

양송이 배지로부터 분리된 *Bacillus subtilis* NO12의 특성김혜수¹ · 박현영¹ · 이찬중² · 공원식² · 조수정^{1,*}¹경남과학기술대학교 제약공학과²국립원예특작과학원 버섯과Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* NO12 from button mushroom substratesHye Soo Kim¹, Hyun Young Park¹, Chan-Jung Lee², Won-Sik Kong², and Soo Jeong Cho^{1,*}¹Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju, 52725, Korea²Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumseong, 27709, Korea

ABSTRACT: Twelve strains of bacteria with cellulase and xylanase activities were isolated from spent mushroom substrates collected from button mushroom cultivation farm, Buye, Chungcheongnam-do in Korea. Among them, one strain, designated NO12, with higher cellulase and xylanase activities was selected by agar diffusion method. The strain NO12 was identified to be a *Bacillus* sp. by biochemical characteristics using *Bacillus* ID kit and MicroLog system. Comparative 16S rDNA gene sequence analysis showed that strain NO12 formed a distinct phylogenetic tree within the genus *Bacillus* and was most closely related to *Bacillus subtilis* with 16S rDNA gene sequence similarity of 99.2%. Based on its physiological properties, biochemical characteristics, and phylogenetic distinctiveness, strain NO12 was classified within the genus *Bacillus*, for which the name *Bacillus subtilis* NO12 was proposed. The cellulase and xylanase activities of *B. subtilis* NO12 were slightly increased according to bacterial population from exponential phase to stationary phase in the growth curve for *B. subtilis* NO12. The xylanase activity continuously increased from the beginning of the exponential phase and exhibited maximum activity in the middle of the exponential phase.

KEYWORDS: *Bacillus subtilis* NO12, Cellulase, Spent mushroom substrates, Xylanase.

최근 우리나라는 소득증대와 웰빙(well-being)문화의 정착으로 건강에 대한 관심이 증가하면서 버섯 소비도 지속적인 증가추세를 보이고 있으며 버섯 소비가 증가함에 따라 버섯 수확 후 남겨진 부산물인 버섯수확후배지의 발생량도 증가하고 있다. 버섯수확후배지는 버섯의 종류와 재

배 방식에 따라 다양하지만 대부분 톱밥과 곡물이 주원료이며 버섯 재배과정 중 배지 영양분의 15-25% 정도만 버섯에 의해 이용되고 나머지는 버섯수확후배지에 남아 있을 뿐만 아니라 버섯 균사체가 분비하는 다양한 생리활성 물질과 버섯 균사체 등이 잔존해 있기 때문에 활용가치가 높은 부산물이다 (Shin and Cho, 2011). 현재 큰노타리, 노타리, 팽이 등의 병재배용 버섯수확후배지는 유기농 퇴비, 가축사료용 첨가제, 버섯재배용 배지, 바이오매스 고형원료, 곤충 사육용 배지, 환경복원용 복토 등으로 활용되고 있다. 그러나 양송이 수확후배지는 유기물 함량이 낮고 버섯 배지 위에 복토를 깔아서 버섯을 배양하기 때문에 활용가치가 낮아 대부분 재배사 근처에 방치되고 있어서 환경오염이 우려되고 있다. 또한 방치된 버섯수확후배지는 침출수와 악취 발생, 버섯파리 등의 해충을 유발시켜 양송이 재배농가에도 심각한 피해를 줄 수 있어서 양송이 수확후배지의 활용방안에 관한 연구가 필요한 실정이다.

양송이 수확후배지 활용에 관한 다양한 연구가 시도되

J. Mushrooms 2017 December, 15(4):249-253
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2017.15.4.249>
 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 September 10, 2017

Revised November 10, 2017

Accepted November 27, 2017

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.

