

버섯 푸른곰팡이균에 대한 길항세균의 항균활성과 세포외 분비효소 생성능

현성희 · 민봉희^{1*}

을지의과대학교 자연과학교실, ¹대구대학교 생명과학부

Antifungal Activity and Exoenzyme Production of Several Bacteria Antagonistic to *Trichoderma* spp. Causing Green Mold Disease

Soung Hee Hyun and Bong Hee Min^{1*}

Department of Natural Science, School of Medicine, Eulji University, Daejeon 301-112, Korea

¹Division of Biological Science, Daegu University, Kyungsan 712-714, Korea

(Received August 14, 2002)

ABSTRACT: *Trichoderma* spp. are the aggressive causal agents for green mold disease on oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) cultivation. Antifungal bacteria (KATB 99121, KATB 99122 and KATB 99123 strains) were isolated from the compost for *Pleurotus ostreatus*. Among these bacterial strains, KATB 99121 strain showed an excellent inhibitory activity to the pathogens for green molds such as *T. harzianum*, *T. viride* and *T. hamatum* and an animal pathogen, *Candida albicans*, but did not affect on the culture of *Pleurotus ostreatus* (2209, Chunchu 2 and Wonhyung strains). KATB 99121 strain secreted amylolytic, proteolytic and cellulolytic exoenzymes. KATB 99122 and KATB 99123 strains excreted amylolytic, proteolytic, cellulolytic, lipolytic exoenzymes and showed β -glucosidase activity. Further studies will be conducted on the development of microbial fungicides using the antagonistic bacteria for the control of green mold disease on *Pleurotus* spp.

KEYWORDS: Antagonistic spectra, Antifungal activity, Lytic enzyme, *Trichoderma* spp.

현재 재배되고 있는 버섯은 약 22종이며 야생 종까지 포함하여 식용 가능한 버섯의 종은 약 300여종으로 추정된다(박, 1998). 전 세계적으로 재배되고 있는 대표적인 식용버섯은 양송이버섯(*Agaricus bisporus*), 표고버섯(*Lentinus edodes*), 팽이버섯(*Flammulina velutipes*), 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 등으로 구분할 수 있다. 국내에서 식용버섯의 인공재배는 양송이, 표고, 느타리, 팽이 이외에 목이버섯(*Auricularia* sp.) 등이 주로 알려져 있다(김 등, 1989; 홍 등, 1984).

식용버섯 중 느타리버섯은 단백질, 아미노산, 당류, 비타민, 무기염류 등 인체에 중요한 영양소를 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(김 등, 1998). 또한, 혈액순환을 촉진하고, 요통, 관절염, 수족마비의 치료, 불안정한 혈압의 조절 및 항암효과가 있는 것으로 밝혀져 있으며(Yoshioka and Tabeta, 1985), 특히 필수 아미노산과 다당류를 함유하고 있음이 밝혀지면서 건강식품 및 보건의약품으로써 그 수요가 날로 증가하고 있는 실정이다(Kalberer and Kunsch, 1974).

느타리버섯의 인공재배는 최초 원목재배로 시작되었으나 산업이 발전함에 따라 그 재배방식도 변하고 있다. 벗

짚재배는 원목에 비하여 염가이며, 배지재료인 벗짚의 구입이 용이하나 배지의 제조 및 균사의 성장 관리가 복잡하여 버섯재배에 실패하는 경우가 적지 않은 실정이다. 벗짚을 이용한 느타리버섯의 재배 실패는 주로 배지의 살균과정 잘못이나 균사성장 기간중의 관리부실 또는 오염된 균주의 사용으로 유해균류가 발생하는 것에 그 원인이 있으며, 이러한 유해균류의 대부분을 차지하는 것은 *Trichoderma* spp.로 버섯 푸른곰팡이병을 일으키는 것으로 알려져 있다(정, 1983).

