 PCR 산물로부터 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 pT7 blue Vector (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)에 클로닝하여 Big Dye Terminator Kit와 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 종 유사성 결정을 위해 Clustal W 분석프로그램[19]을 사용하여 GenBank에 있는 다른 염기서열들과 비교하였다.

분리 미생물의 효소활성 검정

양송이 배지 제조 과정 중 벧짚 내 미생물의 효소 생산용 배지는 minimum salt (MS) 배지 (0.5% yeast extract, 0.5% poly peptone, 0.5% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4)를 기본 배지로 사용하였으며, cellulase와 polygalacturonase 활성은 기본 배지에 1.0% carboxymethyl cellulose (CMC, pH 7.0)와 polygalacturonic acid (pH 5.0)를 첨가한 액체 및 고체 배지를 사용하였다. 그리고 hemicellulase는 기본 배지에 0.5% xylan을 첨가하였고, protease는 20% 탈지분유 용액을 최종농도 1.0% 또는, 0.5% skin milk을 첨가하여 사용하였다. 균의 배양은 10~70°C, pH는 3.0~9.0에서 150 rpm으로 36시간 동안 진탕배양 하였고 균주의 생육 정도는 UV spectrophotometer를 이용하여 600 nm의 흡광도로 측정하였다.

결과 및 고찰

발효 단계별 배지 내 미생물상 변화

양송이 재배농가에서는 배지발효 문제로 재배에 실패하는 경우가 많이 발생하고 있으며, 이들 배지발효와 밀접한 관련이 있는 미생물들 분포양상을 조사하였다. 배지 재료인 벧짚과 계분에는 호기성 세균, 방선균, 유해균이 포함된 다양한 미생물들이 분포하고 있었다(Table 1). 그리고 야외발효 단계별 배지 내에는 고온성 세균(*Bacillus* spp.), 방선균, 형광성 *Pseudomonas* 속, 사상균 등 다양한 미생물들이 분포하였고, 특히 배지발효 과정에서 배지의 분해와 발효에 호기성 세균의 분포는 1차 뒤집기에서 가장 높은 밀도를 보였고, 발효가 진행되면서 밀도는 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 고온성 발효과정 중 푸른곰팡이균(*Trichoderma*)과 중온성 방선균은 생육이 억제되거나 사멸되는 양상을 보였고, cellulose, lignin, chitin 등을 분해하는데 중요한 역할을 하고 있는 고온성 방선균은 높은 밀도를 보였다. 야외발효 과정중 배지 내의 산소공급이 원활하지 않아 퇴적배지의 하층부분에는 혐기성 발효가 일어나게 된다. 따라서 뒤집기를 통해 혐기성 발효를 최소화하고 배지가 잘 혼합되어 균일하게 발효가 일어날 수 있도록 하였다. Table 3에서는 호기성 발효와 혐기성 발효 부위에서의 미생물 분포 양상을 나타내었다. 호기성 세균은 혐기성 발효 보다 호기성 발효 부위에서 높은 밀도를 보였지만 고온성 세균은 혐기성 발효 부위에서 오히려 높은 밀도를 보였다. 고온성 방선균의 경우 1차 뒤집기 시료를 제외한 모든 단계에서 호기성 발효 부위에서 높은 밀도를 보였고, 형광성 *Pseudomonas*속, 푸른곰팡이균, 일반 곰팡이균, 중온성 방선균 등은 검출되지 않았다. 따라

서 야외발효 과정중에는 푸른곰팡이균을 비롯한 일반 곰팡이류는 검출 되지 않아야 하고, 고온성 방선균은 다량 검출되어야 양송이 배지에 적합한 정상적인 발효가 이루어진 것으로 판단할 수 있다. Baker 등[20]은 호기적인 퇴비화 과정에서 세균, 방선균 등의 미생물이 큰 역할을 하며 초기에는 중온성 세균이 우점을 하고 곧바로 온도가 상승함에 따라 고온성 세균, 방선균의 밀도가 증가한다고 하였다. 또한, Shin[21]은 퇴비온도가 20°C일때 *Pseudomonas*속, *Serratia*속 등 세균이 우점하였고, *Penicillium* 등 사상균은 생육하지만, 방선균은 확인 할 수 없었으며, 퇴비온도가 35~45°C에서는 *Bacillus*, *Pseudomonas* 등 세균이 왕성하게 생육하였고,

