

느타리 수확후배지로부터 분리된 고온성 *Bacillus licheniformis* YJ09의 특성

김혜수 · 김철환 · 조수정*

경남과학기술대학교 제약공학과

Isolation and Characterization of Thermophilic *Bacillus licheniformis* YJ09 from Spent Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Substrates

Hye Soo Kim, Chul Hwan Kim, and Soo Jeong Cho*

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

ABSTRACT: In order to isolate thermophilic bacteria with high activity of CMCase and xylanase, spent mushroom substrates was collected from an oyster mushroom cultivation farm in Jinju, Gyeongnam, Korea. Among the isolates, one strain designated as YJ09 was selected by agar diffusion method. The isolate YJ09 was identified as a member of *Bacillus licheniformis* based on biochemical characteristics using *Bacillus* ID kit and MicroLog system. Comparative 16S rDNA sequence analysis showed that isolate YJ09 formed a distinct phylogenetic tree within the genus *Bacillus* and was most closely related to *Bacillus licheniformis* with sequence similarity of 98.9%. Based on its physiological properties, biochemical characteristics and phylogenetic distinctiveness, the isolate YJ09 was classified as *Bacillus licheniformis*. The CMCase and xylanase activity of *B. licheniformis* YJ09 was slightly increased corresponding to the bacterial population from exponential phase to stationary phase in the growth curve of *B. licheniformis* YJ09.

KEYWORDS: *Bacillus licheniformis* YJ09, CMCase, Spent mushroom substrates, Thermophilic bacteria, Xylanase

최근 우리나라는 소득증대와 웰빙(well-being)문화의 정착으로 건강에 대한 관심이 증가하면서 친환경 농산물 소비가 증가하고 있다. 친환경 농산물은 농약과 화학 비료를 사용하지 않거나 최소량만 사용하여 생산한 농산물이다. 우리나라의 농업은 자원순환에 기반을 둔 환경친화적

농업이었다. 그러나 인구 증가에 따른 식량 부족을 해결하기 위해 생산성이 좋은 신종 품종 육종, 화학비료와 농약 사용 등 생산성 증대를 위한 새로운 농업이 발달하게 되었다. 화학비료와 농약의 장기간 사용은 토양의 산성화뿐만 아니라 무기질과 질산태 질소의 축적 및 유출에 의한 지표수와 지하수 오염 문제를 야기하고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 노력의 일환으로 유기물 함량이 많은 농축산 부산물을 퇴비로 재활용하는 자원순환형 친환경 농업의 필요성이 강조되고 있다.

농업생태계의 물질순환 측면에서 자원순환형 친환경 농업에 이용될 수 있는 농축산부산물은 다양하지만 그 중에서도 버섯수확후배지는 버섯을 수확한 후 남겨진 농산 부산물로서 버섯 재배 과정에서 배지 영양분의 20% 정도는 버섯에 의해 이용되고 나머지 80% 정도는 버섯수확후배지에 남아 있을 뿐만 아니라 버섯 균사체가 분비한 각종 생리활성물질 및 버섯 균사체 등이 잔존해 있기 때문에 친환경농업 자원으로 재활용될 수 있는 유기물이다(Williams et al, 2001; Shin and Cho, 2011). 버섯수확

J. Mushrooms 2016 December, 14(4):244-248
http://dx.doi.org/10.14480/JM.2016.14.4.244
Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
© The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author

E-mail : sjcho@gntech.ac.kr

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

Received December 5, 2016

Revised December 9, 2016

Accepted December 19, 2016

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.

후배지는 버섯의 종류와 재배 방식에 따라 다양하지만 대부분 톱밥과 곡물이 주원료이며 일반적으로 톱밥과 곡물에는 난분해성 탄수화물인 cellulose, hemicellulose, lignin 등이 많이 함유되어 있어서 버섯수확후배지를 퇴비로 이용하기 위해서는 난분해성 물질을 분해할 수 있는 CMCase와 xylanase 분비능이 우수한 고온성 미생물의 개발이 우선되어야 한다.