고 있으며 양송이 수확후배지는 유기물 함량이 낮다는 단점이 있기 때문에 주로 양송이 수확후배지의 퇴비화 기술 개발에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 양송이 수확후배지를 퇴비화하기 위해서는 수확후배지의 난분해성 물질을 분해할 수 있는 cellulase와 xylanase 분비능이 우수한 미생물을 이용한 퇴비화 공정이 필요하다. 퇴비화 공정은 미생물의 작용으로 유기물이 생물학적으로 분해되어 안정화되는 일련의 부숙과정이며 부숙된 퇴비는 미생물이 분비한 점액물질에 의해 토양 입단화가 형성되어 토양의 통기성, 투수성, 보수성 등을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 미생물이 생성한 이차대사산물에 의해 식물병원성 미생물의 증식을 억제될 수도 있다(Williams, 2001; Shin and Cho, 2011). 퇴비화에 관여하는 미생물은 *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp., *Cellulomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Pectobacterium carotovorum*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* 등이 알려져 있으며 현재 *Bacillus* sp.와 *Clostridium* sp.에 관한 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다. 특히 *Bacillus* 속의 미생물들은 체외분비효소인 cellulase, xylanase, lactase 등을 분비하여 난분해성 물질을 분해하고 이를 탄소원으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라(Lee and Choi, 2006; Kim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2004; Shin and Cho, 2011) iturin, surfactin, fengycin, 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; Shin and Cho, 2011) 액체배양 시 다른 균주에 비해 생육속도가 빠르고 포자를 형성하여 고온에서도 생육할 수 있으므로(Schallmey *et al.*, 2004) 퇴비화 부숙촉진 미생물이나 미생물제제로 개발 가능성이 높은 자원이다. Yun *et al.* (2009)의 연구에 의하면 양송이 수확후배지에서 분리된 세균은 식물생장촉진효과가 있으며 버섯수확후배지에는 다양한 미생물이 존재하는 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 양송이 수확후배지의 퇴비화 공정에 필요한 균주를 개발할 목적으로 부여군 양송이 재배농가에서 수집한 수확후배지에서 cellulase와 xylanase를 분비하는 균주를 분리하고 분리균의 특성을 조사하였다.

수확후배지에 우점하는 균주 중 CMCcase와 xylanase 활성이 우수한 균주를 분리하기 위하여 충남 부여군 석성면 지역의 양송이 재배농가에서 수확후배지를 수집하였다. 양송이 수확후배지에 우점하는 균주는 수집한 배지 1g을 멸균수에 희석한 후 trypticase soy agar (TSA) 배지에 도말한 다음 40°C에서 48시간 동안 배양하여 분리하였으며 12개의 균주가 분리되었다. 분리균의 cellulase와 xylanase 활성은 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. 분리균의

Table 1. Cellulase and xylanase activity of the isolated strains from button mushroom substrate

Isolated strain	Activity ratio (mm)	
	Cellulase	Xylanase
NO01	3	-
NO02	5	3
NO03	-	-
NO04	5	-
NO05	3	4
NO06	6	5
NO07	-	-
NO08	-	-
NO09	7	-
NO10	2	-
NO11	-	-
NO12	10	7

*The activity ratio was calculated from clear zones formed on TSA plate containing 0.5% CMC with trypan blue and xylan as substrate and incubated at 40°C for 48 hr.

cellulase 분비능이 우수한 균주는 분리균을 0.5% CMC와 1% trypan blue가 첨가된 TSA 배지에 접종한 다음 40°C에서 48시간 동안 배양한 후 코로니 주변에 형성된 cellulose 분해환의 크기를 측정하여 선발하였으며 xylanase 분비능이 우수한 균주는 0.5% xylan이 기질로 첨가된 TSA 배지에 분리균을 접종한 다음 40°C에서 48시간 동안 배양한 후 iodine으로 염색하여 코로니 주변에 형성된 xylan 분해환의 크기를 측정하여 선발하였다. 분리균 중 cellulase 또는 xylan이 각각 기질로 첨가된 TSA 배지에서 분해환의 크기가 가장 큰 균주 NO12가 cellulase와 xylanase 분비능이 가장 우수한 균주로 최종 선발하였다.