Table 1. Density of microbial population on each material for button mushroom compost

Division	Aerobic bacteria (10 ⁶ cfu/g)	<i>Bacillus</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Fluorescent <i>Pseudomonas</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Fungi (10 ⁴ cfu/g)	<i>Trichoderma</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Actinomycetes (10 ³ cfu/g)	
						Mesophilic	Thermophilic
Rice straw	23.5	3.0	9.7	43.3	68.7	1.3	1.5
Watering straw	7.6	75.7	333.3	16.0	27.0	106.7	19.0
Chicken manure	1.0	320	ND	37.6	25.7	4.0	ND

cfu, colony forming unit; ND, not determined.

Table 2. Change of microbial population density on each composts during stages of outdoor composting process

Division	Aerobic bacteria (10 ⁶ cfu/g)	<i>Bacillus</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Fluorescent <i>Pseudomonas</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Fungi (10 ² cfu/g)	<i>Trichoderma</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Actinomycetes (10 ³ cfu/g)	
						Mesophilic	Thermophilic
First turning	33.7	101.7	ND	ND	ND	ND	1,400
Second turning	1.2	436.7	20.0	4.3	ND	ND	33.3
Third turning	2.6	23.0	ND	ND	ND	ND	3.5
Forth turning	14.7	77.7	ND	ND	ND	ND	3.0
After pasteurization	1.3	107.0	ND	0.8	ND	ND	2.3

cfu, colony forming unit; ND, not determined.

Table 3. Change of microbial population density on the aerobic and anaerobic zone during outdoor composting process

Division		Aerobic bacteria (10 ⁶ cfu/g)	<i>Bacillus</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Fluorescent <i>Pseudomonas</i> sp. (10 ³ cfu/g)	Fungi (10 ² cfu/g)	<i>Trichoderma</i> sp. (10 ² cfu/g)	Actinomycetes (10 ³ cfu/g)	
							Meso- philic	Thermo- philic
First turning	Aerobic	38.0	300.0	10.0	0.1	0.2	ND	1,167
	Anaerobic	2.8	57.7	ND	0.3	0.3	ND	1,800
Second turning	Aerobic	71.7	300.0	ND	ND	ND	ND	123.3
	Anaerobic	1.2	516.7	ND	ND	ND	ND	7.0
Third turning	Aerobic	110.7	20.0	ND	ND	ND	ND	44.3
	Anaerobic	0.03	60.3	ND	ND	ND	ND	4.7
Forth turning	Aerobic	110.3	306.7	ND	ND	ND	ND	25.7
	Anaerobic	84.3	390.0	ND	ND	ND	ND	4.0

cfu, colony forming unit; ND, not determined.

Mortierella, *Aspergillus* 등 사상균 및 고온성 방선균이 나타났으며, 55°C에서는 *Bacillus*, *Pseudomonas* 등의 세균과 방선균의 활동이 왕성하였다고 보고하였는데, 본 연구에서도 야외 및 후발효 과정에서 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속이 가장 많이 분포하였다.

발효 과정 중 분리 미생물의 분포

양송이 발효 과정 중 배지내 우점하는 미생물의 분포를 조사하기 위하여 16S rDNA 분석법을 이용하여 동정하였다. 배지 재료에서 분리한 미생물을 동정한 결과 볏짚에서는 *Staphylococcus*속이 58.5%, *Microbacterium*속이 12.2%로 가장 우점하였고(Fig. 1a), 그 외 *Pseudomonas*속 등 8종이 분포하고 있었다. 수분을 첨가한 볏짚의 경우 *Pseudomonas*속이 28.8%, *Stenotrophomonas*속이 27.3%로 가장 우점하였으며(Fig. 1b), 계분에서는 *Bacillus*속만 분포하는 단순한 양상을 보였다(Fig. 1c). 야외발효 및 후발효 과정에서 분리한 미생물의 분포를 조사한 결과 1차 뒤집기한 시료에서는 *Psychrobacter*속 42.4%, *Pseudomonas*속 30.5%, *Bacillus*속 23.7%로 가장 많은 분포하고 있었으며(Fig. 2a), 2차 뒤집기에서 *Bacillus*