*T. viride*는 항생물질인 viridin을 분비하는 것으로 보고되었으며(Brian and McGowan, 1945), *Trichoderma* spp.의 대부분은 chitinase, cellulase 등 다양한 종류의 효소와 trichodermin과 peptide계 항생물질을 생산하여 다른 균류의 생장을 억제하는 것으로 보고되었다(Dennis and Webster, 1971). 벗짚으로 배지를 조제하여 사용할 경우 *Trichoderma* spp. 이외에도 *Aspergillus* spp. 또는 *Verticillium* spp. 등을 포함한 다수의 유해균류가 발생하여 느타리버섯의 균사성장을 저해하는 것으로 보고되고 있다(Zaanyen, 1978). 뿐만 아니라, 최근 병원성 세균에 의한 갈반병의 피해도 심각하여 1988년의 경우 느타리버섯의 생산비율이 70%에서 39%로 감소한 것으로 보고되었다(전 · 차, 1988).

*Corresponding author <E-mail: bhmin@daegu.ac.kr>

본 연구에서는 버섯재배 시 빈번하게 발생하는 유해 균류의 문제점을 해결하고, 과학적이며 안정적인 느타리버섯의 재배를 확립하기 위하여 버섯 푸른곰팡이병의 원인균인 *Trichoderma*속 균주에 대해 길항력이 우수한 세균(KATB 99121, KATB 99122 및 KATB 99123)을 분리하였으며, 분리된 세균의 푸른곰팡이병균에 대한 항균활성과 세포의 분비효소의 활성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

제어균주의 분리

느타리버섯 재배용 배지의 제조단계 중 후 발효과정의 배지시료 60 g을 채취하여 준비된 멸균 증류수에 현탁시킨 후 10배 희석법에 따라 nutrient agar plate(NA, Difco Co.)에 도말하여 42°C 항온 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 푸른곰팡이병 원인균을 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.)와 NA가 동량으로 혼합된 배지의 증양에 접종한 후, NA 배지에서 전 배양된 분리세균의 배양액을 paper disk(Advantec, Toyo) 접종방법으로 길항실험을 실시하여 균체 주변에 투명한 항균활성대를 형성하는 3균주를 분리하였다. 분리한 세균의 생화학적 특성을 Biolog system을 이용하여 분석한 결과 *Bacillus* spp.로 동정되었다(Lee and Hyun, 2000).

사용균주

농업과학연구소에서 분양 받은 느타리버섯 균주인 *Pleurotus ostreatus*(2209, Chunchu 2 및 Wonhyung)와 푸른곰팡이병 병원균인 *T. harzianum*(ATCC 6043, ATCC 6385, ATCC 6426 및 ATCC 6504), *T. viride*(KACC 40519), *T. hamatum*(KACC 40508) 등 9균주와 느타리버섯 재배용 배지의 제조단계 중 후 발효과정의 배지시료에서 분리한 *Trichoderma* spp. 2균주(G 및 Y주) 등 총 11균주를 대상으로 항균활성을 측정하였다. 또한 동물 병원균인 *Candida albicans*(KACC 3006)을 대상으로 한 항균활성을 측정하였다.

분리세균의 푸른곰팡이병균에 대한 항균활성

분리세균의 푸른곰팡이병균 항균활성 측정은 PDA와 NA가 동량으로 혼합된 배지의 증양에 8개의 *Trichoderma*속 균주와 1개의 *C. albicans* 균주를 6 mm agar plug 형태로 접종한 후, nutrient broth 배지에서 전 배양된 분리세균의 배양액과 배양 상등액을 6 mm paper disk(Advantec, Toyo)에 접종하여 disk의 외측면으로부터 형성된 투명한 억제대의 크기를 비교함으로써 분리균주의 항균활성을 측정하였다. 또한 느타리버섯 균주에 대한 영향을 평가하기 위하여 *P. ostreatus* 3균주에 대한 항균활성은 동일한 방법으로 실시하였다.

지방 분해능의 측정

Sierra(1957) 방법을 변형하여 Tween 80을 함유하는 고체배지(peptone 10 g, CaCl₂ 0.1 g, agar 18 g, Tween 80 10 ml, 증류수 1 l)에 분리세균을 접종하고 42°C에서 2일간 정치 배양한 후, 균체 주위에 불투명한 결정체가 나타나면 지방분해능이 있는 것으로 판정하였다.

전분 분해능의 측정

Soluble starch가 함유된 배지(starch 5 g, peptone 10 g, CaCl₂ 0.5 g, MgCl₂ 5 g, MgSO₄ 2 g, KCl 1 g, FeSO₄ 0.001 g, agar 18 g, 증류수 1 l)에 분리세균을 접종하고 42°C에서 2일간 정치배양한 후, 배양된 배지상에 Gram's iodine 용액을 첨가하여 5분간 반응시키고 iodine을 제거한 후 균체 주위에 투명대를 형성하면 전분 분해능이 있는 것으로 판정하였다.

