

버섯병원균에 대한 길항세균 *Bacillus* sp. SD-10이 생산하는 항균물질의 분리

이상원* · 류현순 · 갈상완 · 박기훈¹ · 김철호 · 최영주²

진주산업대학교 미생물공학과, ¹경상대학교 농업생명과학과, ²신라대학교 식품영양학과

Received February 25, 2004 / Accepted May 13, 2004

Isolation of Antimicrobial Substance by Produced *Bacillus* sp. SD-10 with Antagonistic Activity Towards Mushroom Pathogens. Sang Won Lee*, Hyun Soon Ryu, Sang Wan Gal, Ki Hoon Park¹, Chul Ho Kim, and Young Ju Choi². Dept. of microbiological engineering, Jinju national University, Jinju 660-758, Korea, ¹Dept. of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, ²Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea – *Bacillus* sp. SD-10 was investigated to develop biological pesticides for control of mushroom diseases. *Bacillus* sp. SD-10 showed high antifungal activity when cultured at 35~40°C for 30~40 hrs. The culture filtrate of the bacterium inhibited the growth of mycelium of *T. virens* which is a kind of mushroom pathogene. On the test of inhibition of spore germination of *T. virens*, more than 5% of the culture filtrate in the media inhibited completely the germination of the spores. An antimicrobial substance, UPX-1 was purified from the culture filtrate of the *Bacillus*. From the ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum analysis, the substance was indentified as disaccharide composed to six carbon sugars. UPX-1 has not only strong antifungal activity against *T. virens* but also antibacterial activity against *Pseudomonas tolaassi*.

Key words – antifungal activity, antibacterial activity, mushroom pathogene

버섯의 재배도 다른 농작물의 재배와 마찬가지로 여러 가지 병충해와 잡균으로 인하여 버섯 생산량의 감소뿐만 아니라 품질저하 등으로 인하여 농가소득을 크게 저하시켜 심한 경우는 폐농에 이르게 한다[2,12]. 이와 같은 병충해와 잡균으로 인한 버섯의 피해는 버섯의 생장, 발육, 운송 및 저장 등의 시기에 발생하고 있으며, 특히 버섯재배 시에 나타나는 병해는 발병의 원인에 따라 비 병원성 병해와 병원성병해로 크게 나눌 수 있다[5,10]. 비 병원성 병해는 비 생물적 병해 (abiotic diseases) 또는 비 전염성병해(non-infectious diseases)라 불리고 있으며 버섯재배의 부적절한 환경조건과 열악한 재배시설에 의해서 주로 발생하고 있다. 병원성병해는 유해생물의 기생에 의해서 발병하는 것으로 대개 전염성을 가지고 있기 때문에 병 발생면적 및 피해정도가 현저하게 다르게 나타나는 경우도 있다. 이와 같은 병원성병해를 전염성병해 (infectious diseases) 또는 생물적 병해(biotic diseases)로 부르고 있으며, 버섯에 병을 유발하는 병원체는 곰팡이, 방선균, 세균, 바이러스 및 선충 등으로 알려져 있다. 이 중에서 곰팡이 및 세균이 발병시키는 버섯의 질병은 세균성갈색무늬병과 푸른곰팡이병이 주축을 이루고 있으며, 세균성갈색무늬병은 버섯의 갓 부분을 갈색으로 변화시켜 버섯의 양적·질적인 저하를 초래하는 질병으로 주로 *Pseudomonas tolaassi*가 분비하는 tolaasin이라고 하는 toxin에 의해서 발병한다[3,4,5,7]. 그리고 푸른곰팡이병은 균상배지에서 병원균의 균사가 자란 다음 포자가 형성되어 푸른색을 띄는 것으로 주로 *Glio-*

