

버섯폐배지로부터 섬유소분해력이 높은 중온성 균의 분리 및 균주생산을 위한 배지조건의 최적화

김영일 · 정세형 · 석준상 · 양시용 · 허정원 · 곽완섭*
건국대학교 자연과학대학 생명자원환경과학부 축산학전공

Isolation and Identification of High Cellulolytic Bacteria from Spent Mushroom Substrate and Determination of Optimal Medium Conditions for the Growth. Kim, Young-il, Se-Hyung Jung, Joon-San Seok, Si-Yong Yang, Jeong-Weon Huh, and Wan-Sup Kwak*. *Animal Science, School of Life Resource and Environmental Sciences, College of Natural Sciences, Konkuk University, Danwol-dong 322, Korea* – This study was conducted to isolate and identify bacteria producing xylanase and cellulase from spent mushroom substrates and to determine the optimal medium conditions for their growth. Bacteria showing high xylanase and carboxymethyl cellulase activities and low protease and amylase activities were strain 201-3 and strain 206-3. Strain 201-3 was identified as *Enterobacter ludwigii* and named Ent. ludwigii KU201-3. 206-3 was identified as *Bacillus cereus* and named B. cereus KU206-3. The optimal medium condition of Ent. ludwigii KU201-3 was obtained when 1%(w/v) of soybean meal and 3%(w/v) of sucrose were used as nitrogen and carbon source, respectively. That of B. cereus KU206-3 was obtained when 3%(w/v) of soybean meal and 1%(w/v) of molasses were used as nitrogen and carbon sources, respectively.

Key words : Xylanase, CMCCase, Mushroom, Enzyme activity, By-product

서 론

버섯폐배지(버섯부산물)란 버섯을 생산하기 위해 조성된 배지에서 버섯을 생산하고 폐기되는 부산물 또는 폐배지를 말한다. 버섯배지 제조시 섬유소가 많은 톱밥, 면실과 각종 영양물질을 혼합함으로써 폐배지는 섬유소가 높은 특징이 있다. 백색부후균인 버섯균은 lignocellulose 분해 능력이 있는 것으로 보고되고 있다[8, 13]. 반면, 버섯 재배단계별 화학적 성분의 변화에 관한 연구에서 최초단계보다 폐배지 단계에서 난분해성 섬유소의 함량비율이 증가 하였다는 보고[7] 등을 고려하면, 버섯균은 lignocellulose의 분해 능력은 있으나 쉽게 이용이 가능한 영양물질들을 우선적으로 이용하기 때문에 버섯폐배지는 상대적으로 높은 섬유소 함량을 보이게 된다. 결과적으로 폐배지내의 너무 높은 섬유소 함량은 가축사료로 다량 이용 시 제한 요인이 된다.

정 등[5]과 양 등[14]은 xylanase와 CMCCase (carboxymethyl cellulase, Endo- β -1,4-glucanase)의 활력이 높은 균주를 선발하여 probiotics로 이용하면 효과가 있다고 하였다. Cellulase인 CMCCase와 lignin complex에서 xylan backbone을 형성 [4]하는 xylan을 분해하는 xylanase의 분비력이 있는 균주를 적용하면 난분해성 물질들이 어느 정도 분해되어 소화율 개

선에 효과가 있을 것으로 기대된다.

따라서, 본 연구는 톱밥주원료 버섯폐배지의 효과적 사료화를 위한 균주 개발을 목적으로 버섯폐배지로부터 섬유소분해력이 높은 중온성 균주를 분리하고 균주생산을 위한 배지의 최적화 조건을 도출하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 동정

충북 충주시 소재 버섯농가에서 수집한 버섯폐배지를 멸균수에 적정희석 하여 섬유소분해력이 높은 균주를 분리하기 위해 선택배지(PCA (plate count agar), MRS, YM (yeast malt), BHI (brain heart infusion), PDA (photo dextrose agar))에 도말하여 균주들을 분리하였다. 1차적으로 순수 분리된 290개의 균주들은 Table 1에 제시한 screening 배지를 이용하여 clear zone의 확인을 통한 효소분비 여부를 파악하였다. Protease와 xylanase는 배양 후 바로 clear zone 확인이 가능하였으며, cellulase와 α -amylase는 염색을 하여 확인하였다. Cellulase와 xylanase에 대한 clear zone이 강하게 형성되는 균주를 우선 선발하였으며, 이 중 protease와 α -amylase에 대한 clear zone이 약하게 형성되는 균를 선발하였다. 선발균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 동정하였다[2]. 분리균주의 생리 및 생화학적 특성은 API (50CHB) kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 당 발효/이용성을 조사하였으며, cellular fatty acid