섬유소 분해능의 측정

Carboxymethylcellulose(CMC) 배지(CMC 5 g, peptone 5 g, CaCl₂ 0.5 g, MgSO₄ 2 g, KCl 1 g, FeSO₄ 0.001 g, agar 18 g, 증류수 1 l)에 분리세균을 접종하고 42°C에서 2일간 정치배양한 후, 배지상에 0.5 % Congo-red 용액을 첨가하여 5분간 반응시키고 반응액을 제거한 후 균체 주위에 투명대를 형성하면 섬유소 분해능이 있는 것으로 판정하였다.

단백질 분해능의 측정

Gelatin이 첨가된 배지(gelatin 5 g, beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 18 g, 증류수 1 l)에 분리세균을 접종하고 42°C에서 2일간 정치배양한 후, 배지상에 1% tannic acid 용액을 첨가하여 5분간 반응시키고 반응액을 제거한 후 균체 주위에 불투명한 결정체를 형성하면 단백질 분해능이 있는 것으로 판정하였다.

β -glucosidase 활성도 측정

Esculin(6,7-dihydroxycoumarin 6-glucoside)이 첨가된 배지(esculin 3 g, NaNO₃ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 10 mg, KCl 0.5 g, ferric citrate 0.2 g, 2% K₂HPO₄ 50 ml, 1% ZnSO₄ · 7H₂O 1 ml, 0.5% CuSO₄ · 7H₂O 1 ml, agar 18 g, 증류수 1 l)에 분리세균을 접종하고 42°C에서 3일간 정치배양한 후, 균체 주위에 검은색 띠가 형성되면 분해능이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

분리세균의 *Trichoderma*속 균주에 대한 항균활성

느타리버섯의 푸른곰팡이병균인 *Trichoderma*속 균주에 대한 항균활성을 나타낸 길항세균은 각각 KATB 99121, KATB 99122 및 KATB 99123으로 명명하였으며, 느타리

Table 1. Antifungal activities of the isolated bacteria against various isolates of *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma* spp., and *Candida albicans*

Host mushroom/pathogenic fungi	Antifungal effect ^a					
	KATB 99121		KATB 99122		KATB 99123	
	bacteria	culture sup.	bacteria	culture sup.	bacteria	culture sup.
<i>Pleurotus ostreatus</i> (2209)	-	-	-	-	-	-
<i>P. ostreatus</i> (Chunchu 2)	-	±	±	±	-	-
<i>P. ostreatus</i> (Wonhyung)	-	±	-	-	±	-
<i>Trichoderma harzianum</i> (KTCC 6426)	+	+	+	+	+	-
<i>T. harzianum</i> (KTCC 6504)	+++	++	-	-	-	-
<i>T. harzianum</i> (KTCC 6043)	++	+	-	+	+	-
<i>T. harzianum</i> (KTCC 6385)	+++	++	++	+	++	-
<i>T. hamatum</i> (KACC 40508)	++	+	-	-	-	-
<i>T. viride</i> (KACC 40519)	++	-	++	++	+++	-
<i>Trichoderma</i> sp. (isolated Y)	++	+++	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> sp. (isolated G)	++	+++	+	++	+	+++
<i>Candida albicans</i> (KACC 3006)	++	++	++	++	++	++

^aInhibition zone; - : No inhibition, ± : 1-2 mm, + : 3-4 mm, ++ : 4-5 mm, +++ : >5 mm.

