

Isolation and Characterization of Thermophilic *Bacillus* sp. UJ03 from Spent Mushroom (*Flammulina velvtipes*) Substrates

Sang Wan Gal and Soo Jeong Cho*

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

Received August 31 2011 / Revised September 28, 2011 / Accepted September 29, 2011

Spent mushroom substrate (SMS) is a by-product remained after a crop of mushrooms. About seven thermophilic strains were isolated from SMS (*Flammulina velvtipes*). Among them, one isolate, designated UJ03, showed the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* producing mycotoxin on PDA medium, potentially. The strain UJ03 produced cellulase and xylanase as extracellular hydrolases. The strain UJ03 was identified as a member of the genus *Bacillus* by biochemical characteristics using *Bacillus* ID kit and VITEK 2 system. Comparative 16S rDNA gene sequence analysis showed that strain UJ03 formed a distinct phylogenetic tree within the genus *Bacillus* and was most closely related to *Bacillus amyloliquefaciens* with sequence similarity of 98.9%. On the basis of its physiological properties, biochemical characteristics and phylogenetic distinctiveness, strain UJ03 was classified within the genus *Bacillus*, for which the name *Bacillus* sp. UJ03 is proposed. The antifungal compound from *Bacillus* sp. UJ03 was similar to lipopeptide iturin A of *Bacillus* sp.

Key words : Spent mushroom substrates, antifungal activity, cellulase, xylanase, *Bacillus* sp. UJ03

서 론

버섯 수확 후 배지(spent mushroom substrates; SMS)란 버섯을 수확한 후 남겨진 부산물을 말하며 버섯의 종류와 재배 방식에 따라 다양하게 배출되고 있다. 버섯 수확 후 배지는 버섯 1 kg을 생산할 때 5 kg 정도 발생되는 것으로 보고된 바 있으며[6,16,19] 버섯 배지 원료의 대부분은 사료원료이기 때문에 버섯 수확 후 배지도 사료원료로 사용될 수 있다[1]. 또한 버섯 재배과정에서 배지 영양분의 약 20% 정도는 버섯에 의해 이용되고 나머지 80% 정도는 버섯 수확 후 배지에 남아 있으므로[19] 버섯 수확 후 배지는 반추동물 사료원료로서 영양적 가치가 있다고 할 수 있다. 버섯 수확 후 배지 중에서도 팽이버섯 수확 후 배지는 난분해성 물질이 많이 함유되어 있는 톱밥 대신 콘코브, 미강, 밀기울 등을 배지원료로 사용하기 때문에 사료화에 가장 적합하다고 생각되며 우리나라와 같이 사료원료 대부분을 수입에 의존하고 있는 경우 유기물 함량이 높은 버섯 수확 후 배지의 사료화는 축산농가의 경영비 절감에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

버섯 재배 농가에서 배출되는 버섯 수확 후 배지는 높은 수분함량(50~60%)과 저장하는 동안 발생하는 열에 의해 쉽게 부패되는 특징이 있다[9]. 이처럼 부패가 용이한 부산물을 사료화하기 위해서는 발효와 같은 가공이 필요하며 무엇보다도 발효사료 제조에 적합한 생균제 균주의 개발이 중요하다. 발효에는 퇴적, 혐기, 호기발효 등의 방법이 있는데 Kwak [9]