cladium sp., *Trichoderma virens*, *T. harzianum* 및 *T. koningii* 등에 의해서 발병하고 있다[10]. 이러한 버섯의 질병은 배지의 수분과다 및 부족, 고온, 배지불량 등 버섯재배환경에 의해서 그 발병빈도가 증가하는 경향이 있지만, 버섯의 생물적 병해를 유발시키는 병원체들이 서식할 수 없는 버섯 생육배지를 개발한다면 버섯재배 산업의 발전에 크게 기여할 것으로 생각하였다. 그렇기 때문에 본 연구자들은 버섯의 푸른곰팡이병 및 세균성갈색무늬병을 유발하는 병원성 곰팡이와 세균의 생육을 억제하여 버섯의 안정적 생산을 위한 최적배지를 개발할 목적으로 전보[1]에서 버섯의 폐면배지로부터 CMCase 및 amylase 효소 분비력이 매우 우수하면서 *Pse. tolaassi* 및 *T. virens* 병원성 미생물에 대하여 강한 항균력을 가지고 있는 미생물을 순수분리·동정하여 *Bacillus* sp. SD-10으로 명명하고, 이 항균미생물의 액체배양액을 느타리버섯 재배현장에 직접 적용한 결과 세균성갈색무늬병 및 푸른곰팡이병의 발병을 효과적으로 억제하여 느타리버섯의 균사생장 및 자실체의 형성에 탁월한 효과를 나타내고 있다는 것을 보고하였다.

본 연구에서는 *Bacillus* sp. SD-10이 생산하는 항균물질이 갖는 *T. virens*의 균사 생육저해 농도 및 포자발아 억제농도 등을 검토하고 항균물질의 분리 및 동정을 행하여 천연물 버섯병해 방제약재 개발을 위한 기초연구를 행하였다.

재료 및 방법

공시균주

버섯에 푸른곰팡이병을 일으키는 병원성 곰팡이는 실험실

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3394, Fax : +82-55-755-2553

E-mail : swlee@jinju.ac.kr

에 보관 중인 *T. virens*를 사용하였으며, 길항세균은 본 연구자들이 발효된 버섯 폐면배지로부터 직접 순수분리·동정하여 보고한 *Bacillus* sp. SD-10을 사용하였다[1].

사용배지 및 배양

*T. virens*생육 및 보존을 위해서는 potato dextrose agar (PDA)배지를 사용하였으며, 포자발아 억제력 검토 시는 PDA 배지에 Triton X-100을 0.05% 첨가하여 30℃, 상대습도 80%의 growth chamber에서 배양하였다. *Bacillus* sp. SD-10은 carboxymethyl cellulose (CMC) 1%, NaCl 0.3%, KH₂PO₄ 0.2%, yeast extract 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, FeSO₄ · 7H₂O 0.002%, MnSO₄ · 7H₂O 0.001%, CaCl₂ · 2H₂O 0.04%의 구성 성분으로 조성된 배지를 사용하여 37℃에서 배양하였다.

항균활성

버섯 푸른곰팡이병균의 균사생장 억제력은 PDA평판배지 중앙에 cork borer No. 3 (직경 5 mm)을 이용하여 *T. virens*를 접종하고, 평판배지의 가장자리에는 같은 크기의 cork borer로 배지의 표면에 구멍을 내어 *Bacillus* sp. SD-10이 생산한 배양여액 혹은 정제물질을 0~50 µg까지 농도별로 접종한 다음 30℃에서 대치배양하면서 *T. virens*의 균사생장 억제 정도를 직접 관찰하기도하고, 또한 상대적 항균활성은 여러 가지 조건을 달리하여 검토한 항균활성 중에서 가장 높은 항균활성을 나타낸 조건의 콜로니 직경(mm)에 대한 각 조건에서 나타난 콜로니 직경 비를 백분율(%)로 나타내었다[9].

