

버섯의 갈변병 유발세균 *Pseudomonas tolaasii*의 길항세균인 *Pseudomonas fluorescens*의 분리동정 및 배양조건

박 범 식 · 조 남 철 · 전 억 한
경희대학교 수원캠퍼스 산업대학 식품가공학과

Identification of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and its cultivation

Bum-Sik Park, Nam-Chul Cho and Uck-Han Chun

Department of Food Technology and Science, College of Industry
Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

A *Pseudomonas fluorescens* was selected from mushrooms and studied in both batch and fed-batch cultures in order to get maximal biomass concentration. *P. fluorescens* is an aerobic bacterium and antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* which causes blotch disease on the mushroom cap. *P. fluorescens* and *P. tolaasii* were identified by Gram staining, gelatin liquefaction, oxidase test, etc. and were characterized by pigment production, temperature sensitivity, salt tolerance and rapid pitting test, etc.. Cells of *P. fluorescens* well in medium containing 30g/L of glucose, whereas the growth was inhibited at the glucose levels at higher than 30g/L. The highest values of specific growth rate and productivity were obtained when using 10g/l of yeast extract. Optimum concentrations of NH_4Cl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for culture were found to be 1.0g/L and 0.1g/L respectively. Optimum concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ used as a sulfur source was 1.0g/L. It was also found that the cell concentrations reached the maximum level when grown on the medium containing 1.0g/L of KH_2PO_4 and 0.1g/L of CaCl_2 . Also, the optimum culture conditions were 30°C and pH 6.0. Cultivation of *P. fluorescens* at high dissolved oxygen(DO) concentration led to a decrease of bacterial productivity in batch culture. Maximum productivity was achieved at 40% DO concentration.

서 론

현재 우리나라 버섯농가의 가장 심각한 문제는 세균성 병해이며, 이 중 특히 갈변병 유발세균인 *Pseudomonas tolaasii*가 버섯 cap부위에 번식하여 느타리 및 송이버섯 총 생산량의 약 40-50%에 해당하는 손실을 미치고 있다. *P. tolaasii*는 혼합비료, 퇴비 또는 버섯농장 주변에 자연적으로 존재하며(1), 특

히 버섯의 생장조건인 18°C에서 급격히 증식되어 버섯 cap부위에 갈변병을 유발시킨다. 갈변병은 주로 버섯 수확전에 발생하지만 수확 후 낮은 온도에서 저장하는 동안에도 발생하며, *P. tolaasii*가 생성하는 독소에 의하여 버섯의 cap조직이 함몰되거나 검은색의 얇은 조직으로 변화된다(2).

버섯농가에서는 버섯의 병원균인 *P. tolaasii*을 사멸시키기 위해서 항생제를 투여하고 있으나 버섯조

직을 배양하기 전에 살균하여도 비교적 내성이 강하여 재발생되며, 주위환경으로부터 재오염되어 방제하기가 매우 어려울 뿐만 아니라 이는 버섯의 식품적 가치를 저하시킨다.

이러한 *P. tolaasii* 세균에 대해 길항성을 갖는 *Pseudomonas fluorescens*에 의하여 갈변병 예방에 대한 보고가 있으나(3) 기작은 아직 확실하지 않다. 병원균과 길항세균 사이에 영양분에 대한 경쟁이 이루어져서 결국 병원균이 사멸하거나, *P. fluorescens* 세균이 생성하는 효소에 의해 *P. tolaasii*에 의해 생산된 독성물질이 분해되리라는 보고가 있다(4).

본 연구에서는 *P. tolaasii*에 대하여 길항성을 갖는 세균을 선발하고 선발한 길항세균의 대량배양을 위한 최적조건을 설정하였다.

재료 및 방법

사용 균주

*Pseudomonas tolaasii*는 경기도 광주군 소재의 대한버섯연구소에서 갈변병이 발생한 느타리버섯에서 분리 채취하였고, *P. fluorescens*는 갈변병이 유발한 버섯에서 분리하여 Table 1의 기본배지에서 배양한 후 배양액에 80% glycerol을 40:60으로 혼합한 다음 냉동고에 보관하여 사용하였다.

Table 1. Media composition for stock culture of *P. fluorescens* and *P. tolaasii*.