*Corresponding author

Tel: 82-43-840-3521, Fax: 82-43-851-8675

E-mail: wsk@kku.ac.kr

Table 1. Screening media and dyes used for the detection of various enzyme activities

Enzyme	Substrate(basal medium:NA ¹)	Dye	Identification
Protease	2% (w/v) skim milk		Clear zone
Cellulase(CMCase)	1% (w/v) CMC ²	0.2% (w/v) Congo red sol.	Clear zone
Amylase	1% (w/v) soluble starch	0.2% (w/v) I ₂ + 2%(w/v)KI sol	Clear zone
Xylanase	1% (w/v) oat spelt xylan		Clear zone

¹Plate count agar(casein peptone 5 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1 g, agar 15 g/L)

²Carboxymethyl cellulose.

composition은 Miller[10]의 방법에 따라 Gas Chromatography(6890 series, Agilent technologies, USA)를 이용하여, 16S rDNA sequence는 Thompson 등[12]의 방법에 따라 분석 후 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 비교분석하였다.

CMCase, Xylanase, MnP, Laccase 활력 측정

효소활성 측정 기질로 새송이버섯폐배지 2%, urea 0.5%를 증류수에 넣어 121°C 1.5기압에서 30분간 멸균하여 broth로 사용하였다. 250 ml 삼각플라스크에서 총 36시간 배양동안 0, 6, 12, 24, 36시간에 효소의 활력을 측정하였다. xylanase의 활성도는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법[9]을 사용하여 xylan으로부터 유리된 xylose 함량을 측정하여 분석하였다[6]. 증류수에 녹인 1.0%(w/v) xylan 500 µl, PBS(pH 7.0) 250 µl와 효소용액 250 µl을 넣고 50°C에서 15분 동안 반응시킨 후, DNS 시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 5분 동안 끓인 다음, 찬물에서 냉각 후 575 nm에서 흡광도를 측정하였고, D-xylose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소의 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 xylan으로부터 1 µmol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. CMCase의 활성도 측정방법은 xylanase 역가 측정방법 중 기질로 xylan 대신에 CMC(carboxymethyl cellulose)를 사용하는 것과 표준시료로 glucose를 사용하는 것 이외에는 동일한 방법을 사용하여 측정하였다. Laccase 활성은 조효소액 1.9 과 PBS(pH 7.0) 1.7 을 혼합하여, 5 mM의 p-phenylenediamine 0.3 ml를 첨가한 즉시 525 에서 흡광도를 측정하고, 이후 매분마다 흡광도를 측정하여 활성을 계산하였다[11]. MnP (Manganese peroxidase) 생산성은 0.1 M guaiacol 수용액 1.0 ml, PBS(pH 7.0) 1.0 ml, 조효소액 1.0 ml를 혼합한 다음 30 mM H₂O₂액을 0.027 을 첨가해서 반응을 개시한 직후 매분마다 470 nm에서 흡광도를 측정하여 unit를 계산하였다[3].

배지조건 최적화

선발균주를 다양한 질소원과 탄소원이 첨가된 broth에 접

종하여 배양(150RPM, 12시간) 후 serial dilution을 하여 PCA배지에 접종 후 배양(36°C, 12시간) 하여 균수를 측정하였다. 질소원 측정 간 glucose를 1% 수준에서 첨가하였다. 질소원, 질소원농도, 탄소원, 탄소원 농도의 순으로 균수를 측정하였다. 질소원으로는 ammonium chloride의 16종(Table 5)을 분석하였다. 선정된 질소원과 농도에 탄소원으로 CMC 외 10종을 분석하였다.

