

길항작용에 의한 느타리 버섯의 갈변병 유발방지

전역한

(경희대학교 산업대학 식품가공학과)

Control of brown blotch of mushroom by antagonistic bacteria

Chun Uck-Han

Dept. of Food Science, Kyung-Hee Univ., Korea

Abstract

The white colonies of *Pseudomonas tolaasii*, which are responsible for causing brown blotch disease of cultivated mushrooms, and *Pseudomonas fluorescens* were isolated from the Pseudomonas Agar F(PAF) (Difco). After incubation at 25°C for 24 hours, the opaque green colonies and white colonies were observed and they were identified as *P.fluorescens* and *P.tolaasii* respectively from biochemical tests and white line test.

The optimum conditions for *P.fluorescens* obtained by batch fermentation were 30°C and pH 6.0, respectively. The optimum concentrations for media were determined to be NH₄Cl 1.0g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0g/L, CaCl₂ 0.1g/L, KH₂PO₄ 1.0g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0g/L, and yeast extract 10.0g/L. Cells of *P.fluorescens* were grown well on the medium containing 30g/L of glucose, whereas the growth were inhibited with the glucose at higher concentration than 30g/L. Maximum specific growth rate (0.427 h⁻¹) was obtained when a agitation speed was adjusted at 200 rpm.

Continuous culture experiments were carried out on the media containing various sugar concentrations (20~40g/L) at a different dilution rates and the maximum productivities were obtained at the dilution rates between 0.1 and 0.12 h⁻¹. At D=0.1h⁻¹, 1.19g/L of cell concentrations maintained during the steady state.

When a diluted culture broth harvested from the continuous culture was applied to mushroom trays, infection of mushroom by the pathogen was effectively controlled. However, the same effect was not shown once the blotch was caused. The antagonistic activity of *P.fluorescens* culture against the pathogen remained after storing at 4°C for 4 weeks.

I. 서 론

P.tolaasii 세균은 이미 전술했듯이 버섯이나 또는 주위에 약 5×10⁷의 높은 수준으로 존재하며 이외에도 다른 세균 즉 *P.agarici*, *P.gingeri* 등의 pathogen과 함께 버섯 조직으로부터 영양분을 흡수하여 공존한다. 특히 버섯의 생장온도 18°C와 습도 75~80% RH에서 이와 같은

pathogen들은 급격히 증식되어서 amine과 같은 세포의 독소를 생성하여 버섯 cap부위에 갈변병을 유발시킨다.⁷⁾ 갈변병은 주로 버섯수확전에 발생하지만 수확후 낮은 온도에 하루 저장하는 기간중에도 발생한다.

P.tolaasii 세균에 대한 길항작용을 갖는 *P.fluorescens*에 의해서 갈변병을 예방할 수 있다는 보고가 있으며, 이 세균은 버섯재배 배지나 주위 토양으로부터 분리한 것이다.⁷⁾ 또한 *P.tolaasii*의 생장억제를 위해서는 길항세균인

*P.fluorescens*의 농도가 *P. tolaasii*보다 80배 높아야 한다고 보고되었다. 이는, 자연 조건하에서는 *P.fluorescens*가 동시 존재하더라도 *P.tolaasii*세균을 control할 수 없음을 의미하는 것이다. *P.fluorescens*에 의하여 버섯의 갈변병 control기작은 아직 확실하지 않으나, pathogen과 길항세균사이에 영양분에 대한 경쟁이 이루어져 결국 pathogen이 사멸하거나 또는 *P.fluorescens*세균에 생성하는 효소가 갈변병균이 생성하는 독성물질의 분해력을 가지고 있다고 가정한다.

본 연구에서는 실제로 *P.fluorescens* culture를 버섯농장 임상실험에 응용하였다. *P.fluorescens*는 버섯뿐만 아니라 다른 농작물의 병원균의 성장을 억제하는 antibiotics를 생성한다. 감자에 있어서 줄기나 뿌리부분에 생장하여 피해를 주는 것이 *Erwinia carotobora*이며^{8,9,10}, 생물학적 control 방법이 연구되고 있다. 즉 버섯에서와 마찬가지로 감자표면에서 채취한 길항세균으로 감자를 처리함으로써 *Erwinia carotobora* pathogen의 증식을 억제할 수 있으며 Fluorescent pseudomonad가 주요 길항성을 가지고 있으며 또한 감자표면에 쉽게 번식한다^{11,12,13,14}. Colyer와 Mount¹⁵는 fluorescent pseudomonads(*P.putida*)에서 생성되는 항생물질에 의해 수확한 감자의 부패를 6.8~18.2% 감소시켰다고 보고하였다. 이외에도 뿌리환경에 존재하는 pathogen의 *P.fluorescens* 또는 *P.putida*에 의한 control에 대한 많은 보고가 있으며^{16,17,18,19,20,21,22,23}, 예를 들면 면화씨로부터 분리한 *P.fluorescens*(Pf-5)에 의해 병해 유발세균인 *Rhizoctonia solani*를 control하며 이때 길항세균으로부터 pyrrolutrin과 pyoluteorin이라는 항생물질이 생성된다고 보고되었다. Schroth와 Haucock²⁴은 *P.fluorescens*를 이용하여 무우재배에 있어서 60~144%의 수확증가를 획득하였다.

일반적으로 버섯의 경우에도 오염이 안되고 잘 성장하는 버섯인 경우에는 pathogen이 별로 발견되지 않으나, 갈변병이 일단 유발되면 버섯은 물론 버섯주위에서 많은 pathogen(*P.tolaasii*)이 생장하며, 또한 동시에 길항세균도 같이 공존하는 경우가 많다. Nair와 Fahy⁷는 형광성을 띄지 않는 *Pseudomonas* sp.(*P.mutitorans*에 가까운)와 형광성을 띄는 *P.fluorescens* 및 *Enterobacter aerogenes*등 길항작용세균들을 토양과 버섯배지로 부터

분리하였다. 본 연구에서도 Wong과 Preece²⁵의 방법에 의해서 *P.fluorescens*를 분리하여 배양에 사용하였다.

미생물 배양공정은 일반적으로 최적조건하에서 최적배지를 이용하여 이루어지고 있다. Batch process에서는 kinetic parameter들이 시간이 경과함에 따라서 변화한다. 즉 cell농도, 기질, 그리고 생성물등이 그것이다. 실험실용 fermentor에서는 환경인자가 크게 중요성을 띄지 않지만 대량배지에서는 가장 중요한 것이 농도, 온도등이며 특히 aerobic bacteria인 경우에는 용존산소의 양의 적정유지가 고려되어야 한다. Onken²⁶은 *P.fluorescens* 배양에 있어서 산소와 탄산가스의 total pressure 또는 partial pressure가 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 본 연구에서는 일반적으로 세포 조성에 의하여 기본배지를 이용하여 최소배지를 얻었으며, 이러한 최소배지를 이용하여 연속배양에서 cell농도를 측정하여 최적배지를 조성하였다. 또한 초적배지를 조성하기 전에 pH, 온도, D.O.등의 요소들을 최적화하였다. 연속배양에서 얻은 배양약을 임상실험에 이용하였다.