*T. virens*의 포자 발아력 검토는 *Bacillus* sp. SD-10의 배양액을 membrane filter로 여과 멸균한 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 70℃로 냉각한 PDA배지에 0, 1, 5, 10%씩 각각 첨가하여 잘 혼합한 후 평판배지를 제조하였다. 그리고 0.6% soft agar 7 mL에 *T. virens*의 포자를 1.25 × 10⁶ spore/mL가 되도록 혼합하여 미리 준비해둔 PDA평판배지 상에 증충한 다음 30℃에서 배양하면서 *T. virens*의 포자 발아정도를 관찰하였다. 대조구는 대장균의 배양액을 동일방법으로 처리하여 비교하였다.

항균물질 분리 및 동정

Bacillus sp. SD-10의 배양액 15 L을 70℃에서 감압농축시켜 진한 갈색 혼합물 8.3 g을 얻은 다음, 100 mL의 메탄올을 첨가하여 용해하는 물질만을 회수(3회 반복 실시)하였다. 회수한 물질을 모두 혼합하여 45℃에서 다시 감압농축시켜 메탄올 분획물 3.2 g을 얻은 후, 이 분획물을 230~400 mesh의 실리카겔을 충전시킨 칼럼(3×30 cm)에 로딩하여 클로로포름/메탄올을 조건으로 메탄올의 비율을 순차적으로 높여(0~100%)가며 칼럼크로마토그래피를 행하였다. 용리액은 150 mL씩 분획 회수(Fr. 1~25)하여 모든 분획물에 대하여 항균 활성을 검토한 다음, 항균활성이 관찰된 Fr. 12~16을 회수하

여 감압농축시켜 항균혼합물 180 mg을 얻었다. 항균혼합물 180 mg을 클로로포름/메탄올의 1 : 1 조건에서 실리카겔 칼럼크로마토그래피를 실시하여 흰색분말 112 mg을 얻어 UPX-1이라 명명하고, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 통하여 항균물질의 구조분석을 행하였다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼은 Bruker AW500 (500 MHz) 분광기를 사용하였으며 내부 기준물질로 TMS (tetramethylsilane)을 사용하였다.

결과 및 고찰

배양온도의 영향

전보[I]에서 분리 동정하여 보고한 *Bacillus* sp. SD-10균주의 생육 및 항균물질의 생산에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 15℃에서 55℃의 범위로 변화시키면서 24시간 180 rpm으로 진탕 배양한 결과 Fig. 1에서 보는바와 같이 배양온도에 따른 미생물의 생육과 상대적인 항균활성은 유사한 유형을 나타내었다. 미생물의 생육은 25℃이하와 50℃이상의 온도에서 현저하게 떨어졌으나 30℃에서 40℃의 범위에서는 왕성하게 생육하여 35℃에서 4.5의 U.O.D. 값을 나타내었다. 그리고 각 배양온도에서 배양한 *Bacillus* sp. SD-10균주의 배양액이 나타내는 *T. virens*의 생육에 대한 항균활성을 조사하였던 바 20℃에서는 60%의 낮은 항균활성을 나타내었으나, 25℃에서는 86%, 30℃~45℃에서는 95% 이상의 항균활성을 나타내었으며, 50℃ 이상에서는 항균활성이 급격하게 떨어졌다. 이상의 결과로 *Bacillus* sp. SD-10균주의 배양온도는 균의 생육정도 및 항균물질의 생성에 큰 영향을 미치는 것으로 판단되어 이하의 실험에서는 배양온도를 35℃~40℃로 조정하여 수행하였다. 식품산업에 응용할 목적으로 류가[8] 분리한 *Bacillus* sp. HS-25균주의 생육은 25℃~40℃에서 왕성하였지만 항균물질 생산은 20℃~45℃에서 왕성하였다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

