버섯 세균성갈색무늬병원균(*Pseudomonas tolaasii*)의 독소 (tolaasin) 저해균 *Pseudomonas* sp. HC1의 대량배양을 위한 최적 배양조건

이찬중* · 유영미 · 한주연 · 전창성 · 정종천 · 문자원 · 공원식 · 사장선 · 한혜수¹ · 차재순²

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ¹흫살림, ²충북대학교 식물의학과

Cultivation conditions for mass production of detoxifying bacterium *Pseudomonas* sp. HC1 of tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*

Chan-Jung Lee*, Young-Mi Yoo, Ju-Yeon Han, Chang-Sung Jhune, Jong-Chun Cheong, Ji-Won Moon, Won-Sik Kong, Jang-Sun Suh, Hye-Su Han¹ and Jae-Soon Cha²

Mushroom Research Division, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea

¹Heuksalim, Cheongwon-gun, Chungbuk, 363-885, Korea

²Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACTS : Several bacteria are known as the causal agents of diseases of the cultivated button mushroom(*Agaricus bisporus*) and oyster mushroom(*Pleurotus ostreatus*). *Pseudomonas tolaasii* is the causal agent of brown blotch disease of commercial mushrooms. *Pseudomonas* sp. HC1 is a potent biological control agent to control brown blotch disease caused by *Pseudomonas tolaasii*. This can markedly reduce the level of extracellular toxins (i.e., tolaasins) produced by *Pseudomonas tolaasii*, the most destructive pathogen of cultivated mushrooms. To define the optimum conditions for the mass production of the *Pseudomonas* sp. HC1, we have investigated optimum culture conditions and effects of various nutrient source on the bacterial growth. The optimum initial pH and temperature were determined as pH 5.0 and 20°C, respectively. The optimal culture medium for the growth of tolaasin inhibitor bacterium was determined as follows: 0.9% dextrin, 1.5% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂HPO₄, 4mM FeCl₃, and 3.0% cysteine.

KEYWORDS : Mushrooms, Optimum culture, *Pseudomonas tolaasii*, Tolaasin

서 론

다양한 병원성 세균들이 양송이, 느타리, 팽이버섯 등에 갈 반병, 세균성무름병, 미이라병 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이들 세균으로는 *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas gingeri* 그리고 병원성 *Pseudomonas reactans* 등이 보고되었다(Wells *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1982; Young, 1970). 버섯에 발생하는 세균성갈색무늬병은 주로 버섯의 갓 부분에 갈색무늬를 형성하는 병으로서, 버섯의 수량감소 및 시장에서 상품가치를 떨어뜨리는 하나의 큰 원인이 되고 있다. 세균성갈색무늬병은 Tolaas (1915)에 의하여 처음으로 보고되었고, Paine

J. Mushrooms 2014 March, 12(1):35-40
http://dx.doi.org/10.14480/JM.2014.12.1.35
Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
© The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
E-mail : lchanj@korea.kr
Tel : +82-43-871-5711, Fax : +82-43-871-5702