Components	<i>P. fluorescens</i> (g/L)	<i>P. tolaasii</i> (g/L)
NH ₄ Cl	1.5	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	0.05
CaCl ₂	0.1	0.05
Yeast extract	10.0	5.0
Glucose	2.0	2.0
KH ₂ PO ₄	1.0	—

순수 분리 및 특성

갈변병이 발생한 느타리버섯의 cap부위를 증류수에 넣어 여러 차례 혼든 다음 여액을 PAF배지(5)에 접종하여 25℃에서 24시간 배양 후 colony 주위에 흰색을 띄는 *P. tolaasii*와 형광색의 *P. fluorescens*를 분리하였다. 이 때 PAF배지의 조성은

Bacto-tryptone 10g/L, Bacto-proteose peptone No. 3 10g/L, dipotassium phosphate 1.5g/L, magnesium sulfate 1.5g/L, Bacto-agar 15g/L 그리고 Bacto-glycerol 10g/L였다.

*P. fluorescens*와 *P. tolaasii*의 특성을 조사하기 위하여 Gram 염색법 뿐만 아니라 exoenzyme의 생성 여부를 알아보기 위해 8% gelatin으로 gelatin liquefaction을 시행하였고, 1% Kovac's oxidase reagent로 cytochrome c와 이에 관련된 oxidase의 존재를 알아 보았다. L-Arginine dihydrolase test는 혐기적 조건에서 cell이 arginine으로부터 ammonia의 생성을 알아보기 위하여 peptone 1.0g/L, NaCl 5.0g/L, KH₂PO₄ 0.3g/L, agar 3.0g/L, phenol red 0.01g/L 그리고 L-arginine-HCl 10.0g/L를 함유한 Thornely's medium을 이용하였고, starch hydrolysis에 대한 조사는 0.8% potato starch를 이용하여 cell의 starch 분해능을 알아보았으며, 색소의 생성은 King's B medium(6)으로 관찰하였다. 그리고 temperature sensitivity는 nutrient agar medium에서 40℃와 0-4℃에서 균체의 colony 생성도에 의해 조사하였으며, pathogenicity test는 rapid pitting test(5, 7)의 방법으로 실온에서 버섯조각 표면에 browning 형성의 유무로 판단하였고, glucose, glycerol, fructose, sorbitol, inulin, gluconate, lactate, ethylene glycol, succinate, starch, arabinose, lactose, maltose, galactose, xylose 등의 이용도를 측정하기 위하여 1.5%(w/v)의 agar에 1%(w/v)의 각각의 물질이 함유된 nutrient minimal media를 사용하였다.

또한 Bacto-peptone 20.0g/L, Bacto-agar 15.0g/L, glycerol 10.0g/L, K₂SO₄ 10.0g/L, MgCl₂ 1.4g/L의 KA medium과 proteose-peptone 20.0g/L, Bacto-agar 15.0g/L, glycerol 10.0g/L, KH₂PO₄ 1.5g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.5g/L의 KB medium에서 6일 이후에 형광성 유무를 관찰하였으며, nutrient broth에 각각 3, 4, 5, 6, 7%의 NaCl을 첨가하여 3일동안 배양하면서 염에 대한 내성을 알아 보았고, colony의 형태적 특성은 yeast extract 5.0g/L, peptone 5.0g/L, glucose 10.0g/L, agar 20.0g/L의 YPGA배지에서 3일 배양 후 살펴 보았다.

분석 방법

Cell mass : 배양액을 2-4시간마다 5ml씩 채취하여 600nm의 파장에서 Spectronic 20(Bausch & Lomb Co.)으로 optical density(O. D)를 측정하여

성장곡선을 그렸으며, O. D.와 dry cell weight와의 관계에서 얻어진 표준곡선을 이용하여 균체량을 계산하였다.

Glucose 측정 : Glucose의 양은 HPLC(Waters model)에 Aminex HPX-87C column(Bio-Rad, Richmond, Calif, USA)을 사용하여 측정하였다.

세포 배양

*P. fluorescens*의 배양은 total volume이 2.0L인 fermentor(New Brunswick Scientific Co., Inc.)에 working volume을 1.5L로 하여 실시하였다. 유가배양에서는 *P. fluorescens*를 회분배양한 다음 24시간 마다 기질 200ml를 공급한 후 정체기에 도달했을 때의 균체 건조중량을 측정하여 변화를 알아 보았다.

결과 및 고찰

순수 분리 및 특성

Wong과 Preece(5)의 *Pseudomonas* Agar배지(PAF배지, Difco)를 사용하여 *P. fluorescens*와 *P. tolaasii*를 순수분리 하였다.

PAF 평판배지에 버섯에서 분리한 여액을 접종하여 배양하여 colony주위에 흰색의 선을 띄는 *P. fluorescens*와 형광색의 푸른 colony를 순수분리 하였다.