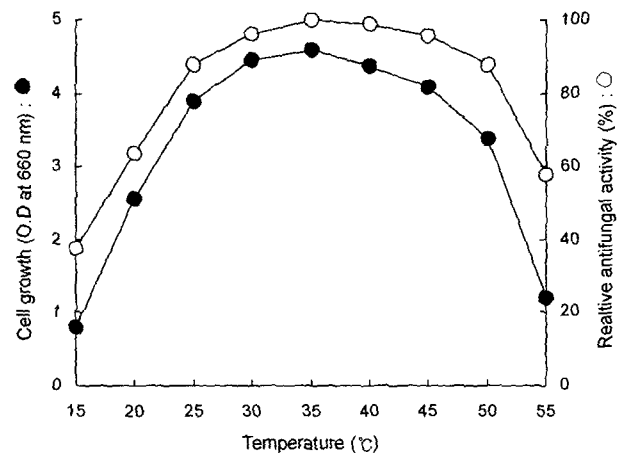


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Bacillus* sp. SD-10 and production of the antagonistic substance.

배양시간의 영향

미생물의 배양시간이 *Bacillus* sp. SD-10의 생육 및 항균물질 생산량에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 2에 나타내었다. *Bacillus* sp. SD-10은 배양 5 hr까지 유도기로 나타났으며, 그 이후부터 급격한 균체의 증식이 이루어져 배양 20 hr을 전후하여 정상기에 도달하여 25 hr째부터 균체 수가 천천히 감소하기 시작하였다. 항균활성은 배양10 hr째에 약 15%를 나타내었으나 그 이후부터 급격하게 항균활성이 증가하여 15 hr, 20 hr 및 25 hr째에 각각 40%, 65% 및 90% 정도의 활성을 나타내었으며 배양 30 hr~40 hr째에 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 류가[12] 분리 동정하여 보고한 *Bacillus* sp. HS- 25의 경우는 배양 18 hr째에 정상기에 도달하였으나 항균활성은 배양 12 hr~48 hr째에 가장 높게 나타난 것으로 보고하였다.

***T. virens*의 생육 저해농도**

버섯의 생육에 전혀 영향을 미치지 않으면서 버섯의 세균성갈색무늬병균 및 푸른곰팡이병균의 생육을 억제하는 것으로 나타난[1] *Bacillus* sp. SD-10을 37°C에서 36 hr 배양한 배양액의 농도가 *T. virens*의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 3에 나타내었다. 대조구(A)는 *E. coli*의 배양액을 0.2 µl의 membrane filter로 여과하여 disc paper (직경 8 mm)에 50 µl 흡착시켜 사용하였는데 *T. virens*의 생육에는 전혀 영향을 미치지 못하였다. 그러나 *Bacillus* sp. SD-10의 배양액을 *E. coli*의 배양액과 동일하게 처리한 후 10, 30 및 50 µl씩 농도별로 각각 처리한 B, C, D에서는 처리 농도가 높을 수록 *T. virens*의 생육이 현저하게 억제되었다. 10 µl를 접종한 B시험구에서는 약간의 저해를 나타내었지만 30 µl를 접종한 C시험구와 50 µl를 접종한 D시험구에서는 뚜렷하게 버섯의 *T. virens*의 생육을 저해하였다.

***T. virens*의 포자발아 억제력 검토**

Bacillus sp. SD-10의 배양액이 *T. virens*의 포자 발아에 미

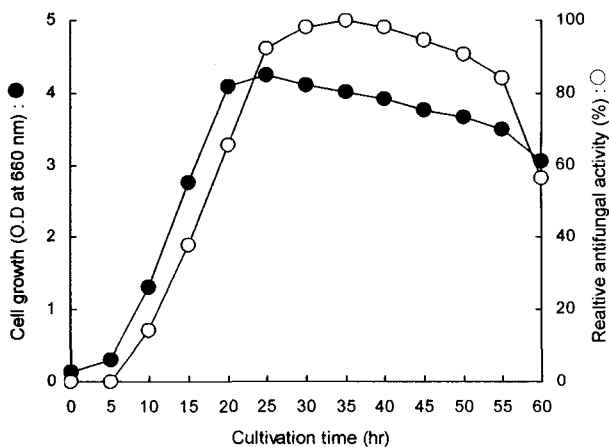


Fig. 2. Effect of cultivation time on growth of *Bacillus* sp. SD-10 and activity of the antagonistic substance.