등은 버섯 수확 후 배지를 혐기발효시킬 경우 3주가 경과한 후에도 곰팡이 오염이 일어나지 않았다고 보고하였다. 버섯 수확 후 배지의 또 다른 특징은 섬유소 함량이 높다는 것이며 이것은 버섯 수확 후 배지를 가축사료로 이용하는데 제한 요인이 될 수 있다. Jung [3], Kim [7], Yang [20] 등은 섬유소 함량이 높은 부산물일 경우 xylanase와 cellulase 활성이 높은 균주를 생균제로 사용하면 효과가 있다고 보고하였으며 xylanase와 cellulase 활성이 높은 균주를 버섯 수확 후 배지 발효사료 첨가용 생균제로 사용할 경우 사료효율 개선 효과가 있을 것으로 기대된다. 또한 버섯 수확 후 배지는 주 원료가 곡물이기 때문에 가축에게 유해한 aflatoxin이나 ochratoxin과 같은 곰팡이독소에 오염될 확률이 높으므로[4,5] 버섯 수확 후 배지 발효사료에 사용할 생균제 균주는 곰팡이독소 생성을 억제할 수 있어야 한다. 현재 축우사료 첨가용 생균제로 개발된 미생물 중에서 *Bacillus* 속은 포자를 생성하여 다양한 환경 조건에서도 생존할 수 있기 때문에 버섯 수확 후 배지 발효사료 제조시 요구되는 내열성과 혐기발효에 적합한 균주로 생각된다. 특히 *Bacillus* 속은 iturin A [12,13], fengycin [18], mycosubtilin [2]과 같은 항균물질을 생성할 뿐만 아니라 xylanase, cellulase, mannanase 등 다양한 효소를 분비하는 특징이 있기 때문에 산업적으로 많이 연구되고 있으며[14] 식품과 의약 산업에서 안전한 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로 알려져 있다.

본 연구에서는 수분과 섬유소 함량이 높은 팽이버섯 수확 후 배지 발효사료에 적합한 생균제 균주 개발을 목적으로 버섯 수확 후 배지에 우점하는 균주를 선별하기 위하여 퇴적되어 있는 수확 후 배지로부터 곰팡이독소를 생성하는 *Aspergillus*

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3397, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sjcho@gntech.ac.kr

*flavus*와 *Aspergillus ochraceus*에 대한 항균활성이 높고 cellulase와 xylanase 생성능이 우수한 균주를 분리·동정하고 분리균이 생성하는 항균물질의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

고온성 균주의 분리 및 배양조건

팽이버섯 수확 후 배지에 우점하는 고온성 균주를 분리하기 위하여 도레미농산(충북 음성 소재 팽이버섯 재배농가)으로부터 탈병 후 퇴적되어 있는 버섯 수확 후 배지를 수집하였다. 고온성 균주는 수집한 배지 1 g을 10 ml의 멸균수에 현탁한 후 현탁액을 trypticase soy agar (TSA) 배지에 도말한 다음 50°C에서 36시간 동안 배양하여 분리하였다.

분리균의 항균활성

분리균의 항균활성은 paper diffusion 법[11]을 이용하여 측정하였으며 곰팡이독소를 생성하는 *Asp. flavus*와 *Asp. ochraceus*는 농촌진흥청 한국농업미생물보존센터(Korean Agricultural Culture Collection)에서 분양받아 사용하였다. 곰팡이독소를 생성하는 *Asp. flavus*와 *Asp. ochraceus*는 멸균된 cork-borer를 사용하여 potato dextrose agar (PDA) 배지 중앙에 접종한 후 30°C에서 2일 동안 배양한 다음 사용하였다. 분리균은 trypticase soy broth (TSB) 배지에 접종하여 50°C에서 2×10^6 CFU/ml까지 배양한 후 paper disc (8 mm, Advantec, Japan)에 20 μ l씩 흡수시켜 실온에서 1시간 동안 확산시킨 다음 곰팡이가 배양된 배지 표면에 고정시켰다. 항균활성은 30°C에서 2일 동안 배양하면서 paper disc 주위의 투명환 크기를 측정하여 확인하였다.

분리균이 분비하는 가수분해효소

항균활성이 확인된 균주의 cellulase 활성은 0.5% carboxy methyl cellulose (CMC, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)와 1% trypan blue가 첨가된 Luria-Bertani (LB) 고체배지에 분리균을 접종한 다음 50°C에서 2일 동안 배양한 후 콜로니 주변에 형성된 cellulose 분해환 크기를 측정하여 확인하였다. Xylanase 활성은 0.5% xylan (xylan from oat spelts, Sigma, USA)이 기질로 첨가된 고체배지에 분리균을 접종한 다음 50°C에서 2일 동안 배양한 후 iodine으로 염색하여 콜로니 주변에 형성된 xylan 분해환 크기를 측정하여 확인하였다.

