

Growth Inhibition of Mushroom Pathogen by *Bacillus* sp. HJ 57Kwon-Il Seo¹, Sang-Won Gal², Sung-Tae Yee³, Kyung-Wuk Park⁴ and Sang-Won Lee^{2*}¹Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea²Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea³Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea⁴S&J Bio Co., Ltd. 303 Business Incubator, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

Received March 21, 2012 / Revised April 5, 2012 / Accepted April 6, 2012

Approximately 80 species of bacteria were isolated from the fermented mushroom first and the HJ-57 antibacterial micro-organism was selected to the final isolation bacteria. It has a high degree of CMCase, amylase, and protease activity as well as high antibacterial activity against mushroom pathogenic bacteria without affecting the growth and development of *Flammulina velutipes* and *Lentinus edodes* mushrooms. The finally selected HJ-57 antibacterial micro-organism was identified as *Bacillus* sp. HJ-57. The initial pH for culture was pH7 and its optimum culture temperature was 35 °C. The antibacterial material produced by *Bacillus* sp. HJ-57 showed a little antibacterial activity even in the 12 hr of culture, but showed the highest antibacterial activity in the 36~48 hr of culture. The HJ-57 antibacterial micro-organism also showed a high antibacterial activity against mushroom pathogenic bacteria and molds in the corn cob contained culture medium is used in *Flammulina velutipes* cultivators.

Key words : *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, antibacterial activity

서 론

버섯은 오래전부터 불로장수의 약으로 매우 귀한 식품으로 여겨지고 cholesterol 저하작용과 항암 및 성인병 등에도 예방 및 치료효과가 있는 것으로 밝혀져 있다[5]. 또한 저칼로리 식품으로서 단백질, 무기질 및 비타민 B₁ 등을 다량 함유하고 있어 건강식품으로 주목을 받으면서 버섯에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[4]. 최근 버섯에 관한 연구로는 버섯의 생물활성에 관한 연구뿐만 아니라 버섯류의 항종양활성 및 면역활성 촉진에 관한 많은 연구들이 행하여지고 있으며[6,9,22], 생산한 버섯의 소비촉진을 위하여 버섯을 이용한 가공식품 및 발효식품의 개발에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다[10,16]. 또한 버섯의 생산단가를 절감하기 위하여 대체배지의 개발이나 버섯생육 촉진을 위한 첨가제의 개발과 함께 버섯재배 시에 빈번하게 발생하는 버섯질병 유발 미생물의 생육억제 등에 관한 연구도 활발하게 이루어지고 있다[13,17].

버섯질병의 발생은 다양한 오염균주로 인하여 버섯 생산량의 감소뿐만 아니라 품질저하 등을 일으키고 심한 경우는 폐농에 이르게 한다[3,21]. 이와 같은 오염균주에 의한 버섯의 피해는 버섯의 성장, 발육 및 저장 등의 시기에 발생하고 있으며, 특히 버섯의 재배 시에 나타나는 버섯의 질병은 세균성갈색무늬병과 푸른곰팡이 병이 주축을 이루고 있다. 세균성갈색무늬병은 버섯의 갓 부분을 갈색으로 변화시켜 버섯의 양적·질적인 저하를 초래하는 질병으로 주로 *Pseudomonas tolaasii*가

분비하는 tolaasii이라고 하는 toxin에 의해서 발병한다[14,15,20]. 그리고 푸른곰팡이병은 균상배지에서 병원균의 균사가 자란 다음 포자가 형성되어 푸른색을 띄는 것으로 주로 *Gliocladium* sp. 및 *Trichoderma* sp. 등에 의해 발병하는 것으로 밝혀져 있다[7,8,11,18].

이러한 버섯의 질병은 배지의 수분과다 및 부족, 고온, 배지 불량 등 버섯재배환경에 의해서 그 발병빈도가 증가하는 경향이 있지만, 버섯의 생물학적 병해를 유발시키는 병원미생물에 대하여 높은 항균활성을 가지는 항균미생물을 버섯배지를 발효시킬 때 사용한다면 버섯의 질병 유발 미생물의 생육이 억제되어 버섯재배 산업의 발전에 크게 기여할 것으로 생각하였다. 그렇기 때문에 본 연구자들은 발효가 완료된 버섯배지에서 CMCase 및 protease 효소활성 등이 높고 버섯질병균주인 곰팡이와 세균 등에 항균활성이 강한 미생물을 분리·동정한 다음 그 항균미생물의 생육특성 등을 밝혀 버섯재배 배지에 적용하기 위한 기초적 연구를 행하였다.

재료 및 방법

공시균주

임의로 채취한 약 300여 점의 버섯발효배지 및 부엽토 등으로부터 carboxy methyl cellulase (CMCase), protease 및 amylase활성이 높고 버섯의 생육에는 영향을 미치지 않으면서 버섯질병균주에 항균활성이 강한 미생물을 순수분리하여 공시균주로 사용하였다. 버섯질병균주로서 푸른곰팡이병을 유발하는 곰팡이는 재배현장에서 오염된 배지를 수거하여 직접 순수분리하여 사용하였으며 세균성 갈반병을 유

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3394, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : swlee@gntech.ac.kr

발하는 세균은 본 연구실에 보관 중인 *Pseudomonas tolaasii* ATCC 33618을 사용하였다. 버섯종균은 전남 여수의 돌산 지역에서 재배 중인 *Lentinus edodes* FRI-5 (표고버섯)과 *Flammulina velutipes* ASI 4003 (팽이버섯) 및 경북 청도지역의 그린피스 팽이버섯 연구소에서 분양받은 *Flammulina velutipes* FVI-5을 사용하였다.

