

표고버섯(*Lentinus edodes*) 균과 *Trichoderma* spp.의 상호작용

김영주¹⁾ · 채정기^{1)*}

¹⁾ 전남대학교 임학과

Interaction between *Lentinus edodes* and *Trichoderma* spp.

Young-ju Kim¹⁾ and Jyung-Ki Chai^{1)*}

¹⁾Department of Forestry Graduate School Chomman National University

ABSTRACT : Mutual growth limitation was observation when the two antagonistic fungi was come in contact with each other. Brown line was formed 2day after contact with *Trichoderma* spp., and then, green spores formed overnight. The laccase activity of *L. edodes* was stimulated when this fungus was co-incubated with *Trichoderma* spp. for a few days in liquid media. In sawdust-rice bran mixtures, outstanding brown line developed when the two antagonistic fungi co-cultured. The pH of the substrates changed from 5.5 to 4.5 after overgrowth, suggesting a difference in the degradation ability and the preference of the two fungi for the lignocellulose material.

KEYWORDS : Mutual growth limitation, Brown line, Co-incubated, Lignocellulose material

표고버섯(*Lentinus edodes*)은 담자균강 주름버섯목 느타리과 잣버섯속에 속하는 식용버섯으로 우리나라에서는 표고(瓢蕈), 중국에서는 향고(香苦), 일본에서는 shiitake, 서구에서는 oak mushroom이라 불리우고 있다. 표고버섯은 봄에서 가을에 걸쳐 주로 참나무류, 자작나무류, 오리나무류 등 활엽수의 나무토막, 그루터기 위에 단생 또는 군생하는 목재부후균으로서 한국, 중국, 일본, 동남아시아, 뉴질랜드 등지에 분포되어 있으며 현재는 캐나다와 미국 등지에서 인공 재배를 하고 있다. 이 표고버섯균은 백색부후균(white rot decay fungi)으로 참나무류(*Quercus* spp.)의 원목이나 살균된 톱밥 등의 lignocellulose 기질에서 주로 재배되고 있다. (Rosyse et al., 1985; Delpech & Olivier, 1991; Levanon et al., 2000). 이러한 lignocellulose 기질에는 다량의 리그닌과 페놀성 화합물이 많이 함유되어 있어서 표고버섯균의 polyphenol oxidases (E.C. 1.10.3.2) 효소체계는 다양한 종류의 lignocellulose 기질에 재배가 적합한 표고버섯 균주의 선발 등에 중요한 요소가 된다 (Mata et al., 1998). 표고버섯을 재배하는 기질이 무엇이든지 간에 재배에 있어서 가장 문제시되는 것 중의 하나는 외부 감염균에 의한 피해이다 (Badham, 1991). 특히, 표고버섯 톱밥종균 및 톱밥배지에서 주로 나타나는 외부 감염균으로는 *Trichoderma* spp.을 들 수 있다(Tokimoto & Komatsu, 1979). *Trichoderma* spp.의 완전세대는 Ascomycetes의 *Hypocrea* (Samuels GJ, 1996)로서 *Trichoderma* spp.는 유기물이 함유된 기질에서는 어느 곳에서나 발생하는 매우 광범위하게 분포하는 균이다.

이러한 *Trichoderma* spp.와 표고버섯균과의 상호 경쟁 작용에는 다양한 기작이 있다 (Savoie et al., 2000). 외부 감염균인 *Trichoderma* spp.가 갖는 기작은 크게 2가지로 나눌 수 있는데 첫 번째 그룹은 기질의 점유를 통한 영양원의 경쟁이며 두 번째 기작은 길항물질과 체외효소를 분비하여 경쟁균의 생육을 억제하는 화학적인 방해(chemical interference) 기작이다. *Trichoderma* spp.의 주요한 특징은 빠른 성장율, 높은 번식률과 가용성 당류를 쉽게 흡수할 수 있는 다양한 다당류분해효소 등을 들 수 있다. 이러한 특징때문에 미강과 같은 가용성 영양원이 첨가된 버섯 재배용 기질에서는 *Trichoderma* spp.는 *L. edodes*보다 초기 활착에 있어 매우 유리한 위치에 있게 된다. 표고버섯균은 미강이 첨가된 목재기질에서 *Trichoderma* spp.보다 상대적으로 느리게 성장하지만 phenoloxidases와 다양한 가수분해(hydrolases)를 갖고 있기 때문에 목재의 세포벽 성분을 효과적으로 분해하는 능력이 있다. 이러한 효소체계는 표고버섯균으로 하여금 목재기질에서 탁월한 경쟁력을 갖게 한다. 표고버섯균은 목재기질에서의 초기 성장시 활착속도는 느리지만 매우 높은 밀도의 영양균사를 형성하면서 꾸준한 생장이 가능하게 한다.

표고버섯균에 대한 *Trichoderma* spp.의 길항작용균은 세포벽분해효소와 중성 에테르추출물인 항균성 물질에 의한 것으로 알려져 있다(Ishikawa et al., 1980; Tokimoto, 1982). 하지만, 적절한 환경조건(온도, 영양원 등)만 주어진다면 표고버섯균은 *Trichoderma* spp.에 길항작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Ishikawa et al. 1980;

Kawamura et al. 1980; Tokimoto 1982; Badham 1991). 목재나 밀짚과 같은 lignocellulose 기질에서 재배되는 표고버섯균이 *Trichoderma* spp.의 침입을 받았을 때 두 균의 접촉부위에서 표고버섯균에 의해 갈색의 색소가 형성되고 laccase 등의 polyphenol oxidase의 활성이 높아지는 것은 익히 알려져 있다(Tokimoto 1980, 1982; Savoie and Mata, 1999).