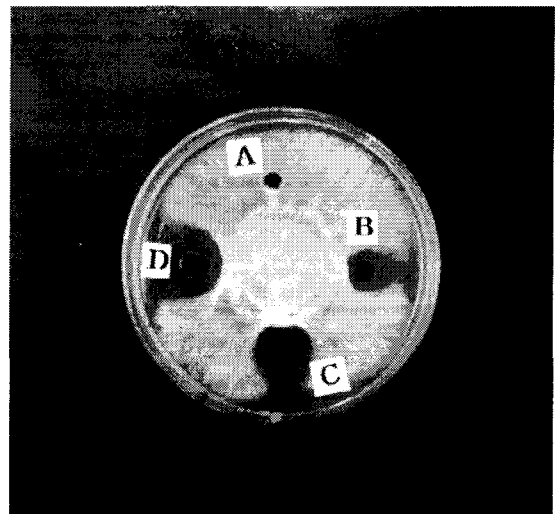


Fig. 3. Growth inhibition of mushroom pathogene, *T. virens* by culture filtrate of *Bacillus* sp. SD-10. A; Control, B; 10 µl, of culture filtrate, C; 30 µl, D; 50 µl.

치는 영향을 검토하여 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4의 1번 줄은 *Bacillus* sp. SD-10의 배양액을 0.2 µl membrane filter로 여과한 후, 그 여과액을 미리 멸균하여 준비해둔 평판배지 성분 0, 1, 5, 10%씩 농도별로 첨가하여 잘 혼합하고 petri dish에 분주한 다음, *T. virens*의 포자현탁액을 100 µl씩 도말하여 30°C의 항온기에서 배양하면서 곰팡이 포자의 발아 억제력을 관찰한 결과이다. Fig. 4의 2번 줄은 대조구로서 *E. coli*의 배양액을 동일하게 처리하여 사용하였다. 대조구로 사용한 Fig. 4의 2-A, B, C, D에서는 *T. virens* 포자의 발아가 모든 시험구에서 왕성하여 *E. coli*의 배양액은 *T. virens* 포자의 발아에 아무런 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 그러나 *Bacillus* sp. SD-10 배양액을 첨가하지 않은 Fig. 4의 1-A 시험구에 비하여 1% 첨가한 B시험구는 약간의 저해가 일어난 반면에 5% 및 10%를 첨가한 C 및 D 시험구에서는 *T. virens* 곰팡이의 포자가 전혀 발아하지 못함을 관찰할 수 있었다.

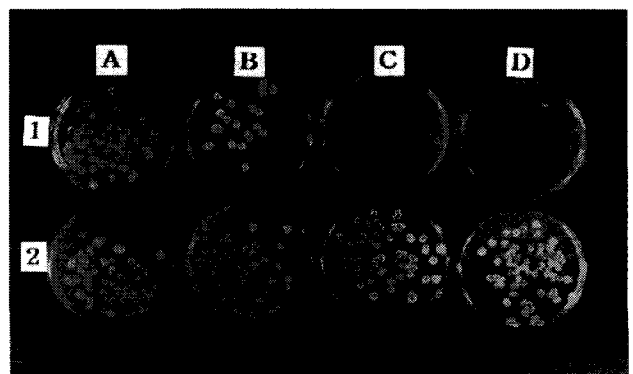


Fig. 4. Inhibition of spore germination of *T. virens* by culture filtrate of *Bacillus* sp. SD-10(1) and *E. coli* JM-109(2). A; 0% of culture filtrate, B; 1%, C; 5%, D; 10%.