버섯(2209, Chunchu 2 및 Wonhyung)의 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Table 1). 길항세균 KATB 99121은 *T. harzianum*(ATCC 6043, ATCC 6385, ATCC 6426 및 ATCC 6504), *T. viride*(KACC 40519), *T. hamatum* (KACC 40508)과 본 연구실에서 분리한 *Trichoderma* 속 균주(G 및 Y주)에 대하여 탁월한 항균활성을 나타내었다(Table 1과 Fig. 1). 분리균주 KATB 99122는 *T. harzianum*(ATCC 6385, ATCC 6426), *T. viride*(KACC 40519)와 *Trichoderma*속 균주(G 및 Y주)에서 균체 및 배양상등액 접종지역에 중등도의 활성대가 관찰되었으며, *T. harzianum*(ATCC 6043 및 ATCC 6504)과 *T. hamatum*

(KACC 40508)에 대해서는 항균활성이 나타나지 않았다. KATB 99123은 *T. harzianum*(ATCC 6043, ATCC 6426 및 ATCC 6385)과 *Trichoderma*속 균주(G 및 Y주)에서 균체 접종지역에서는 미약한 정도의 활성대가 관찰되었고, *T. viride*(KACC 40519)에서는 균체 접종지역에서만 뚜렷한 활성대가 관찰되었다. 그러나 *T. harzianum*(ATCC 6504)과 *T. hamatum*(KACC 40508)에서는 균체와 배양상등액 접종지역에서 항균활성대는 관찰되지 않았다. 분리세균 KATB 99121, KATB 99122과 KATB 99123은 동물병원성균인 *C. albicans*에서 균체 및 배양상등액 접종지역 주변에 뚜렷한 항균활성대를 형성하였다.

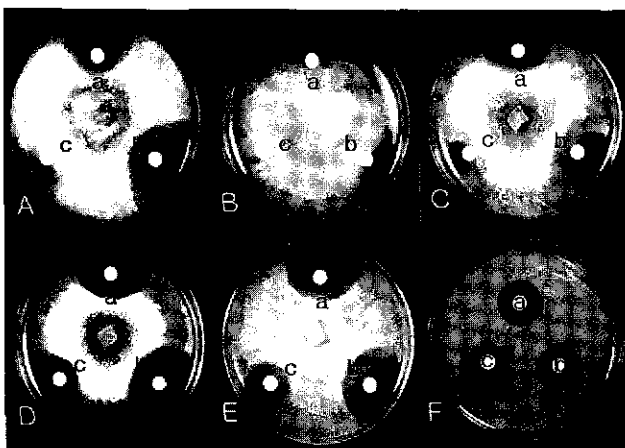


Fig. 1. Growth inhibition effects of bacterial culture supernatant against *Trichoderma* spp. and *Candida albicans*. A : *T. harzianum* (KTCC 6043), B : *T. viride* (KACC 40519), C : *T. hamatum* (KACC 40508), D : *Trichoderma* sp. (isolated G), E : *Trichoderma* sp. (isolated Y), F : *C. albicans* (KACC 3006), a : culture supernatant of KATB 99121, b : culture supernatant of KATB 99122, c : culture supernatant of KATB 99123.

분리세균의 세포의 효소활성

배지에 첨가된 Tween 80의 분해능력 실험에서 길항세균 KATB 99122와 KATB 99123은 균체 주변에 불투명한 결정체를 형성하여 분해능력이 있는 것으로 관찰되었으나, KATB 99121은 지방분해 효소를 분비하지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 전분 분해능력 실험에서는 길항세균 KATB 99121, KATB 99122 및 KATB 99123의 균체 주변에 요오드반응이 일어나지 않는 뚜렷한 투명대를 형성하여 3균주 모두 전분 분해능력이 높은 것으로 확인되었다. 섬유소원인 CMC의 분해능력 실험에서는 길항세균 KATB 99121과 KATB 99122의 균체 주변에 Congo-red에 약하게 반응하는 연분홍색의 불투명대를 형성하여 섬유소 분해효소를 세포외로 분비하는 것으로 확인되었으나, KATB 99123은 미약한 활성대를 나타내었다. 세포외로 분비하는 단백질 분해효소의 활성실험에서 분리세균 KATB 99121, KATB 99122 및 KATB 99123에서는 균체 주변에 tannic acid에 반응하지 않는 투명대를 형성하여 3균주 모두 활성이 있는 것으로 관찰되었다. 세포외로 분비되는 β -glucosidase 활성은 길항세균 KATB 99123에