다양한 균류에 의해 분비되는 laccase는 페놀성 화합물을 산화시켜 탈메틸화 시키거나 중합(polymerization) 및 탈중합(depolymerization)시킨다.(Coll et al., 1993). Laccase(E.C. 1.10.3.2;p-diphenol: oxygen oxidoreductase)는 주로 목재부후균에게서 쉽게 관찰할 수 있는데(Mayer, 1987; Tuor, 1995), 이 효소는 구리를 함유한 산화환원효소로서 페놀류나 polyphenols 화합물의 hydroxyl기에서 하나의 전자를 제거시키므로서 aryloxyradicals를 형성하게 되고 결국 중합된다(Brown, 1967). 이 laccase는 균류의 다양한 생리적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Devries et al.(1986)는 laccase가 리그닌분해, 착색의 형성 및 축적 그리고 포자형성에 작용한다고 하였다. 이 외에 laccase는 리그닌과 리그닌 구조체의 해독작용(Dean & Eriksson, 1994), plant pathogenesis(Thurston, 1994) 그리고 균사체의 형태변화(Rayner et al., 1994)등에 작용하는 것으로 알려져 있다.

따라서 *Trichoderma* spp.의 침입을 받았을 때 *L. edodes*에 의해 나타나는 현상 중의 하나는 갈색 띠의 형성이다. 하지만, 어떤 경우에는 이러한 갈변현상이 전혀 혹은 거의 나타나지 않거나 상대적으로 늦게 발현되기도 한다. 또한, 배양 현상에서는 *Trichoderma* spp.의 종류에 의해 오염이 된 톱밥배지에서 갈색 띠가 형성되지 않은 채 *L. edodes* 따라 그리고 두 길항균이 처한 사항에 따라 *L. edodes*의 laccase 유도정도 및 갈변 현상의 형성 및 변화 정도가 다른 것으로 나타났다.

본 연구는 *L. edodes*와 *Trichoderma* spp.의 균사가 서로 접한 부위에서 발생하는 두 균의 상호작용에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 연구에 사용된 표고버섯 균주는 국내의 버섯 생산에 이용되고 있는 톱밥재배용 균주인 산림5호로서 전남대학교 산림자원미생물학실험실에서 계대·증식배양되었다. 균의 증식용 배지는 YMEA(2% malt extract, 0.2% yeast extract, 1.5% agar) 배지를 이용하였다.

길항작용을 연구한 *Trichoderma* spp.는 종균제조과정과 병버섯 재배과정에서 발생하는 *Trichoderma* spp.를 수집하여 형태 및 생리적 특성이 다른 5개의 균주를 선발하였다.

배지 종류와 조성

YME배지(2% malt extract, 0.2% yeast extract)를 조제한 후 삼각플라스크(100ml)에 배지 50ml씩 분주하고 면전 한 후 121 °C의 고압살균기에서 20분간 멸균하였다. YMEA배지에서 기 배양된 공시균주 접종원을 3mm으로 떼어내어 접종한 후 25±1 °C로 조정된 항온기에서 암배양하였다.

YMEA(2% malt extract, 0.2% yeast extract, 1.5% agar)배지를 기본배지로 선정하여 YMEA배지를 조제한 후 121 °C의 고압살균기에서 20분 정도 살균한 후 Petri-dish(직경 87 15mm)에 10~15ml정도 분주하였다. 배지가 분주된 Petri-dish에 공시버섯균주의 균총의 직경을 3mm 정도(Cork borer No.1)로 떼어 접종하였고, 25±1 °C로 조절된 항온기에서 암배양하였다.

참나무류 톱밥과 미강을 10:2(w/w)로 혼합한 후 수분을 65%로 조절하여 시료를 조제하였다. 이렇게 조제된 시료를 시험관(D24mm×L120mm)에 24g(wet weight)씩 충전하여 일정하게(B.D., 0.21) 다진후 면전을 하고 121 °C의 고압살균기에서 30분간 살균하였다. 살균이 끝난 배지는 냉각(15 °C) 후 오른쪽에는 기 배양된 표고버섯균을 접종하였다. 표고버섯균이 3, 6, 9cm 성장한 후 왼쪽에 *Trichoderma* spp.를 접종하였다.

실험방법과 분석

표고버섯균이 분비하는 laccase의 활성도를 측정하기 위해 삼각플라스크(100ml)에 50ml의 YME배지를 분주하고 121 °C 고압살균기에서 20분간 멸균하였다. YMEA배지에서 기 배양된 표고버섯 접종원을 3mm으로 떼어내어 접종한 후 25±1 °C로 조정된 항온기에서 36일간 암배양 되었다. 정치배양한 표고버섯 균이 분비하는 laccase의 활성도는 일정 기간 배양된 표고버섯 균을 syringe filter (0.2µm)를 이용하여 cell-free culture (1ml)를 사용하였다. cell-free culture 1ml와 ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthazolinesulphonate) 3mg을 1.5ml 0.1M acetate buffer)를 혼합(vortexing)한 후 30에서 30분간 배양하여 산화된 ABTS의 양을 자외선분광분석기를 이용하여 436nm에서 colorimetric unit (CU)로 나타냈다. 표고버섯균에 wood chip을 첨가하였을 때 표고버섯균이 분비하는 laccase의 활성도를 측정하기 위해 표고버섯균을 YME배지에서 25±1 °C로 조정된 항온기에서 10일간 암배양을 시킨 후 wood chip을 1g 첨가하여 3일간 배양한 후 syringe filter (0.2µm)를 이용하여 cell-free culture (1ml)를 채취하여 laccase의 활성도를 측정하였다.