사용배지

항균미생물의 분리용 배지는 sodium chloride 1%, yeast extract 0.5%, peptone 1%, skim milk 2%로 구성된 SM배지와 SM배지에서 skim milk 대신 2% soluble starch가 함유된 AM배지 및 1% carboxy methyl cellulose (CMC)가 함유된 CM배지를 사용하였다. 버섯종균 및 버섯에 푸른곰팡이병을 유발하는 분리곰팡이의 생육 및 보존을 위한 배지는 PDA (Difco) 평판배지, *P. tolaasii*의 생육 및 보존은 LB 배지를 사용하였다.

항균미생물 및 버섯질병균주의 분리

항균미생물의 분리는 발효가 완료된 느타리버섯 및 팽이버섯 배지와 부엽토 등을 채취하여 행하였다. 채취한 각 균원시료 1 g씩을 멸균된 생리식염수 9 ml에 현탁시켜 멸균증류수로 10단계 희석한 후 SM, AM 및 CM평판배지에 각각 도말하여 생육속도가 빠르고 clear zone이 뚜렷한 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별한 균주를 액체배지에서 효소활성을 검토하여 2차 선별한 다음 버섯질병균주에 대한 항균활성이 높으면서 버섯의 생육에는 전혀 영향을 미치지 않는 항균미생물을 최종 분리균주로 선정하였다. 버섯의 질병균주는 오염된 팽이버섯 배지를 수거하여 PDA 평판배지에서 성장하는 곰팡이 콜로니 색상, 형태 및 성장속도 등을 육안으로 관찰하여 순수분리 하였다.

항균미생물의 동정

분리균주의 동정을 위한 형태학적 및 생화학적 특성을 검토하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [2] 및 Bergey's manual of determinative bacteriology 9th [19]에 준하여 1차 동정한 다음 16S rDNA 유전자 분석을 행하여 동정 하였다.

항균활성 측정

항균활성은 agar diffusion법에 준하여 측정하였다. 즉, 500 ml의 삼각플라스크에 200 ml의 액체배지를 넣고 살균한 후, 항균미생물의 전배양액을 1% 접종하여 35°C, 180 rpm, 24 hr 배양하였다. 그 배양액을 8,000×g에서 원심분리한 후 얻은 상정액을 0.2 µm membrane filter로 여과하여 항균활성 측정 시료로 사용하였다. 항균활성 측정은 PDA평판배지 중앙에 corker borer No.5 (직경 7 mm)를 이용하여 버섯질병균주를 블록형태로 접종한 다음 25°C의 항온기에서 접종한 버섯질병

균주의 균사가 평판배지의 1/2정도를 덮을 때까지 배양하였다. 이때 성장하는 버섯질병균주의 끝으로부터 1 cm 정도 떨어진 지점에 분리한 항균미생물을 회전으로 접종하여 항균활성을 측정하기도 하고, 또는 corker borer No.5 (직경 7 mm)를 이용하여 평판배지 상에 구멍을 뚫은 다음 분리한 항균미생물의 배양용액을 120 µl 접종한 후 25°C에서 72 시간까지 대치배양하면서 버섯질병균주의 균사성장 억제정도(inhibition zone)를 관찰하였다. 그리고 버섯을 재배하는 배지 상에서 항균미생물의 활성검토는 실제 팽이버섯 재배농가에서 사용하는 콘코프 함유배지(수분 65%)를 시험관에 충전하여 멸균시킨 다음 버섯에 푸른곰팡이 병을 유발하는 곰팡이의 포자를 6.25×10^6 spore/ml 되도록 현탁한 용액 2 ml를 접종함과 동시에 48시간 배양하여 준비해둔 항균미생물의 배양용액을 동량씩 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양하면서 곰팡이의 균사생육 정도를 관찰하였다.

결과 및 고찰

항균미생물의 순수분리

버섯 생육배지의 성분은 섬유성물질을 비롯한 전분질 및 단백질 등을 다량 함유하고 있기 때문에 배지의 발효균주에 대하여 항균활성이 우수한 균주를 중심으로 순수분리 하였다. 채취한 시료로부터 약 80여 종의 균주를 1차 선별하여 SM, AM 및 CM의 3종류 평판배지 상에서 동시에 clear zone이 크고 뚜렷하며 성장속도가 빠른 13균주를 2차 분리하여 Table 1에 나타내었다. 대부분의 분리균주들은 성장속도가 빠르고 뚜렷한 단일 콜로니를 형성하였으나 SM, AM 및 CM배지 상에 나타나는 clear zone의 크기는 균주에 따라 많은 차이를 보였다. CM배지 상에서는 HJ-50, HJ-54, HJ-55, HJ-57 및 HJ-62, AM배지 상에서는 HJ-57, HJ-59 및 HJ-62, SM배지 상에서는 HJ-60 분리균주를 제외한 다른 균에서 clear zone이 비교적 크고 뚜렷하게 나타났다. 2차 분리한 미생물을 액체배지에서 배양한 다음 효소활성을 측정된 결과 cellulase활성은 HJ-50, HJ-57 및 HJ-62균주가 높고, amylase활성은 HJ-57, HJ-59 및 HJ-62균주에서 높은 나타났으며, protease활성은 HJ-57과 HJ-62 등에서 높게 나타내었다.

