

부속촉진 세균 *Bacillus* sp. SJ21 균주의 cellulase와 xylanase 활성

신평균 · 조수정^{1*}

국립원예특작과학원 버섯과, ¹경남과학기술대학교 제약공학과

Cellulase and Xylanase Activity of Compost-promoting Bacteria *Bacillus* sp. SJ21

Pyung Gyun Shin and Soo Jeong Cho^{1*}

Division of Mushroom Research, International Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, 150 Chilamdong, Jinju 660-758, Korea

In order to isolate thermophilic compost-promoting bacteria with high activity of cellulase and xylanase, spent mushroom substrates with sawdust were collected from mushroom cultivation farm, Jinju, Gyeongnam in Korea. Among of the isolates, one strain, designated SJ21 was selected by agar diffusion method. The strain SJ21 was identified as members of the *Bacillus licheniformis* by biochemical characteristics using *Bacillus* ID kit and VITEK 2 system. Comparative 16S rDNA gene sequence analysis showed that strain SJ21 formed a distinct phylogenetic tree within the genus *Bacillus* and was most closely related to *Bacillus subtilis* with 16S rDNA gene sequence similarity of 99%. On the basis of its physiological properties, biochemical characteristics and phylogenetic distinctiveness, strain SJ21 was classified within the genus *Bacillus*, for which the name *Bacillus* sp. SJ21 is proposed. The cellulase and xylanase activity of *Bacillus* sp. SJ21 was slightly increased according to bacterial population from exponential phase to stationary phase in growth curve for *Bacillus* sp. SJ21.

Key words: Compost-promoting bacteria, Cellulase, Xylanase, *Bacillus* sp. SJ21

서 언

우리나라와 같이 부존자원이 부족한 나라에서는 부산물을 이용한 녹색성장과 식량확보가 필요하며 이를 위해서는 자원순환형 친환경농업 (resource cycling agriculture)의 정착이 선행되어야 한다. 자원순환형 친환경농업에 이용 가능한 부산물은 다양하지만 그 중에서도 버섯 수확 후 배지 (spent mushroom substrates; SMS)는 버섯을 수확한 후 남겨진 농산부산물로서 배지 영양분의 20% 정도는 버섯 재배 과정에서 버섯에 의해 이용되고 나머지 80% 정도는 버섯 수확 후 배지에 남아 있을 뿐만 아니라 버섯균이 분비한 각종 생리활성물질과 버섯 균사체 등이 잔존해 있기 때문에 (Williams et al., 2001) 친환경농업자원으로 재활용될 수 있는 유기물이다. 부산물로 발생하는 각종 유기물은 작물에 유용한 영양분을 함유하고 있으나 악취 발생과 중금속 및 병원균 감염 등의 문제가 발생할 수 있기

때문에 농업 생산에 직접 사용하기에는 위험부담이 있다. 따라서 유기물 함량이 높은 부산물의 농업적 재활용을 위해서는 퇴비화와 같은 가공공정이 필수적이며 효율적인 퇴비화를 위해서는 퇴비화 과정에서 발생하는 악취를 경감시키거나 부속을 촉진시킬 수 있는 미생물의 개발이 필요하다. 퇴비화 공정은 미생물의 작용으로 유기물이 생물학적으로 분해되어 안정화되는 일련의 부속과정이며 부속된 퇴비는 미생물이 분비한 점액물질에 의해 토양의 입단화가 형성되어 토양의 통기성, 투수성, 보수성 등을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 미생물이 생성한 이차대사산물에 의해 식물병원성 미생물의 증식을 억제할 수도 있다. 퇴비화에 관여하는 미생물은 *Bacillus* 속, *Clostridium* 속, *Pseudomonas* 속, *Cellulomonas* 속, *Xanthomonas* 속, *Pectobacterium carotovorum*, *Streptomyces* 속, *Thermomonospora* 속, *Trichoderma* 속 등이 알려져 있으며 현재 *Bacillus* 속과 *Clostridium* 속에 관한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 특히 *Bacillus* 속의 미생물들은 체외분비효소인 cellulase, xylanase, lactase 등을 분비하여 난분해성 물질을 분해하고 이를 탄소원으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 (Kim et al., 1995; Kim et al., 2004; Lee and Choi, 2006) iturin, surfactin, fengycin,