표고버섯균에 *Trichoderma* spp.을 첨가하였을 때 표고버섯균이 분비하는 laccase의 활성도를 측정하기 위해 표고버섯균을 YMEA배지에서 25±1 °C로 조정된 항온기에서 10일간 암배양을 시킨 후 기 배양된 *Trichoderma* spp. 균의 접종원을 3mm으로 떼어내어 성장된 표고버섯균의

균사 위에 접종하여 3일간 배양한 후 syringe filter (0.2 μ m)를 이용하여 cell-free culture (1ml)를 채취하여 laccase의 활성도를 측정하였다.

표고버섯균의 균체량을 측정하기 위해 YME배지에서 25 \pm 1 $^{\circ}$ C로 조절된 항온기에서 일정기간 정치배양한 후 여과(Whatman No. 2)하고 105 $^{\circ}$ C로 24시간 건조하여 균사체의 무게를 구하였다.

단백질 정량은 Lowry법(1951)을 사용하여 정량하였고 이때 표준으로는 Bovine serum albumin (Sigma)을 사용하였다.

고체(한천)배지 조제 및 분석

선발된 공시균주의 균사배양 최적온도를 구명하기 위하여 YMEA배지를 기본배지로 선정하여 YMEA배지에 기 배양된 표고버섯균은 균총의 직경을 8mm 정도로 떼어 접종하고, 기 배양된 *Trichoderma* spp.균의 균총은 3mm 정도로 떼어내어 접종한 후, 균사배양 온도를 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 $^{\circ}$ C로 조절한 항온기에서 표고버섯균은 15일, *Trichoderma* spp.는 5일간 배양하면서 균사생장 속도를 측정하였다.

선발된 공시균주의 균사배양 최적 pH 범위를 구명하기 위해서 YMEA배지에 1N HCl과 1N NaOH로 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0이 되도록 조절하여 배지를 조제하였다. pH가 조절된 배지가 분주된 Petri-dish에 기 배양된 표고버섯균의 균총을 8mm 정도로 떼어 접종하고, 기 배양된 *Trichoderma* spp.균의 균총은 3mm 정도로 떼어내어 접종한 후, 표고버섯균은 15일간, *Trichoderma* spp.는 5일간 배양하면서 pH에 따른 균사생장도를 조사하였다.

표고버섯균과 *Trichoderma* spp.균을 대치배양을 하기 위하여 YMEA배지에 표고버섯 균총의 직경을 8mm로 떼어 접종하고 25 \pm 1 $^{\circ}$ C로 조절된 항온기에서 3, 6, 9, 12일간 배양한 후 *Trichoderma* spp.를 접종하였다. 표고버섯균과 길항균이 서로 대치했을 때 형성되는 상호작용 영역에서 두 균의 형태적 변화와 laccase 활성 및 pH를 조사하였다.

참나무류 톱밥과 미강을 10:2(w/w)로 혼합한 후 수분은 65%로 조절하여 시료를 조제하였다. 이렇게 조제한 시료를 시험관(D24mm \times L120mm)에 24g(wet weight)씩 넣고 일정(B.D., 0.21)하게 다친 후 먼전하여 121 $^{\circ}$ C에서 30분간 살균하였다. 살균이 끝난 배지는 냉각(15 $^{\circ}$ C) 후 오른쪽에는 기 배양된 표고버섯균을 접종하였다. 표고버섯균이 3, 6, 9cm 성장한 후 왼쪽에 *Trichoderma* spp.를 접종하여 표고버섯균과 *Trichoderma* spp. 서로 대치했을 때 형성되는 상호작용 영역에서의 두 균의 형태적 변화와 laccase 활성 및 pH를 조사하였다

결과 및 고찰

액체배지 실험과 laccase 활성변화

표고버섯균을 YME배지에서 일정기간 배양처리 후 배양

여액(cell-free culture)을 이용한 laccase 활성도를 측정한 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같았다.

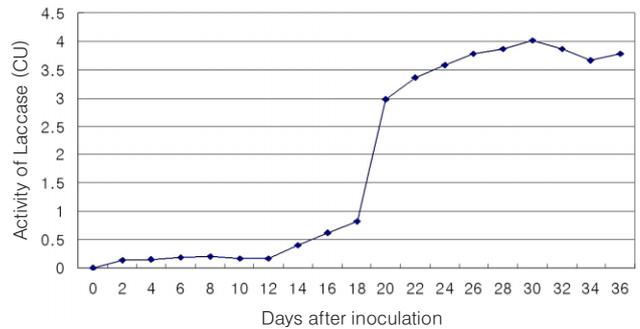


Fig. 1. Changes of laccase activities in culture fluids of *Lentinus edodes*.

Activities of laccase was determined by measuring the absorbance at 436 nm, using UV-Vis Spectrophotometer and presented as colorimetric unit(CU).

표고버섯균의 laccase 활성의 정도는 약간씩 달랐지만, 일반적으로 접종 후 약 10일 이후로 증가하기 시작하여 배양 20일을 기점으로 급격히 증가하기 시작하였다가 배양 처리 30일을 전후하여 약간 감소하기 시작했다(Fig. 1). 또한, 표고버섯균의 활성도는 균체량과 강한 상관관계를 나타냈다(Fig. 2). 표고버섯균의 건중량이 0.15g정도 증가할 때까지는 ABTS 산화율의 변화폭이 매우 적었다. 하지만, 그 이후부터는 균체량이 증가할수록 산화율은 급증하는 것을 알 수 있었다.