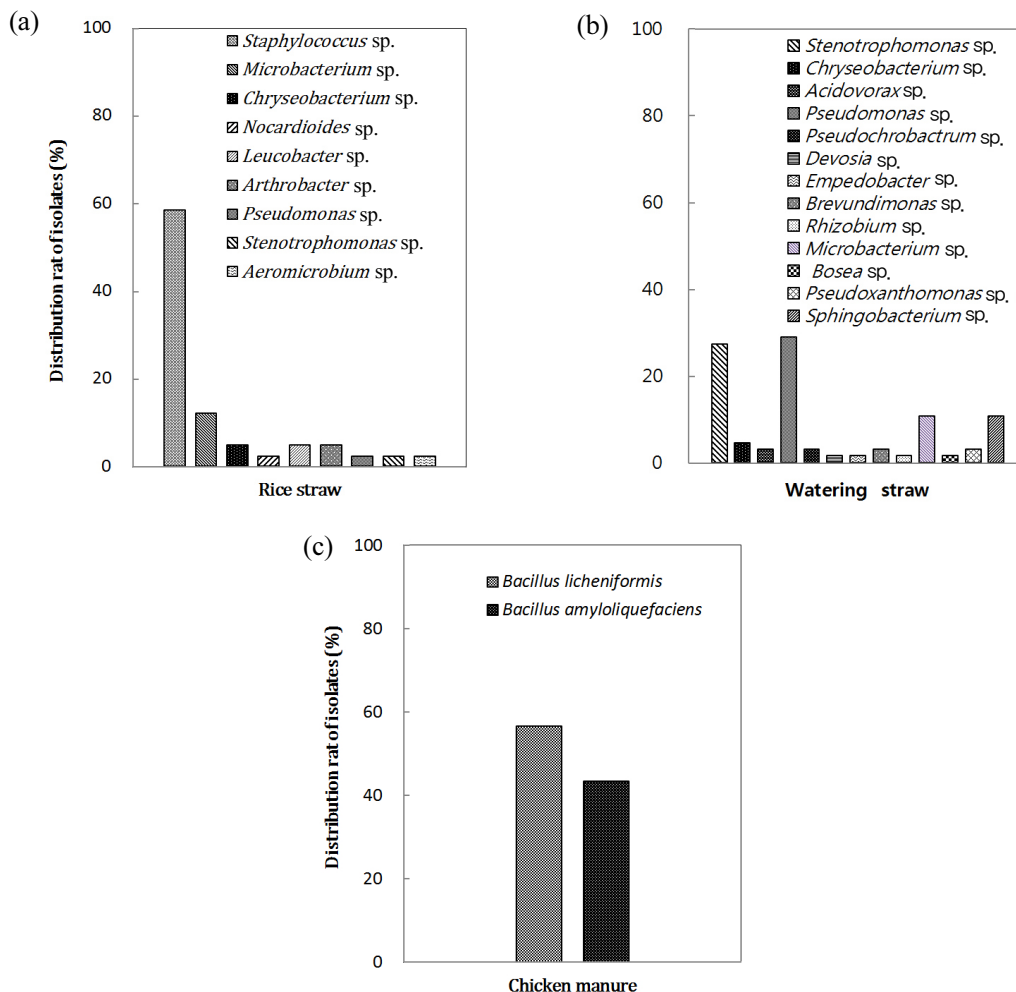


Fig. 1. Identification of several bacteria isolated from button mushroom compost on the basis of 16S rDNA analysis. (a) rice straw; (b) watering straw; (c) chicken manure.

속이 가장 우점 하였고 그 분포율은 84.6%였고, 그 다음 *Pseudomonas*속이 9.6%로 가장 많이 분포하는 것을 확인하였다(Fig. 2b). 3차 뒤집기에서는 *Psychrobacter*속 44.0%, *Bacillus*속 34.0%로 가장 많이 분포하고 있었으며(Fig. 2c), 4차 뒤집기에서는 *Pseudoxanthomonas*속 23.4%, *Sphingobacterium*속 10.6%로 가장 우점 하였고, 야외 발효가 진행될수록 4차 뒤집기에서 미생물의 분포가 다양해지는 양상을 보였다(Fig. 2d). 그리고 후발효 완료에서는 *Bacillus*속이 76.1%로 가장 많이 분포하는 것을 확인하였다(Fig. 2e). 분리 균주 중 우점균으로 확인된 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속은 식물의 성장을 조절하는 인산가용화, 질소고정, 식물 성장촉진 호르몬(auxin, cytokinin, gibberelin)의 생산, 에틸렌 조절 등의 기작이 알려져 있다[22]. 또한, *Bacillus*속은 항생물질에 의해 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용[12] 및 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 길항작용으로 많이 알려져 있다[23].