버섯질병균주에 대한 항균활성

오염된 팽이버섯의 배지로부터 8종의 오염원인 미생물을 순수분리하여 PDA평판배지에 배양하였을 때 성장속도, 콜로니의 형태 및 색상 등을 육안으로 관찰하여 3종류의 오염 곰팡이를 분리·선별하였다. 이 분리한 곰팡이와 세균성 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii* 균주에 대하여 2차 순수분리한 미생물의 항균활성을 검토하여 Table 2와 Fig. 1에 나타내었다. 분리한 대부분의 항균미생물은 버섯에 푸른곰팡이병을 유발하는 곰

Table 1. Comparison of cell growth, clear zone size and enzyme activities of the isolated strains by agar diffusion method

| Isolated strains | Mycelial growth ¹⁾ | Clear zone ²⁾ | | | Enzyme activities (units/ml) | | |
|------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------------------|---------|----------|
| | | CM ³⁾ | AM ⁴⁾ | SM ⁵⁾ | CMCase | Amylase | Protease |
| HJ-50 | +++ | +++ | ++ | +++ | 6.1 | 6.3 | 25.3 |
| HJ-51 | +++ | ++ | ++ | +++ | 4.8 | 8.6 | 30.2 |
| HJ-52 | ++ | ++ | ++ | +++ | 5.2 | 7.4 | 34.1 |
| HJ-53 | +++ | ++ | ++ | +++ | 5.7 | 8.6 | 25.2 |
| HJ-54 | +++ | +++ | ++ | +++ | 4.2 | 5.6 | 29.8 |
| HJ-55 | +++ | +++ | ++ | +++ | 4.8 | 9.2 | 31.5 |
| HJ-56 | ++ | ++ | ++ | +++ | 5.1 | 6.1 | 33.2 |
| HJ-57 | +++ | +++ | +++ | +++ | 6.4 | 11.8 | 45.6 |
| HJ-58 | +++ | ++ | ++ | +++ | 4.2 | 6.6 | 28.5 |
| HJ-59 | +++ | ++ | +++ | +++ | 5.5 | 10.6 | 26.9 |
| HJ-60 | +++ | ++ | ++ | ++ | 5.6 | 7.8 | 30.8 |
| HJ-61 | +++ | ++ | ++ | +++ | 3.5 | 9.5 | 33.3 |
| HJ-62 | +++ | +++ | +++ | +++ | 5.9 | 11.2 | 37.2 |

¹⁾Growth rate : +; slow, ++; medium, +++; fast. ²⁾Size of clear zone on CM³⁾ containing carboxy methyl cellulose for cellulase activity, AM⁴⁾ containing soluble starch for amylase and SM⁵⁾ media containing skim milk for protease: +; less than 4 mm, ++; 4-9 mm, +++; more than 9 mm.

Table 2. Antifungal activities of the isolated strains against mushroom pathogenic molds and bacteria

| Isolated Strains | Mushroom pathogenic ¹⁾ | | | |
|------------------|-----------------------------------|------|------|--------------------|
| | Isolated molds | | | <i>P. tolaasii</i> |
| | M-23 | M-24 | M-25 | |
| HJ-50 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| HJ-51 | ++ | ++ | ++ | - |
| HJ-52 | +++ | +++ | ++ | +++ |
| HJ-53 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| HJ-54 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| HJ-55 | +++ | ++ | ++ | ++ |
| HJ-56 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| HJ-57 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| HJ-58 | + | +++ | ++ | - |
| HJ-59 | + | +++ | ++ | + |
| HJ-60 | - | - | - | ++ |
| HJ-61 | + | + | + | - |
| HJ-62 | +++ | ++ | +++ | ++ |

¹⁾-.; Non activity, +; less than 4 mm, ++; 4-9 mm, +++; more than 9 mm.

팡이에 대하여 비교적 높은 활성을 나타냈으나 HJ-60과 HJ-61 균주는 낮게 나타내었다. 그리고 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii*에 대해서는 HJ-52 및 HJ-57균주에서 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과로 버섯에서 푸른 곰팡이병을 유발하는 M-23, M-24 및 M-25 곰팡이와 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii*에 대하여 동시에 비교적 높은 항균활성을 나타내는 항균미생물로는 HJ-52, HJ-57 및 HJ-62분리균주로 나타났다.