유기물의 퇴비화에 관여하는 미생물로는 *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp., *Cellulomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Pectobacterium carotovorum*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Tricoderma* 등이 보고되어 있다. 이 중에서도 *Bacillus* 속은 cellulase, xylanase, pectinase 등의 다양한 효소를 분비하여 난분해성 물질을 분해할 수 있을 뿐만 아니라(Lee and Choi, 2006; Kim et al, 1995; Kim et al, 2004) 포자를 형성하여 고온에서도 잘 견딜 수 있고 생존력이 높다는 장점이 있다(Schallmey et al, 2004).

본 연구에서는 유기물 함량이 높은 느타리 수확후배지의 퇴비화에 필요한 균주를 개발할 목적으로 진주인근 지역의 느타리 재배농가에서 수집한 수확후배지로부터 가수분해효소를 분비하는 고온성 균주를 분리하고 분리균의 특성을 조사하였다.

부속축진 미생물의 분리

느타리 수확후배지에 우점하는 균주 중 CMCase와 xylanase 활성이 우수한 균주를 분리하기 위하여 진주 인근 지역의 느타리 재배농가로부터 탈병 후 2시간 이내의 수확후배지를 수집하였다. 느타리 수확후배지에 우점하는 고온성 균주는 수집한 배지 1 g을 멸균수에 10^6 으로 희석한 후 trypticase soy agar(TSA, BD Difco, Franklin Lakes, USA) 배지에 도말한 다음 55°C에서 48시간 동안 배양하여 분리하였다. 분리균 중 가수분해 효소를 분비하는 균주는 carboxy methyl cellulose(CMC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 또는 xylan(Xylan from oat spelts, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 각각 기질로 첨가된 TSA 배지에서 확인하였다. CMCase 분비능이 우수한 균주는 분리균을 0.5% CMC와 1% trypan blue(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 TSA 배지에 접종한 다음 55°C에서 48시간 동안 배양한 후 콜로니 주변에 형성된 cellulose 분해환의 크기를 측정하여 선발하였으며 분리균의 xylan 분해능은 0.5% xylan이 기질로 첨가된 TSA 배지에 분리균을 접종한 다음 55°C에서 48시간 동안 배양한 후 iodine으로 염색하여 콜로니 주변에 형성된 xylan 분해환의 크기를 측정하여 선발하였다.

분리균의 동정

최종 선발된 균주의 형태적 특징은 55°C에서 48시간 동안 배양한 다음 현미경으로 관찰하여 확인하였으며 생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit(Microgen™, Camberley,

UK)와 MicroLog system(BioLog™, Hayward, USA)을 이용하여 조사하였다.

최종 선발된 균주의 16S rDNA 염기서열은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 얻은 산물 중 1.5 kb에 해당하는 단편을 PCR purification kit(Qiagen, Germantown, USA)를 사용하여 정제한 다음 MacroGen 사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 최종 선발된 균주의 16S rDNA 염기서열은 GeneBank database에 등록된 균주들의 16S rDNA 염기서열과 상동성을 조사하여 계통학적 유연관계를 분석하였으며 그 결과는 DNAMan analysis system(Lynnon Biosoft, San Ramon, USA)을 이용하여 계통도로 작성하였다.

분리균의 생육과 효소 생성능

분리균의 생육이 효소 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.5% CMC 또는 xylan이 기질로 첨가된 TSB 배지에 분리균을 각각 접종한 다음 48시간 동안 진탕배양하면서 3시간 간격으로 배양액을 채취하였다. 분리균의 생육곡선은 채취한 배양액을 600 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였으며 CMCase와 xylanase 활성은 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다(Miller et al, 1960). CMCase 활성은 3시간 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 7.0) 250 μ l를 혼합하여 100°C에서 10분 동안 반응시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xylanase 활성은 CMC 대신에 xylan을 기질로 사용하여 CMCase와 동일한 방법으로 측정하였다. CMCase와 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.