분리균 NO12의 형태적 특징은 분리균을 TSA 배지에서 48시간 동안 배양한 후 현미경으로 관찰하였으며 그 결과 분리균 NO12는 Gram양성 간균이었다. 분리균 NO12의 생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit와 MicroLog system을 이용하여 분석하였으며 *Bacillus* ID kit로 분석한 결과 분리균은 *B. subtilis*와 99.2%의 probability을 나타내었으며 MicroLog system에 의한 분석결과에서도 *B. subtilis*와 유사한 생화학적 특성을 나타내었다. *Bacillus* ID kit와 MicroLog system에 의한 분리균 NO12의 생화학적 특성을 종합하면 Table 1과 같이 arbutin, cellobiose, dextrin, D-fructose, D-galactose, gentiobiose, D-glucose, maltose, mannan, D-manitol, 3-methylglucose, D-psicose, D-raffinose, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, α -hydroxybutyric acid, ρ -hydroxyphenyl acetic acid, L-lactic acid, pyruvic acid 등에 대해 양성반응을 보였다.

Table 2. Phenotypic characters of strain NO12

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	-
Endospore formation	+	Mannan	+
Physiological properties		D-manitol	+
Anaerobic growth	w	D-mannose	-
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	+
15%	-	L-raffinose	-
Biochemical characteristics		D-ribose	-
Oxidase activity	+	D-salicin	-
Catalase activity	+	Sedoheptulosan	-
Urease activity	-	D-sorbitol	+
Voges-Proskauer test	-	Stachyose	-
Indol production	-	Sucrose	+
Hydrolysis of		Tagatose	-
Casein	-	D-trehalose	+
Gelatin	+	Turanose	-
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	-
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

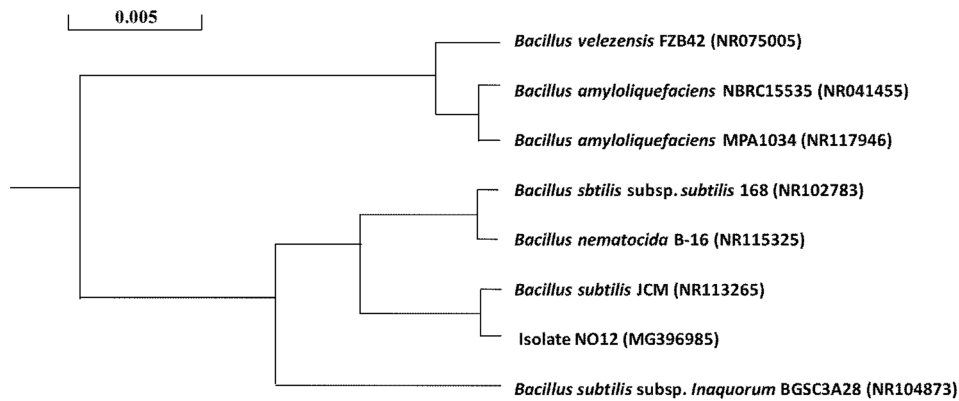


Fig. 1. Phylogenetic relationships of the isolate NO12 and other closely related bacteria based on the partial 16S rDNA gene sequence. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values(expressed as percentages of 10,000 replications) are shown at major branching points. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position.

분리균 NO12의 16S rDNA 염기서열은 중합효소연쇄 반응(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 분석하였다. 분리균 NO12의 16S rDNA 염기서열은 *B. subtilis*와 99.2%의 상동성을 나타내었으며 분리균 NO12의 16S rDNA 염기서열은 GeneBank database에 MG396985로 등록되었다. 분리균 NO12와 *Bacillus* 속 균주의 계통학적 유연관계는 분리균 NO12와 GeneBank database에 등록된 *Bacillus* 속 균주들의 16S rDNA 염기서열을 비교분석한 다음 DNAMAN analysis system (Lynnon Biosoft, Canada)을 이용하여 계통도로 나타내었다(Fig. 2). *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 NO12는 *Bacillus* ID kit와 MicroLog system을 이용한 생리적·생화학적 특성 분석과 16S rDNA 염기서열 분석에서 *B. subtilis*와 가장 가까운 특성을 나타내었다. 분리균 NO12의 생리적·생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 유연관계를 종합하여 분리균 NO12는 *Bacillus subtilis* NO12로 명명되었다.