Received March 3, 2014
Revised March 28, 2014
Accepted April 1, 2014

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(1919)에 의하여 *P. tolaasii*로 명명되었다. *P. tolaasii*는 느타리, 양송이, 표고버섯 등에 갈색무늬병을 일으키는 대표적인 버섯 병원균이다(Tsuneda *et al.*, 1995; Rainey *et al.*, 1992; Goor *et al.*, 1986). 분류학적으로 *P. tolaasii*는 버섯에서 분리되는 다양한 형광성 *Pseudomonas*종과 매우 유사하여, 생리적인 특성 및 영양요구성에 의한 방법으로는 뚜렷한 구분이 어렵다(Wells *et al.*, 1996; Goor *et al.*, 1986). 또한 *P. tolaasii*에 의한 갈색무늬 증상은 *P. gingeri*에 의해 발생하는 열은 갈색(yellow-brown)의 반점병인 ginger blotch disease와 유사한 특성을 가지고 있다(Cutri *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 1982). *P. tolaasii*는 tolaasin이라는 독소를 생산하여 세포 밖으로 분비하며 이 독소는 버섯 세포막에 유입되어 이온통로 형성과 물질이동 및 이에 따른 세포내 삼투압의 교란을 통한 세포막의 파괴, 조직의 괴사 등을 통하여 갈색무늬병을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Brodey *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1991; Cho and Kim, 2003) 이 독소는 병원균이 병을 일으키는데 필요한 가장 중요한 병원성 결정인자로 보고되었다(Brodey *et al.*, 1991; Nair and Fahy, 1973; Rainey *et al.*, 1991). Tolaasin은 아미노산 18개로 구성된 분자량 1,985 Da의 lipodepsipeptide로, N-말단이 β -hydroxyoctanoic acid와 acylation되어 있으며, C-말단의 lysine은 14번째의 threonine과 lactone을 형성하여 환상결합을 하고 있는 2차 대사산물임이 밝혀졌다(Nutkins *et al.*, 1991; Jourdan *et al.*, 2003).

이 병은 버섯의 생장온도 16°C와 습도 8090%에서 급격히 증식되어서 아민과 같은 세포의 독소를 형성하여 버섯 갓 부위에 갈색무늬병을 유발시킨다((Nair and Fahy, 1972). 갈색무늬병은 주로 버섯 수확전에 발생하지만 수확 후 낮은 온도에서 저장하는 중에도 발생한다. 병 발생의 예측이 매우 어렵고 병 발생 후에는 방제가 거의 불가능하며, 한번 발생하면 재배사 전체로 급격하게 전염되어 심한 경우에는 버섯을 전혀 수확하지 못하게 하는 경우도 있다(Kim *et al.*, 1994).

따라서 본 연구는 병원균이 분비하는 독소(tolaasin)를 저해하여 병의 발생을 억제하고 버섯 병해의 친환경적 방제를 위한 독소저해 미생물을 선발하여, 항균력 및 특성

을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양

세균성갈색무늬병원균 *P. tolaasii*가 분비하는 독소(tolaasin)를 저해하는 것으로 확인된 *Pseudomonas* sp. HC1 균주를 공시하였다(Lee *et al.*, 2013). 이하 모든 실험에서는 R2A배지(Reasoner and Geldreich, 1985)와 기본배지(Stanier *et al.*, 1966)를 이용하여 실험하였다.

배양적온

HC1 균주의 배양적온을 조사하기 위해 R2A 액체배지에 CH1 균주를 접종한 후 5°C에서 40°C까지 5°C 간격으로 조정된 진탕배양기(180 rpm, 24시간)에서 24시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 조사하면서 세균의 밀도를 측정하였다.

초기 pH의 영향

초기 pH에 따른 CH1 균주의 생육정도를 조사하기 위하여 R2A 액체배지를 1 N NaOH와 1N HCl을 이용하여 pH 3.0에서 pH 11까지 pH 1.0 간격으로 보정하고 진탕배양기(180 rpm, 28°C)에서 CH1를 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 조사하면서 세균의 밀도를 조사하였다.

영양원에 따른 독소저해균의 증식에 미치는 영향

독소저해균의 최적 배양조건을 조사하기 위하여 기본배지(Stanier *et al.*, 1966)에 탄소원 fructose 등 18종, 무기질소원 NH₄Cl 등 6종, 유기질소원 peptone 등 6종 그리고 아미노산 asparagine 등 11종을 각각 1%씩 첨가하였고, 무기염류 13종을 1 mM 농도로 첨가하여 각각에 대한 생육정도를 조사하였다. 또한 선발된 각각의 성분들에 대한 최적 농도를 조사하기 위하여 각각의 성분을 0.1%에서 4.0%까지 배지에 첨가하여 24시간동안 진탕배양(180 rpm, 28°C) 후 생육정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1. Effect of temperature and pH on the growth of *Pseudomonas* sp. HC1.