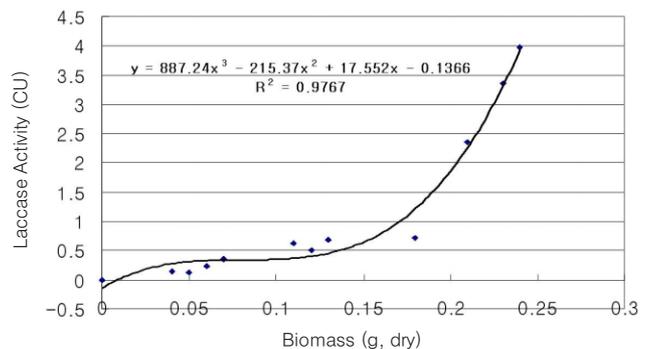


Fig. 2. Laccase activity and protein concentration in the liquid culture media during the cultivation of *L. edodes*. *L. edodes* was cultured for 36 days.

***Trichoderma* spp.에 의한 표고버섯균의 laccase의 유도**

본 연구에서는 *Trichoderma* spp.종류에 따른 표고버섯의 laccase 유도의 정도를 알아보하고자 YME 배지에 배양된 표고버섯 배양액에 *Trichoderma* spp.와 졸참나무 톱밥(*Quercus serrata* wood chip)을 처리하여 laccase의 분비량에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 3.과 같았다. Laccase 유도율은 T4, T2, T1 그리고 T12와 T5의 순이었다.

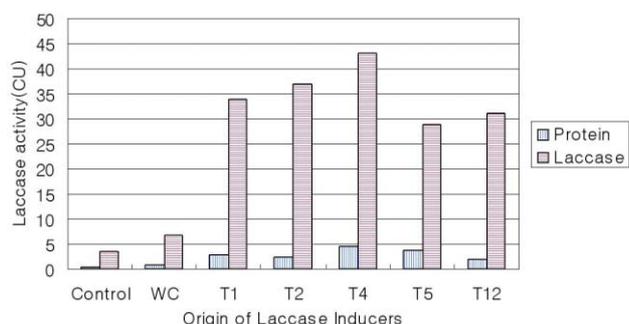


Fig. 3. Induction of extracellular laccase of *L. edodes* by *Trichoderma* spp.

고체(한천)배지배양과 상호작용영역 변화

표고버섯균이 *Trichoderma* spp.와 대치했을 때 형성되는 상호작용지역의 변화를 조사하기 위해 YMEA 배지에 두 균류를 접종하여 대치배양을 시켰다.

두 균은 서로의 영양생장을 억제시켰으며 이 대치선을 기준으로 두 균의 고유 성장특징인 방사방향의 균사생장은 상호억제되는 것으로 나타났다. 하지만 *Trichoderma* spp. 보다 표고버섯의 균사생장이 눈에 띄게 억제되는 것으로 나타났으며 두 균의 균사가 접한 후 2일 부터 *Trichoderma* spp.는 *L. edodes*의 균사 위로 성장하는 것

을 볼 수 있었다(Table 1,2, Fig. 4).

Trichoderma spp.가 표고버섯의 영양균사 위로 성장함에 따라 갈색대치선은 이동하였다. 즉 갈색대치선은 *Trichoderma* spp.의 균사선단의 이동과 일치하여 이동하면서 *Trichoderma* spp.의 균사선단 바로 전면에 형성되었다(Fig. 4).

상호작용 영역에서 나타나는 균류간의 형태적 변화는 표고버섯균과 대치를 하는 *Trichoderma* spp.의 종류에 따라 약간의 차이를 나타냈다. T12의 경우 표고버섯 영양균사의 나이가 6일 이하 일 경우 갈색대치선을 유도하지 못했으나 9일 이상일 경우 대치선을 유도하였다. 그리고, 표고버섯에 대한 성장억제 정도는 다른 *Trichoderma* spp.(T1,2,5)에 비해 낮았다(Fig. 4). 또한, T4의 경우 표고버섯의 배양 기간과 상관없이 T4 균사 위로 자라지 못하였으며 오히려 에 의해 생육이 억제 당하는 것으로 나타났다(Table2, Fig. 4).

두 길항균의 상호작용 영역에서의 Laccase 생성과 변화

본 연구결과에 의하면 두 균류가 서로 대치해서 형성되는 interaction zone은 크게 A, B, C의 3부분(Fig. 5.)으로 나뉘어 표고버섯의 균체의 laccase 함량을 측정하여 갈색변화와 laccase의 상관성을 조사하였다(Table 3.).

Table 1. Production of pigmented barrages and overgrowths during confrontations between mycelia of *L. edodes* and *Trichoderma* spp. on agar media

Age of <i>L.edodes</i> <i>Trichoderma</i> spp.	Brown line formation at contact with				Mutual limitation of growth				Growth of <i>Trichoderma</i> spp. on basidiomycetes			
	3	6	9	12	3	6	9	12	3	6	9	12
T1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
T5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T12	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

Each data was examined at 3 days after *Trichoderma* spp. inoculation and presented as + (detected) and - (non-detected).

Table 2. Brown line moving with apex of *Trichoderma* spp

<i>Trichoderma</i> spp.	Days after <i>Trichoderma</i> spp. inoculation		
	3	6	9
T1	+	+	+
T2	+	+	+
T4	-	-	-
T5	+	+	+
T12	-	+	+

L. edodes was pre-cultured for 6 days before *Trichoderma* inoculation. The stability of brown line was examined at 3, 6 and 9 days after *Trichoderma* inoculation and presented as + (brown line moving) and - (brown line stable).