분리균의 생리적 특성 및 생화학적 특성 조사

최종 선발된 균주는 50°C에서 36시간 동안 배양한 다음 1% phosphotungstic acid로 negative stain한 후 투과전자현미경 (JEM 1010, Germany)으로 형태적 특징을 확인하였으며 Gram 양성/음성은 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 염색한

후 현미경으로 관찰하여 판정하였다. 온도가 분리균의 생육에 미치는 영향은 TSA 배지에 분리균을 도말한 후 10, 20, 30, 40, 50, 60°C에서 2일 동안 배양하면서 조사하였으며 분리균의 신진대사능인 생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit (Microgen™, UK)와 VITEK 2 system (bioMérieux, USA)을 사용하여 조사하였다.

분리균의 16S rDNA 염기서열 분석

최종 선발된 분리균의 분자생물학적 동정을 위해 분리균의 genomic DNA를 i-genomic BYF DNA extraction kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 분리한 후 분리된 genomic DNA를 주형가닥으로 증합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)을 수행하였다. 증합효소연쇄반응은 universal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하여 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. 증폭된 PCR 산물 중 1.5 kb에 해당하는 단편은 PCR purification kit (Qiagen, USA)를 사용하여 정제한 다음 Macrogen (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 16S rDNA 염기서열을 분석하였으며 그 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GeneBank database에 등록하였다(JN848829). 분석된 16S rDNA 염기서열의 상동성은 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 GeneBank database에 등록된 균주들의 16S rDNA 염기서열과 계통학적 유연관계를 비교·분석하였으며 그 결과를 근거로 DNAMAN analysis system (Lynnon Biosoft, Canada)에 의해 계통도를 작성하였다.

분리균이 생성하는 항균물질의 분리

Bacillus 속 균주는 대부분 펩타이드성 항균물질을 생산하므로 Nakano [10] 등의 방법에 따라 분리균이 생성하는 항균물질을 분리하였다. 분리균을 No. 3 배지(polypeptone 10 g, glucose 10 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, pH 6.8)에서 50°C로 3일 동안 배양한 다음 배양액을 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 6N HCl를 가하여 pH를 2.0으로 조절한 후 6,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 펠렛만을 취한 다음 메탄올에 추출하여 사용하였다. 메탄올에 추출된 산 침전물은 thin layer chromatography (TLC; silicagel 60F₂₅₄, Merck, Germany)에서 chloroform/methanol/water (6.5/2.5/0.5)의 용매조건으로 전개한 후 10% H₂SO₄로 발색하여 확인하였으며 high performance liquid chromatography (HPLC; Agilent 1100 series, USA)를 이용하여 펩타이드성 항균물질을 분리하였다. HPLC 분석에 사용된 column은 C18 reverse column이며 용매는 3.8 mM trifluoroacetic acid/water (1/4=v/v), flow rate는 1 ml/min이고 흡광도는 210 nm에서 측정하였다.

Reference 물질로 사용한 iturin A는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)로부터 구매하여 사용하였다.

결과 및 고찰

팽이버섯 수확 후 배지로부터 UJ03 균주의 분리

버섯배지에 우점하는 고온성 균주를 분리하기 위하여 퇴적되어 있는 버섯 수확 후 배지로부터 시료를 수집한 다음 희석한 후 50°C에서 생육하는 균주만을 선발하여 순수분리하였다. 순수분리된 균주 중 TSA 배지에서 콜로니의 형태, 냄새, 내생포자 형성 여부 등을 조사하여 *Bacillus* 속으로 생각되는 7균주를 1차 선발하였다. *Bacillus* 속은 Gram 양성, 간균, 통성 혐기성이며 다양한 효소와 항생물질을 다량 분비한다고[15] 보고된 세균으로 가축사료 첨가용 생균제 균주로 많이 이용되고 있으며 특히 포자를 형성하여 다양한 환경에서도 생존할 수 있기 때문에 버섯 수확 후 배지 발효사료 제조에 적합한 생균제 균주로 판단된다.