Fig. 2. Effect of carbon sources for the growth of *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium. 1: Fructose, 2: Galactose, 3: Saccharose, 4: Soluble starch, 5: Inositol, 6: Glycerol, 7: Xylose, 8: Dextrose, 9: Lactose, 10: Dextrine, 11: Na-CMC, 12: Adonitol, 13: Mannitol 14: Mannose, 15: Maltose, 16: Raffinose, 17: Cellobiose, 18: Ethanol, 19: Salicine.

Fig. 3. Effect of Dextrine concentration on the production of detoxifying substance by *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium.

온도와 pH에 따른 영향

저해균 HC1 균주의 최적 생육온도를 구명하기 위하여 다양한 온도에 실험을 실시하였다. 저해균을 5°C~45°C까지 5°C간격으로 생육정도를 조사한 결과 10°C에서 20°C까지 온도가 올라갈수록 생육 정도가 완만하게 증가하는 양상을 보였으나, 40°C 이상에서는 급격하게 생육이 저해되었다. 따라서 저해균 HC1 균주는 20°C에서 생육이 가장 좋았다. 저해균 HC1 균주의 생육에 미치는 pH의 효과를 검증하기 위하여 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11에서 생육정도를 조사한 결과, pH 4.0 이하에서는 균이 거의 생육하지 않았으며, pH 5.0에서 가장 생육이 양호하였고 pH가 올라갈수록 균의 생육은 점점 낮아졌다(Fig. 1). 따라서 HC1 균주의 최적 pH는 5.0으로 확인되었다(Fig. 1).

탄소원에 따른 영향

탄소원을 선별하기 위하여 fructose, galactose, saccharose, soluble starch, inositol 등 19가지의 탄소원을 기초배지에 각각 1%씩 첨가하여 20°C, 180 rpm으로 진탕배양하여 24시간 후 균주의 생육을 조사하였다. 그 결과 Dextrine을

Fig. 4. Effect of inorganic nitrogen sources for the growth of *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium. 1: NH₄Cl, 2: (COONH₄)₂, 3: NH₄H₂PO₄, 4: (NH₄)₂HPO₄, 5: NH₄NO₃, 6: NaNO₃, 7: (NH₄)₂SO₄.

Fig. 5. Effect of (NH₄)₂HPO₄ concentration of the production of detoxifying substance by *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium.

첨가한 배지에서 가장 높은 생육을 보였다(Fig. 2). Dextrine의 농도별로 균 생육정도를 조사한 결과 0.1~3.5%까지 완만한 생육을 보였고 3.5% 이상 농도에서는 균 생육이 저해되는 양상을 보였으며, Dextrine을 0.8% 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 좋았다(Fig. 3).

무기질소원에 따른 영향

무기질소원을 선별하기 위하여 NH₄Cl, (COONH₄)₂, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄을 기초배지에 각각 1%씩 첨가하여 20°C, 180 rpm으로 진탕배양하여 24시간 후 균주의 생육을 확인하였다. 그 결과 NaNO₃를 첨가한 배지에서는 균이 생육하지 못하였으며, 나머지 6종류의 무기질소원을 첨가한 배지에서는 균 생육이 비슷한 경향을 보였다. 이들 중 균 생육이 가장 높았던 (NH₄)₂HPO₄를 첨가한 배지를 선별하였다(Fig. 4). (NH₄)₂HPO₄의 최적농도를 선별하기 위하여 0.1~1.0% 농도에서 균 생육을 조사한 결과 0.1~0.5%까지 완만한 생장을 보였고 0.5% 이상 농도에서는 생육이 저해되는 경향을 보였다. 무기질소원 (NH₄)₂HPO₄을 0.5% 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 좋았다(Fig. 5).

유기질소원에 따른 영향

Fig. 6. Effect of organic nitrogen sources for the growth of *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium. 1: Peptone, 2: Soytone 3: Urea, 4: Casamino acid, 5: Tryptone, 6: Yeast extract, 7: Malt extract.