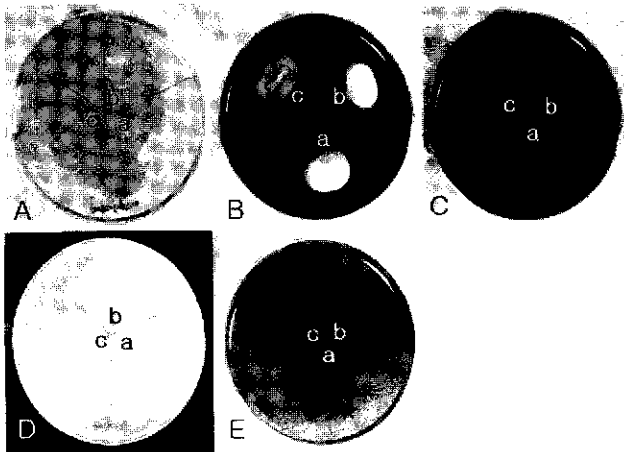


Fig. 2. Exoenzyme activities of antagonistic bacteria on the solid media. A : Proteolytic activity, B : Amyolytic activity, C : Cellulolytic activity, D : Lipolytic activity, E : β -glucosidase activity, a : KATB 99121, b : KATB 99122, c : KATB 99123.

서 가장 높은 활성을 나타내었고, KATB 99122, KATB 99121의 순서로 약한 활성이 관찰되었다.

고 찰

느타리버섯은 약 48여 개의 품종이 있으며, 국내에는 그 중에서도 원형느타리, 춘추느타리 등 일반적인 느타리버섯(*P. ostreatus*) 7품종을 비롯하여, 사철느타리(*P. florida*) 2품종, 여름느타리(*P. sajor-caju*) 2품종 등 형태나 재배특성이 다른 13개의 품종이 보급되어 인공재배되고 있으며 현재에도 새로운 품종 개발을 위한 연구가 진행되고 있다(김 등, 1998).

최근 느타리버섯의 재배는 폐면을 이용한 재배방법이 활용되고 있으며, 이를 응용한 폐면 상자재배가 현재의 느타리버섯 재배의 근간이 되고 있다. 그러나, 폐면을 이용한 배지 제조시 수분조절이 잘 안되어 과습하면 발효가 잘 되지 않고, 살균열의 침투가 어려워 살균에 실패하는 경우가 발생된다. 이러한 경우 혐기성 발효가 일어나기 쉽고, 후발효가 어려워 *Trichoderma* spp.에 의한 푸른곰팡이병이 빈발하게 되어 재배에 실패하기 쉽다.

진균류는 현재 다양한 농작물에 피해를 주고 있으며, 이러한 농작물에 대한 병원성 진균류의 억제활성을 나타내는 길항성 세균에 관한 연구와 상품이 실용화되고 있다. 대표적으로 *Bacillus* spp.(Hassett et al., 1996), *Pseudomonas aeruginosa*(Rosales et al., 1995), *Serratia marcescens*(Park et al., 1995), *Alkaligenes faecalis*(Howell et al., 1988) 등에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구실에서 분리한 세균(KATB 99121, KATB 99122 및 KATB 99123)은 균체뿐 아니라 배양상등액 처리균에서도 *Alternaria alternata*, *A. porri*, *Phytophthora capsici*,

P. cryptogea 및 *Sclerotinia sclerotiorum* 등의 병원성 곰팡이에 우수한 억제효과가 관찰되었으며(Lee and Hyun, 2000) 본 실험에서도 *Trichoderma*속 8균주와 동물병원성 균주 *C. albicans*에 균체 및 배양상등액 접종지역에서 탁월한 항진균 활성이 관찰되었고(Fig. 1 및 Table 1), 동물병원성균에 대한 항진균 활성측정으로 앞으로 분리된 길항세균은 식물 및 동물 병원성 진균류의 항균활성 균주로서 연구를 계속해야 할 것이다. 또한, 길항세균은 대상 작물인 *Pleurotus ostreatus*(2209, Chunchu 2 및 Wonhyung)에 대해서는 균체 및 배양상등액 모두 억제활성이 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구자들에 의해 분리된 3개의 길항세균은 2차 오염원으로 작용할 수 있는 균체를 직접 사용하지 않고 그 대사산물을 이용한 항진균 물질개발이 가능할 것으로 판단된다. 또한 후발효 버섯배지에서 분리된 이들 길항 세균들은 다양한 유기물 분해능력, 즉 지질, 전분, 섬유소, 단백질 등을 분해하는 능력을 보유하고 있으므로 이러한 유기물 분해능이 뛰어난 미생물의 개발은 농작물 재배 시 발생하는 진균성 질병발생을 억제함은 물론 퇴비의 개량 나아가 토양 및 수질환경 개선에도 크게 기여할 것으로 판단된다.