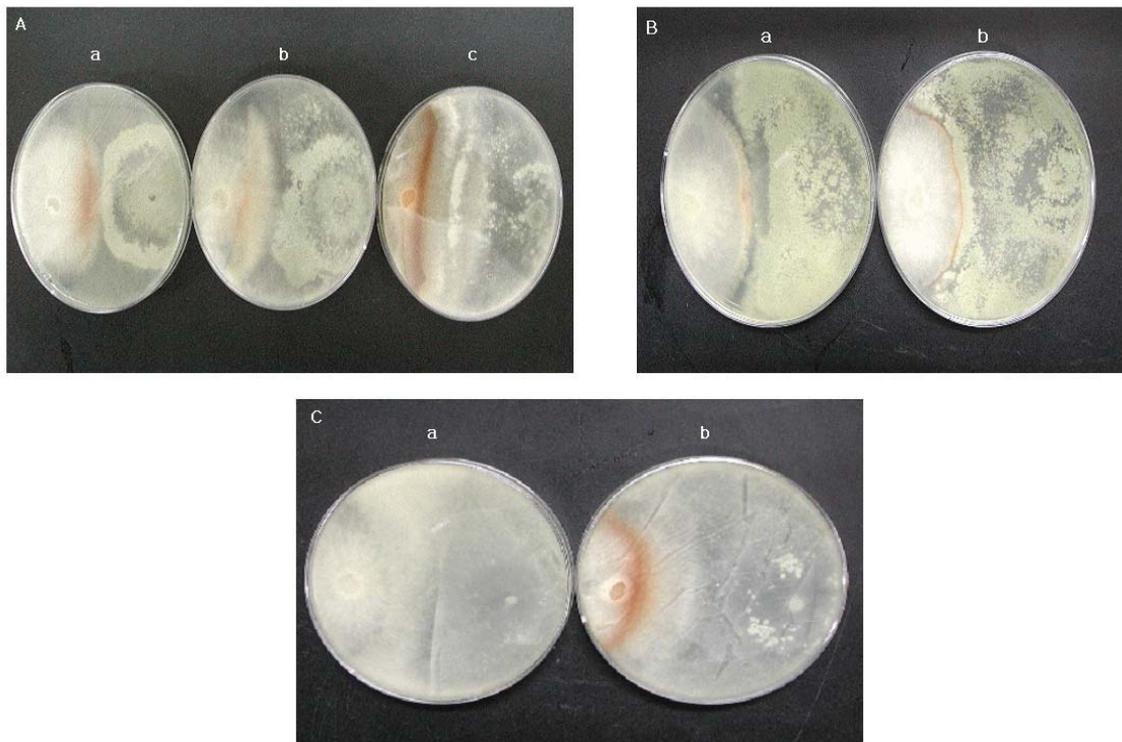


Fig. 4. -A : Formation and moving of brown barrage with the apex of *Trichoderma* (T1)

L. edodes was pre-cultured for 6 days and *Trichoderma*(T1) was challenge-cultured for 3(a), 4(b) and 6(c) days, respectively. Brown line(a) was formed 2 days after contact with *Trichoderma* and green spore was formed overnight. *Trichoderma* covered over the mycelia of *L. edodes* and brown line moved backward and diffuse brown zone was formed (b,c)

B : Formation and non-moving of brown barrage.

L. edodes was pre-cultured for 6 days and *Trichoderma*(T4) was challenge-cultured for 3(a) and 10(b) days, respectively. The vegetative hyphal growth of *Trichoderma* (T4) was inhibited before contact with *L. edodes* and stimulated to generate so many green spores(a). Brown line was so stable that brown zone couldn't formed (b).

C : Late induction of brown barrage

L. edodes was pre-cultured for 6 days and *Trichoderma*(T12) was challenge-cultured for 3(a) and 6(b) days, respectively. Brown line couldn't be found in 3 days but the vegetative mycelia of T12 invaded into the mycelial mat of *L. edodes*, close to the disc-inoculant of *L. edodes* (a). Diffuse brown zone was formed in 6 days, very closely to the disc (b).

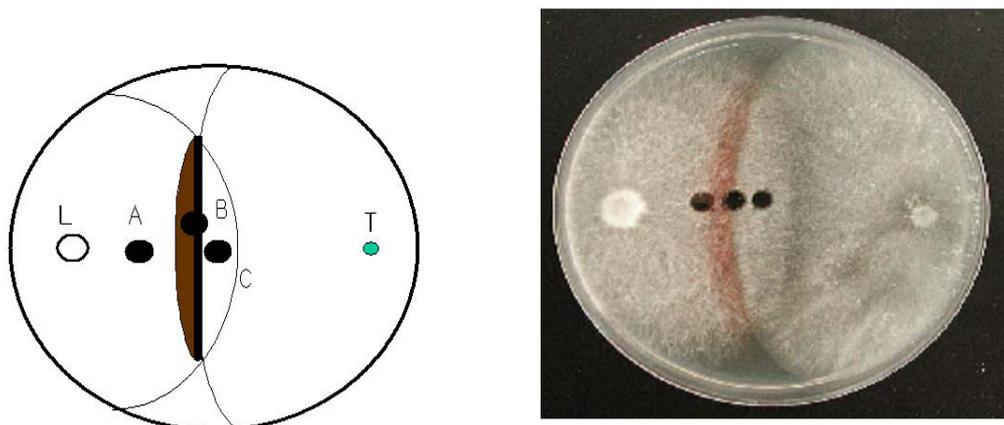


Fig. 5. Production of brown barrage by *L. edodes* and over-growth of *Trichoderma* spp.