항균미생물이 버섯의 생육에 미치는 영향

분리한 13종류의 항균미생물들은 3종류의 평판배지 상에서 clear zone의 크기가 크고 뚜렷하며 액체배지에서 효소활성이 비교적 높고 또한 버섯질병미생물에 대한 항균활성이 우수한

것으로 나타났으나 이들 항균미생물이 버섯의 생육에는 어떤 영향을 미치는지를 검토하여 Fig. 2에 나타내었다. 여수지역의 농가에서 재배하는 *L. edodes* (Fig. 2의 A행 사진) 생육에는 분리한 항균미생물 중에서 HJ-53, HJ-54, HJ-55 및 HJ-58균주가 약간의 생육저해를 일으키는 것으로 나타났고, *F. velutipes*의 팽이버섯(Fig. 2의 B행 사진)에서는 HJ-54, HJ-55 및 HJ-56균주가 약간의 버섯생육저해를 일으켰으나 다른 항균미생물들은 버섯의 생육에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고 경북 청도지역의 농가에서 재배하는 *F. velutipes* FVI-5 팽이버섯(Fig. 2의 C행 사진)에는 분리한 모든 항균미생물이 버섯의 생육에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 본 연구에서는 SM배지, AM배지 및 CM평판배지

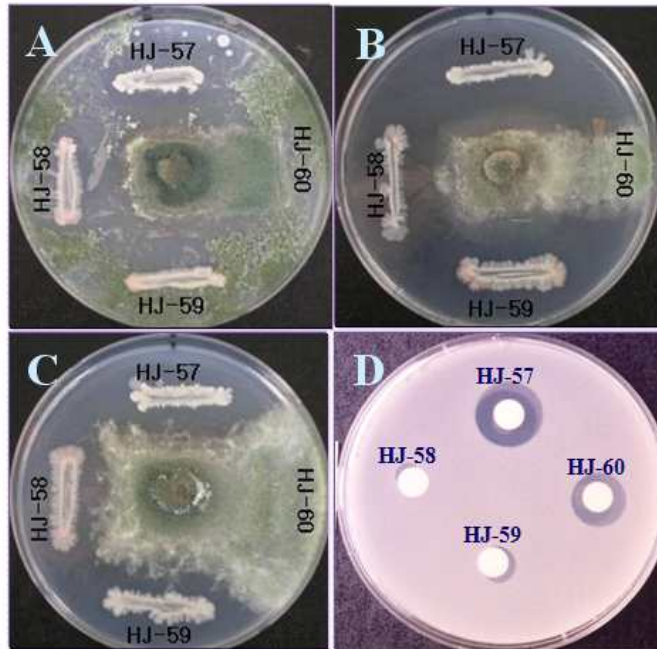


Fig. 1. Antifungal activities of the isolated strains against mushroom pathogenic molds and bacteria, *P. tolaasii*. A; M-23, B; M-24, C; M-25, D; *P. tolaasii*. HJ-57, HJ-58, HJ-59, HJ-60; Numbers of bacteria isolated from the fermented mushroom media.