P.fluorescens 배양액에 의해서 갈변병 세균이 억제되는 확실한 기작은 아직 알 수 없으나, *P.tolaasii*가 만드는 toxic한 물질을 분해시키는 효소나 또는 antibiotics가 생성된다고 생각할 수 있으며, 또 한편 영양물질에 대한 경쟁적 작용때문이라 추측되나 이 부분에 대한 계속적인 연구도 요구된다. *P.fluorescens*를 대량 배양하여 버섯농가에 보급하여 실제 버섯재배에 적용할 수 있으며 수확량 증가에 큰 역할을 할 것으로 확신하며 특히 *P.fluorescens*는 여타 농작물 특히, 감자, 오이등의 pathogen에도 길항성을 띄므로 이들 농작물에 발생하는 병원성균의 생리학적 생태학적 연구가 선행된다면 아주 좋은 무공해 농약으로 개발 가능성이 있다고 사료된다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주

*P.tolaasii*는 경기도 광주군 소재 대한버섯연구소에서 갈변병이 발생한 느타리버섯으로부터 분리, 채취하였다. *P.fluorescens*는 역시 갈변병이 유발, 버섯 및 배지에서

분리하였고 또한 일부는 Mauri Foods Dairy Laboratories (Moorebank Avenue, Moorebank, NSW)로 부터 분양받아서 사용하였다. 갈변병이 유발된 버섯으로부터 *P.tolaasii*와 *P.fluorescens*의 분리는 Wong과 Preece²⁵⁾의 방법을 이용하였으며, 이때 배지(PAF)조성은 Bactotryptone, 10g/L; Bacto-proteose peptone No 3, 10g/L; Dipotassium phosphate, 1.5g/L; Magnesium sulfate, 1.5g/L; Bacto-agar, 15g/L; 그리고, Bactoglycerol, 10g/L에 최종 pH는 7.0이었으며, 25°C에서 24시간 배양하여 나타난 단일 균락을 이용하였다.

2. 사용배지

P.fluorescens 및 *P.tolaasii*의 stock culture에 사용된 배지는 Table 1과 같다. 100ml flask에서 배양한 후 배양액에 glycerol(80%)을 50 : 50으로 혼합한 후 냉동고에 보관하여 사용하였다. 일부 균주는 agar 배지에 생장시켜 냉장고에 보관하여 사용하였다.

Table 1. Media composition for stock culture of *P.tolaasii* and *P.fluorescens*(g/L)

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

또한 *P.fluorescens* 회분배양에 관한 실험에서 기본 배지 조성은 Table 2와 같다. 초기온도 30°C, pH 4.5에 고정시켰다.

3. 균주분리

갈변병 유발버섯의 cap부위를 증류수에 담아서 여러 차례 흔든 후 여액을 PAF배지에 접종하여 25°C에서 24

시간 배양후 푸른 빛의 형광을 띤 균락과 흰 백색의 균락을 동일배지에서 순수분리하였다. 이때 흰 백색의 균락주위에 하얀 선이 생기는 것을 관찰하였고 이것이, *P.tolaasii*이며 푸른 색의 형광성을 띤 균락이 *P.fluorescens*이다.

Table 2. Media composition for *P.fluorescens* at batch culture(g/L). pH was adjusted at 4.5

Components	Mediums
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05
CaCl ₂	0.05
KH ₂ PO ₄	1.0
Yeast extract	5
Glucose	30

4. 배양조건

고체배지에서 생긴 균락 *P.fluorescens*를 100ml flask에서 24시간 배양한 후 500ml 삼각 flask에 100ml의 배지(Table 2 참조)에서 24시간 배양 후 fermentor (New Brunswick Scientific Co., Inc.)에서 반응조건, 배지조성등에 관한 실험을 하였다. 연속배양실험은 회분배양과 동일한 반응기(Working volume=1.5L)를 사용하였으며, 일정 양의 D.O.를 유지하기 위하여 교반속도를 조절하였다(200, 350, 400 rpm). 2N NaOH를 이용하여 pH 6.0을 유지하였고, 온도는 30°C를 유지하였다. 30일간의 연속실험을 행하였으며, 적당한 간격으로 sample을 취하였다. 반응중에 생성하는 거품을 제거하기 위하여 소포제로서 silicon(Toshiba)을 사용하였다. Peris-talitic pump (Vision Science Co.)를 이용하여 dilution rate를 조절하였다.

5. 분석방법

배양물을 증류수로 희석하여 spectronic 20(Bausch & Lomb Co.)으로 600nm에서 2~4시간마다 weight

와 O.D와의 관계에서 얻어진 standard curve(Fig. 1)를 이용하여 균체량을 얻었다.

Glucose의 양은 HPLC(Waters model)에 Aminex HPX-87C column(Bio Rad, Richmond, Calif. U.S.A.)를 연결하여 측정하였다.

6. 임상실험

대한버섯연구소(경기도 광주군 목리 소재)에서 느타리버섯 재배 용기 50~100개를 선별하여 pin이 나오기 전부터 완전히 성장이 끝날 때까지 3회 배양액을 버섯과 주위배지에 뿌려서 *P.fluorescens* 배양액에 의한 갈변병 방지에 관한 관찰을 하였으며, 이때 온도는 18°C, 습도는 80%(RH)를 유지하였다. 특히 *P.fluorescens* 배양액의 저장에 관한 실험을 동시에 수행하였다.

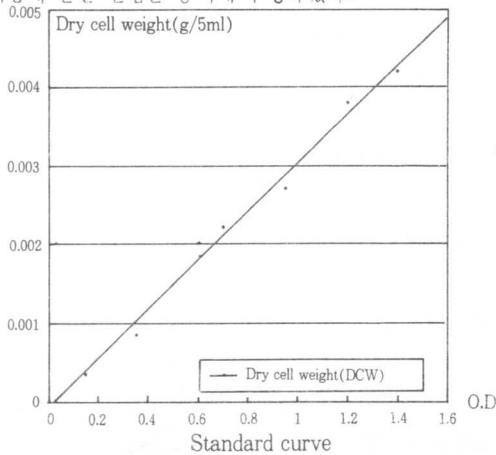


Fig. 1. Correlation curve between optical density and dry cell weight of *P.fluorescens*.

7. 생화학적 검사

Lelliott등²⁷⁾의 방법에 의하여 oxidase 검사, levan 생성유무, arginine 가수분해, nitrate 환원등의 검사를 하였다.

8. Pitting검사

Gandy²⁸⁾가 사용한 방법대로 버섯 cap의 tissue block을 사용하였다. 분리한 *P.tolaasii*를 25°C에서 PAF 배지에 배양한 후 증류수에 세포수가 약 10⁸ cells/ml이상

되도록 현탁시킨 후 버섯 cap의 표피를 벗긴 tissue block에 1 loop정도의 현탁액을 접종시킨 후 물에 적신 종이가 들어 있는 petri dish에서 25°C에서 배양한 후 조직변화를 검사하였다.

9. 길항성 검사

PAF배지로부터 *P.tolaasii* 세균 colony와 *P.fluorescens* colony를 증류수 10ml에 각각 채취한 후(10⁸ cells/ml), 1:1, 1:5 그리고 1:10의 비율로 현탁하여 섞은 후 PAF에 다시 접종하여 *P.tolaasii*에 대한 길항성을 조사하였다.