분리균 UJ03의 특성

1차 선발된 균주의 *Asp. flavus*와 *Asp. ochraceus*에 대한 항균활성은 PDA 배지에서 paper diffusion 법에 따라 확인하였으며 항균활성이 강한 UJ03, UJ06, UJ07 균주를 2차 선발하였다(Table 1). 버섯 수확 후 배지는 곡물함량과 수분함량이 높기 때문에 가축에게 치명적인 aflatoxin이나 ochratoxin을 생

성하는 곰팡이에 오염될 가능성이 높다. 따라서 버섯 수확 후 배지 발효사료의 안전성과 보존성을 향상시키기 위해서는 분리균과 같이 aflatoxin과 ochratoxin의 생성을 억제할 수 있는 생균제 균주의 개발이 필요하다. 또한 버섯 수확 후 배지에는 섬유소가 많이 함유되어 있으므로 섬유소 구성성분인 hemicellulose, xylan, cellulose 등을 가수분해하는 효소를 생성하는 균주를 선발하기 위하여 agar diffusion 법에 따라 2차 선발된 균주의 xylanase와 cellulase 활성을 조사하였다. 그 결과 xylanase와 cellulase를 동시에 분비하는 1종의 균주(UJ03)를 최종 선발하였으며 최종 선발된 균주 UJ03을 본 실험에 사용하였다(Fig. 1). 분리균 UJ03은 내생포자를 형성하는 *Bacillus* 속 균주로 고온에서도 생육할 수 있으며 *Asp. flavus*와 *Asp. ochraceus*에 대한 항균활성이 높고 xylanase와 cellulase를 동시에 분비하기 때문에 수분함량과 곡물함량이 높은 버섯 수확 후 배지 발효사료에 적합한 생균제 균주로 사용될 수 있을 것이다.

분리균 UJ03의 분류, 동정

분리균 UJ03의 형태적 특성을 조사하기 위하여 1% phosphotungstic acid로 negative stain한 후 투과전자현미경으로 관찰한 결과 분리균 UJ03은 크기가 1.3~1.8×0.9 μm인 간균이었으며(Fig. 2) Gram 염색 결과는 양성이었다.

분리균 UJ03의 생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system를 이용하여 분석하였으며 *Bacillus* ID kit로 분석한

Table 1. Antifungal activity of isolates from spent mushroom substrate against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*

Test strains	Isolates						
	UJ01	UJ02	UJ03	UJ04	UJ05	UJ06	UJ07
<i>Asp. flavus</i>	+ ^a	+	+++	-	-	++	+
<i>Asp. ochraceus</i>	-	-	++	-	+	+	+

^a Inhibitory zone diameter >30 mm, +++; 20-30 mm, ++; 10-20 mm, +; <10 mm, -.