접수 : 2011. 8. 30 수리 : 2011. 9. 26

*연락처 : Phone: +82557513397

E-mail: sjcho@gntech.ac.kr

bacillomycin과 같은 항진균성 항생물질을 생산하기 때문에 식물병 방제효과를 기대할 수 있으며 (Nakano et al., 1998; Regine et al., 1985; Roongsawang et al., 2002; Vanittanakam et al., 1986) 액체배양 시 다른 균주에 비해 생육속도가 빠르고 포자를 형성하여 고온에서도 생육할 수 있으므로 (Schallmey et al., 2004) 퇴비화 부속촉진 미생물이나 미생물제재로 개발 가능성이 높은 자원이다.

버섯 수확 후 배지는 버섯의 종류와 재배 방식에 따라 다양하게 배출되고 있지만 대부분 톱밥과 곡물이 주원료이며 일반적으로 톱밥과 곡물에는 난분해성 탄수화물인 cellulose, hemicellulose, lignin 등이 많이 함유되어 있다. Kim et al. (1999)은 cellulose를 가수분해할 수 있는 cellulase는 축산 분뇨의 퇴비화 촉진에 기여한다고 보고하였다. Hemicellulose의 주요 구성성분인 xylan은 xylanase에 의해 D-xylose로 분해되며 xylanase는 농산부산물의 이용성 증대를 위해 필요한 효소이다. 따라서 난분해성 물질인 cellulose, hemicellulose, lignin 등을 많이 함유하고 있는 버섯 수확 후 배지를 퇴비로 이용하기 위해서는 cellulase와 xylanase 분비능이 우수한 부속촉진 미생물의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 유기물 함량이 높은 새송이버섯 수확 후 배지의 퇴비화에 필요한 부속촉진 미생물을 개발할 목적으로 진주인근 지역의 새송이버섯 재배농가에서 수집한 수확 후 배지로부터 cellulase와 xylanase를 동시에 분비하는 미생물을 분리·동정하고 분리균이 생성하는 cellulase와 xylanase의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

부속촉진 미생물의 분리 Cellulase와 xylanase 분비능이 우수한 균주를 분리하기 위하여 경남 인근 지역의 새송이버섯 재배농가로부터 유기물 함량이 높은 새송이버섯 수확 후 배지를 수집하였다. 새송이버섯 수확 후 배지에 우점하는 미생물은 수집한 배지 1 g을 멸균수에 현탁하여 10^3 으로 희석한 후 trypticase soy agar (TSA) 고체 배지에 도말한 다음 50°C에서 36시간 동안 배양하여 분리하였다. 분리균 중 cellulase와 xylanase를 동시에 분비하는 미생물은 carboxy methyl cellulose (CMC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 또는 xylan (Xylan from oat spelts, Sigma, USA)이 각각 기질로 첨가된 배지에서 확인하였다. Cellulase 분비능이 우수한 미생물은 분리균을 0.5% CMC와 1% trypan blue가 첨가된 Luria-Bertani (LB) 고체배지에 접종한 다음 50°C에서 36시간 동안 배양한 후 코로니 주변에 형성된 cellulose 분해환의 크기를 측정하여 선발하였으며 cellulase 분비능이 확인된 분리균의 xylan 분해능은 0.5% xylan이 기질로 첨가된 LB 고체배지에 분리

균을 접종한 다음 50°C에서 36시간 동안 배양한 후 iodine으로 염색하여 코로니 주변에 형성된 xylan 분해환의 크기를 측정하여 최종 선발하였다.

분리균의 동정 최종 선발 균주의 형태적 특징은 분리균을 50°C에서 36시간 동안 배양한 다음 현미경으로 관찰하여 확인하였으며 생화학적 특성은 Bacillus ID kit (Microgen™, UK)와 VITEK 2 system (bioMérieux, USA)을 사용하여 조사하였다.