10. 배양검사

Potato 배지(Potato 30g/L, glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, nutrient agar 30g/L)에 *P.tolaasii* 배양액 및 원심분리한 후 cell free 여액을 spread한 후 느타리버섯균의 성장상태를 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 순수분리 및 특성

PAF 배지를 이용하여 *P.tolaasii*와 *P.fluorescens*를 순수분리하였다. Pseudomonas Agar 배지(PAF)(Difco)를 제조회사의 지시에 따라 만들었다. 배지조성은 이미 재료및 방법에 전술하였다. 느타리버섯의 갈변병이 생긴 cap부위를 잘라서 증류수에 씻어낸후 버섯을 제거한 나머지 여액을 PAF에 접종한 후 25°C에서 24시간 동안 배양한 결과 *P.tolaasii*가 자란 colony 주위에 흰 테가 생성됨을 볼 수 있었다. 또한 형광색의 푸른 colony도 발견하였다. Fig. 2에서는 색깔의 구별이 확실치 않으나 UV light에 비추었을 때 완전히 다른 색깔임을 구별할 수 있었다(a:형광색의 푸른 colony, b:흰 색의 colony). 특히 배양온도를 30°C 이상으로 했을 때는 흰테가 발견되지 않았으며, pH 6~7에서 가장 잘 나타났다. (Table 3)

Table 3. The effect of various incubation temperatures on the production of white line in PAF medium around *P.tolaasii*

pH	Temperature (°C)			
	30	25	20	15
10	-	-	-	-
9	-	+	+	+
8	-	+	+	+
7	-	+++	++	+
6	-	+++	++	+
4	-	-	-	-

+, white line produced; -, white line not produced.

Table 4에 나타냈듯이 *P.tolaasii* 세균이나 *P.fluorescens* 세균 모두 levan 생성, oxidase 생성, nitrate 환원성에 있어서 동일한 결과를 보였으나 흰테의 생성과 pitting test에서는 상이한 결과를 보였다. 또한 *P.tolaasii* 세균은 24시간 배양 후 흰색의 불규칙적인 colony를 가에 형성했으며 48시간 후에는 평평한 집락을 형성하였다. *P.fluorescens*는 형광성의 푸른 색깔을 띄었으며 역시 평평한 집락을 형성하였다.

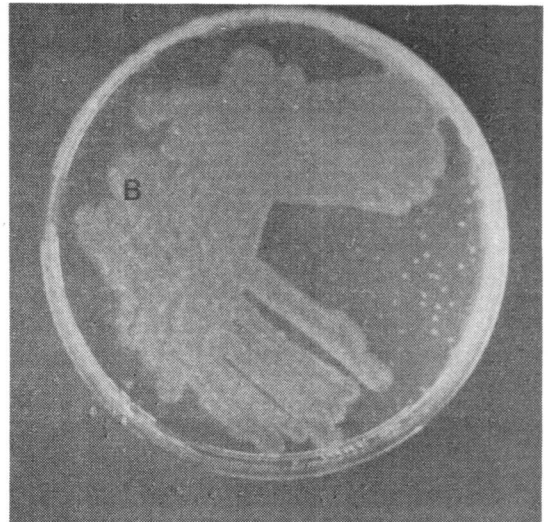
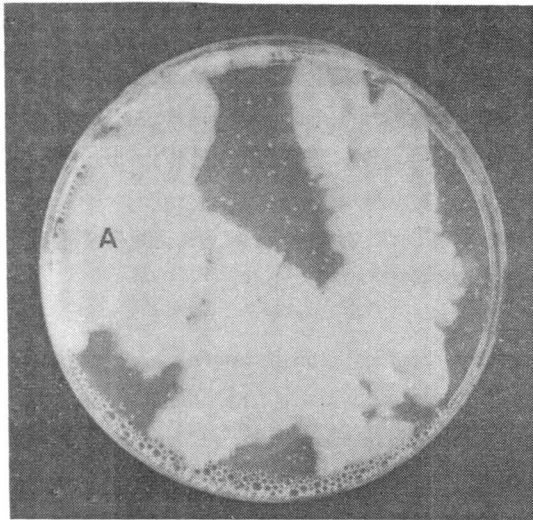


Fig. 2. Screening *Pseudomonas* isolates on the PAF medium. After incubation for 24h at 25°C, opaque white colonies(a) and the translucent blue organisms(b which do not show clearly in the photograph) were observed.

분리한 *P.tolaasii*와 *P.fluorescens* 현탁액을 각각의 비율로 섞은 후 PAF에 배양한 결과 Table 5에서와 같이 1:10의 비율로 섞었을 때 *P.tolaasii*의 생장은 완전히 저해되었으며 이것은 적어도 1:10의 비율에서 *P.fluorescens*가 길항작용을 할 수 있다는 것을 의미한다.

P.tolaasii 세균이 느타리버섯 균사의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 버섯균사 배양검사를 행하였다.

Potato agar 배지위에 *P.tolaasii* 배양액을 원심분리하여 세포를 제거한 cell free broth와 세포를 제거하지 않은 culture broth를 spread한 후 버섯균사를 배양시켰을 때, 두 실험에서 모두 균사체는 성장하지 못하였으나 *P.tolaasii* 배양액이 없는 배지에서는 균사체가 잘 성장하였다(Table 6).

Table 4. Colony appearance on PAF medium and some reactions of both *P.tolaasii* and *P. fluorescens*

Test	Strains	
	<i>P.tolaasii</i>	<i>P.fluorescens</i>
White line test	+	-
Pitting test	+	-
Levan	-	-
Oxidase	+	+
Arginine hydrolysis	+	+
Nitrate reduction	-	-

Table 5. The effect of ratio of *P.tolaasii* and *P.fluorescens* on antagonism against *P.tolaasii*

Ratio of <i>P.tolaasii</i> and <i>P.fluorescens</i>	Antagonism
1 : 1	-
1 : 5	+
1 : 10	+++

+ : antagonism occurred

- : antagonism not seen

Table 6. The effect of culture broth of *P.tolaasii* on growth of mushroom mycelia on potato agar medium

Media	Mycelial
Potato media	growth
Potato media with <i>P.tolaasii</i> broth	not grown
Potato media with cell free broth	not grown

2. 최적조건

가. 배 지

Table 2의 기본배지에 carbon 및 energy source로서 glucose, fructose, sucrose 및 sorbitol을 각각 30g/L로 고정하여 삼각 flask에서 배양실험을 행하였다. Table 7에 결과를 정리하였으며 glucose보다는 fructose에서 더 높은 수치의 specific growth rate와 pro-

ductivity를 얻었으나, 현재 우리나라에서 fructose의 값이 glucose보다 비싼 형편이어서 이후의 실험에서는 glucose를 carbon 및 energy source로서 사용하였다.

Table 7. Cell growth on the media containing various substrates

Substrates	Specific growth rate(μ)(h ⁻¹)	Productivity
glucose	0.356	0.116
fructose	0.335	0.121
sucrose	0.323	0.105
sorbitol	0.297	0.099

glucose를 제외한 Table 2의 기본배지를 이용하여 glucose 농도를 10~30g/L까지 변화시키면서 초기 pH 5.0에서 *P.fluorescens*를 flask 배양하였다. Fig. 3에 나타냈듯이 30g/L에서 0.58g/L의 세포농도를 얻었으며 Table 8에 각 glucose 농도에서 얻어진 specific growth rate 및 productivity를 나타내었다.