적 요

*Trichoderma*속 균주는 느타리버섯 재배 시 발생하는 버섯 푸른곰팡이병의 주요 원인균이다. 후발효된 버섯 배지로부터 버섯 푸른곰팡이병균에 항균활성을 나타내는 길항세균(KATB 99121, KATB 99122 및 KATB 99123)을 분리하였다. 분리세균 중 KATB 99121은 *T. harzianum*(4균주), *T. viride* 및 *T. hamatum*과 동물병원성 곰팡이 *Candida albicans*에 대하여 우수한 억제 활성이 관찰되었고, 특히 세균의 배양상등액 접종실험에서 강한 항균활성을 보였다. 또한, KATB 99121은 전분, 단백질 및 섬유소를 분해하는 효소를 세포외로 분비하는 것으로 관찰되었고, KATB 99122와 KATB 99123은 전분, 단백질, 섬유소 분해효소는 물론 지질 분해효소도 분비하고 있었으며 β -glucosidase 활성도 높은 것으로 확인되었다. 앞으로 이들 길항세균들을 이용하여 느타리버섯 푸른곰팡이병 방제를 위한 미생물 살균제의 개발에 대한 연구를 수행할 예정이다.

감사의 글

본 논문은 2002년도 대구대학교 학술연구비의 부분적 지원에 의해 수행되었기 이에 감사드립니다.

참고문헌

김동현, 공원식, 김경수, 김영호, 유창현, 김영배. 1998. 느타리버

- 섯류의 생화학적 방법에 의한 품종구분. 한국균학회지 **26**: 173-181.
- 김태영, 홍재식, 이태규, 김명곤, 오경철. 1989. 느타리버섯의 일 반성분 및 유리당의 함량변화. 한국농화학회지 **32**: 14-22.
- 박용환. 1998. 최신 버섯학, pp. 314-321.
- 성재모, 유영복, 차동렬. 1998. 버섯학, pp. 259-301. 교학사.
- 전창선, 차동렬. 1988. 느타리버섯 병해 발생조사. 농업기술연구 소 시험연구보고서, 생물부편, pp. 794-800.
- 정환채. 1983. 느타리버섯의 벗짚배지 발효방법에 관한 연구. 한국균학회지 **11**: 123-129.
- 홍재식, 박용환, 정기태, 김명곤. 1984. *Pleurotus sajor-caju*의 재 배에 관한 연구. 배양조건 및 화학 성분 변화. 한국균학회지 **12**: 93-98.
- Brian, P. W. and McGowan, J. C. 1945. Viridin, a highly fungistatic produced by *Trichoderma viride*. *Nature* **156**: 144-145.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* **57**: 25-39.
- Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 1011-1020.
- Hassett, D. J., Sokol, P. A., Howell, M. L., Ma, J. F., Schweizer, H. T., Ochsner, U. and Vasil, M. L. 1996. Ferric uptake regulator(Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J. Bacteriol.* **178**: 3996-4003.
- Howell, C. R., Beier, R. C. and Stipanovic, v 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium preemergence* damping-off by the bacterium. *Phytopathology* **78**: 1075-1077.
- Kalberer, R. and Kunsch, U. 1974. Amino acid composition of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Lebensn. U. Technol.* **7**: 242-244.
- Lee, H. Y. and Hyun, S. H. 2000. *In vitro* biological control against *Trichoderma harzianum* using antifungal bacteria. *Kor. J. Environ. Biol.* **18**: 441-446.
- Park, S. K., Lee, H. Y. and Kim, K. C. 1995. Antagonistic effect of chitinolytic bacteria on soilborne plant pathogens. *Kor. J. Plant. Pathol.* **11**: 47-52.
- Rosales, A. M., Thomashow, L., Cook, R. J. and Mes, T. W. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **85**: 1028-1032.
- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* **23**: 15-22.
- Van Zaanyen, A. 1978. New possibilities for control of dry bubble caused by *Verticillium Fungicola*. *J. Mushroom* **67**: 210-211.
- Yoshioka, Y. and Tabet, R. 1985. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus*(Fr.) Quel. : Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research* **140**: 93-100.