Inoculants : L(*Lentinus edodes*), T(*Trichoderma* spp. ;T2)

Sampling for laccase activity detection : A(L), B(Brown area in interaction zone), C(non-brown area in interaction zone)

*Trichoderma*의 종류에 상관없이 모든 처리구에서 laccase 활성율(CU)은 B>C>A 지역 순이었다. B지역은 표고버섯이 갈색으로 착색된 부위로서 *Trichoderma* spp.의 균사의 선단에서부터 시작된다. C 지역은 *Trichoderma*가 표고버섯의 균사위로 성장한 지역으로 두 종의 균사가 상하층으로 분리되어 있거나 서로 혼합된 지역이다. A 지역은 표고버섯만이 있는 지역이다. 표고버섯에 의해 분비되어진 laccase의 함량이 가장 높은 B 지역은 *Trichoderma* spp.의 감염에 대응한 표고버섯의 길항작용 영역임이 추정할 수 있다. 하지만 C 지역은 *Trichoderma* spp.와 표고버섯이 서로 혼합하여 존재하는 지역에서의 laccase 함량도 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 표고버섯의 laccase가 갈변현상 형성에 있어서 충분조건이 되지 못함을 제시한다.

Table 3. Laccase production by *L. edodes* in antagonistic zone

<i>Trichoderma</i> spp.	Day 10(4 d after treatments)		
	A	B	C
T1	0.071	0.130	0.101
T2	0.071	0.125	0.096
T4	0.047	0.136	0.081
T5	0.089	0.114	0.085
T12	0.078	0.091	0.086

L. edodes was pre-cultured for 6 days before *Trichoderma* inoculation. The laccase activity (CU) was examined at 4 days after *Trichoderma* inoculation.

두 길항균의 상호작용 영역에서의 pH 변화

앞에서 살펴본 바와 같이 T12와 T13의 경우 표고버섯의 균사생육을 크게 저해하지 않고 over-growing을 하는 것으로 나타났다. 하지만, 이때 표고버섯의 laccase 유도율은 다른 *Trichoderma* spp.의 그것과 상이하지 않았다. 이에 본 연구에서는 interaction zone의 부위별로 Agar배지

의 pH를 조사하였으며 그 결과는 Table. 4.와 같았다.

표고버섯의 균사가 분포하는 지역(L)의 경우 배지의 pH 범위는 4.3~4.4 정도였다. 길항균인 *Trichoderma* spp.의 균사가 분포하는 지역(T)은 T12와 T13을 제외하고는 pH 5.5~6.7의 범위였으며 T12와 T13은 4.5~5.0으로 표고버섯의 범위와 유사하였다. 이때, 두 길항균이 같이 존재하는 영역(T+L)의 경우 pH는 두 길항균이 갖는 범위의 중간 정도를 나타냈다 (Table 4).

Table. 4. Local modulation of substrate pH by *Trichoderma* spp. in interaction zone

<i>Trichoderma</i> spp	confrontations between mycelia of <i>L. edodes</i> and <i>Trichoderma</i> spp.		
	T	T+L	L
T1	6.8±0.01	5.4±0.02	4.4±0.01
T2	5.4±0.01	4.6±0.03	4.3±0.01
T4	5.6±0.03	4.8±0.04	4.4±0.01
T5	5.7±0.03	4.7±0.04	4.3±0.04
T12	4.8±0.02	4.4±0.04	4.3±0.02
T13	3.7±0.04	4.1±0.01	4.3±0.03

L. edodes was pre-cultured for 6 days before and pH was determined at 3 days after *Trichoderma* inoculation and confrontation area was presented as T(*Trichoderma* spp.), L(*L. edodes*) and T+L(Brown zone). pH is expressed by the average and standard deviation of 5 replicates.

톱밥배지배양과 상호작용 영역변화

미강이 첨가된 졸참나무(*Quercus serrata*) 톱밥배지에서 표고버섯과 *Trichoderma* spp.의 길항작용을 조사한 결과 Fig. 6.과 같았다. 표고버섯을 각각 3(A), 6(B), 9(C) cm 정도 기 배양한 톱밥배지에 *Trichoderma* spp.를 접종하였다. 모든 처리구에서 표고버섯 균사의 배양기간과는 상관없이 *Trichoderma* spp.를 만났을 때 갈색의 대치선을 형성하였다. 그리고 대치 2-3일 후부터 표고버섯은



Fig. 6. Challenge culture of *Lentinula*(right) and *Trichoderma* spp.(left) in lignocellulose substrate (Legend : *L. edodes* was pre-cultured for 3(A), 6(B) and 9(C) cm in sawdust-rice bran mixtures(in the ratio of 10:2, w/w and moisture content was 65%) before *Trichoderma* inoculation. In all treatments, outstanding brown line was formed and the mycelia of *L. edodes* grew over the mycelia of *Trichoderma* spp. in a few days after contacts.)

Trichoderma spp.의 균사 위로 생장을 하였으며, agar배지에서와는 달리 톱밥배지에서 표고버섯균이 *Trichoderma* spp. 균사 위로 성장한다는 Badham (1991)의 연구결과와 일치하였다.

또한, Table 5.에 의하면, T12를 제외한 *Trichoderma* spp.에 의해 점유된 톱밥배지의 pH는 약 5.0~6.0의 범위이며 표고버섯에 의해 점유된 배지의 pH는 약 4.0~4.5의 범위로 나타났다. 또한, 두 균이 서로 만나서 갈색대치선을 형성한 부위의 pH는 약 4.5~5.5의 범위로 나타났다. 하지만 일정한 시간(약 2-3일 후)이 지나면 *L. edodes*의 영양균사는 *Trichoderma* spp.의 균사 위로 생장을 하는데 이 부위의 pH는 약 4.3~4.8의 범위를 나타냈다.