기본배지(Table 2)와 glucose 농도 30g/L에서 최적 온도를 결정하였다.

Table 8. Specific growth rate(μ) and maximum productivities(g/l/h) obtained from *P. fluorescens* grown at various glucose concentrations

Glucose (g/L)	Specific growth rate(μ)(h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)
10	0.087	0.0109
15	0.095	0.0117
20	0.109	0.0129
30	0.152	0.0164

나. 환경조건

배양온도를 30°C에서 45°C까지 변화시켜 flask에서 30시간 배양하였다. Fig. 4에서 보듯이 30°C와 35°C에서 가장 높은 세포농도를 얻었다. 그러나 앞으로의 모든 회분배양과 연속배양에서 배양온도는 30°C로 고정하

였다. 이와 같이 최적배양온도와 기질농도를 결정한 후 pH에 따른 세포농도를 조사하였다. 이때 배양시간은 30 시간이었다.

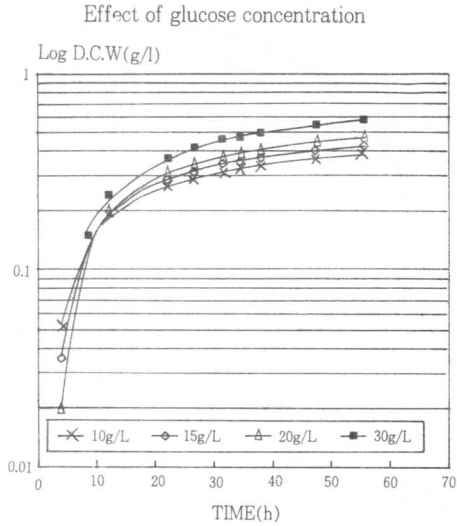


Fig. 3. Batch growth of *P. fluorescens* on various glucose concentrations at 30°C.

Table 9. Specific growth rate (μ) and maximum productivities obtained from *P. fluorescens* grown at various pH ranges

pH	Specific growth rate (μ) (h^{-1})	Productivities (g/l/h)
4	0.083	0.0198
5	0.166	0.0316
6	0.317	0.0479
7	0.106	0.0377

pH 6.0에서 가장 높은 수치의 비증식 속도($\mu=0.317 h^{-1}$)와 productivity(0.047g/l/h)를 얻었으며 회분배양과 연속배양에서 모두 pH 6.0에서 배양실험을 행하였다.

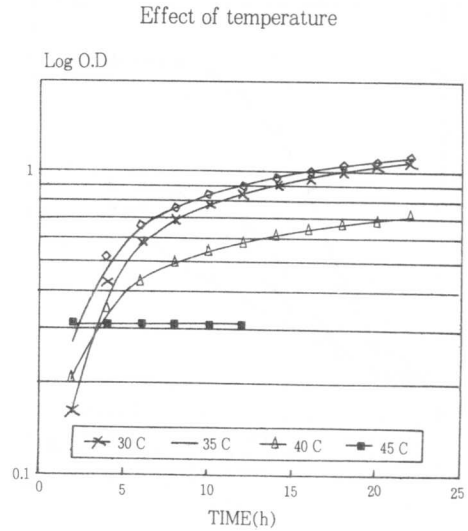


Fig. 4. Effect of temperature on the growth of *P. fluorescens*.

3. 최적배지조성

가. 영양인자

Yeast extract가 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 상기 전술한 조건(온도=30°C, glucose 농도=30g/L)과 그외의 배지조성은 Table 2의 기본배지를 이용하여 회분배양을 실시하였다. Yeast extract의 농도는 3g/L에서 10g/L까지 변화시켰으며, 일반적으로 연속배양에서 yeast extract의 양은 10g/L이상을 초과하지 않는다. 주 이유는 경제적인 면을 고려하여 배양하기 때문이다.

Fig. 6에 yeast extract양에 따른 세포의 농도를 log 값을 취하여 비교하였으며, Table 10에는 세포 비증식 속도(μ)와 productivity를 요약하여 정리하였다. Yeast extract 10g/L에서 가장 높은 비증식 속도(0.523 h^{-1})와 productivity(0.029g/l/h)를 각각 나타내었다.

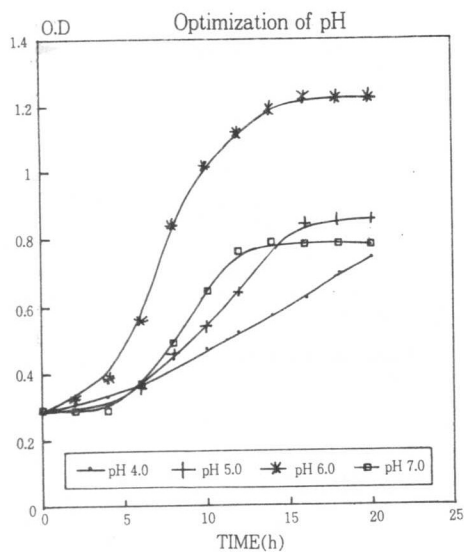


Fig. 5. (a) Effect of initial pH on the growth of *P. fluorescens*. Cells were grown at 30°C.

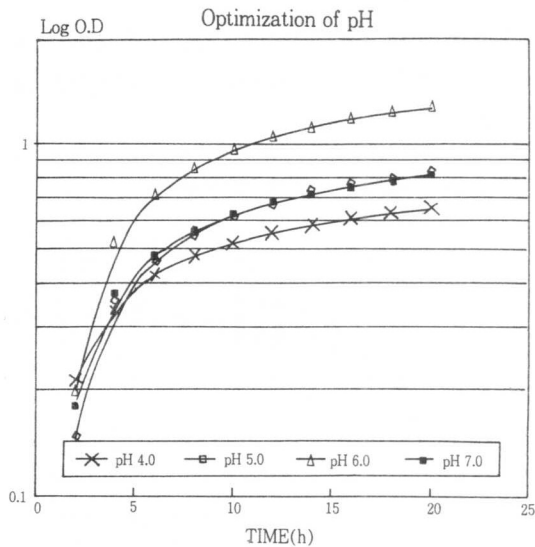


Fig. 5 (b) Log scale of Fig. 5(a).

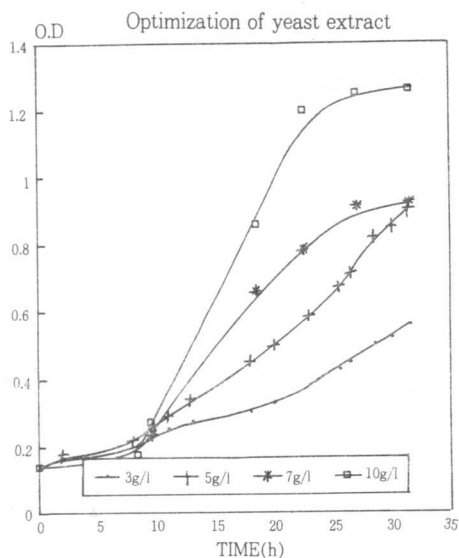


Fig. 6. (a) Effect of yeast extract on the growth of *P. fluorescens*. (Temperature=30°C).