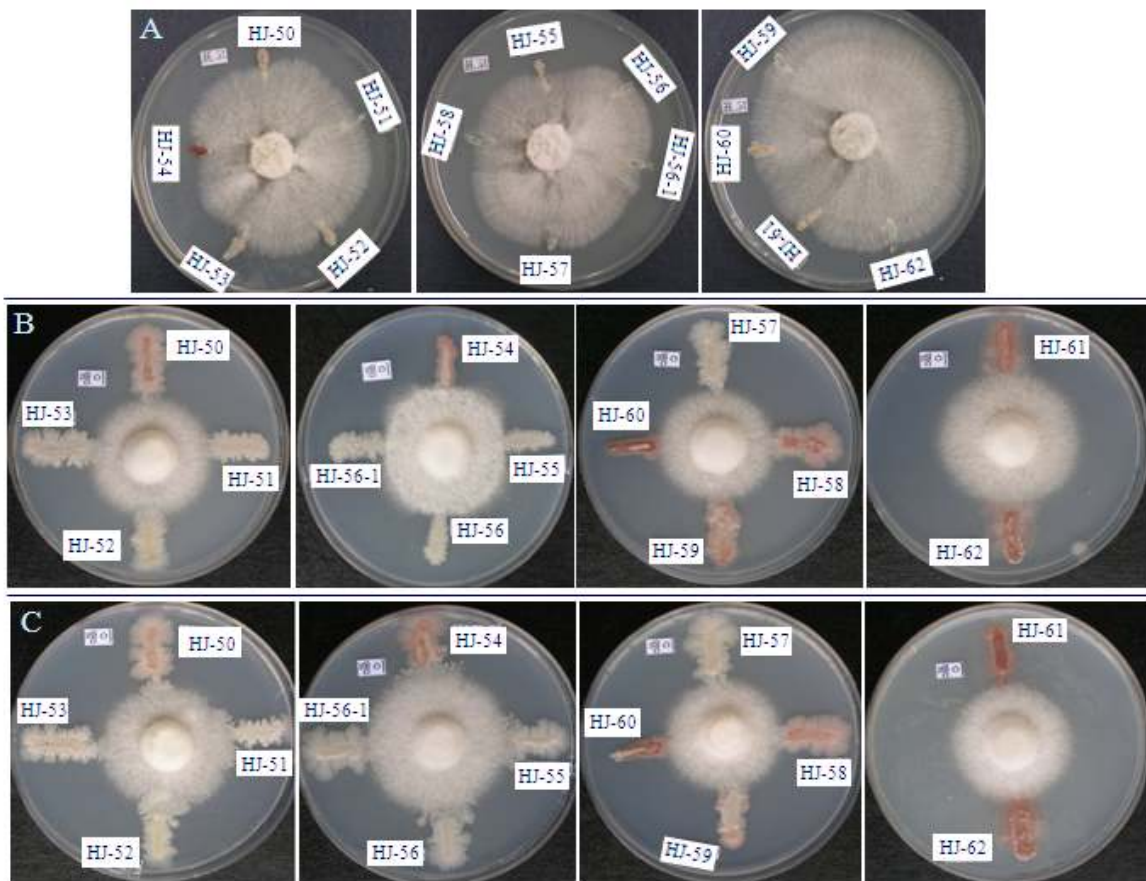


Fig. 2. Growth regulation of the isolated bacteria with several mushrooms. A; *L. edodes* FRI-5, B; *F. velutipes* ASI 4003, C; *F. velutipes* FVI-5. HJ-50~HJ-62; Numbers of bacteria isolated from the fermented mushroom media.

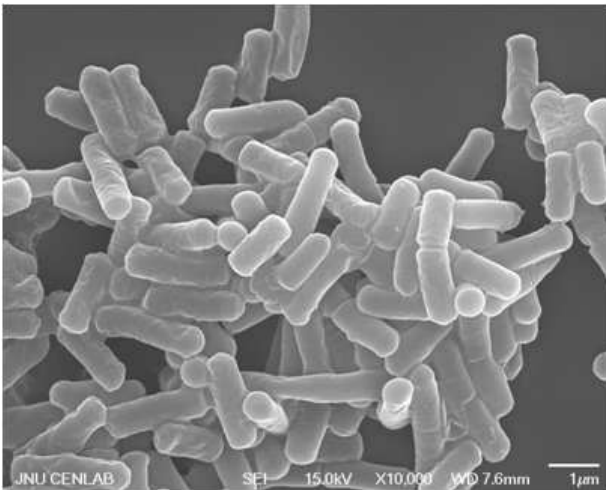


Fig. 3. Photograph of transmission electron microscope of the isolated HJ-57 bacterium.

상에서 clear zone의 크기가 크고 뚜렷하며 액체배지에서 효소 활성이 비교적 높고, 곰팡이 및 세균성의 버섯질병미생물에 대한 항균활성이 우수하면서 팽이버섯 및 표고버섯 등의 균사 생육 등에 전혀 영향을 미치지 않는 HJ-57균주를 최종 분리균 주로 선정하여 이하의 실험을 행하였다.

분리균주의 동정

최종 선정된 항균미생물인 HJ-57의 형태학적 및 생화학적 특성을 검토하여 Fig. 3과 Table 3에 나타내었다. 분리한 HJ-57 균주는 Gram 양성이며 편모 및 내생포자를 가지는 간균으로 크기는 0.7-0.9×2.1-3.2 µm로 나타났다. 생화학적 특성은 oxidase, catalase 및 urease반응은 양성이었으나, indol 생성은 음성이었다. 이러한 결과를 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [19] 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [2]에 준하여 동정한 결과 *Bacillus*

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of the isolated HJ-57 bacterium

| Test items | Reaction | Test items | Reaction |
|--------------|-----------------|----------------------|----------|
| Gram stain | + | Spore formation | + |
| Cell type | Rod | Oxidase reaction | + |
| Size (µm) | 0.7-0.9×2.1-3.2 | Catalase reaction | + |
| Motility | + | Urease reaction | + |
| Colony color | Ivory | Voges-Prostauer test | + |
| Fluorescence | - | Citrate utilization | + |
| Flagellum | + | Indol production | - |

+, Positive reaction, -, Negative reaction.

```

5'-CTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTTGAGTGCAG
AAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG
TAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
ACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC
ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAA
ACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCCG
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTACACCAGGAGTTTGTACACCCGAA-3'
    
```

Fig. 4. 16S rDNA sequence of the isolated HJ-57 bacterium.

속(genus)인 것으로 추정되었으며 16s rDNA 분석(Fig. 4)을 행한 결과 분리한 HJ-57균주는 98% 정도 *Bacillus* sp.과 유사한 것으로 판명되어 최종분리 선정한 균주를 *Bacillus* sp. HJ-57로 명명하였다.