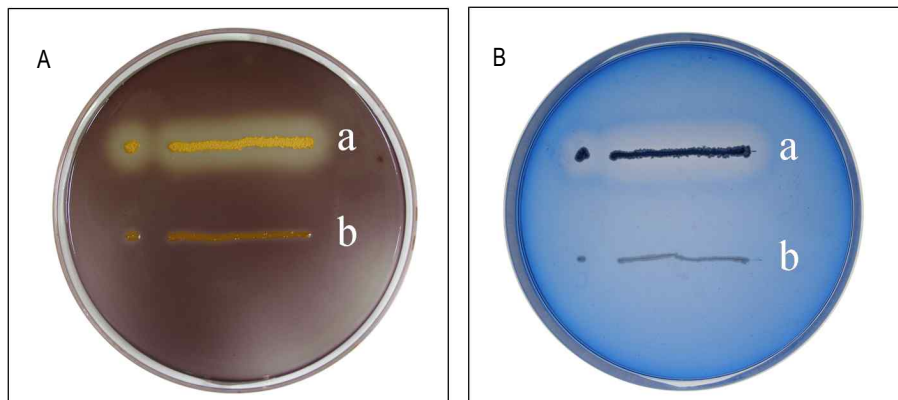


Fig. 1. Xylanase (A) and CMCCase (B) activity of the isolate UJ03 by agar diffusion method. a: isolate UJ03, b: *Escherichia coli* as a negative control.

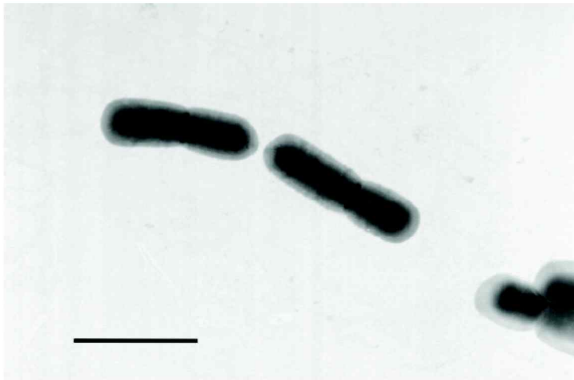


Fig. 2. Transmission electron micrograph of the isolate UJ03. Exponentially growing culture was observed by negative stain with 1% phosphotungstic acid. Scale bar, 2.4 μ m.

결과 분리균은 *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*를 포함하는 *B. subtilis* group과 98.7%의 probability을 나타내었으며 VITEK 2 system에 의한 분석결과에서는 *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis*와 유사한 생화학적 특성을 나타내었다. *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system에 의한 분리균 UJ03의 생화학적 특성을 종합하면 arabinose, L-pyrrolydonyl-arylamidase, sucrose, tyrosine arylamidase, adonitol, ala-phe-pro arylamidase, methyl-D-glucoside, meth-

yl-A-D-glucopyranoside acidification, citrate, D-mannitol, cellobiose, β -glucosidase, D-glucose, salicin, esculin hydrolysis, trehalose, ONPG, raffinose, xylose, arginine, nitrate, β -xylosidase, leucine-arylamidase, phenylalanine arylamidase 등에 대해 양성반응을 보였으며 kanamycin, oleandomycin, polymixin B 등의 항생제에 대해서는 감수성을 나타내었다.

분리균의 계통학적 유연관계를 조사하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 분리균 UJ03은 *B. amyloliquefaciens*와 98.9%의 상동성을 나타내었으며 생리적·생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 유연관계를 종합하여 분리균 UJ03은 *Bacillus* sp. UJ03으로 동정되었다. 분리균의 16S rDNA 염기서열에 근거한 계통도는 GeneBank에 등록된 균주들의 16S rDNA 염기서열을 비교하여 작성하였으며 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Shivaji [17] 등은 *B. altitudinis* 41KF2b^T (AJ831842), *B. stratosphericus* 41KF2a^T (AJ831841), *B. aerophilus* 28K^T (AJ831844)를 포함하는 *Bacillus* 속은 다양한 환경에서 포자를 생성하여 생존할 수 있기 때문에 환경에 따라 종 다양성이 큰 세균으로 16S rDNA 염기서열에서 100%의 상동성을 나타내더라도 서로 다른 종으로 분류될 수 있다고 보고하였으며 분리균 UJ03도 16S rDNA 염기서열 분석에서는 이미 보고된 *B. amyloliquefaciens*와 98.9%의 상동성을 보였지만 생리적·생화학적 특성에서는 차이를 나타내었다(Table 2).