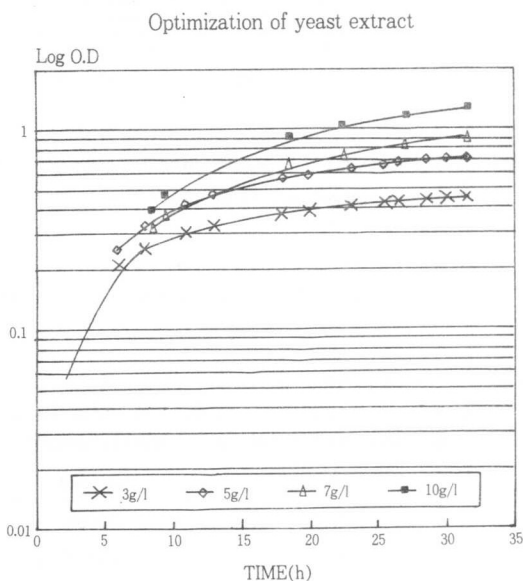


Fig. 6. (b) Log scale of Fig. 6(a).

Table 10. Effect of concentrations of yeast extract as the growth of *P. fluorescens* at 30°C

Concentrations of Y.E. (g/L)	Specific growth rate(μ) (h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)
3	0.089	0.011
5	0.164	0.018
7	0.289	0.021
10	0.523	0.029

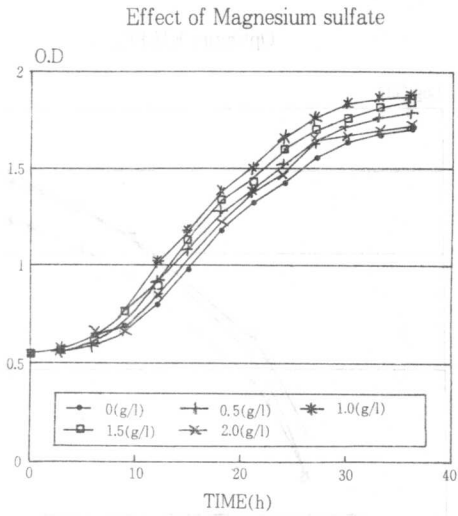


Fig. 7. Effect of $MgSO_4$ on the cell growth. (Temperature = $30^\circ C$)

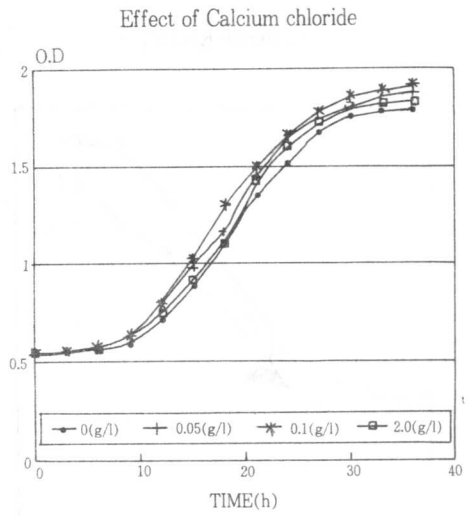


Fig. 8. Effect of $CaCl_2$ on the growth of *P.fluorescens*. (Temperature = $30^\circ C$)

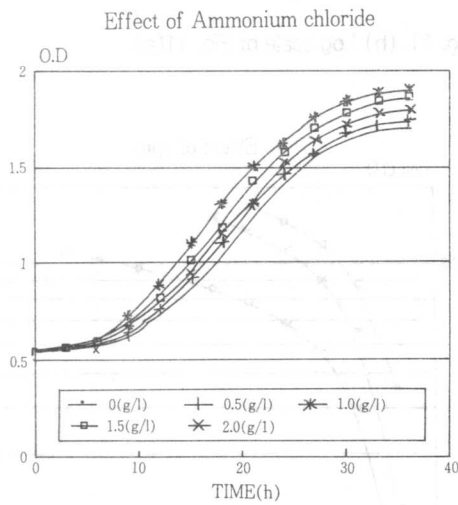


Fig. 9. Batch culture of *P.fluorescens* on the medium containing various NH_4Cl at $30^\circ C$.

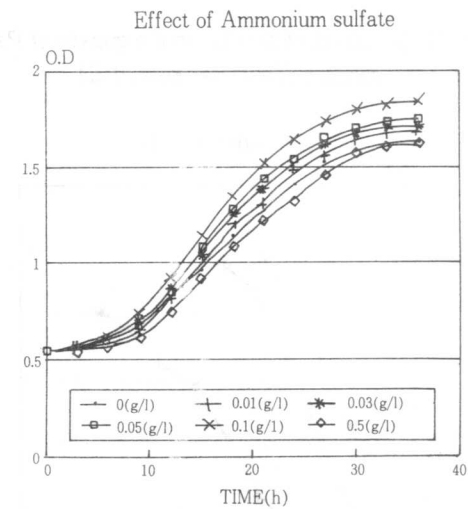


Fig. 10. Batch culture data obtained from the growth on medium containing various $(NH_4)_2SO_4$ at $30^\circ C$.

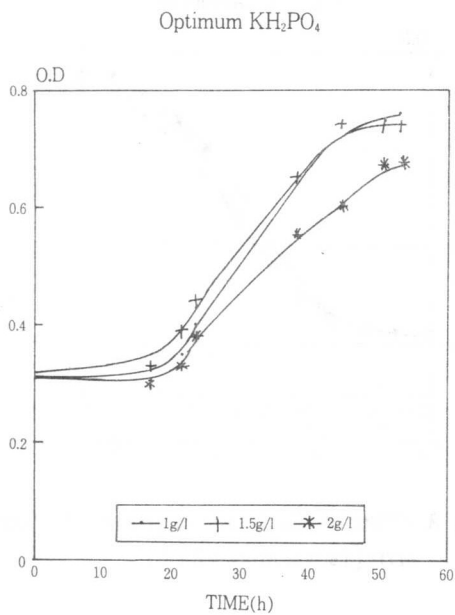


Fig. 11. (a) Effect of KH_2PO_4 on the growth of *P. fluorescens*. (Temperature = 30°C)

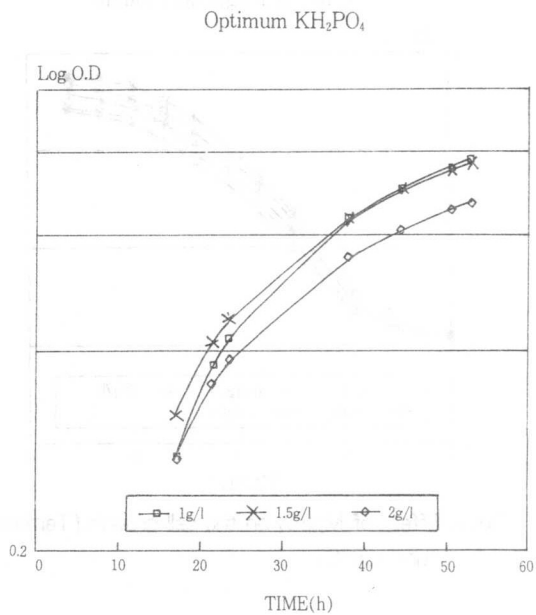


Fig. 11. (b) Log scale of Fig. 11(a).