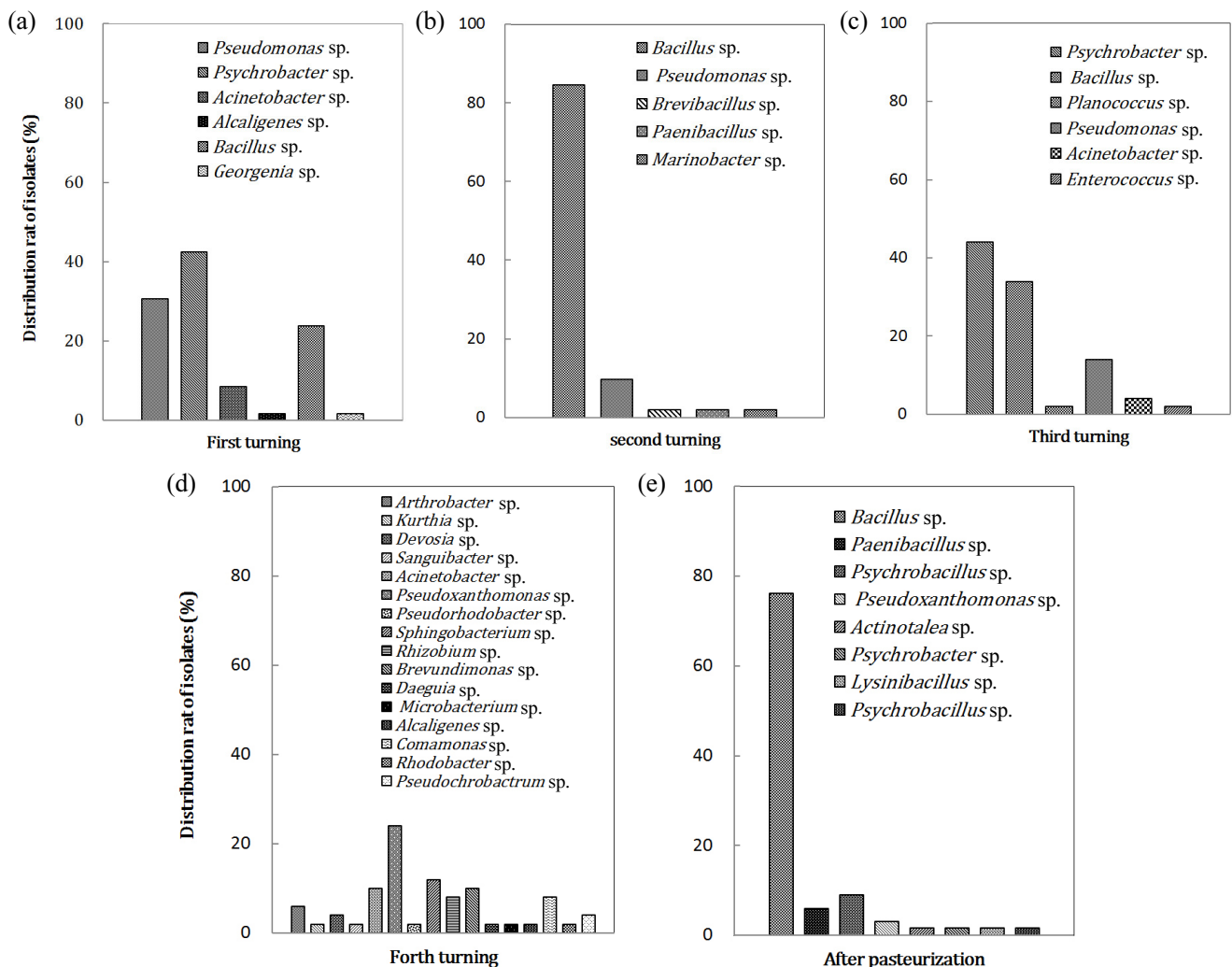


Fig. 2. Identification of bacteria isolated from outdoor composting process on the basis of 16S rDNA analysis. (a) first turning; (b) second turning; (c) third turning; (d) forth turning; (e) after pasteurization.