*P. fluorescens*와 *P. tolaasii*의 동정 및 특성은 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*(6)에 준하여 생화학적 test와 형태학적 특징을 조사하여 Table 2와 Table 3에 정리하였다. *P. tolaasii*가 *P. fluorescens*보다 glucose, glycerol, fructose, sorbitol, inulin, succinate, starch, arabinose, maltose, galactose의 높은 이용도를 보였다.

배지 조정

배지에는 균체의 에너지원으로 필요한 carbon source와 균체의 구조합성에 필요한 탄소, 질소, 마그네슘, 인, 황 등의 성분들이 포함되어 있고, PAF 평판배지에서 screening한 *P. fluorescens*를 배양하여 각 영양소가 세포생장에 미치는 영향을 조사하여 *P. fluorescens*의 최적 배양조건을 산출하였다.

기본배지에 glucose의 함량을 10, 20, 30, 40, 50g/L로 변화하여 pH 5.0, 온도 30°C에서 *P. fluorescens*를 배양한 결과 glucose의 함량이 30g/L일 때 가장 높은 세포농도를 얻었고, 균체 비증식 속도 역시 최대치를 얻었다(Table 4). 그리고 glucose농도가 30g/L 이상일 때는 오히려 세포농도가 감소하

Table 2. Identification of *P. fluorescens* and *P. tolaasii*.

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. tolaasii</i>
Gram staining	-	-
Gelatin liquefaction	+	+
Oxidase test	-	+
L-Arginine dihydrolase	-	+
Starch hydrolysis	+	-
Utilization of :		
glucose	+	++
glycerol	+	++
fructose	+	++
sorbitol	+	++
inulin	+	++
gluconate	-	-
lactate	-	-
ethylene glycol	-	+
succinate	+	++
starch	-	+
arabinose	-	+
lactose	+	+
maltose	-	+
galactose	-	+
xylose	-	-

Table 3. Characteristics of *P. fluorescens* and *P. tolaasii*.

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. tolaasii</i>
Pigment production	+	+
Temperature sensitivity(40°C)	-	-
Temperature sensitivity(0-4°C)	+	-
Rapid pitting test	-	+
Fluorescence on		
KA medium	+	-
KB medium	+++	-
Salt tolerance(nutrient medium+NaCl)		
3%	++	+++
4%	+	++
5%	-	+
6%	-	+
7%	-	-
YPGA(colony morphology) medium		
white	+	+
diameter(<3mm)	++	-
irregular	-	-

Table 4. Specific growth rate(μ) and Productivity of *P. fluorescens* on various glucose concentrations.

Concentration of glucose(g/L)	Specific growth rate(h ⁻¹)	Productivity(g/L/h)
0	0.064	0.208
10	0.069	0.219
20	0.071	0.229
30	0.074	0.236
40	0.068	0.217
50	0.060	0.204

※ Cultivation were carried out at 30°C & pH 5.0.

Table 5. Effect of concentrations of various ingredients on the growth of *P. fluorescens*

Ingredients(g/L)	Specific growth rate(h ⁻¹)	Productivity(g/L/h)
MgSO₄ · 7H₂O		
0	0.130	0.036
0.5	0.115	0.038
1.0	0.130	0.045
2.0	0.103	0.037
CaCl₂		
0	0.073	0.039
0.05	0.088	0.043
0.1	0.125	0.044
0.2	0.088	0.042
NH₄Cl		
0	0.07	0.036
0.5	0.07	0.037
1.0	0.12	0.043
1.5	0.09	0.041
2.0	0.08	0.040
(NH₄)₂SO₄		
0	0.097	0.037
0.01	0.115	0.039
0.03	0.109	0.040
0.05	0.121	0.043
0.1	0.133	0.045
0.5	0.097	0.033
KH₂PO₄		
1.0	0.051	0.011
1.5	0.046	0.011

※ Cultivation were carried at 30°C & pH 5.0.

으며, glucose의 함량을 30g/L로 고정하고 그 외의 배지조성은 기본배지를 기준으로 하여 yeast extract의 양을 3g/L에서 10g/L로 변화시키면서 회분배양을 실시하여 yeast extract의 함량이 10g/L일때 *P. fluorescens*가 가장 빠르게 성장하였다.

