

# 냉장 저장 중인 청도반시에 발생한 곰팡이의 동정

방나래<sup>1</sup> · 하상오<sup>2</sup> · 김대호<sup>1</sup> · 김선화<sup>1</sup> · 홍승범<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립농업과학원 농업미생물과, <sup>2</sup>청도감와인주

## Identification of Fungi Isolated from Cheongdo-Banshi (flat persimmon) Stored in a Refrigerator

Narae Bang<sup>1</sup>, Sango Ha<sup>2</sup>, Dae-Ho Kim<sup>1</sup>, Seon-Hwa Kim<sup>1</sup> and Seung-Beom Hong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Korean Agricultural Culture Collection, Agricultural Microbiology Div. National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

<sup>2</sup>Cheongdo Persimmon Wine Co., Cheongdo 714-833, Korea

**ABSTRACT :** Nine strains of fungi which showed different colonies were isolated from Cheongdo-Banshi (flat persimmon) stored in a refrigerator. Based on morphological and molecular characteristics, they were identified as *Botrytis cinerea* (n=4), *Penicillium expansum* (n=2), and *Rhizopus delemar* (n=1). Of these, *B. cinerea* and *P. expansum* occurred frequently but *R. delemar* occurred rarely. This report of *P. expansum* and *R. delemar* on persimmon is the first time in Korea.

**KEYWORDS :** *Botrytis cinerea*, Flat persimmon, *Penicillium expansum*, *Rhizopus delemar*

### 서론

몇 년 전까지만 해도 애호가 중심이었던 국내의 와인 시장이 2011년 한국과 미국의 자유무역협정(FTA) 비준 이후에 웰빙(well-being) 열풍과 더불어 지속적으로 확산되고 대중화되면서 와인의 소비량이 매우 빠르게 성장하고 있는 추세이다[1]. 이에 국내에서도 와인 제조에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 감[2], 자두[3], 무화과[4] 등 우리 입맛에 맞는 과일을 활용한 와인이 생산되고 있다. 그 중 청도 반시는 특유의 높은 당도와 풍부한 비타민 A, B, C 및 무기질, 그리고 항산화 기능이 있는 phenolics를 다량 함유하고 있어 조직의 손상방지, 노화방지, 심혈관계질

환 예방, 항암효과를 나타내는 특성이 있을 뿐만 아니라, 기름기와 약간의 독성을 함유하고 있는 씨가 없어 이를 제거하는 제조공정을 줄일 수 있어 와인을 생산하는데 좋은 재료로 사용될 수 있다[5, 6].

일반적으로 곰팡이는 과일을 썩게 만들어 경제적 가치를 떨어뜨리지만 때로 곰팡이는 의외의 좋은 결과를 유발하기도 한다. 포도에 발생한 *Botrytis cinerea*에 의한 귀부현상(noble rot)이 대표적인 예이다. 이처럼 곰팡이는 식품을 부패시키는 유해한 면과 발효식품 제조 시 사용되는 유익한 면이 공존한다.

본 실험은 감 와인 제조에 사용되는 국내 재배 품종 반시의 냉장저장 중에 발생하는 곰팡이를 동정함으로써 반시 저장 중의 곰팡이 오염 대책을 마련하고 한편으로는 이들이 감 와인의 발효에 사용이 될 수 있는 지에 대한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

### 재료 및 방법

경북 청도감와인(주)으로부터 의뢰 받은 냉장저장 중인 청도 반시에 발생한 곰팡이를 핀셋으로 집어서 배지에 치상하는 직접분리법에 의하여 분리하였다. 직접분리법에는 Malt Extract Agar (MEA) [20]배지를 사용하였다[7]. 분리된 균주는 단포자 분리법으로 순수 분리하였으며, MEA 사면배지에 배양하여 4°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

Kor. J. Mycol. 2014 December, 42(4): 276-281  
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.276>  
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249  
 © The Korean Society of Mycology

\*Corresponding author  
 E-mail: funguy@korea.kr

Received November 6, 2014  
 Revised November 16, 2014  
 Accepted December 8, 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.

분리된 균주는 형태적 특성과 분자적 특성을 함께 조사하여 동정하였다. 분리 균주의 형태적 특성을 관찰하기 위해 포자현탁액을 *Penicillium*속의 균주는 MEA, Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Creatine Sucrose Agar (CREA) [20]배지에, *Botrytis*속의 균주는 MEA, Oatmeal Agar (OA), Dichloran Glycerol 18 % Agar (DG18) [20]배지에, *Rhizopus*속의 균주는 MEA, OA, DG18배지에 접종하여 25°C 항온기에서 7일간 배양한 뒤에 배지상에서의 균주 성장 모습과 MEA 배지에서 자란 균주의 광학현미경에 의한 구조를 관찰하였다.