최종 선발 균주의 16S rDNA 염기서열은 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 얻은 산물 중 1.5 kb에 해당하는 단편을 PCR purification kit (Qiagen, USA)를 사용하여 정제한 다음 MacroGen (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였으며 그 결과는 GeneBank에 등록하였다 (JN860198). 중합효소연쇄반응에 사용한 universal primer는 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')이고 중합효소연쇄반응은 genomic DNA를 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 30 cycle을 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 10분 동안 수행하였다. 최종 선발 균주의 16S rDNA 염기서열은 GeneBank database에 등록된 균주들의 16S rDNA 염기서열과 상동성을 조사하여 계통학적 유연관계를 분석하였으며 그 결과는 DNAMan analysis system (Lynnon Biosoft, Canada)을 이용하여 계통도로 작성하였다.

분리균의 생육과 효소 생성능 분리균의 생육이 효소 생성에 미치는 영향은 0.5% CMC 또는 xylan이 기질로 첨가된 LB 액체배지에 분리균을 각각 접종한 다음 36시간 동안 진탕배양하면서 4시간 간격으로 채취한 배양액을 사용하여 조사하였다. 분리균의 생육곡선은 채취한 배양액을 600 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였으며 cellulase와 xylanase 활성은 DNS 환원당 정량법 (Miller et al., 1960)으로 측정하였다. Cellulase 활성은 4시간 간격으로 채취한 분리균 배양액을 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액만 회수한 다음 상등액 250 μ L와 0.5% CMC 500 μ L, 200 mM phosphate buffer (pH 6.0) 250 μ L를 혼합하여 100°C에서 10분 동안 반응시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다. Xylanase 활성은 CMC 대신에 xylan을 기질로 사용하여 cellulase와 동일한 방법으로 측정하였다. Cellulase와 xylanase 활성 측정에 사용된 표준시료는 각각 glucose와 D-xylose이고 효소 활성을 나타내는 단위인 1 unit은 CMC 또는 xylan으로부터 1분 동안 1 μ mol의 glucose 또는 D-xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Cellulase와 xylanase 분비능이 우수한 균주를 분리하기 위하여 진주인근 지역의 새송이버섯 재배농가에서 퇴적되어 있는 새송이버섯 수확 후 배지를 수집하였다. 수집한 새송이버섯 수확 후 배지는 멸균수에 희석하여 TSA 고체 배지에 도말한 다음 50°C에서 배양하였으며 23개의 균주가 분리되었다. 분리균의 cellulase와 xylanase 활성은 agar diffusion 법에 따라 CMC 또는 xylan이 각각 기질로 첨가된 고체배지에서 분해환의 크기를 측정하여 조사하였으며 cellulase와 xylanase를 동시에 분비하는 3개의 균주를 1차 선발하였다 (Table 1). 선발된 균주 중에서 분해환의 크기

Table 1. Cellulase and xylanase activity of the isolated strains from spent mushroom substrate. The activity ratio was calculated from clear zones formed on LB agar plate containing CMC or xylan as substrate and incubated at 50°C for 36 hr.

Isolated strain	Activity ratio	
	Cellulase activity	Xylanase activity
SJ03	1.6	2.0
SJ07	-	1.8
SJ09	1.8	1.5
SJ11	1.5	-
SJ15	1.0	-
SJ21	2.4	1.9

가 가장 큰 균주 SJ21을 최종 선발하여 본 실험에 사용하였다. 분리균 SJ21의 형태적 특징을 조사하기 위하여 분리균을 TSA 고체배지에서 36시간 동안 배양한 후 현미경으로 관찰한 결과 분리균 SJ21은 Gram양성 간균이었다. 분리균 SJ21의 생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system를 이용하여 분석하였으며 *Bacillus* ID kit로 분석한 결과 분리균은 *B. lincheniformis*와 95.76%의 probability을 나타내었고 VITEK 2 system에 의한 분석결과에서도 *B. lincheniformis*와 유사한 생화학적 특성을 나타내었다. 분리균 SJ21과 *B. lincheniformis*, *B. subtilis*의 생화학적 특성을 비교한 결과는 Table 2에 나타내었다. *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system에 의한 분리균 SJ21의 생화학적인 특성을 종합해보면 분리균 SJ21은 arabinose, cellobiose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, salicin, sucrose, trehalose, xylose, adonitol, galactose, methyl-D-glucoside, ONPG, arginine, citrate, nitrate 등에 대해 양성반응을 나타내었으나 inositol, sorbitol, methyl-D-mannoside, inulin, melizitose, indole, arginine, VP 등에 대해서는 음성반응을 나타내었다.