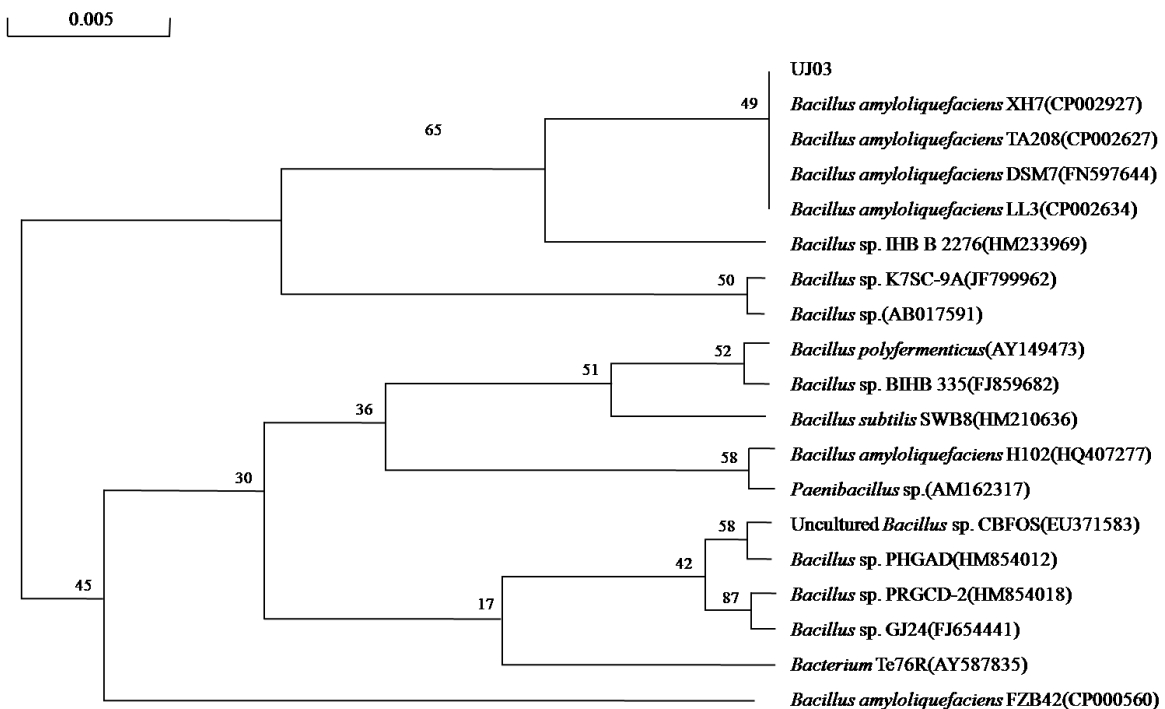


Fig. 3. Phylogenetic relationships of the isolate UJ03 and other closely related bacteria based on the partial 16S rDNA gene sequence. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values (expressed as percentages of 10,000 replications) are shown at major branching points. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position.

Table 2. Biochemical characteristics of strain UJ03

Characteristics	Reaction ^a		
	<i>B. subtilis</i>	Strain UJ03	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Arabinose	+	+	+
Cellobiose	+	+	-
Inositol	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Mannose	+	-	+
Raffinose	+	+	+
Rhamnose	+	+	+
Salicin	+	+	-
Sorbitol	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Xylose	-	+	+
Adonitol	-	-	+
Galactose	+	-	-
Methyl-D-Mannoside	-	-	+
Methyl-D-Glucoside	+	+	+
Inulin	+	+	-
Melzitose	-	-	-
Indole	-	-	-
ONPG	+	+	+
Arginine	-	-	+
Citrate	+	+	+
VP	-	+	-
Nitrate	-	+	+

^a +, positive reaction; -, negative reaction.