배양온도 및 pH의 영향

배양온도가 분리한 *Bacillus* sp. HJ-57항균미생물의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 5에 나타내었다. 배양온도를 15°C~50°C의 범위로 변화시키면서 검토한 결과 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물의 생육은 15~35°C까지는 균체가 직선적으로 증가하였으나 45°C 이상의 온도에서는 급격하게 생육이 저하하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물의 최적생육 온도는 25~40°C 부근인 것을 확인되었다. 그러나 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물은 15°C에서도 최적온도인 35°C에서의 O.D.값을 80% 이상 유지하고 있기 때문에 버섯배지의 발효균주로 사용할 경우 팽이버섯의 균사생육(17°C 내외) 온도에서도 상당한 생육활성은 유지할 것으로 사료된다. Berridga 등[1]은 *Streptococcus lactis*의 경우 배양온도에 따라 생성되는 물질의 패턴이 변화되는 것을 발견하였으며, nisin생성의 최적온도는 28~30°C로 보고된바 있어 분리한 *Bacillus* sp. HJ-57균주와는 다른 적온을 나타내었다. 그리고 배지의 초기 pH를 35°C의 최적 배양온도에서 검토한 결과 초기 pH 4에서 pH 5까지는 생육이 급격하게 증가하였으나 pH 6에서 pH 8까지는 거의 대등하게 왕성한 생육상태를 나타내었다. 이상의 결과로 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물의 생육최적 pH는 pH 6.0~7.0인 것으로 판단되며, 이 pH범위는 팽이버섯 균사생육 최적 pH와 거의 일치하는 것으로 사료되어 버섯의 배지발효에 적당한 균인 것으로 생각된다. Lee 등[12]은 버섯질병균에 대한 길항세균인 *Bacillus* sp. SD-10의 생육최적온도는 35~40°C, pH는 7.0으로 보고하면서 미생물의 배양온도 및 pH는 균의 생육 및 항균물질의 생산에 크게 영향을 미치는 것으로 보고하였다.

배양시간에 따른 항균활성

Bacillus sp. HJ-57 항균미생물을 배양할 때 배양시간이 항균물질의 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 6에 나타내었다. *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물을 72 hr까지 배양하면서 일정시간 간격으로 그 배양용액을 채취하여 M-23, M-24 및 M-25질병균주 대한 항균활성을 검토한 결과 12시간 배양한 용액에서 버섯 질병균주에 대하여 약간의 항균활성을 나타내었으나, 24시간 배양 이후부터는 항균활성이 더욱더 뚜렷하게 나타났으며, 36~48 hr배양한 용액에서 매우 강한 활성을 나타내었다. 그리고 그 항균활성은 72시간 배양 때까지 유지됨을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물의 항균활성은 36~48시간 배양하였을 때 가장 높은 항균활성을 갖는 것으로 판단되었다. Lee 등[12]은 미생물의 배양시간이 *Bacillus* sp. SD-10의 항균물질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 배양 15 hr, 20 hr 및 25 hr째에 최대항균활성의 40%, 65% 및 90%의 항균활성을 나타내고 최대의 항균활성은 30~40 hr 배양 시간 동안에 나타내었다고 보고한 결과와 거의 일치하였다.

버섯배지 상에서 항균활성

실제 버섯을 재배하는 배지 상에서 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물이 버섯질병균주의 생육억제에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 7에 나타내었다. 버섯배지를 충진한 시험관 상층부에 버섯질병균주인 M-23, M-24 및 M-25의 포자용액과 전배양한 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물의 배양용액을 동시에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 결과 대조구(a)에서는 전혀 버섯질병균주인 세균과 곰팡이의 생육이 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 각 버섯질병균주만을 접종한 시험구(b)에서는 버섯질병균주의 왕성한 생육이 관찰되었으나 버섯질병균주와 항균미생물을 동시에 접종한 시험구(c)에서는 버섯질병균주 생육이 현저하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 그리고 배양 7일째에 버섯질병균주가 약간 성장하고 있는 시험구의 상층부에 분리한 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물 배양용액 2 ml를 중첩 접종하여 2주일 동안 방치하여도 버섯질병균주인 곰팡이의 성장은

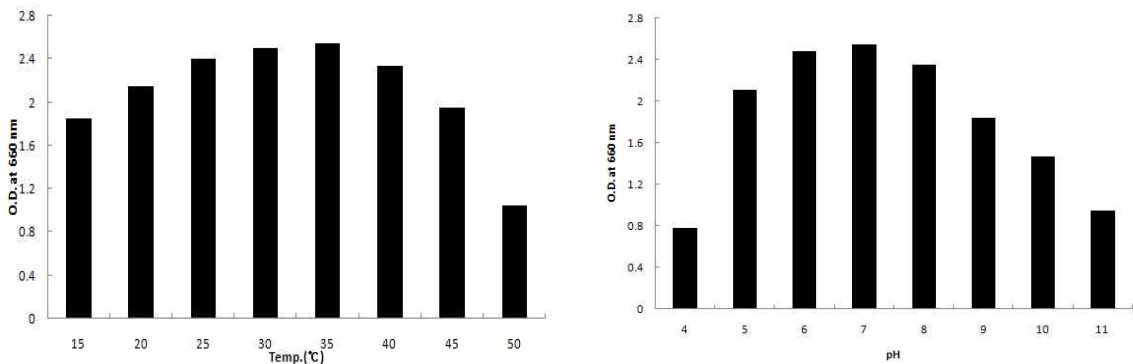


Fig. 5. Effect of optimal temperature and initial pH on the growth of the isolated *Bacillus* sp. HJ-57.