결과 및 고찰

Cellulose, xylan 분해성 균주의 분리 및 효소 활력

Xylan, CMC, skim milk, starch를 기질로 1% 첨가한 screening 배지를 이용하여 버섯폐배지로부터 분리한 균주들 중 복합효소에 대한 clear zone의 형성정도가 우수한 8균주를 1차 선발하였다(Table 2). 196-2번 균주는 colony 형태, 냄새 등 형태학적 관찰을 통하여 196-5번 균주와 거의 유사하여 선발에서 제외하였으며, 96-1번 균주는 성장속도가 현저히 느려 선발에서 제외하였다. Xylanase는 hemicellulose의 구성성분인 xylan을 분해하는 효소이며, lignin의 xylan backbone에 결합되어 있는 잔기들(arabinose, phenolic acid, glucuronic acid, p-coumaroyl acid 등)에 대한 분해능이 있어 lignin과 cellulose 등의 이용성 증대에 효과가 있는 것

Table 2. Enzyme activities of 1st-selected 8 strains¹

Strain No.	Enzyme activity at 30°C ²			
	Xylanase	CMCase	Amylase	Protease
96-1	+	+++	+	++
196-2	+++	++	+++	+++
196-5	+++	++	+++	+++
201-3	+++	++	+++	+++
201-7	++	+++	+++	++
201-8	++	++	++	++
206-1	-	+++	-	-
206-3	+++	++	+++	+++

¹The enzyme activity was evaluated after 24hr of incubation on plate count agar with 1% xylan, CMC, starch and skim milk, respectively.

²+++ represents excellent clear zone formation on the screening medium; ++ good; + fair; - negative.

로 알려져 있다[1]. 섬유소함량이 높은 버섯폐배지에서 생존이 가능한 미생물은 기본적으로 cellulose 또는 xylan을 탄소원으로 이용 가능하다고 판단된다. 따라서, 섬유소함량이 높은 버섯폐배지의 저장 및 발효에 사용할 목적으로 xylanase에 대한 clear zone 형성정도를 우선 선발 기준으로 하여, 196-5, 201-3, 206-1, 206-3번 균주를 선발하였으며, 버섯폐배지를 기질로 하여 측정된 효소활력은 Table 3에 제시하였다. 201-3번 균주는 CMCase, xylanase와 laccase의 활력이 가장 우수하여 최종적으로 선발하였으며, 206-3번 균주는 선발에서 중요한 선발요인인 xylanase의 활력이 높아서 추가적으로 선발을 하였다.

선발균주의 특성 및 동정

최종적으로 선발된 균주의 생리 및 생화학적 특성 파악을 위해 API 50 CHB 동정 kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 당 발효/이용성을 조사한 결과는 Table 4에 제시하였다. 201-3과 206-3는 당이용 패턴이 비슷하였으며, 206-3번 균주는 추가적으로 glycerol, mannitol, amygdaline, arbutine을 이용하여 산을 생성하였다. 간이동정 결과 201-3번은 *B. mycoides*로, 206-3번은 *B. cereus*로 간이동정 되었으나, 두 균주 모두 C13:0 ISO와 C13:0 ISO가 차지하는 비율이 높

Table 3. Enzyme activities of 2nd-selected strains¹

Enzyme activity(30°C)	196-5	201-3	206-1	206-3
CMCase(unit/ml)	169.5	209.7	192.8	162.6
Xylanase(unit/ml)	85.2	114.4	74.3	116.9
Laccase(unit/min)	3.7×10^{-2}	4.0×10^{-2}	3.7×10^{-2}	1.8×10^{-2}
MnP(unit/sec)	8.7×10^{-5}	2.2×10^{-4}	4.8×10^{-5}	1.3×10^{-4}

¹Basal medium: 2.0%(w/v) spent mushroom substrates + 0.5%(w/v) urea.

은 결과를 보인 세포질 지방산조성 결과(Table 5)와 16s rDNA sequence결과(Fig. 1, 3)에 의한 계통수는 Fig 2, 4에 각각 표시하였다. 이상의 결과들로 부터 201-3번은 최종적으로 *Enterobacter ludwigii*로, 206-3번은 *Bacillus cereus*로 동정되어 *Ent. ludwigii* KU201-3, *B. cereus* KU206-3으로 각각 명명하였다.

