

Pseudomonas tolaasii 길항세균인 *Pseudomonas fluorescens*의 분리 및 배양

조 남 철 · 박 범 식 · 전 억 한

경희대학교 산업대학 식품가공학과

Identification and Cultivation of *Pseudomonas fluorescens* Antagonistic to *Pseudomonas tolaasii*

Nam Chul Cho, Bum Sik Park and Uck Han Chun

Department of Food Technology and Science, College of Industry Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens was selected from mushroom and studied in both batch and continuous culture in order to find out optimum conditions for cultivation. *P. fluorescens* is an aerobic bacterium and antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* which causes blotch disease on the mushroom cap. Cells of *P. fluorescens* were grown well on medium containing 30g/L of glucose, whereas the growth was inhibited with the glucose concentration at higher than 30g/L. The highest value of specific growth rate and productivity were obtained when using 10g/L of yeast extract. Optimum concentrations of NH_4Cl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for culture were found to be 1.0g/L and 0.1g/L respectively. Optimum concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ used as a sulfur source was 1.0g/L. It was also found that the cell concentrations were at the maximum level when grown on the medium containing 1.0g/L of KH_2PO_4 and 0.1g/L of CaCl_2 . Also, the optimum culture conditions were 30°C and pH 6.0. Cultivation of *P. fluorescens* at high initial dissolved oxygen(D. O) value led to a decrease of bacterial productivity in batch culture. Maximum productivity was achieved at 68 for the initial D. O value.

서 론

버섯의 높은 식품적 가치로 버섯소비량은 계속 증가하고 있다. 현재 우리나라 버섯농가의 가장 심각한 문제는 세균성 병충해이며, 이 중 특히 갈변병 유발 세균인 *Pseudomonas tolaasii*가 버섯 cap부위에 번식하여 느타리 및 송이버섯 총 생산량의 약 40-50%에 해당하는 손실을 미치고 있다. *P. tolaasii*는 혼합 비료, 퇴비 또는 버섯농장 주변에 자연적으로 존재하며(1), 특히 버섯의 성장조건인 18°C에서 급격히 증식되어 버섯 cap부위에 갈변병을 유발시킨다. 갈변병은 주로 버섯 수확 전에 발생하지만 수확 후 낮은 온도에서 저장하는 동안에도 발생하며, *P. tolaasii*가 생성하는 독소에 의하여 버섯의 cap조직이 함몰되거나 검은색의 얇은 조직으로 변화된다(2).

버섯농가에서는 버섯의 pathogen인 *P. tolaasii*세균을 사멸시키기 위해서 항생제를 투여하고 있으나 버섯조직을 배양하기 전에 살균하여도 비교적 내성이 강하여 재발생되며, 주위환경으로부터 재오염되어 control하기가 매우 어려울 뿐만 아니라 이는 버섯의 식품적 가치를 저하시킨다.

이러한 *P. tolaasii*세균에 대해 길항작용을 갖는 *Pseudomonas fluorescens*에 의하여 갈변병 예방에 대한 보고가 있으나(3), mechanism은 아직 확실하지 않다.

Pathogen과 길항세균 사이에 영양분에 대한 경쟁이 이루어져서 결국 pathogen이 사멸하거나, *P. fluorescens*세균이 생성하는 enzyme에 의해 *P. tolaasii*에 의해 생산된 독성물질이 분해된다는 보고가 있다(4).

본 연구에서는 *P. tolaasii*에 길항성을 갖는 세균을 선별하고 선별한 길항세균의 대량배양을 위한 최적 조건을 설정하였다.

재료 및 방법

사용 균주

*P. tolaasii*는 경기도 광주군 소재의 대한버섯연구소에서 갈변병이 발생한 느타리버섯에서 분리 채취하였고, *P. fluorescens*는 갈변병이 유발한 버섯에서 분리하여 Table 1의 media에서 배양한 후 배양액에 80% glycerol을 40:60으로 혼합한 다음 냉동고에 보관하여 사용하였다.