이상의 결과로 본 연구자들이 분리·동정한 *Bacillus* sp. SD-10의 항균 미생물은 버섯 병원성 곰팡이의 균사 생장은 물론 포자의 발아까지도 억제하는 것으로 나타났다.

항균물질 분리 및 동정

Bacillus sp. SD-10이 생산하는 항균물질을 LC를 이용하여 분리한 다음 ¹H-, ¹³C-NMR을 통하여 구조를 분석·동정한 결과를 Fig. 5~Fig. 7에 나타내었다. 분리된 활성화합물에서 22개의 탄소피크가 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 관찰되었는데(Fig. 5) 이것은 anomeric-탄소가 1개 존재하는 2탄당에서 관찰되는 전형적인 피크이었다. 또한 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 관찰된 101.9 ppm의 피크는 알데히드성 탄소에서 기인된 것으로 생각되며, 97.2 ppm, 92.9 ppm의 피크는 anomeric-탄소가 1

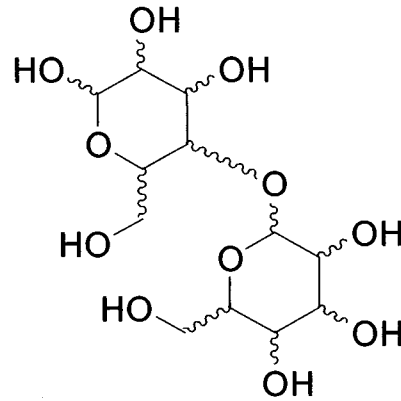


Fig. 7. Structure of the purified substance, UPX-1.

개 있음을 나타내는 것으로 생각되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 관찰된 5.16 ppm, 5.10 ppm, 4.78 ppm의 피크 역시 anomeric-탄소와 알데히드성 탄소가 각각 1개씩 있음을 나타내었다(Fig. 6). 이상의 분광학적인 자료를 종합하면 탄소 6개를 가지는 당 2개가 2탄당 구조로 존재하는 화합물인 것으로 생각되었다(Fig. 7).

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): d = 3.27(m), 3.30(m), 3.42(m), 3.51(m), 3.60(m), 3.82(m), 4.48(d, J=7.8), 5.10(m), 5.15(m)

¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD): d = 61.2, 61.4, 61.76, 61.8, 70.5, 70.6, 70.7, 72.5, 73.2, 73.3, 73.7, 73.76, 74.1, 74.14, 74.9, 75.7, 76.9, 80.4, 80.9, 92.9, 97.2, 101.9

UPX-1의 항균활성

Bacillus sp. SD-10의 배양액으로부터 UPX-1항균물질을 순수 분리하여 푸른곰팡이병원균 및 세균성 갈색무늬병원균의 원인 미생물에 대한 항균력을 검토하여 Fig. 8 및 Fig. 9에 나타

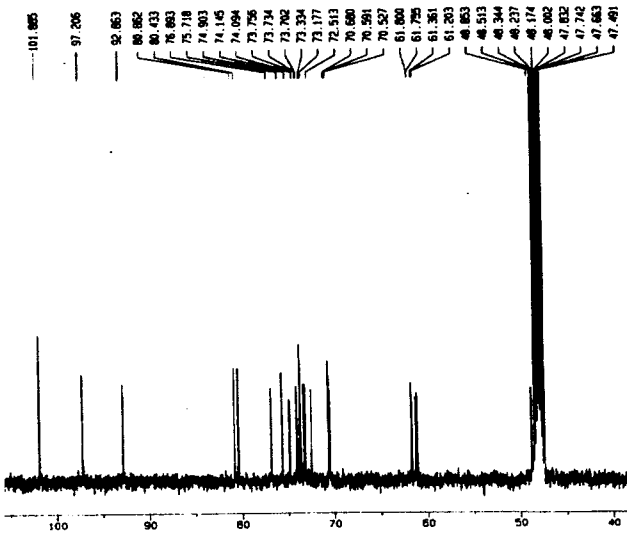


Fig. 5. ¹³C-NMR spectrum of the antimicrobial substance isolated from *Bacillus* sp. SD-10.