분리균 UJ03이 생산하는 항균물질의 특성

분리균 UJ03이 생성하는 항균물질은 분리균을 No. 3 배지에서 액체 배양한 다음 산 침전한 후 메탄올에 추출하여 얻었으며 항균물질의 TLC 분석은 iturin A를 reference 물질로 사용하여 수행하였다. Reference 물질로 사용한 iturin A는 대부

분의 *Bacillus* 속 균주가 생성하는 펩타이드성 항균물질 중 하나이다[2,12,13,18]. 분리균이 생성하는 항균물질은 TLC 상에서 chloroform/methanol/water (6.5/2.5/0.5)를 전개용매로 사용하여 10% H₂SO₄으로 발색하였을 때 분홍색을 띄었다. 10% H₂SO₄에서 분홍색으로 발색되는 물질의 Rf치는 0.36, 0.70, 0.77이었으며 reference 물질인 iturin A의 Rf치(0.34)와 비교하였을 때 유사한 Rf치를 나타내었다. TLC에서의 결과를 근거로 C18 reverse column를 이용하여 HPLC 분석(Fig. 4)을 수행한 결과에서도 분리균의 메탄올 추출물은 3.765분, 4.333분, 4.448분에서 분리되었으며 iturin A는 3.974분, 4.562분, 4.682분에서 분리되어 두 물질이 유사한 retention time에서 분리됨을 확인할 수 있었다. Reference 물질로 사용한 iturin A를 보고한 Peypoux 등[13]에 의하면 *Bacillus* 속은 지방산의 탄소수가 다른 isomer를 가진 iturin을 분비한다고 보고하였으며 분리균의 메탄올 추출물도 HPLC 분석 결과 retention time이 다른 3개의 peak를 나타내었다. 따라서 TLC와 HPLC 결과를 종합하면 분리균이 생성하는 항균물질은 iturin A와 유사한 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 2011년 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ007474)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

References

1. Bae, J. S., Y. I. Kim, S. H. Jung, Y. G. Oh, and W. S. Kwak. 2006. Evaluation on feed-nutritional value of spent mushroom(*Pleurotus osteratus*, *Pleurotus eryngii*, *Flammulina velutipes*) substrates as a roughage source for ruminants. *J.*

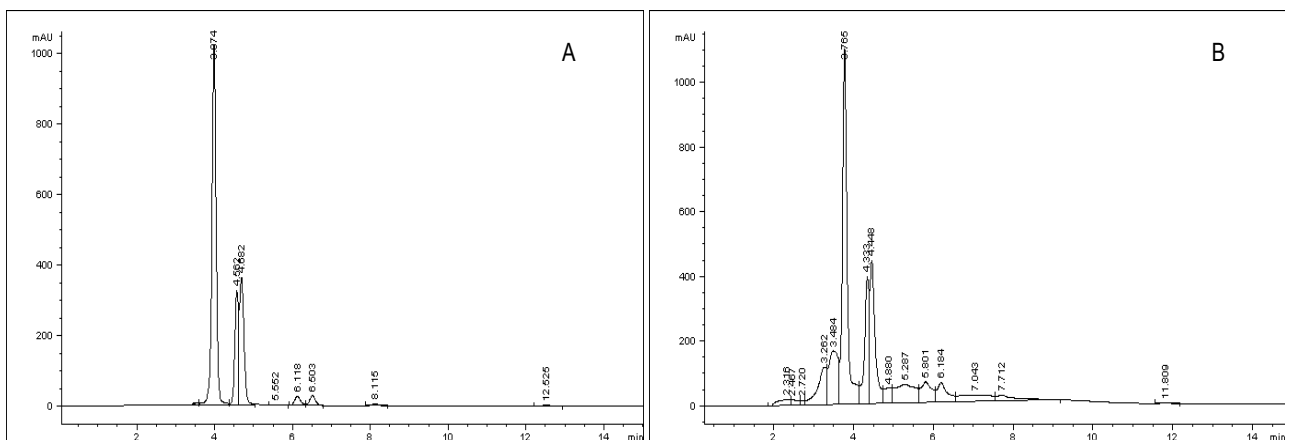


Fig. 4. HPLC chromatogram of iturin A standard purchased from Sigma (A) and compound obtained in this work (B). Eluent solvent: 3.8 mM trifluoroacetic acid/acetonitrile=1/4, Flow rate:1 ml/min., Absorbance: 210 nm.