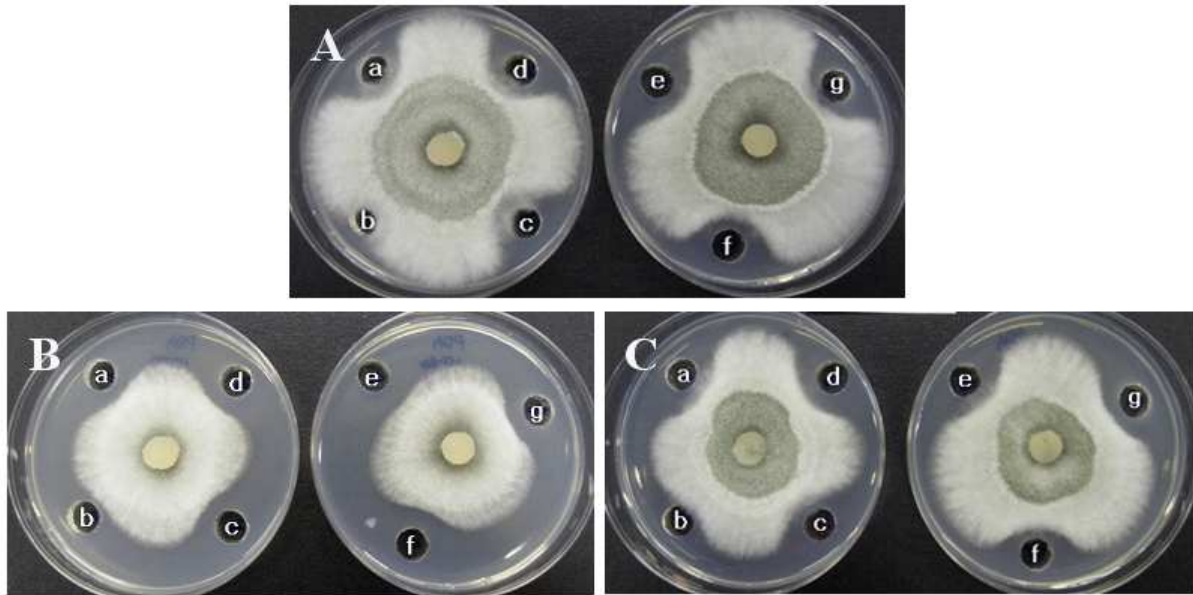


Fig. 6. Antimicrobial activities according to the culture time of the isolated *Bacillus* sp. HJ-57. A: M-23, B: M-24, C: M-25. Culture time of *Bacillus* sp. HJ-57; a: 12 hr, b: 18 hr, c: 24 hr, d: 36 hr, e: 48 hr, f: 60 hr, g: 72 hr.

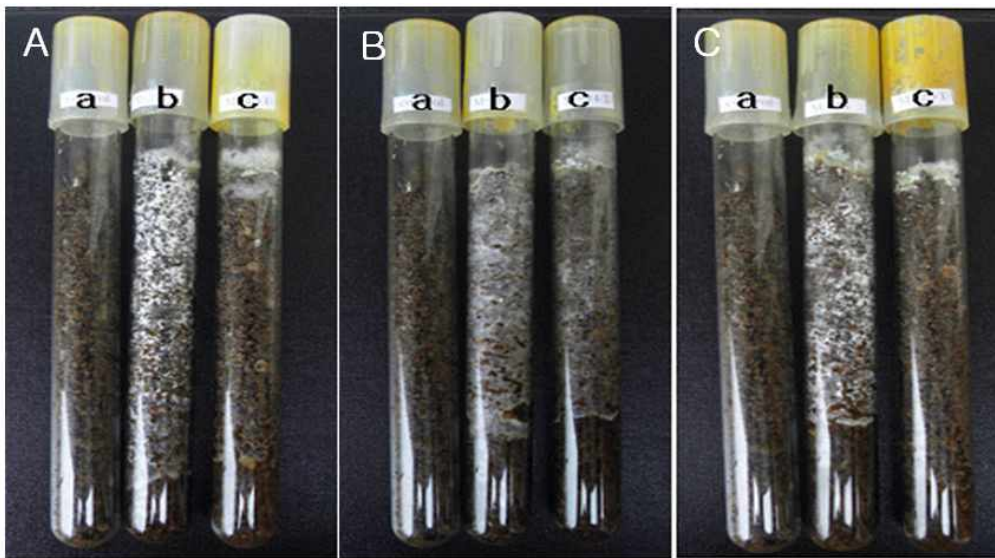


Fig. 7. Antifungal activities of *Bacillus* sp. HJ-57 against mushroom pathogens on the corn cob containing media. A: M-23, B: M-24, C: M-25. a: control, b: only mushroom pathogens, c: mushroom pathogens plus *Bacillus* sp. HJ-57 (1:1)

더 이상 이루어지지 않음을 확인하였다. 이상의 결과로 본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물은 버섯 질병균주인 세균 및 곰팡이의 생육억제에 효과적인 것으로 나타나 버섯재배에 매우 유용한 항균미생물인 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 농림수산식품평가원의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