분리균의 계통학적 유연관계를 조사하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 분리균 SJ21은 *B. subtilis*와 99%의 상동성을 나타내었으며 분리균의 16S rDNA 염기서열과 GeneBank에 등록된 균주들의 16S rDNA 염기서열을 비교하여 작성한 계통도는 Fig. 1에 나타내었다. *Bacillus* 속은 다양한 환경에서 포자를 생성하여 생존할 수 있기 때문에 환경에 따라 종 다양성이 큰 세균으로 16S rDNA 염기서열

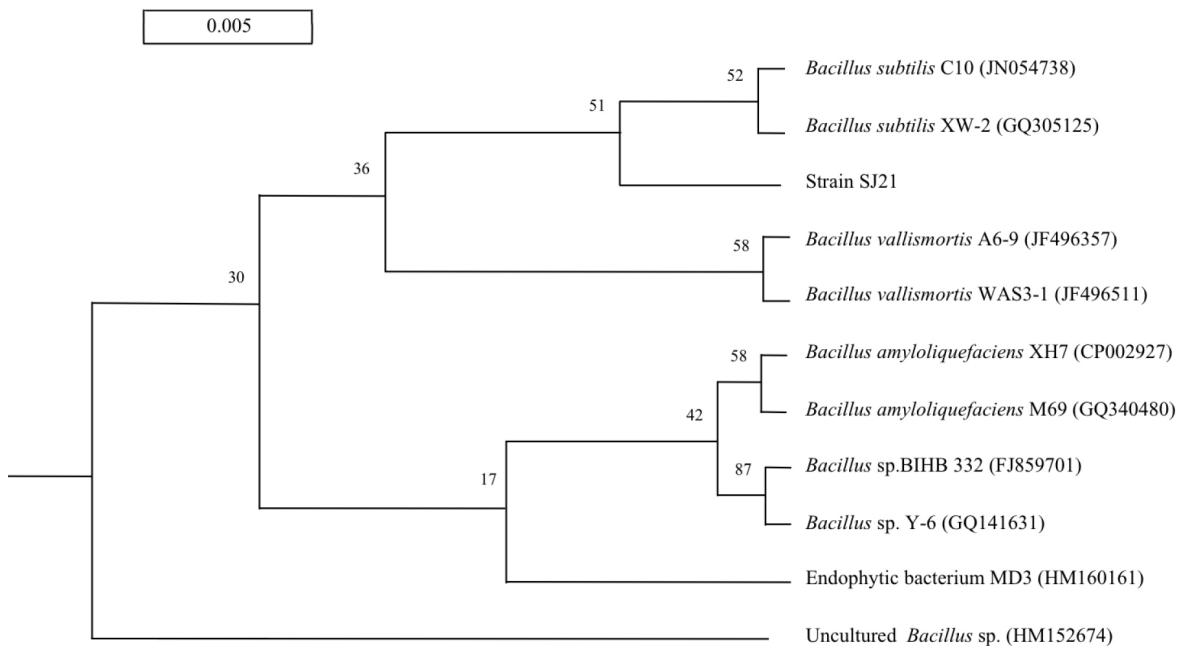


Fig. 1. Phylogenetic relationships of the isolate SJ21 and other closely related bacteria based on the partial 16S rDNA gene sequence. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values (expressed as percentages of 10,000 replications) are shown at major branching points. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position.

Table 2. Biochemical characteristics of strain SJ21.