*Trichoderma*의 종류에 상관없이 모든 처리구에서 laccase 활성율(CU)은 9cm>6cm>3cm 순이었다. 이 연구결과에 의하면, *L. edodes*에 의해 분비되어진 laccase의 함량이 가장 높은 9cm 지역 즉, brown zone은 *Trichoderma* spp.의 감염에 대응한 *L. edodes*의 길항작용이지만, *Trichoderma* spp.의 상황이 불리할 때 표고버섯균의 laccase를 더 많이 유도하는 것으로 나타났다.

Table 5. Local production of Laccase by *L. edodes* in antagonistic zone

<i>Trichoderma</i> spp.	Brown line formation at interaction zone		
	3cm	6cm	9cm
T1	0.160	0.201	0.200
T2	0.154	0.190	0.202
T4	0.149	0.160	0.167
T5	0.155	0.160	0.175
T12	0.163	0.173	0.190

L. edodes was pre-cultured for 3, 6, 9cm before *Trichoderma* inoculation. The laccase activity (CU) was examined at 2 days after *Trichoderma* inoculation.

두 길항균의 상호작용영역에서의 pH 변화

본 실험에 사용된 기질은 전분 등의 가용성 성분이 많은 미강이 첨가된 톱밥배지였다. Chai (1999a)에 따르면, 이러한 조건은 *Trichoderma* spp.의 초기생장을 촉진시켜 배지의 빠른 점유를 가능케 한다. 하지만, *Trichoderma* spp.의 균사는 톱밥의 목재세포벽을 쉽게 분해하지 못한다. 하지만, *L. edodes*는 배지에 첨가된 미강의 함량에 크게 상관없이 일정한 생장율을 나타낸다.

또한, *L. edodes*에 의한 목재성분의 부후정도가 높을수록 기질의 pH는 산성화(pH 5.5 4.5)되는 것으로 알려져 있다 (Chai et al., 1999b). 이러한 *L. edodes*의 lignocellulose 분해특성을 고려한다면 미강이 첨가된 톱밥배지에서 성장하는 *L. edodes*는 톱밥 사이의 미강성분 뿐만 아니라 톱밥의 목재세포벽을 동시에 분해하면서 균사의 배지 점유율을 높혀갈 것으로 추정할 수 있다.

Table 6. Local modulation of lignocellulose substrate pH by *L. edodes* in interaction zone

<i>Trichoderma</i> spp.	Confrontations between mycelia of <i>L. edodes</i> and <i>Trichoderma</i> spp.			
	T	T+L	L	L/T
T1	6.5±0.03	5.0±0.01	4.3±0.04	4.3±0.04
T2	5.9±0.03	5.2±0.01	4.1±0.04	4.4±0.01
T4	6.1±0.01	5.1±0.02	4.3±0.01	4.4±0.01
T5	5.8±0.01	5.0±0.04	4.6±0.01	4.6±0.03
T12	4.2±0.01	4.6±0.01	4.3±0.03	4.4±0.02
T13	3.7±0.02	4.0±0.03	4.4±0.01	4.1±0.01

L. edodes was pre-cultured for 6 cm and *Trichoderma* was inoculated. Confrontation area was presented as T(*Trichoderma* spp.), L(*L. edodes*), T+L(Brown zone) and L/T(*L. edodes* over *Trichoderma*.)

적 요

표고버섯은 *Trichoderma* spp.의 침입을 받으면 두 균이 접하는 부위에 다량의 laccase을 분비하여 갈색 대치선을 형성하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 어떤 경우에는 이러한 갈변현상이 전혀 혹은 거의 나타나지 않거나 상대적으로 늦게 발현되기도 한다. 또한, 현장에서는 *Trichoderma* spp.의 종류에 의해 오염이 된 톱밥배지에서 갈색 대치선이 형성되지 않은 채 표고버섯에 따라 그리고 두 길항균이 처한 상황에 따라 표고버섯의 laccase 유도정도 및 갈변현상의 형성 및 변화 정도가 다른 것으로 나타났다. 본 연구는 표고버섯과 *Trichoderma* spp.의 균사가 서로 접한 부위에서 발생하는 두 균의 상호작용에 대해 다양하게 조사하였다.

1. YME 배지에서 표고버섯의 laccase 활성은 주로 10일 이후에 증가되기 시작하였고 20일을 기점으로 급격히 증가하였으며 30일을 전후하여 다시 감소하기 시작했다. 또한, laccase 활성도는 균체량 상관이 있었다.
2. 본 연구에 사용된 모든 *Trichoderma* spp.는 표고버섯의 laccase 활성을 촉진시켰으며 균주별로 약간의 차이가 있었다.
3. YMEA 배지에서 대치배양된 표고버섯은 모든 *Trichoderma* spp.의 침투에 대해 brown-line을 형성함으로써 길항작용을 보이면서 두 길항균은 서로의 균사생장을 억제하였으며 표고버섯의 균사생장이 더 억제되는 것으로 나타났다. 하지만, T12균주의 경우 6일 이하로 배양된 표고버섯의 영양균사의 갈색 대치선의 형성을 유도하지 못했다.
4. Brown-line 형성 이후 *Trichoderma* spp.의 영양균사는 표고버섯의 영양균사 위로 계속해서 생장을 하였으며 이때, 갈색 대치선은 *Trichoderma* spp. 영양균사의 정단부위 직전에 형성되면서 이동하였다. 하지만, T4와 표고버섯의 영양균사가 서로 근접했을 경우 뚜렷한 갈