순수 분리 및 특성

갈변병이 발생한 느타리버섯의 cap부위를 증류수에 넣어 여러 차례 흔든 다음 여액을 PAF(5)에 접종하여 25°C에서 24시간 배양 후 colony주위에 흰색의 선이 생기는 *P. tolaasii*와 형광색의 *P. fluorescens*를 분리하였다. 이 때 PAF배지의 조성은 Bacto-trypton 10g/L, Bacto-proteose peptone No3 10g/L, dipotassium phosphate 1.5g/L, magnesium sulfate 1.5g/L, Bacto-agar 15g/L 그리고 Bacto-glycerol 10g/L였다.

*P. fluorescens*와 *P. tolaasii*의 특성을 조사하기 위하여 8% gelatin으로 gelatin liquefaction을, 1% Kovac's oxidase reagent로 oxidase test를 실시하였고, L-Arginine dihydrolase와 starch hydrolysis에 대한 조사는 Thornely's medium과 0.8% potato starch를 각각 함유한 배지를 이용하였다. 색소의 생성은 King's B medium(6)으로 관찰하였다. 또한 temperature sensitivity는 nutrient agar medium에서 40°C와 0-4°C에서 세포의 colony생성에 의해 조사하였고, pathogenesis test는 rapid pitting test(5, 7)의 방법으로 실온에서 버섯조각 표면에 browning형성의 유무로 판단하였으며, glucose, glycerol, fructose, sorbitol, inulin, gluconate, lactate, ethylene glycol, succinate등의 이용도를 측정하기 위하여 1.5%(w/v)의 agar에 1%(w/v)의 각각의 물질이 함유된 nutrient minimal media를 사용하였다.

분석 방법

i) Cell mass

배양액을 2-4시간 마다 5ml씩 채취하여 600nm

Table 1. Media composition for stock culture of *P. fluorescens* and *P. tolaasii*.

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

의 파장에서 Spectronic 20(Bausch & Lomb Co.)으로 optical density(O. D)를 측정하여 성장곡선을 그렸으며, O. D와 dry cell weight와의 관계에서 얻어진 표준곡선을 이용하여 균체량을 계산하였다.

ii) Glucose 측정

Glucose의 양은 HPLC(Waters model)에 Aminex HPX-87C column(Bio-Rad, Richmond, Calif. USA)을 연결하여 측정하였다.

세포 배양

*P. fluorescens*의 배양은 total volume이 2.0L인 fermentor(New Brunswick Scientific Co., Inc.)에 working volume을 1.5L로 하여 실시하였다.

결과 및 고찰

순수 분리 및 특성

Wong과 Preece의 방법(5)에 의해 *Pseudomonas* Agar배지(PAF배지, Difco)를 사용하여 *P. fluorescens*와 *P. tolaasii*를 순수분리하였다. 갈변병이 생긴 느타리버섯의 cap부위를 절단하여 증류수에 넣어 여러차례 흔든 후 여액을 PAF평판배지(5)에 접종하여 배양하여 colony주위에 흰색의 선을 띄는 *P. tolaasii*와 형광색의 푸른 Colony를 순수 분리하였다. *P. fluorescens*와 *P. tolaasii*의 특성을 Table 2에 정리하였다. *P. tolaasii*가 *P. fluorescens*보다 glucose, glycerol, fructose, sorbitol, inulin, succinate의 높은 이용도를 보였다.

배양조건

배지에는 균체의 에너지원으로 필요한 carbon source와 균체의 구조합성에 필요한 탄소, 질소, 마그네슘, 인, 황 등의 성분이 포함된다.