질소원에 의한 생육조건

선발균주의 질소원에 따른 총균수에의 영향은 Table 6에 제시하였다. 질소원으로는 두 균주 모두 soybean meal이 가장 우수하였다. 두 균주 모두 비단백태 질소화합물(non protein nitrogen)보다는 단백질질소(protein nitrogen)원에서

Table 4. Biochemical (carbohydrates) characteristics of strain 201-3 and strain 206-3

Characteristics	Strain		Characteristics	Strain	
	201-3	206-3		201-3	206-3
Glycerol	-	+	Salicine	+	+
Erythritol	-	-	Cellobiose	+	+
D-Arabinose	-	-	Maltose	+	+
L-Arabinose	-	-	Lactose	+	+
Ribose	+	+	Melibiose	-	-
D-xylose	-	-	Saccharose	+	+
L-xylose	-	-	Trehalose	+	+
Adonitol	-	-	Inuline	-	-
β Methyl-xyloside	-	-	Melezitose	-	-
Galactose	-	-	D-Raffinose	-	-
D-Glucose	+	+	Amidon	+	+
D-Fructose	+	+	Glycogen	+	+
D-Mannose	-	-	Xylitol	-	-
L-sorbose	-	-	β Gentiobiose	-	-
Rhamnose	-	-	D-Turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D-Tagatose	-	-
Mannitol	-	+	D-Fucose	-	-
Sorbitol	-	-	L-Fucose	-	-
α Methyl-D-mannoside	-	-	D-Arabitol	-	-
α Methyl-D-glucoside	-	-	L-Arabitol	-	-
N Acetyl glucosamine	+	+	Gluconate	-	-
Amygdaline	-	+	2 ceto-gluconate	-	-
Arbutine	-	+	5 ceto-gluconate	-	-
Esculine	+	+			

Table 5. Cellular fatty acid composition of strain 201-3 and strain 206-3

Fatty acids	Strain	
	201-3	206-3
 %	
C9:0	0.19	
C11:0 ISO	0.51	
C12:0 ISO	1.30	2.02
C12:0	0.77	1.20
C13:0 ISO	20.97	20.07
C13:0 ANTEISO	1.57	2.14
C14:0 ISO	3.82	5.33
C14:0	3.54	4.71
C15:0 ISO	35.37	27.27
C15:0 ANTEISO	2.91	3.55
C15:0		0.61
C16:1 w7c alcohol	0.97	0.85
C16:0 ISO	3.12	4.54
C16:0	2.28	5.46
C15:0 2OH	0.89	0.59
ISO C17:1 w10c	1.86	1.86
ISO C17:1 w5c	4.06	3.03
C17:1 ANTEISO A		0.76
C17:0 ISO	4.71	4.60
C17:0 ANTEISO		0.73

Table 6. Effect of nitrogen sources on total bacteria counts^{1,2,3}

Nitrogen sources(1%)	Strain	
	201-3	206-3
 Log ₁₀ cfu/g ⁴	
Ammonium chloride	-	-
Ammonium citrate	-	-
Ammonium nitrate	-	-
Ammonia solution	-	-
Ammonium sulfate	-	-
Beef extract	8.18	6.34
Casamino acid	6.15	6.78
Casein	-	-
Malt extract	4.32	-
Peptone	5.61	-
Skim milk	5.63	7.23
Soybean	5.04	7.32
Soybean meal	8.23	7.58
Soytone	8.11	-
Tryptone	8.08	7.08
Urea	-	-
Yeast extract	8.20	7.57

¹Basal carbon source : 1.0%(w/v) glucose.
²The rate of growth was evaluated after 12 hr of incubation on plate count agar.
³Culture : casein peptone 5 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1g, agar 15 g /L; “-” : no growth.
⁴Colony-forming unit per gram of wet sample.

GGGGACTGCGGCAGGCTACCATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTT
 GCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCC
 TGATGGAGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTC
 GCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCA
 GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCC
 TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCA
 GACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
 TGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTAC
 TTTACGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTT
 ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAGTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCACGCAGGC
 GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
 TCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
 CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACCGATGTCGACTTGAGGTTG
 TGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGG
 GGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCAC
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCT
 ACTCTTGACATCCAGAGAAGTTCAGAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAA
 CTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTC
 CGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTA
 CAATGGCCGATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCAT
 AAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC
 GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAAGAAGTT
 AGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTGTGATNCAGAACGGG

Fig. 1. 16s rDNA sequence of strain 201-3.