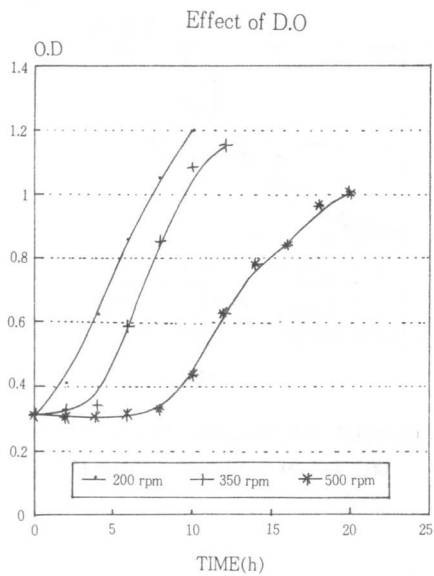


Fig. 12. (a) Batch growth of *P. fluorescens* at different oxygen concentrations which were manipulated by agitation speed. (Temperature = 30°C, pH 6.0)

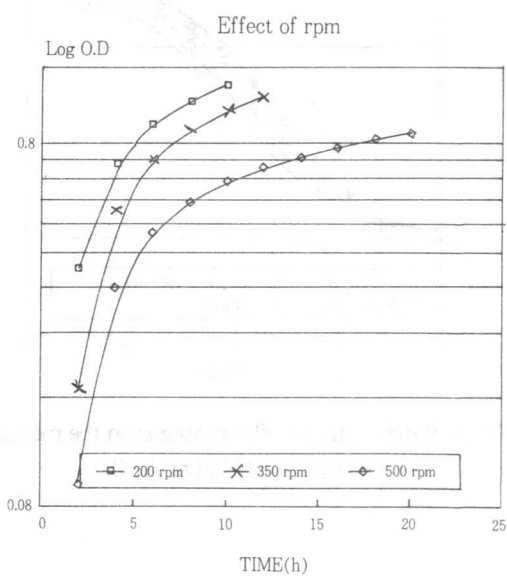


Fig. 12. (b) Log scale of Fig. 12(a).

Yeast extract의 영향에 대해서 많은 연구가 이루어졌으며, *Z.mobilis*의 배양인 경우 2.5g/L이하에서는 세포의 성장이 거의 이루어지지 않았다고 보고되었으며²⁹⁾, 경제성때문에 yeast extract를 calcium pantothenate, biotin, sulphur등으로 대체해서 defined media를 만들어 연속배양에 사용하기도 하였다^{30,31,32,33)}. Defined media에서 세포의 yield는 약 1/2로 감소하였으나, 대사능력, 즉 q_p , q_s (specific rates for production rate or substrate consumption rate)는 연속배양에서 감소되지 않았다고 보고되었다. 그러나 본 연구에서는 세포증식이 주요산물이며, 연속배양에서는 yeast extract 5g/L를 사용하였다.

이외에도 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$ 등이 미치는 영향을 조사하기 위해 Table 2의 기본배지에 glucose 30g/L, yeast extract 10g/L를 첨가하여 상기 화학물질 변화에 따른 실험을 하였다. 농도범위는 기초배지를 기준삼았다.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 sulphur source로서 사용하였으며 Fig. 7에서 보듯이 세포농도에 많은 영향을 미쳤으며 Table 11에 정리하였듯이 1.0 g/L이었을 때 가장 높은 kinetic parameter를 보였다. $CaCl_2$ 의 최적농도는 0.1g/L이었으며 0.2g/L에서는 오히려 세포 농도의 감소결과를 얻었다. Nitrogen source로서 이용한 NH_4Cl 에서는 1.0g/L일 때 가장 높은 세포농도와 kinetic parameter를 얻었으며(Fig. 9), 역시 nitrogen source로서 사용한 $(NH_4)_2SO_4$ 에서는 Fig. 10에 나타냈듯이, 0.1g/L에서 가장 좋은 높은 세포농도를 나타내었다.

KH_2PO_4 의 영향을 조사하였으며, 최적농도로서 1.0g/L를 결정하였다(Fig. 11, a, b 참조). 각각의 ingredient들의 농도의 따른 비증식 속도와 productivity를 Table 11에 정리하였다.

나. 산소요구량

위의 결과를 이용하여 회분배양시 최적 배지 조성을 얻었으며(Table 12), 최적배지를 이용하여 aeration이 *P. fluorescens* 배양에 미치는 영향에 대해서 조사하였다. D.O.값을 조절하기 위하여 agitation speed를 200, 350, 500 rpm으로 변화시켜서 실험하였다.

Table 11. Effect of various ingredients($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4) on the growth of *P.fluorescens* at 30°C

Ingredients (g/L)	Specific growth rate (μ) (h^{-1})	Productivity (g/l/h)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		
0	0.130	0.036
0.5	0.115	0.038
1.0	0.130	0.045
1.5	0.120	0.042
2.0	0.103	0.037
$CaCl_2$		
0	0.073	0.039
0.05	0.088	0.043
0.1	0.125	0.044
0.2	0.088	0.042
NH_4Cl		
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
$(NH_4)_2SO_4$		
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
KH_2PO_4		
1.0	0.051	0.011
1.5	0.046	0.011

pH는 6.0, 온도는 30°C에 맞추어서 CSTR(NBS fermentor)에서 배양하였다. Total working volume 2.0L인 반응기에 1.5L의 배지를 채워서 실험하였다. agitation speed를 증가시키면 D.O.값을 상승시키지만 세포의 성장에는 역효과를 나타내었다(Fig. 12, a,b). Agitation speed를 500rpm으로 상승시켰을 경우 세포성장의 lag phase가 약 8시간 지속되었으며 Table 13에서 보듯이 specific growth rate역시 낮은 수치를 나타내었다.

Agitation speed를 200rpm으로 감소시켰을 때 lag

Table 12. The composition of optimum for batch culture of *P.fluorescens*

Components	Concentration(g/L)
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
Glucose	30.0

phase가 아주 짧았으며, specific growth rate는 0.427 h⁻¹을 나타내었다. 높은 agitation speed에서의 세포 성장에 대한 저해는 shear force에 기인한 것으로 사료된다. 그러나 Onken²⁶⁾은 oxygen의 부분압이 240mbar에서 1150mbar로 증가할 때 비증식 속도가 급격히 감소하였다고 보고하였다. 이때 agitator를 사용하지 않고 air-lift fermentor를 이용하였다. 이는 *P.fluorescens*가 높은 O₂ 농도에서 성장저해를 받는다는 것을 의미한다. O₂ 부분압을 241mbar로 감소시켰을 때 정상적인 비증식속도를 나타내었다고 보고하였다.