PAF 평판배지에서 screening한 *P. fluorescens*를 배양하여 각 영양소가 세포 성장에 미치는 영향을 조사하였으며, 온도, pH, 용존산소량 등의 반응조건에 따른 세포농도를 측정하여 *P. fluorescens*의 대량배양을 위한 최적의 배지조성과 반응조건을 산출하였다.

i) Glucose의 영향

기본배지에 glucose의 함량을 10, 20, 30, 40, 50g/L로 변화하여 *P. fluorescens*를 pH 5.0, 온도 30°C에서 배양한 결과 glucose의 함량이 30g/L일 때 가장 높은 세포농도를 얻었고, glucose농도가 30g/L이상일 때는 오히려 세포농도가 감소하였으며, 각각의 glucose농도에서의 productivity를 Fig. 1에 나타내었다. 30g/L의 glucose농도에서 최대의 productivity를 얻었으며, 비증식속도 역시 최대치를 얻었다 (Table 3).

ii) Yeast extract의 영향

Glucose의 함량을 30g/L로 고정하고 그 외의 배지조성은 기본배지를 기준으로 하여 yeast extract의 함량을 3g/L에서 10g/L로 변화시키면서 회분배양을 실시하였다. Fig. 2에 나타냈듯이 yeast extract의 함량이 10g/L일 때 *P. fluorescens*가 빠르게 성장하였다.

iii) 영양소의 영향

최적 배지조성을 위하여 여러 가지 영양소의 함량

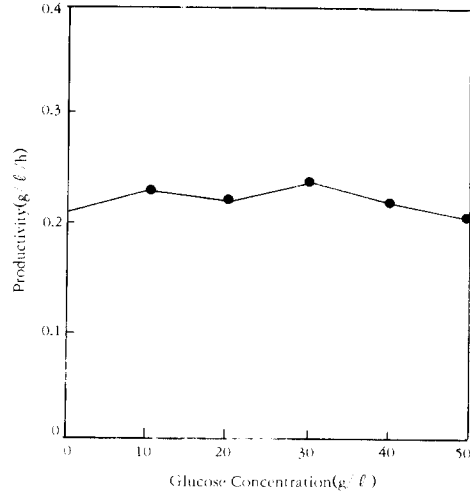


Fig. 1. Productivities of *P. fluorescens* on the various glucose concentrations at 30°C, pH 5.0.

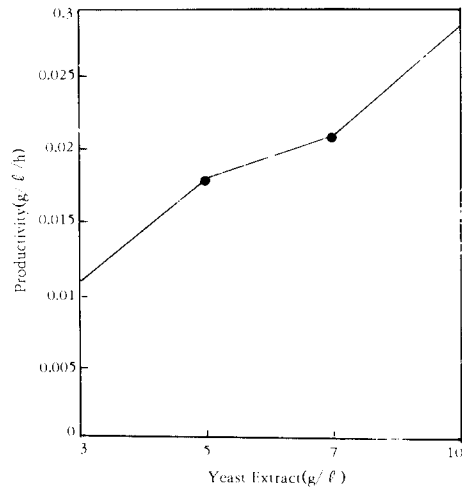


Fig. 2. Effect of yeast extract on the growth of *P. fluorescens*.

Table 2. Characteristics of *P. fluorescens* and *P. tolaasii*.

Characteristics	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. tolaasii</i>
Gelatin liquefaction	+	+
Oxidase test	-	+
L-Arginine dihydrolase	-	+
Starch hydrolysis	+	-
Pigment production	+	+
Temperature sensitivity(40°C)	-	-
Temperature sensitivity(0-4°C)	+	-
Rapid pitting test	-	+
Utilization of:		
glucose	+	++
glycerol	+	++
fructose	+	++
sorbitol	+	++
inulin	+	++
gluconate	-	-
lactate	-	-
ethylen glycol	-	+
succinate	+	++

Table 3. Specific growth rate(μ) of *P. fluorescens* on the various glucose concentrations at 30°C, pH 5.0.