- 색 대치선이 먼저 형성되고 그 이후 서로의 영역을 침범(over-growing)하지 못했으며 갈색 대치선은 이동하지 않고 안정적이었다.
5. 두 길항균이 서로 대치한 지역의 laccase 활성율을 부위별로 조사한 결과 laccase 활성율은 *Trichoderma*류의 종류에 상관없이 모든 처리구에서 B, C, A의 순으로 나타났다.
 6. 두 길항균이 서로 대치한 지역의 pH를 조사한 결과 표고버섯의 균사 분포지역의 pH는 4.3~4.4, T12, T13의 경우 pH 4.5~5.0, T1, T2, T5의 경우 pH 5.5~6.7의 범위였으며 두 길항균의 길항작용 지역의 경우 두 균이 갖는 pH 범위의 중간정도의 값을 나타냈다. 이러한 결과는, T12, T13의 경우 표고버섯의 갈변 현상 유도가 느리거나 거의 유도하지 않는 점을 고려한다면, 갈변 현상 형성에 있어서 길항균의 pH 범위가 중요한 역할을 하는 것을 추정할 수 있었다.
 7. 미강이 첨가된 톱밥배지 상에 3, 6, 9cm 기배양된 표고버섯에 접종된 *Trichoderma* spp.는 모든 처리구에서 갈색 대치선을 형성하였다. 하지만, 한천배지에서와는 상반되게 대치 후 2~3일이 지나면 표고버섯의 영양균사는 *Trichoderma* spp.의 균사 위로 성장을 하였다. 또한, 이때 배지의 pH는 표고버섯의 점유지역의 경우 pH 4.0~4.5, *Trichoderma* spp.의 경우 pH 5.0~6.0, 그리고 갈색 대치선을 형성지역의 경우 pH 4.5~5.5의 범위였으나 표고버섯이 *Trichoderma* spp. 위로 성장한 지역의 pH는 4.3~4.8의 범위를 나타냈다.

인용문헌

- Badham E.R., 1991. Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia* 83(4) : 455-463.
- Brown, R.R. 1967. In "Oxidative coupling of phenols", Taylor, W.I. & Battersby, A.R. eds., 167-201, Marcel Dekker, New York.
- Chai, J.K., Lee, S.J., Kim, Y.S., 1999a. Utilization of *Robinia pseudoacacia* as sawdust medium for cultivation of edible and medicinal mushrooms. *Plant Res.* 2(1), 42-48.
- Chai, J.K., Lee, S.J. and Kim, Y.S. and Lee, K.H. 1999b. Biodegradation of Mill-waste Substrate by *Flammulium velutipes*. The 6th Int. Symp. Development of Anti-cancer Resource from Plants & Annual Meeting of the Plant Resources. *Plant Res.* p. 80-81.
- Coll, P. M., Taberner, C., Santamaria, R. and Perez, P. 1993. Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic Basidiomycete PMI (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4129-4135.
- Dean, J. F. D. & Eriksson, K. F. L. 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforchung* 48, 21-33.
- Dec, J., and Bollag, J. M. 1990. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 19, 543-550.
- Delpech, P. and Oliver, J.-M. 1991. Cultivation of shiitake on straw based pasturized substrates. *Mushroom Science* 13, 523-528.
- Devries, O. M. H., Kooistra, W. H. C. F. and Wessels, J. G. H. 1986. Formation of an extracellular laccase by a *Schizophyllum commune* dikaryon. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2817-2826.
- Ishikawa, H., Nagao, M., Oki, T. and Kawabe, K. 1980. Physiological changes in *Lentinus edodes*(Berk.) Sing. mycelia induced by *Trichoderma* metabolites. *Reports on the Tottori Mycological Institute* 18, 197-204.
- Kawamura, N., Nakamura, Y. and Goto, M. 1980. Relationship between resistance of *Lentinus edodes* to *Hypocrea muroiana* and components of culture media. *Reports on the Tottori Mycological Institute* 18, 205-216.
- Levanon, D., Rotschild, N., Danai, O. and Masaphy, S. 1993. Bulk treatment of substrate for the cultivation of shiitake mushroom. *Bioresource Technology* 45, 63-64
- Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Mata G., Savoie J.-M. and Delpech P. 1998. Variability in laccase production by mycelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in presence of soluble lignin derivatives in solid media. *Mater und Organism*, 31:109-122.
- Rayner, A. D. M., Griffith, G. S. and Wildman, H. G. 1994. Elicitors in plant and microbial metabolism-Induction of metabolic and morphogenetic changes during mycelial interactions among species of higher fungi. *Biochem. Soci. Transa.* 22, 389-394.
- Rosyse, D.J., Schisler, L.C. and Diehle, D.A. 1985. Shiitake mushrooms. Consumption, production and cultivation. *Interdisciplinary Science Review* 10, 329-335.
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma* : a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research* 100, 923-935.
- Savoie, J.-M., Delpech, P. and Billette, C. 2000. Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. during shiitake cultivation on pasteurized wheat straw. *Science and Cultivation of Edible Fungi* (edited by Van Griensven). pp. 667-674.
- Savoie, J.-M. and Mata, G. 1999. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15 : 369-373.
- Tokimoto, K. and Komatsu, M., 1979. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma*. *Annals Phytopathol. Soci. Japan* 45 : 261-264.
- Tokimoto, K. 1982. Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* caused by mycolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* when the two fungi were in an antagonistic state. *Trans. the Mycol. Soci. Japan* 23, 12-30.
- Thurston, F., 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiol.* 140, 19-26.