Referneces

1. Berridge, V. A., Barranova, I. P. and Egorov, N. S. 1979. Nisin accumulation dynamic in a *Streptococcus lactis* culture. *Appl. Biochem. Microbiol.* **15**, 360-362.
2. Gerhardt, P. R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Sneath, G. B. 1981. Phillips manual of methods for general bacteriology. *Am Soc. Microbiol.* **35**, 144-150.
3. Healey, K. W. and Harvey, J. M. 1989. A biological control

- agent for the mushroom industry. Proceedings Eighth Aust. *Biotechnol. Conference* 322-324.
4. Hong, J. S. 1980. Nutrition value and medicine efficacy of mushroom. *Food Ind.* **53**, 79-84.
 5. Kawade, M., Sumiya, T., Shimura, K. and Ito, H. 1984. Activation of the reticulo-endothelial system by antitumor polysaccharide from *Agaricus blazei* iwade. *Med. Biol.* **109**, 299-302.
 6. Kim, B. K., Kwun, J. Y., Park, Y. I. and Choi, E. C. 1992. Antitumor components of the cultured mycelia of *Calvatia craniformis*. *J. Kor. Cancer Assoc.* **24**, 57-63.
 7. Kim, J. W., Kim, K. H. and Kang, H. J. 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*. *Kor. J. Plant Pathol.* **10**, 197-210.
 8. Kim, J. W., Kwon, S. I. and Kang, H. J. 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. *Kor. J. Plant Pathol.* **11**, 353-360.
 9. Kim, S. H., Kim, H. W., Choi, O. C. and Kim, B. K. 1993. Immunological studies on colluban isolated *Collubia confluens*. *J. Kor. Cancer Assoc.* **25**, 288-298.
 10. Kim, S. Y., Son, M. H., Ha, J. U. and Lee, S. C. 2003. Preparation and characterization of fried surimi gel containing king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 855-858.
 11. Lee, J. G. 1999. Mushroom diseases and protection strategies. *Mushroom* **3**, 31-41.
 12. Lee S. W., Ryu, H. S., Gal, S. W., Park, G. H., Kim, C. H. and Choi, Y. J. 2004. Isolation of antimicrobial substance by produced *Bacillus* sp. SD-10 with antagonistic activity towards mushroom pathogens. *J. Life Sci.* **14**, 467-471.
 13. Lee, S. S., Kim, S. K., Lee, T. S. and Lee, M. W. 1997. Cultivation of oyster mushroom using the garlic peel as an agricultural by-product. *Kor. J. Mycol.* **25**, 268-275.
 14. Nutkins, C. J., Mortishire-Smith, J. R., Packman, C. L., Brodey, L. C. and Rainey, B. P. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* paine. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2621-2627.
 15. Paine, S. G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushroom. *Ann. Appl. Biol.* **5**, 206-219.
 16. Park, W. P., Lee, S. C., Bae, S. M., Kim, J. H. and Lee, M. J. 2001. Effect of enoki mushroom (*Flammulina velutipes*) addition on the quality of *Kimchi* during fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 210-214.
 17. Ryu, J., Lee, G. J., Jung, G. T., Na, J. S., and Hwang, C. J. 1996. Study on the media development of *Pleurotus ostreatus* by waste cotton stuff. *Kor. J. Mycol.* **24**, 176-179.
 18. Seo, G. S. 2001. Mushroom pathogen and its protection. *Mushroom* **5**, 17-38.
 19. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins.
 20. Tolaas, A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushroom. *Phytopathology* **5**, 51-54
 21. Wells, J. M., Sapers, G. M., Felt, W. F., Butterfield, J. E., Jones, B., Bouzar, H. and Miller, F. C. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. *Phytopathology* **86**, 1098-1104.
 22. Yoshioka, Y., Tabeta, R. H., Saito, N. and Fukuoka, F. 1985. Antitumor polysaccharides from *P. ostrestus* (Fr.) Quel.: Isolation and structure of α -glucan. *Carbohydr. Res.* **140**, 92-100.

초록 : *Bacillus* sp. HJ 57에 의한 버섯 병원균주의 생육억제

서권일¹ · 갈상원² · 이성태³ · 박경욱⁴ · 이상원^{2*}

(¹순천대학교 식품영양학과, ²경남과학기술대학교 제약공학과, ³순천대학교 생물학과, ⁴에스엔제이바이오(주))

발효된 버섯배지 및 부엽토 등으로부터 80여 종의 균주를 1차 분리하여 CMCase, amylase 및 protease활성이 높고 버섯질병균주에 대한 항균활성이 높으면서 표고버섯 및 팽이버섯의 생육에는 전혀 영향을 미치지 않는 HJ-57 항균미생물을 최종 분리균주로 선정하였다. 최종 선정한 HJ-57 항균미생물을 동정한 결과 *Bacillus* sp. HJ-57로 밝혀졌으며, 배양을 위한 배지의 초기 pH는 pH 7, 배양온도는 35℃가 최적인 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. HJ-57균주는 12 hr 배양하였을 때는 약간의 항균활성을 나타내었지만, 배양 36~48 hr 배양하였을 때는 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. *Bacillus* sp. HJ-57 항균미생물은 팽이버섯 재배농가에서 사용하는 콘코프 함유배지 상에서도 버섯질병균주인 세균 및 곰팡이에 대하여 매우 높은 항균활성을 나타내었다.