일반적으로 *Bacillus* 속은 다양한 효소와 항생물질을 다량 분비하며 포자를 형성하여 다양한 환경에서도 생존할 수 있기 때문에 분리균 NO12는 퇴비화를 촉진하는 유용한 미생물 자원이 될 수 있을 것이다.

분리균의 생육이 효소 생성에 미치는 영향은 분리균의 생육곡선과 cellulase 및 xylanase 활성의 상관관계를 비교하여 확인하였다. 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 흡광

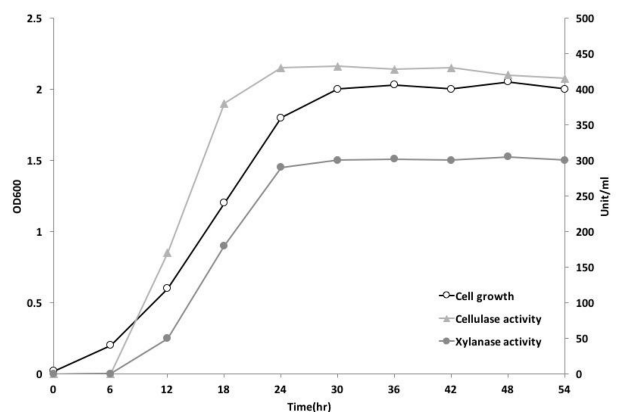


Fig. 2. Growth and enzyme production of *Bacillus subtilis* NO12. *B. subtilis* NO12 was growth in TSB medium with 0.5% CMC (▲) or xylan (◆) at 40°C for 48 hr. The cell growth (●) was determined by measuring OD₆₀₀ of cell culture. The enzyme activity was determined with the culture supernatants.

도를 측정하여 작성하였으며 cellulase와 xylanase 활성은 DNS 환원당 정량법으로 측정하였다(Miller *et al*, 1960). Cellulase 활성은 3시간 간격으로 채취한 분리균 배양액을 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액만 회수한 다음 상등액 250 ul와 0.5% CMC 500 ul, 200 mM phosphate buffer (pH 7.0) 250 ul를 혼합하여 100°C에서 10분 동안 반응시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 unit로 나타내었다. Xylanase 활성은 CMC 대신에 xylan을 기질로 사용하여 CMC와 동일한 방법으로 측정하였다. 1 unit는 효소 활성을 나타내는 단위로서 CMC 또는 xylan으로부터 1분 동안 1 umol의 glucose 또는 D-xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 나타내었고 glucose와 D-xylose가 cellulase와 xylanase 활성 측정을 위한 표준시료로 사용되었다(Fig. 3). Cellulase 활성은 분리균이 증식함에 따라 대수증식기 초반부터 급

격히 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).

적 요

Cellulase와 xylanase 분비능이 우수한 세균을 분리하기 위하여 부여군 석성면 지역의 양송이 재배농장으로부터 수확후배지를 수집하였다. 양송이 수확후배지로부터 12종의 균주를 분리하였으며 이 중 cellulase와 xylanase 활성이 가장 우수한 균주 NO12를 최종 선발하였다. 분리균 NO12의 생리적·생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit와 MicroLog system을 이용하여 조사하였으며 분리균 NO12는 *Bacillus subtilis*와 유사한 특징을 나타내었다. 분리균 NO12의 16S rDNA 염기서열도 *B. subtilis*와 99.2%의 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 종합하여 분리균 NO12는 *B. subtilis* NO12로 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.

감사의 글

본 연구는 2017년 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ01112505)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

References

- Jung YP, Kyung KC, Jang KY, Yoon MH. 2011. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria from waste mushroom bed from *Agaricus bisporus*. *Kor J Soil Sci Fert.* 44:866-871
- 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 Microb Biotech.* 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 Microb Biotech.* 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.
- 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. *Kor 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. *Bioresour Technol.* 79:227-230.