Characteristics	Reaction [†]		
	<i>B. subtilis</i>	Strain SJ21	<i>B. lincheniformis</i>
Arabinose	+	+	+
Cellobiose	+	+	-
Inositol	+	-	+
Mannitol	+	+	+
Mannose	+	+	+
Raffinose	+	+	+
Rhamnose	+	+	+
Salicin	+	+	-
Sorbitol	+	-	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Xylose	-	+	+
Adonitol	-	+	+
Galactose	+	+	-
Methyl-D-Mannoside	-	-	+
Methyl-D-Glucoside	+	+	+
Inulin	+	-	-
Melizitose	-	-	-
Indole	-	-	-
ONPG	+	+	+
Arginine	-	+	+
Citrate	+	+	+
VP	-	-	-
Nitrate	-	+	+

[†] +, positive reaction; -, negative reaction.

에서 100%의 상동성을 나타내더라도 서로 다른 종으로 분류될 수 있으며 (Seki et al., 1978) 분리균 SJ21도 16S rDNA 염기서열 분석에서는 이미 보고된 *B. subtilis*와 99%의 상동성을 보였지만 생리적·생화학적 특성에서는 *B. lincheniformis*에 가까운 특성을 나타내었다.

분리균 SJ21의 생리적·생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 유연관계를 종합하여 분리균 SJ21은 *Bacillus* sp. SJ21로 동정되었다. 일반적으로 *Bacillus* 속은 다양한 효소와 항생물질을 다량 분비하며 포자를 형성하여 다양한 환경에서도 생존할 수 있기 때문에 분리균 SJ21은 부속촉진 세균으로써 유기물의 퇴비화에 유용한 생물자원이 될 수 있을 것이다.

분리균의 생육이 효소 생성에 미치는 영향은 0.5% CMC 또는 xylan이 각각 기질로 첨가된 LB 액체배지에 분리균을 접종한 다음 36시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 채취한 배양액의 생육곡선과 DNS 환원당 정량법에 준하여 측정된 cellulase와 xylanase 활성의 상관관계를 조사하여 확인하였다 (Fig. 2). Cellulase 활성은 분리균이 증식함에 따라 대수증식기 중반부터 급격히 증가하였고 정지기에 진입하면 효소활성이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났으며 xylanase 활성은 대수증식기 초기부터 지속적으로 증가하여 대수증식기 중반에 최대활성을 나타내었다. 이 결과는 *Bacillus* 속이 분비하는 탄수화물 분해효소의 활성은 미생물의 증식과 더불어 지속적으로 증가하고 정지기에 도달하면 최대활성을 나타낸다는 Kim et al. (Kim et al., 1995; Kim et al., 2004)의 보고와 일치하였다.