CMCase와 xylanase 활성이 우수한 고온성 균주를 분리하기 위하여 진주 인근 지역의 느타리 재배농가에서 탈병 후 2시간 이내의 느타리 수확후배지를 수집한 다음 멸균수에 10^6 으로 희석하였으며 희석액은 TSA 배지에 도말한 다음 55°C에서 배양하여 17개의 균주를 분리하였다. 분리균의 CMCase와 xylanase 활성은 한천확산법에 따라 CMC 또는 xylan이 각각 기질로 첨가된 TSA 배지에서 분해환의 크기를 측정하여 분해환의 크기가 가장 큰 균주 YJ09를 최종 선발하였다.

분리균 YJ09의 형태적 특징은 분리균을 TSA 배지에서 48시간 동안 배양한 후 현미경으로 관찰하였으며 그 결과 분리균 YJ09는 Gram양성 간균이었다. 분리균 YJ09의 생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit와 MicroLog system을 이용하여 분석하였으며 *Bacillus* ID kit로 분석한 결과 분리균은 *B. licheniformis*와 96.82%의 probability을 나타내

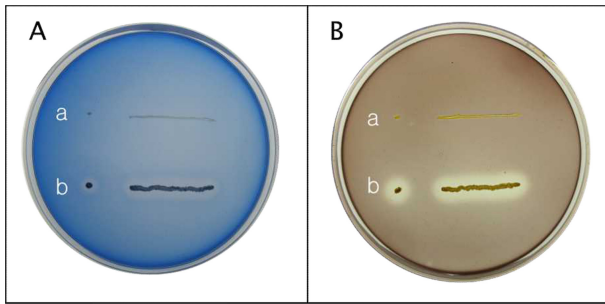


Fig. 1. CMCase (A) and xylanase (B) activity of the isolate YJ09 by agar diffusion method. The isolate YJ09 grown on TSA medium containing CMC with trypan blue and xylan as substrates. The plate was incubated at 55°C for 48 hr. a: *Escherichia coli* as a negative control, b: isolate YJ09.

있으며 MicroLog system에 의한 분석결과에서도 *B. licheniformis*와 유사한 생화학적 특성을 나타내었다. *Bacillus* ID kit와 MicroLog system에 의한 분리균 YJ09의 생화학적인 특성을 종합하면 Table 1과 같이 Dextrin, D-fructose, Gentiobiose, D-glucose, Maltose, Mannan, D-manitol, 3-methylglucose, P-psicose, Sucrose, D-trehalose, pyruvic acid 등에 대해 양성반응을 보였다.

분리균의 계통학적 유연관계를 조사하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 분리균 YJ09은 *B. licheniformis*와 98.9%의 상동성을 나타내었으며 분리균의 16S rDNA 염기서열에 근거한 계통도는 GenBank에 등록된 균주들의 16S rDNA 염기서열을 비교하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. *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 있는 균주이지만(Seki et al, 1978) 분리균 YJ09은 *Bacillus* ID kit와 MicroLog system을 이용한 생리적·생화학적 특성 분석과 16S rDNA 염기서열 분석에서 *B. licheniformis*와 가장 가까운 특성을 나타내었다.

분리균 YJ09의 생리적·생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 유연관계를 종합하여 분리균 YJ09은 *Bacillus licheniformis* YJ09로 동정되었다. Schäfer(2005) 등의 보고에 의하면 *Bacillus licheniformis*는 50°C에서 잘 생육하며 protease와 amylase 등의 효소를 분비하여 산업적으로 중요한 미생물 자원이다. 따라서 분리균 YJ09은 다양한 효소를 다량 분비하며 포자를 형성하여 고온에서도 생존할 수 있기 때문에 퇴비화를 촉진하는 유용한 미생물 자원으로 이용될 수 있을 것이다.