Fig. 7. Effect of Yeast extract concentration on the production of detoxifying substance by *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium.

유기질소원을 선별하기 위하여 Peptone, Soytone, Urea, Casamino acid, Tryptone, Yeast extract, Malt extract을 기초배지에 각각 1%씩 첨가하여 20°C, 180 rpm으로 진탕배양하여 24시간 후 HC1 균주의 생육을 확인하였다. 그 결과 다른 질소원에 비해 soytone과 yeast extract에서 균 생육이 빨랐다. 이들 중 균 생육이 가장 좋은 yeast extract을 첨가한 배지를 선별하였다(Fig. 6). Yeast extract의 최적농도를 선별하기 위하여 0.5~3.0% 농도에서 균 생육을 조사한 결과 0.5~1.5%까지 생육이 점점 높아왔고 1.5% 이상에서는 생육이 약간 저해가 되었으며, yeast extract를 1.5% 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 좋았다. 따라서 yeast extract를 1.5% 첨가한 배지를 유기질소원으로 선별하였다(Fig. 7).

아미노산에 따른 영향

아미노산을 선별하기 위하여 asparagin, methionone, proline, leucine 등 12가지 아미노산을 기초배지에 각각 1%씩 첨가하여 20°C, 180 rpm에서 진탕배양하여 24시간 후 HC1 균주의 생육을 확인하였다. 그 결과 methionine, leucine, valine, aspartic acid, glutamic acid, cysteine, threonine을 첨가한 배지에서는 균이 생육하지 못하였으며, arginine을 첨가한 배지에서 균생육이 가장 좋았다(Fig. 8). Arginine의 최적농도

Fig. 8. Effect of amino acid sources for the growth of *Pseudomonas* sp. CH1 in basal medium. 1: Asparagine, 2: Methionine, 3: Proline, 4: Leucine, 5: Glutamine, 6: Valine, 7: Aspartic acid, 8: Glutamic acid, 9: Arginine, 10: Histidine, 11: Cysteine, 12: Threonine.

Fig. 9. Effect of arginine concentration on the production of detoxifying substance by *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium.

Fig. 10. Effect of inorganic salts for the growth *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium. 1: KCl, 2: BaCl₂, 3: CaCl₂, 4: MgSO₄, 5: ZnSO₄, 6: FeSO₄, 7: AgNO₃, 8: Na₂MoO₄, 9: KH₂PO₄, 10: FeCl₃, 11: CoCl₂, 12: Li₂SO₄, 13: MnSO₄.

를 선별하기 위하여 0.1~1.5% 농도로 생육정도를 조사한 결과 0.1~0.5%까지 완전한 생장을 보였고 0.5% 이상에서는 생육이 저해되는 것을 확인하였으며, arginine을 0.5% 첨가하였을 때 균생육이 가장 높았다(Fig. 9).

무기염류에 따른 영향

Fig. 11. Effect of FeCl₃ concentration on the production of detoxifying substance by *Pseudomonas* sp. HC1 in basal medium.

무기염류를 선별하기 위하여 KCl, BaCl₂, CaCl₂, MgSO₄, ZnSO₄ 등 13가지 무기염류를 기초배지에 각각 1%씩 첨가하여 20°C, 180 rpm에서 진탕배양하여 24시간 후 HC1 균주의 생육을 확인하였다. 그 결과 FeCl₃을 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 높았다(Fig 10). FeCl₃의 최적농도를 선별하기 위하여 1~10 mM 농도별로 균의 생육을 확인하였을 때에는 1~10 mM까지 거의 비슷한 성장률을 보였고 이들 중 생육이 가장 좋은 4 mM을 무기염류 농도로 선별하였다(Fig. 11).