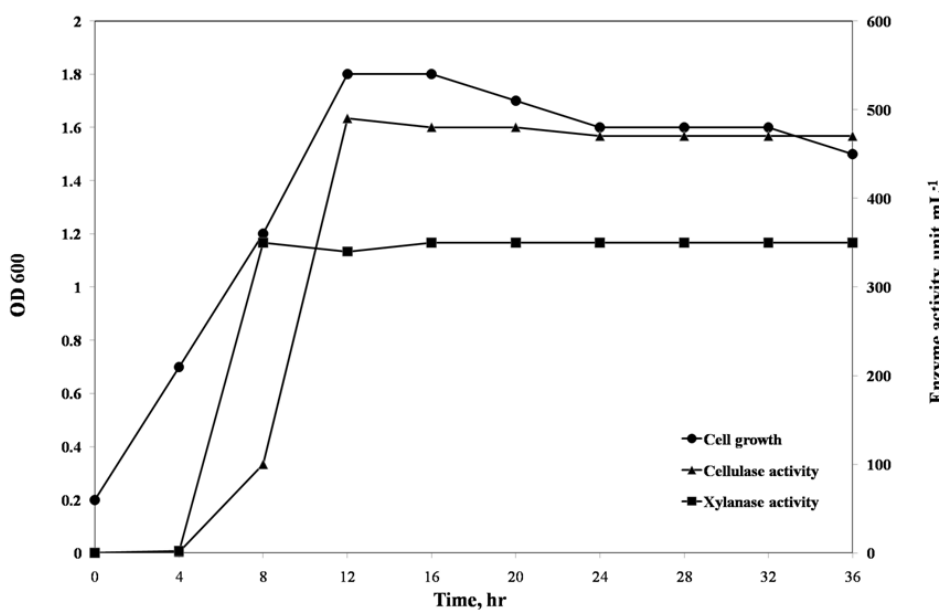


Fig. 2. Growth and enzyme production of Bacillus sp. SJ21. The *Bacillus* sp. SJ21 was growth in LB medium with 0.5% CMC or xylan at 50°C for 36 hr. The cell growth was determined by measuring OD₆₀₀ of cell culture. The enzyme activity was determined with the culture supernatants.

요 약

Cellulase와 xylanase 분비능이 우수한 고온성 부속촉진 세균을 분리하기 위하여 진주 인근지역의 새송이버섯 재 배농장으로부터 새송이버섯 수확 후 배지를 수집하였다. 새송이버섯 수확 후 배지로부터 23종의 균주를 분리하였으며 이 중 cellulase와 xylanase을 동시에 분비하는 균주를 최종 선발하여 SJ21으로 명명하였다. *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system를 이용하여 분리균 SJ21의 생리적·생화학적 특성을 조사한 결과 분리균 SJ21은 *B. lincheniformis*와 유사한 특징을 나타내었으며 16S rDNA 염기서열 분석 결과에서는 *B. subtilis*와 99%의 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 종합하여 분리균 SJ21은 *Bacillus* sp. SJ21로 동정되었다. 분리균이 분비하는 cellulase와 xylanase 활성은 분리균이 증식함에 따라 대수증식기 중반부터 급격히 증가하였고 정지기에 진입하면 효소활성이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났으며 xylanase 활성은 대수증식기 초기부터 지속적으로 증가하여 대수증식기 중반에 최대활성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 2011년 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호 : PJ006425)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Duitman, E.H., L.W. Hamoen, M. Rembold, G. Venema, H. Seitz, W. Saenger, F. Bernhard, R. Reinhardt, M. Schmidt, C. Ullrich, T. Stein, F. Leenders, and J. Vaster. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:13294-13299.
- Han, Y.W. 1987. Microbial utilization of straw. *Asv. in Applied Microbiology* 23:119-125.
- Kim, D.J., H.J. Shin, B.H. Min, and K.H. Yoon. 1995. Isolation of a Thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbial biotechnol.* 23 (3): 304-310.
- Kim, J.Y., S.H. Heo, and J.H. Hong. 2004. Isolation and characterization of an alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Kor. J. Appl. Microbial biotechnol.* 40(2):139-146.
- Kim, T.I., J.D. Han, B.S. Jeon, S.W. Ha, C.B. Yang, and M.K. Kim. 1999. Isolation and characterization of *bacillus subtilis* CH-10 secreting cellulase from catttle manure. *J. Microbial.* 35(4):277-282.
- Lee, J.H. and S.H. Choi. 2006. Xylanase production by *Bacillus* sp. A-6 isolated from rice bran. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16(12):1856-1861.
- Miller, G.L., R. Blum, W.E. Glennon, and A.L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal. Biochem.* 2:127-132.
- Nakano, M.M., M.A. Marahiel, and P. Zuber. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170:5662-5668.
- Regine, M.D., M. Ptak, F. Peypoux, and G. Michel. 1985. Pore-forming properties of iturin A: a lipopeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta.* 815:405-409.
- Roongsawang, T., T. Kameyama, M. Haruki, and M. Morikawa. 2002. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastain and surfactin. *Extremophiles* 6:499-506.
- Shallmeyer, M., A. Singh, and O.P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50:1-17.
- Seki, T., C.K. Chung, H. Mikami, and Y. Oshima. 1978. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28:182-189.
- Vanittanakam, N. and W. Loeffler. 1986. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J. Antibio. Tokyo* 39:888-901.
- Williams, B.C., J.T. McMullan, and S. McCahey. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as apotential energy feedstock. *Biores. Technol.* 79:227-230.