양송이 배지 발효 중 미생물의 효소활성 변화

양송이 배지에서 분리한 미생물의 세포벽 분해 효소활성은 각각의 선택 배지에서 분해환 (clear zone)의 크기로 조사하였다(Figs. 3, 4). 야외발효 1차 뒤집기에서 분리한 미생물의 cellulose, hemicellulose 분해효소는 약한 활성을 보였고, pectin 분해효소는 강한 활성을 보였다. 그러나 protease 분해효소는 활성을 거의 보이지 않았다. 2차 뒤집기에서 분리한 미생물은 cellulose, hemicellulose에 대해서는 강한 활성을 보였으며, 특히 protease 분해효소를 가진 미생물의 분포가 가장 많았다. 또한 2차 뒤집기 및 3차 뒤집기에서 분리한 미생물은 1차 뒤집기에 분리한 미생물보다 효소활성이 높은 미생물의 분포가 높았다. 전체적으로 분리 미생물의 효소활성은 발효 초기에 cellulose 분해효소가 먼저 배지에 작용하여 탄소원을 분해한 후 hemicellulose 분해효소가 부차적으로 작용하는 양상을 보였고, 이들 효소를 분비하는 미생물들은 2차와 3차 뒤집기에서 많이 분포하는 것을 알 수 있었다. 그리고 pectin 분해효소는 전체 발효 과정 동안 왕성하게 작용하였으며, 특히 2차 뒤집기에서 분리한 미생물이 가장 강한 활성을 보였으며, protease 분해효소는 발효 초기에 왕성하게 작용하지만, 발효 후기로 갈수록 작용 양상은 줄어들었다(Fig. 4). Shin[21]은 벧짚이 발효될 때 cellulose, hemicellulose는 미생물에 의하여 간단한 당류로 분해되고 퇴비의 온도는 상승하게 된다고 하였다. 또한, cellulose를 분해하는 세균으로 *Bacillus*속, *Pseudomonas*속, *Clostridium*속, *Cellulomonas*속 등이 많이 알려져 있다[6].

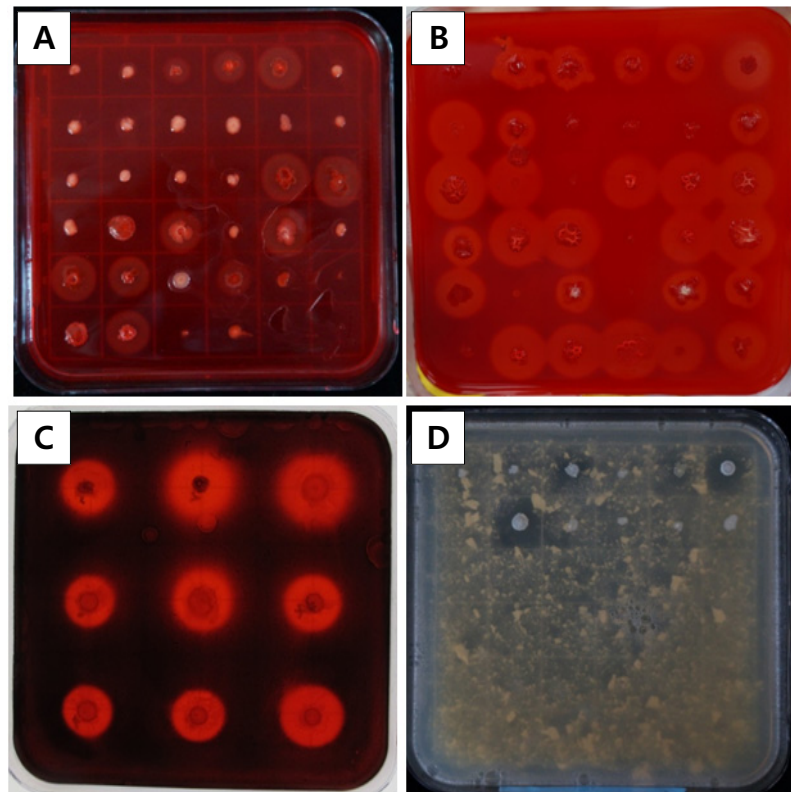


Fig. 3. Enzymatic activation of separated selected microorganism by rice straw composting process. A, cellulase activation; B, hemicellulase activation; C, pectinase activation; D, protease activation.