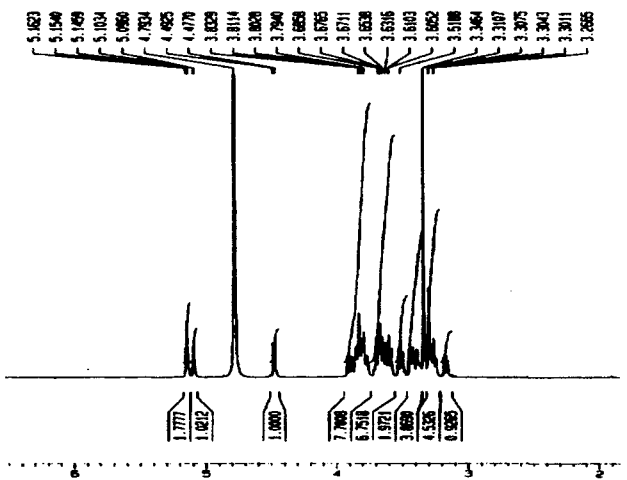


Fig. 6. ¹H-NMR spectrum of the antimicrobial substance isolated from *Bacillus* sp. SD-10.

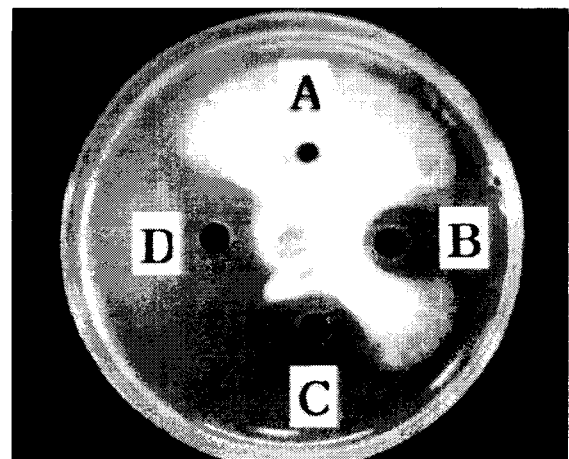


Fig. 8. Growth inhibition of mushroom pathogen, *T. vires* by the purified substance, UPX-1. A; 0 µl of UPX-1, B; 5 µl, C; 10 µl, D; 50 µl.

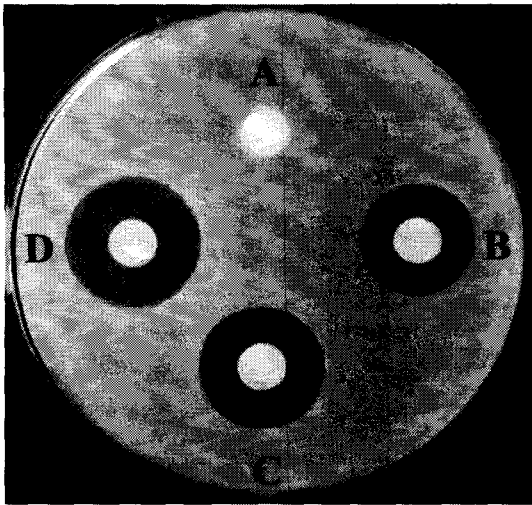


Fig. 9. Growth inhibition of mushroom pathogen, *Pse. tolaassi* by the purified substance, UPX-1.
A; 0 μ l of UPX-1, B; 10 μ l, C; 20 μ l, D; 30 μ l.