적 요

버섯 세균성갈색무늬병원균인 *Pseudomonas tolaasii*에 대한 독소저해균으로 보고된 *Pseudomonas* sp. HC1 균주의 배양적 특성과 최적 배양을 위한 대량배지를 선별하였다. HC1균주의 생육온도는 20~40°C, pH는 5.0~11.0까지 넓은 범위에서 왕성한 생육을 보였다. 대량배양을 위한 효율적인 영양원 선별을 위하여 기본배지에 탄소원 fructose 등 18종, 무기질소원 NH₄Cl 등 6종, 유기질소원 peptone 등 6종 그리고 아미노산 asparagine 등 11종을 각각 1%씩 첨가하였고, 무기염류 13종을 1 mM 농도로 첨가하여 각각에 대한 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 선별된 각각의 영양성분들에 대한 최적 농도를 조사하기 위하여 각각의 성분을 0.1%에서 4.0%까지 배지에 첨가하여 배양후 생육정도를 조사하였다. 그 결과, 대량배양을 위한 생육최적조건은 온도 20°C, pH5, 탄소원 0.9% dextrine, 유기질소원 1.5% yeast extract, 무기질소원 0.5% (NH₄)₂HPO₄, 아미노산 3.0% cysteine, 무기염류 4 mM FeCl₃에서 왕성한 생육을 보였다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 기관고유 연구과제(PJ010121032014)

에 의하여 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

- Brodey CL, Rainey PB, Teste M, Johnstone K. 1991. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol Plant-Microbe Interact.* 4:407-411.
- Cho KH, Kim YK. 2003. Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol Lett.* 221:221-226.
- Cutri SS, Macauley BJ, Roberts WP. 1984. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas 'gingeri'*. *J Appl Bacteriol.* 57:91-298.
- Goor M, Vantomme R, Swings J, Gillis M, Kersters K, de Ley J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *J Gen Microbiol.* 132:2249-2264.
- Jourdan F, Lazzaroni S, Mendes BL, Lo Cantore P, de Julio M, Amodeo P, Iacobellis NS, Evidente A, Motta A. 2003. A left-handed alpha-helix containing both L- and D-amino acids: the solution structure of the antimicrobial lipodepsipeptide tolaasin. *Proteins.* 52:534-543.
- Kim JW, Kim KH and Kang HJ. 1994. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom 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 (in Korean)
- Lee CJ, Yoo YM, Han JY, Jhune CS, Cheong JC, Moon JW, Suh JS, Han HS, Cha JS. 2013. Isolation of the Bacterium *Pseudomonas* sp. HC1 Effective in Inactivation of Tolaasin Produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Kor J Mycology.* 41:248-254.
- Nair NG, Fahy PC. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J Applied Bacteriology.* 35:439-442.
- Nair NG, Fahy PC. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Aust J biol Sci.* 26:509-512
- Nutkins JC, Mortishire-Smith RJ, Packman LC, Brodey CL, Rainey PB, Johnstone K, Williams DH. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J Am Chem Soc.* 113 : 2621-2627.
- Paine SG. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann Appl biol.* 5:206-219.
- Rainey PB, Brodey CL, Johnstone K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of cultivated mushroom. Pages 95-118 in: *Advances in Plant Pathology*, Vol. 8. Andrews JH and Tommerup I. eds. Academic Press, Inc., New York.
- Reasoner DJ, Geldreich EE. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol.* 49:1-7.
- Stainer RY, Palleroni NJ, Doudoroff M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J General Microbiol.* 43: 159-271.
- Tolaas AG. 1915. A Bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology.* 5:51-54

- Tsuneda A, Suyama K, Muradami S, Ohira I. 1995. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on Quercus logs. *Mycoscience*. 36:283-288.
- Wells JM, Sapers GM, Fett WF, Butterfield JE, Jones JB, Bouzar H, Miller FC. 1996. Postharvest discolorization of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. *Phytopathology*. 86:1098-1104.
- Wong WC, Fletche, JT, Unsworth BA, Preece TF. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J Appl Bacteriol*. 52:43-48.
- Young JM. 1970. Drippy gill: a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* n. sp. *NZJ Agr Res*. 13:977-990.