Table 13. Specific growth rate(μ) of *P. fluorescens* in batch cultivation at different agitation speed(rpm)

RPM	Specific growth rate(μ)
(Final D.O.)	(h ⁻¹)
200(78)	0.427
350(90)	0.359
500(94)	0.216

4. 연속배양

플라스크 및 CSTR fermentor에서 얻은 최적조건(온도 30°C, pH 6.0, agitation speed=200 rpm)을 이용하여 연속배양을 실시하였다. 회석속도를 0.025에서 0.25 (h⁻¹)까지 변형시키면서 glucose 농도를 20g/L, 30g/L, 40g/L로 변화하면서 Table 12에 나타나 있는 배지

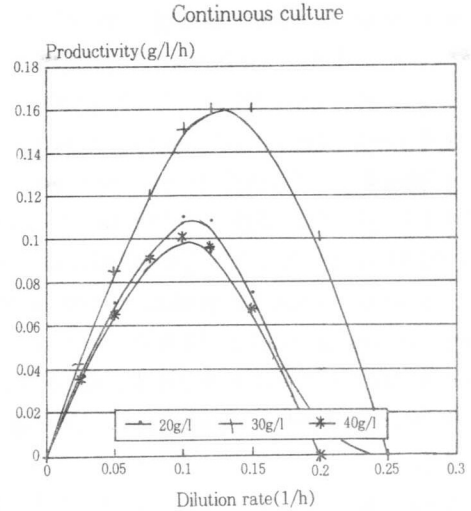


Fig. 13. Continuous culture of *P.fluorescens* on the medium containing various glucose and ingredients. Culture conditions were 30°C, pH 6.0

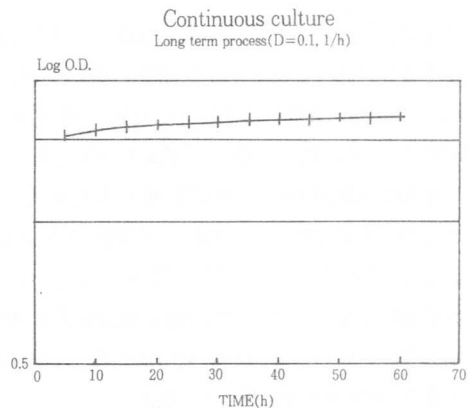


Fig. 14. Continuous culture of *P.fluorescens* on the defined medium containing 30g/L of glucose at dilution rate 0.1 h⁻¹. Culture conditions were 30°C, pH 6.0.

조성³⁴⁾에서 얻은 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 연속배양에서는 yeast extract 대신에 금속이온(FeSO₄·7H₂O, CuSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O)등을 추가로 첨가시켰다.

사용한 배지의 glucose 농도에 관계없이 회석속도 0.05 h⁻¹에서 최고의 균체농도를 얻었으며 이때 균체수율(Y_{x/s})은 각각 0.875, 1.063, 0.813이었다.

회석속도 0.1 h⁻¹에서 최대치의 productivity(회석속도 × 세포농도, DX)를 나타내었으며, 회분배양때 보다도

높은 세포농도를 얻었다. 이는 추가로 첨가한 금속이온들의 영향때문으로 사료된다.

Table 14의 30 g/L의 glucose 농도와 ingredients를

첨가한 배지를 이용하여 희석배율 0.1 h⁻¹을 고정하여 60시간 연속배양결과 steady state에서 1.19 g/L의 세포농도를 얻었다(Fig. 14).

Table 14. Relative concentration of individual elements in bacterial cells, common media for cultivation and calculated composition of basal medium

Element	Components	Medium(glucose)		
		20g/L	30g/L	40g/L
N	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.26	7.89	10.53
P	KH ₂ PO ₄	0.165	0.248	0.33
K	K ₂ HPO ₄	0.25	0.37	0.5
Na	NaHPO ₄ ·12H ₂ O	0.27	0.405	0.54
Mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.525	0.787	1.01
Fe	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.017	0.026	0.034
Mn	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.0025	0.012	0.05
Cl	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.125	0.188	0.259
Co	CoCl ₂	0.34	0.51	0.68
Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₄ ·4H ₂	0.007	0.011	0.014
B	H ₃ BO ₃	0.24	0.36	0.48
PO ₄	H ₃ PO ₄	0.12mg	0.18mg	0.24mg

5. 갈변병의 control

*P.fluorescens*를 갈변병이 유발된 버섯으로부터 분리하고 또한 Mauri Foods Dairy Laboratory(Moorebank Avenue, Moorebank, NSW 2170)로부터 분양받은 균주를 사용하였다. 이미 전술한 최적조건하에서 희분배양한 culture broth를 사용하였다. 30시간 배양했을때 높은 세포농도를 얻었으며 배양액의 pH는 배양시와 동일한 pH 6.0을 맞추었다. 원심분리를 하지 않고도 10g/L 활성이 좋은 세포를 얻었다. 이와 같이 얻은 배양액을 5배에서 100배까지 희석하여서 살균된 배지에 버섯균을 접종한 후 버섯균사가 형성될 시기부터 완전히 버섯 cap이 형성되었을 때까지 적당한 간격으로 3차례 50~100개의 시료에 분무기로 뿌렸다. Table 15에서 보듯이 10배의 희석농도까지는 갈변병 유발이 억제되었다. 이와 같은 결과는 3회반복실험으로부터 공통적으로 얻은 것이다.

또한 분양받은 *P.fluorescens* 역시 *P. tolaasii*에 대한

길항성을 보였다. *P.tolaasii*나 *P.fluorescens*를 1:10으로 희석하여 PAF 배지에 접종한 결과 *P.tolaasii*보다는 대부분 형광성을 띤 푸른색의 *P.fluorescens*만이 관찰되었다. 선명하게 볼 수 없으나 결과를 Fig. 15의 사진에 나타내었다.

Table 15. Control of mushroom blotch by culture of *P.fluorescens* selected from diseased mushrooms

Dilution	Disease Control
0	90%
5	90
10	90
15	30
20	30
100	—

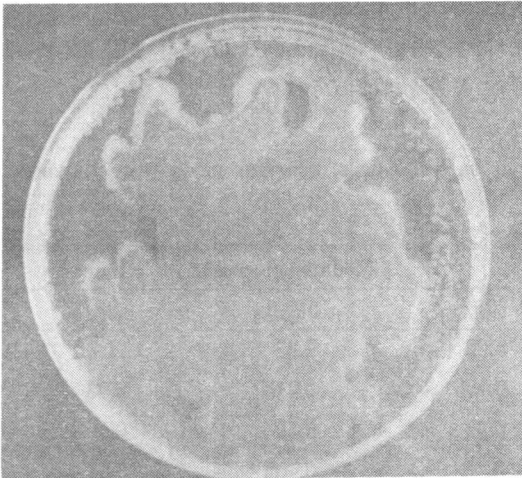


Fig. 15. Mixture of *P. fluorescens* and *P. tolaasii* grown on PAF medium at 25°C for 24h. The Growth *P. tolaasii* was seriously inhibited.

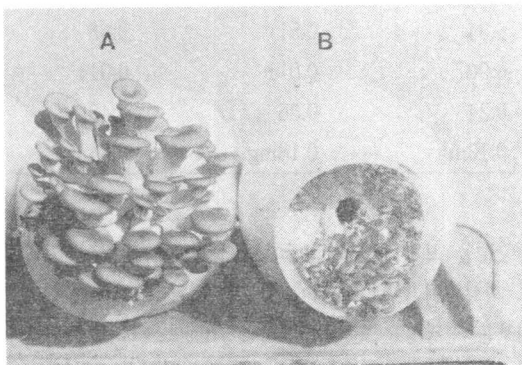


Fig. 16. Photographs of diseased mushroom caused by *P. tolaasii* and healthy mushrooms with an application of *P. fluorescens* culture.