Concentration of glucose(g/L)	Specific growth rate(h ⁻¹)
control	0.064
10	0.069
20	0.071
30	0.074
40	0.068
50	0.060

을 변화시킨 배지에 *P. fluorescens*를 배양하여 세포 성장에 미치는 영향을 조사하였다(Table 4). 균체의 구조합성에 필요한 질소원으로서 NH_4Cl 을 선택, 함량을 변화시켰을 때 1.0g/L에서 가장 높은 세포농도를 얻었으며, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 0.1g/L가 최적농도였다.

Sulfur source로서 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하였고, 1.0g/L이 최적농도로 나타났으며, 1.5g/L에서는 오히려 세포농도의 감소를 보였다. 또한 CaCl_2 의 최적농도는 0.1g/L였고, 역시 2.0g/L일 때는 오히려 세포농도가 감소하였으며, KH_2PO_4 의 최적농도는 1.0g/L임을 알 수 있었다.

iv) 온도의 영향

배양온도를 30℃에서 40℃까지 달리하면서 배양하여 온도가 세포의 성장에 미치는 영향을 알아본 결과 Fig. 3에서 보듯이 30℃와 35℃에서 세포농도가 가장 높게 나타났다.

v) pH의 영향

pH가 세포농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지금까지 실험결과 얻어진 최적 배지조성 및 조건에서 pH를 4에서 7까지 변화시켜 *P. fluorescens*를 배양한 결과 pH가 6.0일 때 세포농도가 가장 빨리 증가하였으며, Fig. 4에 균체 비증식속도와 생산성을 계산하여 나타내었다.

vi) 산소의 영향

지금까지의 실험에서 얻은 최적배지(Table 5)와 최적조건을 이용하여 *P. fluorescens*의 성장에 있어서 oxygen이 cell growth에 미치는 영향을 알아보기 위하여 발효조의 agitation speed를 200, 300, 500rpm으로 변화시켜 초기 D.O.를 각각 68, 89,

92에서 배양한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

초기 D.O.값을 92로 높였을 때는 lag phase가 약 8시간 지속되었고, 세포의 성장속도가 크게 둔화되었으며, 초기 D.O.값을 68로 감소시켰을 경우 lag phase가 아주 짧게 나타났다.

Onken(8)은 oxygen의 부분압이 240mbar에서 1150mbar로 증가할 때 비증식속도가 급격히 감소하였으며, oxygen부분압을 241mbar로 감소시켰을 때 정상적인 균체 비증식속도를 나타내었다고 보고하였다. 이는 *P. fluorescens*가 높은 초기 oxygen농도에서 성장저해를 받는다는 것을 의미한다.

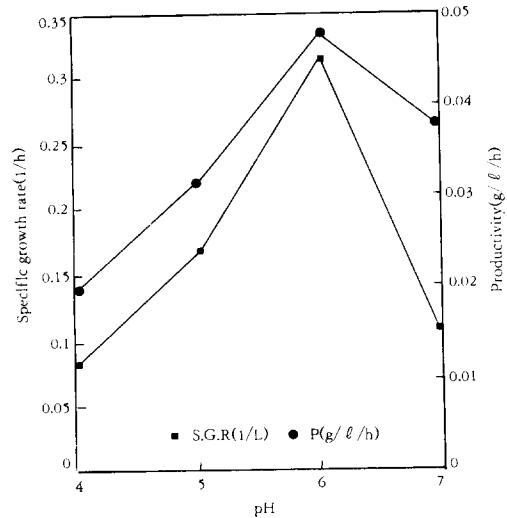


Fig. 4. Effect of pH on the growth of *P. fluorescens*.

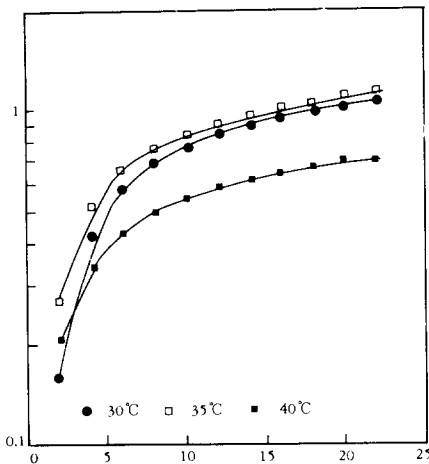


Fig. 3. Effect of temperature on the growth of *P. fluorescens*.