최적 배지조성을 위하여 여러가지 영양소의 함량을 변화시킨 배지에 *P. fluorescens*를 배양하여 세포 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 균체의 구조합성에 필요한 질소원인 NH₄Cl은 1.0g/L에서 가장 높은 세포농도를 얻었으며, (NH₄)₂SO₄는 0.1g/L가 최적농도였다. 그리고 sulfur source로서 사용한 MgSO₄ · 7H₂O는 1.0g/L가 최적농도로 나타났으며, 1.5g/L에서는 오히려 세포농도의 감소를 보였다. 또한 CaCl₂의 최적농도는 0.1g/L였고, 역시 2.0g/L일 때는 오히려 세포농도가 감소하였으며, KH₂PO₄의 최적농도는 1.0g/L임을 알 수 있었다(Table 5).

배양 조건

온도, pH, 용존산소량 등의 반응조건에 따른 세포 농도를 측정하여 *P. fluorescens*의 대량배양을 위한 최적의 반응조건을 산출하였다. 배양온도를 30°C에서 40°C까지 달리하면서 배양하여 온도가 균체의 성장에 미치는 영향을 알아본 결과(Fig. 1) 30°C와

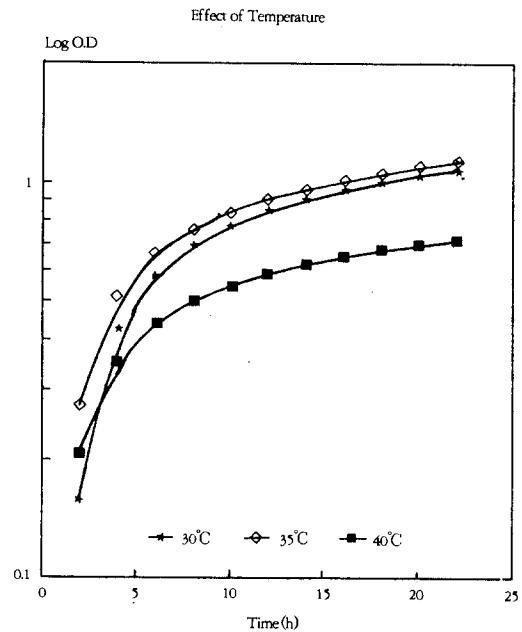


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *P. fluorescens* at pH 6.0.

35°C에서 세포농도가 가장 높았으며, pH를 4에서 7까지 변화시켜 *P. fluorescens*를 배양한 결과 (Table 6) pH가 6.0일 때 세포농도가 가장 빨리 증가하였으며, 지금까지의 실험에서 얻은 최적배지 (Table 5)와 최적조건을 이용하여 *P. fluorescens*의 성장에 있어서 산소가 균체 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DO값을 각각 0%, 20%, 30%, 40% 그리고 50%로 변화시키면서 배양한 결과 DO값을 50%로 높였을 때는 균체의 성장속도가 크게 둔화되었으며, DO값을 40%로 고정시켰을 경우 세포농도가 아주 높게 나타났다(Fig. 2). Onken(8)은 산소의 부분압이 240mbar에서 1150mbar로 증가할 때 비증식속도가 급격히 감소하였으며, 산소부분압을 241mbar로 감소시켰을 때 정상적인 균체 비증식

속도를 나타내었다고 보고하였다. 이는 *P. fluorescens*가 높은 초기 산소농도에서 성장저해를 받는다는 것을 의미한다.

지금까지의 실험결과로부터 얻은 *P. fluorescens*의 최적 배지조성을 Table 7에 정리하였다.

유기 배양

*P. fluorescens*의 세포농도를 높이기 위하여 기질을 일정량씩 계속적으로 공급하여 유기배양을 시행하면서 정체기 때의 세포농도를 측정된 결과 기질의 첨가에 따라 세포농도가 계속증가함을 알 수 있었으며(Fig. 3), batch culture의 경우보다 높은 세포농도를 얻을 수 있었다.

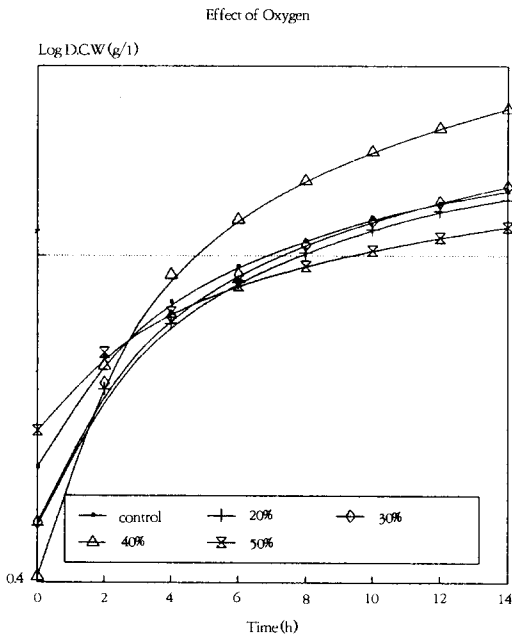


Fig. 2. Effect of D. O. concentrations on the growth of *P. fluorescens* at 30°C, pH 6.0.