내었다. Fig. 8은 순수 분리한 UPX-1 항균물질을 *T. virens*에 처리한 결과인데 5 μ l을 처리한 B시험구에서는 약간의 저해가 일어났으나, 10 μ l 및 50 μ l 첨가한 C 및 D시험구에서는 *T. virens*의 생육이 완전히 억제되었다. Fig. 9는 UPX-1 항균물질을 *Pse. tolaassi*에 처리한 결과인데 대조구에서는 전혀 활성을 나타내지 않은 반면에 UPX-1물질을 10 μ l, 20 μ l 및 30 μ l을 처리한 B, C 및 D 시험구에서는 아주 뚜렷한 clear zone을 나타내었다. 이상의 결과로 UPX-1 물질은 버섯의 재배에 있어서 빈번하게 발생하는 푸른곰팡이병 및 세균성 갈색무늬병을 유발하는 원인 미생물인 *T. virens*와 *Pse. tolaassi*에 탁월한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었고, 천연물 버섯병해 방제약재로서 개발할 가치가 있는 것으로 판단되었다.

요 약

Bacillus sp. SD-10이 생산하는 항균물질을 이용하여 버섯의 갈색무늬병균 및 푸른곰팡이병균에 대한 천연물 버섯병해 방제약재 개발을 위한 기초적 연구를 행하였다. *Bacillus* sp. SD-10은 35~40°C의 배양온도에서 30~40 hrs 배양하였을 때 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 이 배양액을 이용하여 *T. virens*의 균사 생육저해 및 포자발아 억제 농도를 검토한 결과, 균사생육은 30 μ l 이상 처리 시 뚜렷하게 저해되었으며 포자발아는 평판배지에 5%(v/v) 이상 첨가 시 완전하게 억제되었다. *Bacillus* sp. SD-10의 배양액으로부터 항균물질을 순수분리하여 UPX-1으로 명명하고, UPX-1을 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼으로 구조를 동정한 결과 탄소 6개로 구성된 당 2개가 2당류 구조로 결합되어 있는 화합물임이 밝혀졌다. UPX-1은 *T. virens* 뿐 아니라 *Pse. tolaassi*에도 아주 강한 항균효과를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2000년 우수산업대학 연구개발사업 및 2000년 현장으로 기술개발사업의 지원에 의해서 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Gal, S. W. and S. W. Lee. 2002. Development of optimal culture media for the stable production of mushroom. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 71-76.
- Healey K. W. and J. M. Harvey. 1989. A biological control agent for the mushroom industry. Proceedings Eighth Aust. Biotechnol. Conference 322-324.
- Kim, J. W., K. H. Kim and H. J. Kang. 1994. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushrooms in Korea. 1. On the causal organisms of the rots of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean J. Plant Pathol.* **10**, 197-210.
- Kim, J. W., S. I. Kwon and H. J. Kang 1995. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushrooms in Korea. 2. Bacteriological characteristics of *P. tolaasi* causing mushroom brown blotch and white line reacting organisms. *Korean J. Plant Pathol.* **11**, 353-360.
- Lee, J. G. 1999. Mushroom diseases and protection strategies. *Mushroom* **3**, 31-41.
- Nutkins, C. J., J. R. Mortishire-Smith, C. L. Packman, L. C. Brodey and B. P. Rainey. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* paine. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2621-2627.
- Paine, S. G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushroom. *Ann. Appl. Biol.* **5**, 206-219.
- Ryu, H. S. 2004. Production and characteristics of bacteriocin of *Bacillus* sp. HS-25 isolated from traditional Doenjang and properties of its product. *Jinju National University*, M. S. Thesis.
- Schiewe, A. and K. Mendgen. 1992. Identification of antagonists for biological control of the post harvest pathogens *Pezizula malicorticis* and *Nectria galligena* on apple. *J. Phytopathol.* **134**, 229-237.
- Seo, G. S. 2001. Mushroom pathogen and its protection. *Mushroom* **5**, 17-38.
- Tolaas, A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* **5**, 51-54.
- Wells, J. M., G. M. Sapers, W. F. Felt, J. E. Butterfield, B. Jones, H. Bouzar and F. C. Miller. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. *Phytopathology* **86**, 1098-1104.