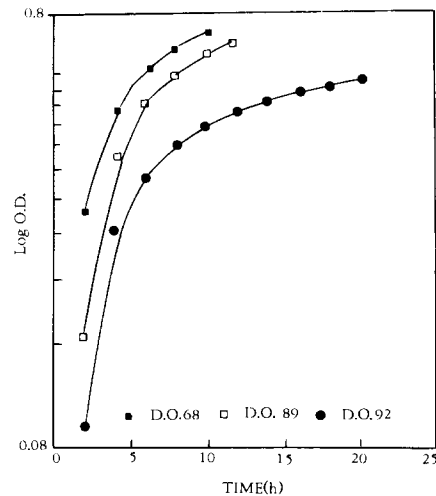


Fig. 5. Effect of D.O. value on the growth *P. fluorescens* at 30℃, pH 6.0.

Table 4. Effect of concentrations of various ingredients on the growth of *P. fluorescens* at 30°C, pH 5.0

Ingredients(g/L)	Specific growth rate(h ⁻¹)	Productivity(g/L/h)
MgSO₄ · 7H₂O		
0	0.130	0.036
0.5	0.115	0.038
1.0	0.130	0.045
2.0	0.103	0.037
CaCl₂		
0	0.073	0.039
0.05	0.088	0.043
0.1	0.125	0.044
0.2	0.088	0.042
NH₄Cl		
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
(NH₄)₂SO₄		
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
KH₂PO₄		
1.0	0.051	0.011
1.5	0.046	0.011

Table 5. The composition of optimum for batch culture of *P. fluorescens*.

Compenents	Concentration(g/L)
Glucose	30.0
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

요 약

버섯 갈변병 유발세균인 *P. tolaasii*에 길항성을 나타내는 *P. fluorescens*를 분리하였으며, 대량배양을 위하여 최적 배지조성 및 배양의 최적조건을 확립하였다. 세포성장에 있어서 carbon 및 energy source인 glucose의 경우 30g/L일 때 세포농도가 가장 높았으며, yeast extract의 농도가 10g/L까지 증가함에 따라 세포농도도 증가하였다. 질소원인 NH₄Cl과 (NH₄)₂SO₄는 각각 1.0g/L와 0.1g/L일 때 세포성장이 가장 좋게 나타났고, sulfur source인 MgSO₄ · 7H₂O의 최적농도는 1.0g/L였다. 그리고 KH₂PO₄와 CaCl₂는 각각 1.0g/L와 0.1g/L일 때 세포농도가 가장 좋았고, 온도 30°C, pH 6.0 그리고 초기 D. O를 68로 유지시켰을 때 세포성장이 가장 높았으며, 균체 비증식속도(μ)와 생산성도 높았다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업(91년도) 지원으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. W. C. Wong and T. F. Preece(1980). *J. Appl. Bacteriol.*, **49**, 304-305.
2. N. G. Nair and P. C. Fahy(1972). *J. Appl. Bacteriol.*, **35**, 439-442.
3. K. W. Healey and J. M. Harvey(1989). *Proceedings Eight Aust. Biotechnol. Conference*. 322-324.
4. N. G. Nair and P. C. Fahy(1973). *Aust. J. Biol. Sci.* **26**, 509-512.
5. W. C. Wong and T. F. Preece(1979). *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 401-407.
6. N. J. Palleroni(1984). *In Bergy's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 149-199. Edited by N. R. Krieg. Baltimore/London, Ontario: Williams & Wilkins.
7. M. Goor, R. Vantomme, S. Swings, M. Gillis, K. Kersters and J. Deley(1986). *J. Gene. Micro.*, **132**, 2249-2264.
8. U. Onken(1990). *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 983-989.