- Anim. Sci. Technol.* **48**, 237-246.
2. 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. USA* **96**, 13294-13299.
 3. 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. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 383-388.
 4. Kabak, B., A. D. Dobson, and I. Var. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 593-619.
 5. Kabak, B. and A. D. Dobson. 2009. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *J. Food Prot.* **72**, 2006-2016.
 6. Kim, Y. I., J. S. Bae, S. H. Jung, M. H. Ahn, and W. S. Kwak. 2007. Yeild and physicochemical characteristics of spent mushroom(*Pleurotus ryngii*, *Pleurotus osteratus* and *Annullina velutipes*) substrates according to mushroom species and cultivation types. *J. Anim. Sci. Technol.* **49**, 79-88.
 7. Kim, Y. I., S. H. Jung, S. Y. Yang, J. W. Huh, and W. S. Kwak. 2007. Effects of cellulolytic microbes inoculation during deep stacking of spent mushroom substrates on cellulolytic enzyme activity and nutrients utilization by sheep. *J. Anim. Sci. Technol.* **49**, 667-676.
 8. Krause, M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr, and P. Nogaard. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in highgrain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* **76**, 2912-2920.
 9. Kwak, W. S., S. H. Jung, and Y. I. Kim. 2008. Broiler litter supplementation improves storage and feed-nutritional value of sawdust-based spent mushroom substrate. *Bioresource Technol.* **99**, 2947-2955.
 10. 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.
 11. Perez, C., M. Pauli, and P. Bazerque. 1990. An antibiotics assay by agar well diffusion method. *Acta Biol. Med. Exp.* **15**, 113-115.
 12. 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.
 13. Regine, M. D. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**, 151-174.
 14. Schallmeyer, M., A. Singh, and O. P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**, 1-17.
 15. 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.
 16. Semple, K. T., B. J. Reid, and T. R. Fermor. 2001. Impact to composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants, *Environ. Poll.* **112**, 269-283.
 17. Shivaji, S., P. Chaturvedi, K. Suresh, G. S. Reddy, C. B. Dutt, M. Wainwright, J. V. Narlikar, and P. M. Bhargava. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1456-1473.
 18. Vanittanakam, N. and W. Loeffler. 1986. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J. Antibiot. (Tokyo)* **39**, 888-901.
 19. Williams, B. C., J. T. McMullan, and S. McCahey. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Bioresource Technol.* **79**, 227-230.
 20. 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. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 110-114.

초록 : 팽이버섯 수확 후 배지로부터 고온성 *Bacillus* sp. UJ03의 분리 및 특성

갈상완 · 조수정*

(경남과학기술대학교 제약공학과)

버섯 생산 후 발생하는 부산물인 팽이버섯 수확 후 배지로부터 7종의 고온성 균주를 분리하였으며 이 중 곰팡이독소를 생성하는 *Asp. flavus*와 *Asp. ochraceous*에 대한 항균활성이 높으면서 xylanase와 cellulase 생성능이 우수한 균주를 최종 선발하여 UJ03으로 명명하였다. *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system를 이용하여 분리균 UJ03의 생리적·생화학적 특성을 조사한 결과 분리균 UJ03은 *Bacillus* 속과 유사한 특징을 나타내었으며 16S rDNA 염기서열 분석 결과에서는 *B. amyloliquefaciens*와 98.9%의 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 종합하여 분리균 UJ03은 *Bacillus* sp. UJ03으로 동정되었으며 분리균 UJ03이 생성하는 항균물질은 TLC와 HPLC 분석에서 *Bacillus* 속 균주가 생성하는 펩타이드성 항균물질인 iturin A와 유사한 특성을 나타내었다.