분자적 동정을 위하여 분리된 균주를 Malt Extract Broth (MEB)에 접종하고 25°C에서 5일간 진탕배양하여 균사체를 수확하였다. 수확한 균사체는 동결건조 후에 마쇄하고 Dneasy Plant Mini Kit (QIAgen, Hilden, Germany; 69106)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. *Penicillium*속의 균주는  $\beta$ -tubulin영역을, *Botrytis*속의 균주는 RPB2 영역을, *Rhizopus*속의 균주는 rDNA-LSU영역을 증폭하였다.  $\beta$ -tubulin영역을 증폭하기 위하여 bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3')와 bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') 프라이머[7]를 사용하였고, RPB2 영역을 증폭하기 위하여 fRPB2-5F (5' GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG 3')와 RPB2-7R (5' CCC ATW GCY TGC TTM CCC AT 3') 프라이머[8]를 사용하였으며, rDNA-LSU 영역을 증폭하기 위하여 NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3')과 NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') 프라이머[9]를 사용하였다. 각 유전자 영역의 증폭을 위해서는 genomic DNA 1  $\mu$ L, 10X buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 3  $\mu$ L, 각각의 100 pM primer 0.4  $\mu$ L, 1.5 unit/ $\mu$ L Taq polymerase (SolGent Co., Ltd.) 0.3  $\mu$ L를 넣고 증류수로 최종량을 50  $\mu$ L로 하였다.  $\beta$ -tubulin PCR은 94°C에서 5분간 predenaturation시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 총 30회 반복하고 최종 72°C에서 6분간 extension을 수행하였다[7]. RPB2 PCR은 94°C에서 5분간 predenaturation시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension의 조건으로 총 35회 반복하고 최종 72°C에서 10분간 extension을 수행하였다[10]. rDNA-LSU PCR은 55°C에서 1분간 annealing의 조건으로 denaturation, annealing, extension의 과정을 35회 반복한 것 외에는  $\beta$ -tubulin PCR과 같은 조건으로 수행하였다[9]. PCR 증폭 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후에 PCR<sub>6</sub> Cleanup Plate (Millipore Corp., Bedford., MA 01730)로 정제한 뒤, Genotech (GENOTECH, Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열은 DNASTAR의 seqman 프로그램을 이용하여 편집한 후에 NCBI (National Center for Biotechnology Information) GeneBank의 염기서열을 획득하여 MEGA version

5.2.2의 Neighbor-Joining [11] 계통도를 작성하였다. 균주 간 거리는 Tamura-Nei 상수 거리계산 모델을 사용하였고 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다.