Table 6. Specific growth rate(μ) and Productivity of *P. fluorescens* on various pH

pH	Specific growth reat(h^{-1})	Productivity(g/L/h)
4	0.082	0.02
5	0.166	0.032
6	0.317	0.048
7	0.106	0.038

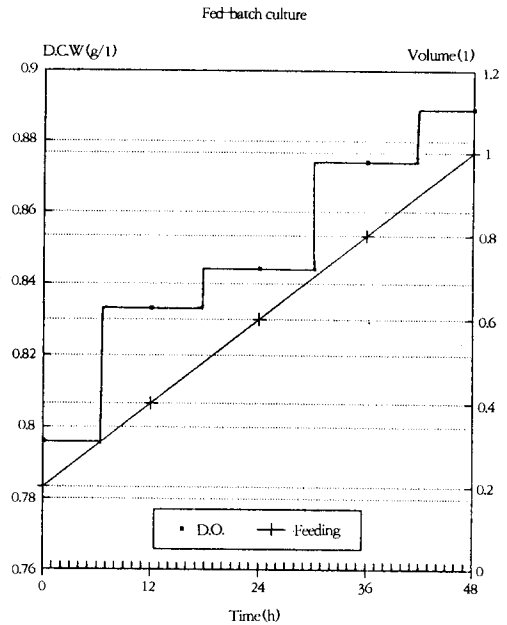


Fig. 3. Increase in cell concentration of *P. fluorescens*. during fed-batch culture at 30°C, pH 6.0.

Table 7. The optimal composition for batch culture of *P. fluorescens*.

Components	Concentration(g/L)
Glucose	30.0
NH ₄ Cl	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
CaCl ₂	0.1
KH ₂ PO ₄	1.0
Yeast extract	10.0

요 약

버섯 갈변병 유발세균인 *Pseudomonas tolaasii*와 이에 대해 길항성을 나타내는 세균을 버섯으로부터 각각 분리하여 Gram staining, gelatin liquefaction, oxidase test 등을 통해 *P. fluorescens*와 *P. tolaasii*를 동정하였으며, pigment production, temperature sensitivity, salt tolerance, 그리고 rapid pitting test 등의 여러가지 실험을 통하여 특징을 알아 보았다. 또한 *P. fluorescens*를 대량으로 배양하기 위하여 최적 배지조성 및 배양의 최적조건을 확립하였고, 세포농도를 높이기 위하여 유가배양을 시행하였다. 세포성장에 있어서 carbon 및 energy source인 glucose의 경우 30g/L일 때 세포농도가 가장 높았으며, yeast extract의 농도가 10g/L에서 세포농도가 최적으로 성장하였다. 질소원인 NH_4Cl 과 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 각각 1.0g/L와 0.1g/L일 때 세포성장이 가장 좋게 나타났고, sulfur source인 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 최적농도는 1.0g/L였다. 그리고 KH_2PO_4 와 CaCl_2 는 각각 1.0g/L와 0.1g/L일 때 세포농도가 가장 높았으며, 온도 30°C, pH 6.0 그리고 DO는 40%로 유지시켰을 때 세포성장이 가장 높았으며, 유가배양에 의해 세포농도를 증가시킬 수 있었다.

감 사

본 연구는 1991년도 학술 진흥 재단 자유공모과

제 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. W. C. Wong and T. F. Preece (1980), *J. Appl. Bacteriol.*, **49**, 304.
2. N. G. Nair and P. C. Fahy (1972), *J. Appl. Bacteriol.*, **35**, 439.
3. K. W. Healey and J. M. Harvey (1989), *Proceedings Eight Aust. Biotechnol.*, Conference, 332.
4. N. G. Nair and P. C. Fahy (1973), *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**, 509.
5. W. C. Wong and T. F. Preece (1979), *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 401.
6. N. J. Palleroni (1984), *In Bergy's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 149. Williams & Wilkins, Baltimore/London, Ontario (N.R. Krieg, eds).
7. M. Goor, R. Vantomme, S. Swings, M. Gillis, K. Kersters and J. Deley (1986). *J. Genetic. Microbiol.* 2249
8. U. Onken (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 983.
9. T. Suzuki, Y. Mushiga, T. Yamane and S. Shimizu (1988), *Appl. Microbiol. biotechnol.*, **27**, 417.