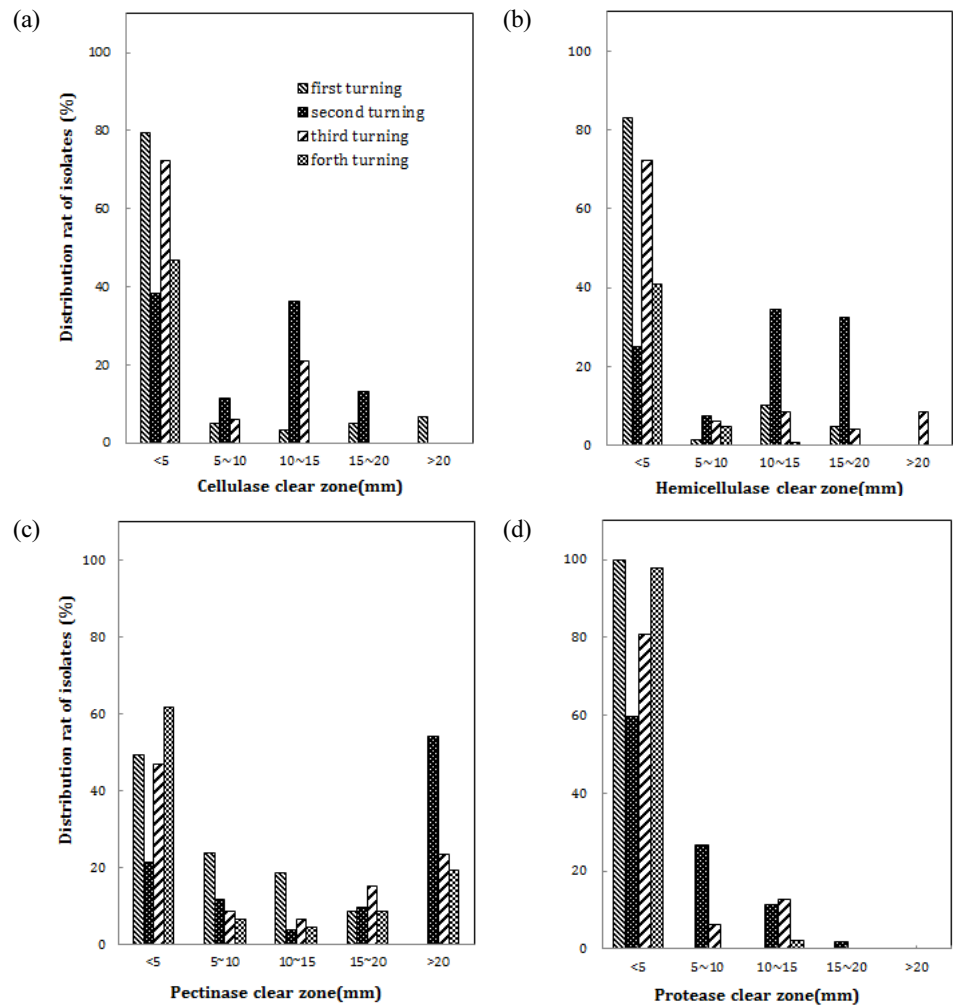


Fig. 4. Enzymatic activity of selected microorganism during outdoor composting process. (a) cellulase activity; (b) hemicellulase activity; (c) pectinase activity; (d) protease activity.

적 요

본 연구는 양송이 배지의 관행적인 발효기술 개선에 대한 기초자료를 제공하기 위하여 배지 발효에 중요한 역할을 하는 다양한 미생물에 대한 밀도변화 및 분류학적인 특징을 밝혔고, 이들 미생물이 분비하는 세포벽 분해 관련 효소활성 변화를 조사하였다. 양송이 배지 발효와 밀접한 관련이 있는 미생물의 밀도 변화를 분석한 결과 고온성 세균, 방선균, 형광성 *Pseudomonas* spp., 사상균 등 다양한 미생물들이 분포하였으며, 고온성 발효가 진행됨에 유해균은 사멸되는 경향을 보였다. 야외발효 과정에서는 *Psychrobacter*속, *Pseudomonas*속, *Bacillus*속, *Pseudoxanthomonas*속이 가장 많이 분포하였고, 후발효 완료 배지에서는 *Bacillus*속, *Psychrobacillus*속이 우점하였다. 이러한 벚짚 발효 과정 중 분리한 미생물의 효소활성은 발효 초기에 cellulose 분해효소가 먼저 배지에 작용하여 탄소원을 분해한 후 hemicellulose 분해효소가 부차적으로 작용하는 양상을 보였고, 이들 효소를 분비하는 미생물들은 2차와 3차 뒤집기에서 많이 분포하였다.