분리균의 생육이 효소 생성에 미치는 영향은 0.5% CMC 또는 xylan이 각각 기질로 첨가된 TSB 배지에 분리균을 접종한 다음 48시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 채취한 배양액의 생육곡선과 DNS 환원당 정량법에 준하여 측정된 CMCase와 xylanase 활성의 상관관계를

Table 1. Phenotypic characteristics of isolate YJ09

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Morphology		<i>m</i> -inositol	-
Shape	Rod	Inulin	-
Gram stain	+	D-lactose	-
Cell dimension (?)	0.4×0.8-1	Lactulose	-
Flagellation	> 1	Maltose	+
Swarming on soft TS agar	+	Maltotriose	w
Endospore formation	+	Mannan	+
Physiological properties		D-manitol	+
Anaerobic growth	w	D-mannose	w
Aerobic growth	+	D-melezitose	-
Growth at		D-melibiose	-
10°C	-	Methyl- α -D-galactoside	-
20°C	w	Methyl- β -D-galactoside	-
30°C	+	3-methylglucose	+
40°C	+	Methyl- α -D-glucoside	w
50°C	+	Methyl- β -D-glucoside	-
60°C	+	Methyl- α -D-mannoside	-
Growth in NaCl		Palatinose	w
5%	+	D-psicose	+
10%	-	D-raffinose	w
15%	-	L-raffinose	-
Biochemical characteristics		D-ribose	w
Oxidase activity	+	D-salicin	-
Catalase activity	+	Sedoheptulosan	-
Urease activity	-	D-sorbitol	w
Voges-Proskauer test	-	Stachyose	-
Indol production	-	Sucrose	+
Hydrolysis of		Tagatose	-
Casein	-	D-trehalose	+
Gelatin	+	Turanose	w
Starch	+	Xylitol	-
Carbohydrates		D-xylose	w
<i>N</i> -acethyl-D-glucosamin	w	Carboxylic acids	
<i>N</i> -acethyl-D-mannosamine	-	Acetic acid	-
Amygdalin	-	<i>N</i> -acethyl-L-gutamic acid	-

Table 1. Continued

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Amygdalin	-	N-acetyl-L-gutamic acid	-
L-arabinose	-	α-hydroxybutyric acid	-
Arabitol	-	β-hydroxybutyric acid	-
Arbutin	-	γ-hydroxybutyric acid	-
Cellobiose	+	ρ-hydroxyphenyl acetic acid	-
α-cyclodextrin	-	α-ketoglutaric acid	-
β-cyclodextrin	-	α-ketovaleric acid	-
Dextrin	+	L-lactic acid	-
D-fructose	+	D-malic acid	-
L-fucose	-	L-malic acid	-
D-galactose	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-glucose	+	Succinamic acid	-
Glycogen	-	Succinic acid	-

+, positive reaction; -, negative reaction; w, weak reaction

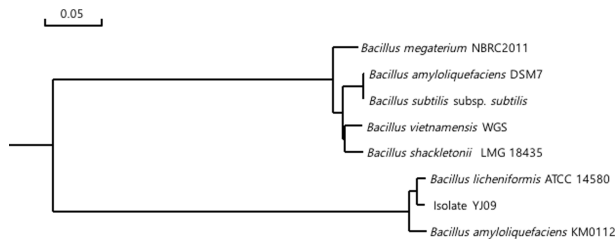


Fig. 2. Phylogenetic relationships of the isolate YJ09 and other closely related bacteria based on the partial 16S rDNA sequence. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values(expressed as percentages of 10,000 replications) are shown at major branching points. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position.