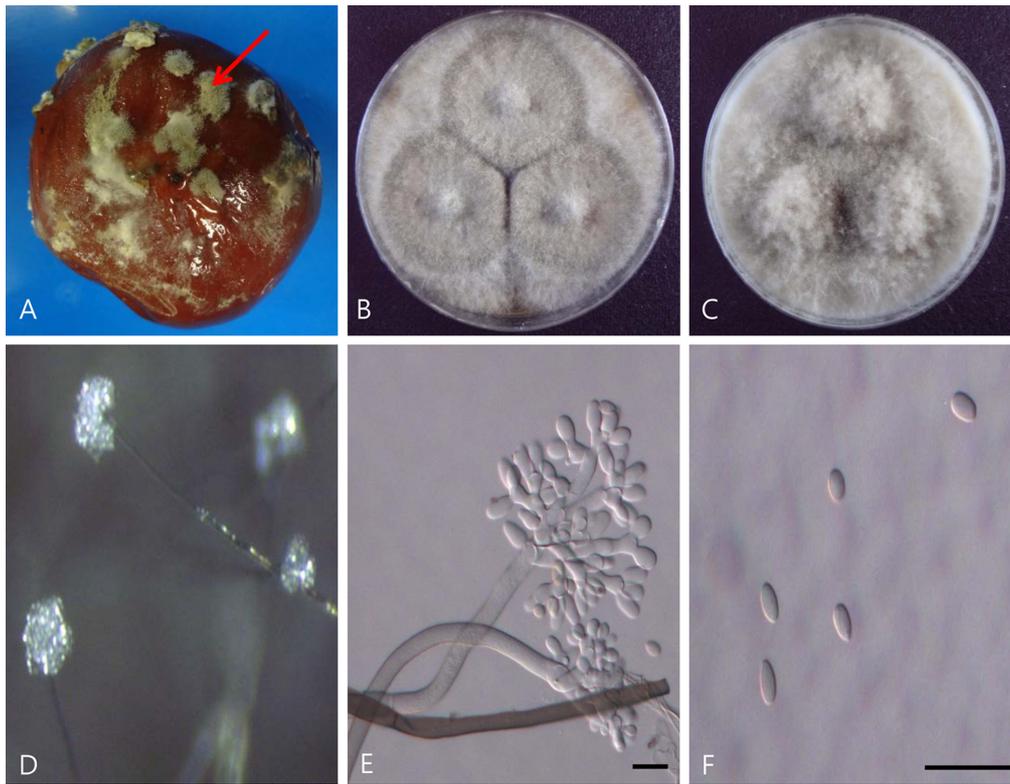
## 결과 및 고찰

냉장 저장 중인 반시로부터 서로 다른 모양으로 자란 7 균주의 곰팡이를 분리하고 이들을 MEA, CYA, OA, DG18에 접종하여 성장과 형태특성을 관찰한 바, 이들은 4균주는 *Botrytis* sp. (대표균주 KACC 47369), 2균주는 *Penicillium* sp. (대표균주 KACC 47368), 그리고 한 균주는 *Rhizopus* sp. (KACC 47370)로 추정되었다.

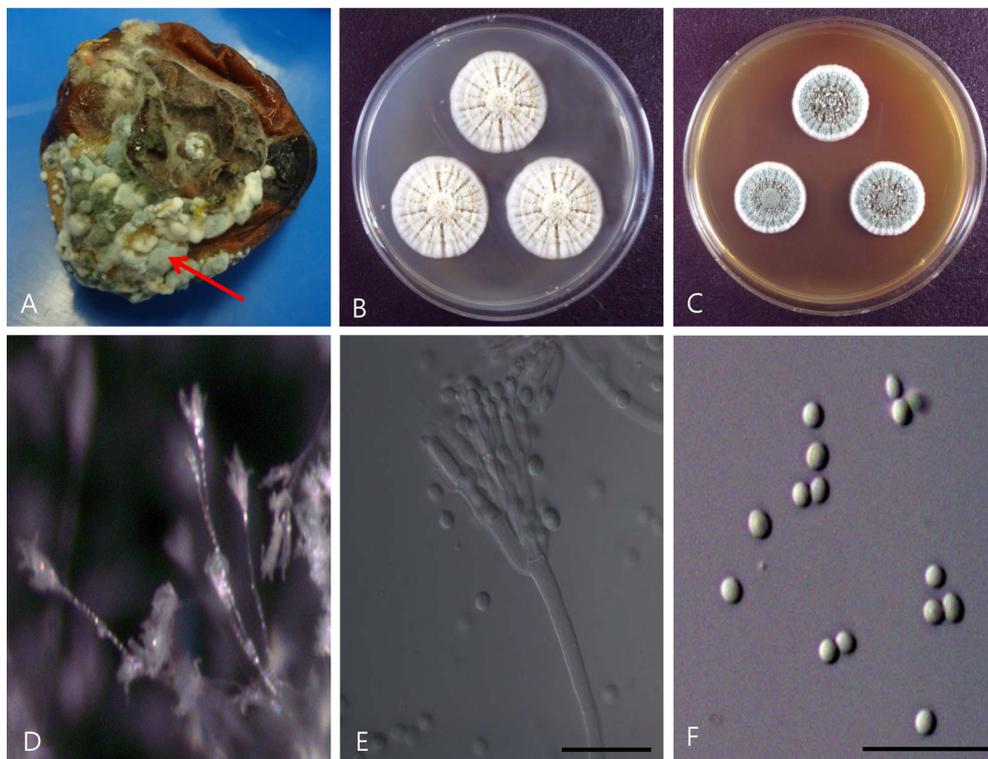
KACC 47369의 균사는 MEA배지에서 회색에서 암회색의 집락을 나타냈으며, 배양시간이 경과됨에 따라 검정색의 균핵을 형성하였다. 분생포자는 11.5-12.1  $\times$  7.5-9.2  $\mu$ m 크기로 타원형과 계란형으로 매끈한 형태를 나타내었다 (Fig. 1). 이는 Ellis 등[12]이 보고한 *Botrytis cinerea*의 균학적 특징과 일치하였고, RPB2 유전자 분석 결과도 *B. cinerea*와 같은 그룹 (Fig. 4A)을 형성하여, KACC 47369 균주는 *Botrytis cinerea* Pers.로 최종 동정되었다.