성장이 더 좋았으며, 단일물질로 구성된 질소원 보다는 soybean meal과 yeast extract와 같은 복합물질로 구성된 질소원에서 생육상태가 양호하였다. 이는 추가적으로 함유된 미량 물질들에 의한 영향으로 판단된다. soybean meal의 농도에 따른 총균수에의 영향은 Table 7에 제시하였다. 201-3번 균주는 1.0%(w/v) 이상의 농도에서는 큰 차이가 없었으며, 1%가 가장 높았다. 206-3번은 3.0%에서 가장 높은 생장을 나타냈다.

탄소원에 의한 생육조건

다양한 탄소원에 대한 총균수 변화는 Table 8에, 농도에 대한 총균수 변화는 Table 9에 제시하였다. 201-3, 206-3번 균주 모두 탄소원에 따른 균 생육에 큰 차이는 없었으며, 이들의 농도에 있어서도 총균수에의 영향 또한 미

AGCAGGGGGCTATCTGCAGTCGGCGATGGATTAGAGCTTGCTCTTATGAA
 GTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTG
 GGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCA
 TGGTTCGAAATTTGAAAGCGCGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGC
 GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGT
 AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCT
 GTTGTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
 ACCTAACAGAAAGCCACGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGGGTAATAC
 GTAGGTGCAAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCCGCGCAGGT
 GGTTCCTAAGTCTGATGTAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
 TGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACT
 TTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG
 AGGGTTCCGCCCTTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
 GGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
 CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
 AGGTCTTGACATCCTCTGAAACCTTAGAGATAGGCTTCTCCTTCGGGA
 GCAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGATGATGT
 TGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATT
 AAGTTGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA
 CAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCAT
 AAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCT
 GGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT
 CGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGC

Fig. 2. 16s rDNA sequence of strain 206-3.

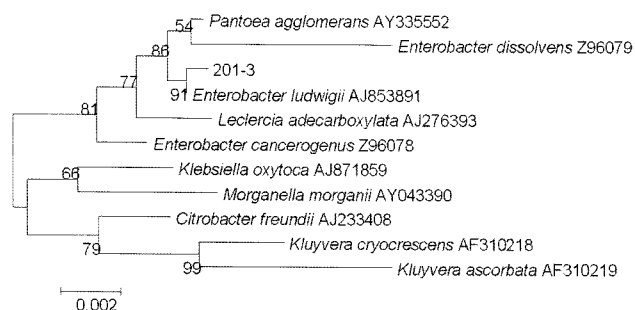


Fig. 3. Phylogenetic tree of strain 201-3 (*Enterobacter ludwigii*).

미한 편이었다. 201-3번은 sucrose 2.0%에서, 206-3번은 molasses 2.0%에서 가장 생육상태가 좋았다. 대량생산을 위

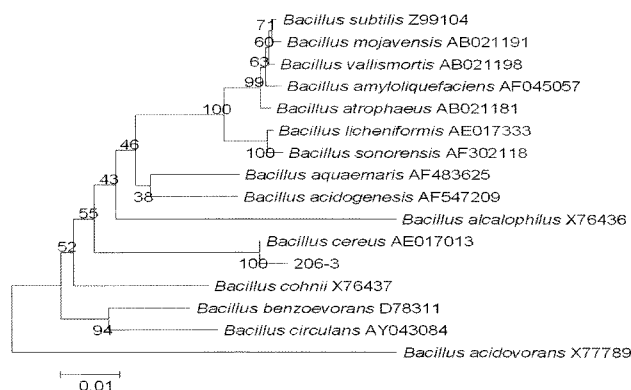


Fig. 4. Phylogenetic tree of strain 206-3 (*Bacillus cereus*).

Table 7. Effect of nitrogen source (soybean meal) concentrations on total bacteria counts^{1,2}

Nitrogen concentration (%)	Strain 201-3		Strain 206-3	
 Log ₁₀ cfu/g ³			
0.5	7.26	7.48		
1.0	8.23	7.59		
1.5	8.00	7.68		
2.0	8.11	7.56		
3.0	8.18	8.46		

¹The rate of growth was evaluated after 12 hr of incubation on plate count agar.

²Culture : casein peptone 5 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1 g+agar 15 g/L

³Colony-forming unit per gram of wet sample.