Acknowledgements

This study was supported by research grants (PJ011125) provided by the Rural Development administration (RDA) of Korea.

REFERENCES

1. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Agriculture, forestry and livestock food statistics. Sejong: Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs; 2013.
2. Hong JS, Kim YH, Kim MK, Kim YS, Sohn HS. Content of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. Kor J Food Sci Technol 1989;21:58-62.
3. Geml J, Geiser DM, Royse DJ. Molecular evolution of *Agaricus* species based on ITS and LSU rDNA sequences. Mycol Prog 2004;3:157-76.
4. Kim MJ, Lim SJ, Kang DK. Isolation of a *Bacillus Licheniformis* DK42 producing cellulase and xylanase, and properties of the enzymes. J Anim Sci Technol 2008;50:429-36.
5. Delmer DP. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 1999;50:245-76.
6. Kim TI, Han JD, Jeon BS, Ha SW, Yang CB, Kim MK. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH-10 secreting cellulase from cattle manure. Kor J Mycol 1999;35: 277-82.
7. Shin PG, Cho SJ. Cellulase and xylanase activity of compost-promoting bacteria *Bacillus* sp. SJ21. Kor J Soil Sci Fertil 2011;44:836-40.
8. Hayes WA. Nutritional factors in relation to mushroom production. In: Proceedings of the 8th congress of the International Society for Mushroom Science;1971; London, England. Coatesville: The International Society for Mushroom Science;1972. p. 663-74.
9. Gerrits JP, Bels-Koning HC, Muller FM. Changes in compost constituents during composting, pasteurization and cropping. In: Proceedings of the 6th congress of the International Society for Mushroom Science;1965; Wageningen and Amsterdam, Netherlands. Coatesville: The International Society for Mushroom Science;1967. p. 225-43.
10. Sung JM, Yu YB, Cha DY. Mushroom science. Seoul: Kyohaksa; 1998.
11. Kim IG, Someya T, Whang KS. The observation and a quantitative evaluation of viable but non-culturable bacteria in potable groundwater using epifluorescence microscopy. Kor J Mycol 2002;38:180-5.
12. Lee CJ, Yun HS, Jhune CS, Cheong JC, Han HS. Changes and distributional pattern of microorganism in cotton waste media for oyster mushroom cultivation. Kor J Mycol 2009;37:150-4.
13. Martin JP. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci 1950;69:215-32.
14. Küster E, Williams ST. Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature 1964; 202:928-9.
15. Williams J, Clarkson JM, Mills PR, Cooper RM. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. Appl Environ Microbiol 2003;69:4190-1.

16. Katoh K, Ithoh K. New selective media for *Pseudomonas* strains producing fluorescent pigment. *Soil Sci Plant Nutr* 1983;29:525-32.
17. James N. Soil extract in soil microbiology. *Can J Microbiol* 1958;4:363-70.
18. Johnson JL. Similarity analysis of rRNAs. In:Gerhardt PE, Wood WA, Krieg NR, editors. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, DC:American Society of Microbiology;1994. p. 683-700.
19. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-80.
20. Baker M, Knoop B, Quiring S, Beard A, Lesikar B, Sweeten J, Burns R. Chapter 1, The decomposition process [Internet]. College Station: Texas A&M AgriLife Extension, Texas A&M System; 2009 [cited 2016 Nov 8]. Available from: <http://aggie-horticulture.tamu.edu/earthkind/landscape/dont-bag-it/chapter-1-the-decomposition-process>.
21. Shin GC. Studies on nutrient sources, fermentation and harmful organisms of the synthetic compost affecting yield of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Kor J Mycol* 1979;7:13-73.
22. Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. London: Imperial College Press; 1999.
23. Jung HK, Kim JR, Woo SM, Kim SD. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2006;34:94-100.