6. 느타리버섯 (*Lactarius Hatsudake*)

Field study에 이용한 *P. fluorescens* 배양액을 수도물에 희석했을 때는 세포의 활성도가 급격히 감소하여서 거의 효과를 나타내지 못하였으며 이는 수도물에 함유되어 있는 크로린때문인 것으로 추측된다. 또한 일단 *P. tolaasii*에 감염되어 갈변병이 유발되기 시작했을 때는 거의 또는 전혀 갈변병을 control할 수 없었다. 갈변병 유발 버섯과 길항세균을 이용하여 얻은 건강한 버섯을 Fig.

16에 나타내었다.

P. fluorescens 배양액을 4~5°C에 보관실험을 행하였으며, 4주까지는 viability에 영향을 미치지 않았으나 6주 저장시는 viability에 영향을 미쳤다(Table 16 참조).

Table 16. Effect of storage time on a shelf-life

Storage time(week)	Viability
0	+++
1	+++
2	+++
3	+++
4	++
5	+
6	+

또한 배양액을 원심분리하여 얻은 세포를 freezing 시켜 보존실험을 행한 결과 3개월동안 viability의 손실은 10%내외였다. 따라서 아주 낮은 온도(-60°C)에서 보존성이 좋지만 freeze drying시켰을 때는 viability의 손실이 대단히 컸다. 이것은 rehydration시킬 때 세포내 물질이 유출되어서 세포의 활성이 저하되는 것으로 사료된다.³⁶⁾

실제로 길항세균을 버섯농장에 이용할 때 가장 중요한 것은 정확한 희석과 또한 저장온도, 시간이 중요한 것으로 나타났으며, 대량 배양시켜서 농가에 보급한다면 버섯 수확량의 증대를 꾀할 수 있다고 사료된다.

참고 문헌

1. Wong, W.C. and Preece, T. F.(1980) *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops: A note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. J. Appl. Bacterial. 49, 305-304.
2. Healey K.W. and Harvey, J.M.(1989) A biological control agent for the mushroom industry. Proceedings Eighth Aust. Biotechnol. Conference. p 322-324.
3. Tolaas, A.G.(1915) A bacterial disease of culti-

- vated mushrooms. *Phytopathology* 5, 51-54.
4. Paine, S.G.(1919) Studies in bacteriosis. II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Annals of Applied Biology* 5, 206-219.
 5. Yong, W.C. (1970) Drippy gill-a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* sp. *New Zealand J. Agriculture. Research.* 13, 977-990.
 6. Wong, W.C., Fletcher, J.T., Unsworth, B.A. and Preece, T.F.(1982). A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bacteriol.* 52, 43-48.
 7. Nair, N.G. and Fahy, D.C.(1972) Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bact.* 35, 439-442.
 8. Azad, H.R., Davis, J.R., Schnathorst, W.C., and Kado, C.I.(1985) Relationship between rhizoplane and rhizosphere bacteria and *Verticillium* wilt resistance in potato. *Arch. Microbial.* 140, 347-351.
 9. De Boer, S.H., Cuppels, D.A., and Kelman, A. (1978) Pectolytic *Erwina* spp. in the root zone of potato plants in relation to infection of daughter tubers. *Phytopathology.* 68, 1784-1790.
 10. Powelson, M.L. and Apple, J.D.(1984) Soil and seed tubers as sources of inoculum of *Erwina carotovora* pv. *carotovora* for stem soft rot of potatoes. *Photopathology.* 74, 429-432.
 11. Apple, J.D. and Powelson, M.L.(1983) Potato blackleg in progeny plantings from diseased and symptomless parent plants. *phytopathology.* 73, 806.
 12. Kloepper, J.W. and Schroth, M.N.(1981) Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology.* 71, 1020-1024.
 13. Kloepper, J.W., Schroth, M.N. and Miller, J.D. (1980) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology.* 70, 1078-1082.
 14. Loper, J.E., Suslow, T.V., and Schroth, M.N. (1984) Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology.* 74, 1454-1460.
 15. Colyer, P.D. and Mount, M.S.(1984) Bacteriozation of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. *Plant Dis.* 68, 703-706.
 16. Geels, F.P. and Schippers, B.(1983). Selection of antagonistic *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathology Z.* 108, 193-206.
 17. Geels, F.P. and Schippers, B.(1983). Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatment with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology Z.* 108, 207-214
 18. Howell, C.R. and Stipanovic, R.D.(1980) Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology.* 70, 712-715.
 19. Howie, W.J. and Echandi, E.(1983) Rhizobacteria: Influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Soil Biol. Biochem.* 15, 127-132.
 20. Scher, F.M. and Baker, R.(1982) Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology.* 72, 1567-1573.

21. Sneh, B., Dupler, M., Elad, y., and Baker, R. (1984) Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent of lytic bacteria from Fusarium-suppressive soil. *Phytopathology*. 74, 1115-1124.
22. Vransky, J., Vancura, V. and Stanek, M.(1981) Control of microorganisms in the rhizosphere of wheat by inoculation of seeds with *Pseudomonas putida* and by folia application of urea. *Folia microbiol.* 26, 45-51
23. Weller, D.M. and Cook, R.J.(1983) Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*. 73, 463-469.
24. Schroth, M.N. and Hancock, J.G.(1981) Selected topics in biological control. *Ann. Rev. Microbiol.* 35, 453-476.
25. Wong, W.C. and Preece, T.F.(1979) Identification of *Pseudomonas tolaasii*:the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting test. *J. Appl. Bacteriol.* 47, 401-407.
26. Onken, U.(1990). Batch and continuous cultivation of *Pseudomonas fluorescens* at increased pressure. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 983-989
27. Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C. (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* 29, 470-489.
28. Gandy, D.G.(1968) A technique for screening bacteria causing brown blotch of cultivated mushrooms. *Annual Report of the Glasshouse Crops Research Institute for 1967*, 150-154.
29. Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L. and Tribe, D.E.(1982) Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Engi.* 23, 37-84
30. Belaich, J.P., Belaich, A. and Simonpietri, P. (1972) Uncoupling in bacterial growth : effect of pautothenate starvation on growth of *Zymomonas mobilis*. *J. Gen. Microbiol.* 70, 179-185.
31. Fein, J.E., Charley, R.C., Hopkins K.A., Lavers, B. and Lawford, H.G.(1983) Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 5(1), 1-6
32. Nipkow, A., Beyeler, W. and Fiechter, A. (1984), An improved synthetic medium for continuous cultivation of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 237-240.
33. Galani, I., Drinas, C. and Typas, M.A.(1985) Growth requirements and the establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 7(9), 673-678.
34. Chang-Ho, K., Tai-Jin., K. and Suk-In, H. (1990). The medium optimization through continuous culture of an methanol utilizing bacterium for SCP production.
35. Rogers, D.J. amd Wuest, P.J.(1980). Mushroom brown blotch : Effect of chlorinated water on disease intensity and bacterial populations in casing soil and on pilei. *Phytopathology*, 70(9), 902-905
36. Chen, S.L. and Chiger, M.(1985). Production of Bakers' yeast ; in *Comprehensive Biotechnology*(ed.) Murray Moo-Young. Pergamon Press. pp 429-461