Table 8. Effect of carbon source at 1% and 3% of soybean meal on total bacteria counts^{1,2}

Carbon Source(1%)	Strain 201-3		Strain 206-3	
	Soybean meal 1%	Soybean meal 3%		
 Log ₁₀ cfu/g ³			
CMC	7.81	-		
Dextrose	8.43	-		
Fructose	8.23	8.46		
Glucose	8.23	8.41		
Maltose	8.49	8.40		
Molasses	8.11	8.76		
Starch	8.34	8.34		
Sucrose	8.63	8.46		
Wheat flour	8.30	-		
Xylan	-	8.20		
Xylose	7.98	-		

¹The rate of growth was evaluated after 12 hr of incubation on plate count agar.

²Culture : casein peptone 5 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1 g+agar 15 g/L; “-” : no growth.

³Colony-forming unit per gram of wet sample.

한 조건에서는 두 균주 모두 부산물이며 가격이 저렴한 molasses를 1% 수준에서 사용하는 것이 효과적이라 판단된다.

Table 9. Effect of carbon source concentrations at 1% and 3% of soybean meal on total bacteria counts^{1,2}

Carbon concentration (%)	Strain 201-3		Strain 206-3	
	Soybean meal 1%		Soybean meal 3%	
	Sucrose	Molasses	Sucrose	Molasses
 Log ₁₀ cfu/g ³			
0.5	7.98	8.00		
1.0	8.61	8.79		
1.5	7.74	8.32		
2.0	8.95	8.65		
3.0	8.26	8.18		

¹The rate of growth was evaluated after 12hr of incubation on plate count agar.

²Culture : casein peptone 5g, yeast extract 2.5g, dextrose 1g, agar 15g/L

³Colony-forming unit per gram of wet sample.

요 약

본 연구는 톱밥주원료 버섯폐배지의 효과적 사료화를 위한 균주개발을 목적으로 버섯폐배지로부터 섬유소분해력이 높은 중온성 균주의 분리 동정하고 균주생산을 위한 배지의 최적화 조건 도출을 위하여 실시하였다. Xylanase와 CMCase의 활력이 높으면서 amylase와 protease의 활력이 낮아 선발된 균은 201-3, 206-3번이며, 동정결과 201-3은 *Enterobacter ludwigii*로 동정되어 *Ent. ludwigii* KU201-3으로, 206-3은 *Bacillus cereus*로 동정되어 *B. cereus* KU206-3으로 명명 하였다. 균주생산을 위한 적정 액상배양조건은 *Ent. ludwigii* KU201-3은 질소원으로 soybean meal 1%, 탄소원으로 sucrose 3%가, *B. cereus* KU206-3은 질소원으로 soybean meal 3%, 탄소원으로 molasses 1%인 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 농진청 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Campbell, G. L. and M. R. Bedford. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* **72**: 449
- Claus, D. and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus*, PP1105-1139. In Sneath, P. H. A. (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Ha, H. C. 2001. Purification and characterization of manganese peroxidase from *Pleurotus ostreatus*. *Proc. Asian Mycol. Symp.* 209-214.
- Ha, J. K., S. S. Lee, Y. S. Moon and C. H. Kim. 2005. Ruminant nutrition and physiology. *Seoul National Univ. Press.*
- Jung, W. H., S. Y. Yang, M. D. Song, J. K. Ha and C. W. Kim. 2003. Isolation of *Bacillus* sp. producing xylanase and cellulase and optimization of medium conditions of its production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 383-388.
- Khasin, A., I. Alchanati and Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1725-1730.
- Kim, Y. I., J. S. Bae, J. W. Huh and W. S. Kwak. 2007. Monitoring of feed-nutritional components, toxic heavy metals and pesticide residues in mushroom substrates according to bottle type and vinyl bag type cultivation. *Kor. J. of Ani. Sci.* **49**: 67-78.
- Makela, M., S. Galkin, A. Hatakka and T. Lundell. 2002. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 542-549.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters including hydroxy acid. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 861-867
- Morohoshi, N., T. Nakamura and T. Haraguchi. 1985. Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Trametes versicolor*(I). *Tokyo Univ. of Agri. and Tech.* **21**: 101-105.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka and M. Itavaara. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Tech.* **72**: 169-183.
- Yang, S. Y., M. D. Song, O. H. Kim, and C. W. Kim. 2001. Isolation of *Bacillus* sp. producing multi-enzyme and optimization of medium conditions for its production Using Feedstuffs for Probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 110-114.

(Received Aug. 3, 2007/Accepted Sep. 9, 2007)