조사하여 확인하였다(Fig. 3). CMCCase 활성은 분리균이 증식함에 따라 대수증식기 초반부터 급격히 증가하였고 정지기에 진입하면 효소활성이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났으며 xylanase 활성은 대수증식기 중반부터 지속적으로 증가하여 정지기 초반에 최대활성을 나타내었다. 이 결과는 *Bacillus* 속이 분비하는 탄수화물 분해효소의 활성이 세포의 성장과 더불어 지속적으로 증가하고 정지기에 도달하면 최대활성을 나타낸다는 이전의 보고와 일치하는 것이었다(Kim et al, 1995; Kim et al, 2004; Shin and Cho, 2011).

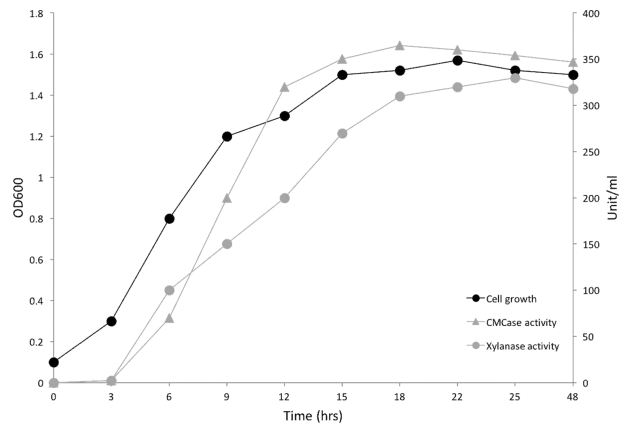


Fig. 3. Growth and enzyme production of *Bacillus licheniformis* YJ09. *B. licheniformis* YJ09 was growth in TSB medium with 0.5% CMC (▲) or xylan (■) at 55°C for 48 hr. The cell growth (●) was determined by measuring OD₆₀₀ of cell culture. The enzyme activity was determined with the culture supernatants.

적 요

CMCase와 xylanase 분비능이 우수한 고온성 세균을 분리하기 위하여 진주 인근지역의 느타리 재배농장으로부터 수확후배지를 수집하였다. 느타리 수확후배지로부터 17종의 균주를 분리하였으며 이 중 CMCCase와 xylanase 활성이 큰 균주 YJ09를 선발하였다. *Bacillus* ID kit와 MicroLog system을 이용하여 분리균 YJ09의 생리적·생화학적 특성을 조사한 결과 분리균 YJ09은 *B. licheniformis*와 유사한 특징을 나타내었으며 16S rDNA 염기서열 분석 결과에서도 *B. licheniformis*와 98.9%의 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 종합하여 분리균 YJ09은 *B. licheniformis* YJ09로 동정되었다. 분리균이 분비하는 CMCCase와 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.

참고문헌

Kim DJ, Shin HJ, Min BH, Yoon KH. 1995. Isolation of a Thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor J Appl Microbial biotechnol.* 23: 304-310.

Kim JY, Heo SH, Hong JH. 2004. Isolation and characterization of an alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Kor J Appl Microbial biotechnol.* 40:139-146.

Lee JH, Choi SH. 2006. Xylanase production by *Bacillus* sp. A-6 isolated from rice bran. *J Microbiol Biotechnol.* 16:1856-1861.

Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal*

- Biochem.* 2:127-132.
- Schafer T, Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC, Pedersen S, Salmon S, Olsen HS, Deinhammer R, Lund H. 2005. Enzymes for Technical Applications. In: Biopolymers, eds Fahnestock, S.R. and A. Steinbüchel, pp. 377-437, Wiley VCH Editor
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol.* 50:1-17.
- Seki T, Chung CK, Mikami H, Oshima Y. 1978. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol.* 28:182-189.
- Shin PG, Cho SJ. 2011. Cellulase and xylanase activity of compost-promoting bacteria *Bacillus* sp. SJ21. *Korean J Soil Sci Fert.* 44:836-840.
- Williams BC, McMullan JT, McCahey S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Biores Technol.* 79:227-230.