KACC 47368은 MEA배지에서 0, 4, 10, 15, 25°C에서 배양한 결과 0, 0.7 cm, 1.7 cm, 3 cm, 3.4 cm로 25°C에서 가장 잘 자랐으며, 4°C에서도 생육이 가능한 것을 확인하였다. 7일간 배양했을 때 CYA배지에서의 집락의 색깔은 cream yellow에서 배양시간이 경과됨에 따라 약간의 blue green을 나타냈으며, MEA배지에서는 blue green을 많이 나타내고 균사 끝부분은 white를 나타내었다. CYA배지에서의 reverse color는 brown의 중심부와 cream to yellow로 관찰되었으며 colony texture는 floccose에서 weakly fasciculate 하였다. 광학현미경을 통한 관찰 결과 Conidia는 크기가 3.4-4.1  $\times$  3.1-3.4  $\mu$ m로 타원형이었으며, Conidiophore는 terverticillate이었고 균사표면으로부터 대부분 형성되었다. Phialide는 플라스크모양으로 매끈하며 크기는 8.5-10.4  $\times$  2.5-3.4  $\mu$ m이며, metulae의 크기는 10.1-11.6  $\times$  3.4-4.5  $\mu$ m이었다. Rami는 1~2개의 그룹으로 되어 있었으며 그 크기는 11.4-12.5  $\times$  3.6-4.4  $\mu$ m이었고, Stipe는 격벽을 가진 형태로 매끄러운 형태를 나타내었다 (Fig. 2). 이는 Tzean 등 [13]이 보고한 *Penicillium expansum*의 균학적 특징과 일치하였으며,  $\beta$ -tubulin 유전자 분석 결과 *P. expansum* CBS 32548<sup>T</sup> 균주와 100% 상동성 (Fig. 4B)을 보여, KACC 47368 균주는 *Penicillium expansum* Link로 최종 동정되었다.

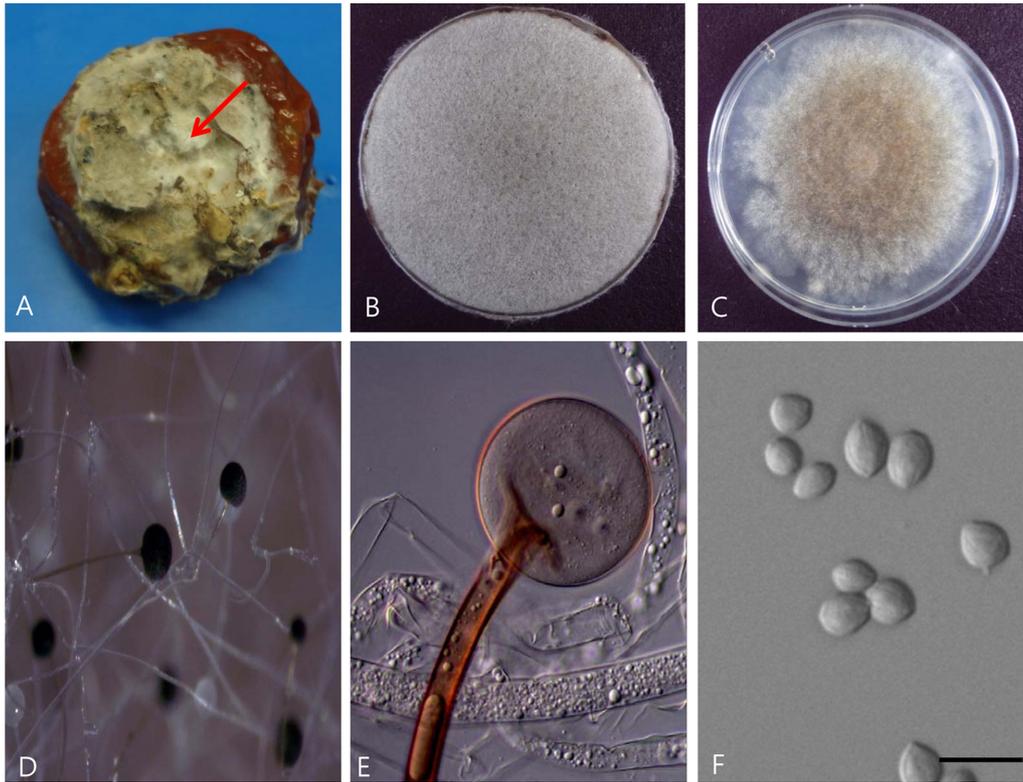
KACC 47370의 균사는 CYA와 MEA배지에서 배양 시 3 일만에 전체 Petri dish를 덮어버릴 만큼 생육이 빠르고 무 격벽균사로 포자낭경의 끝에 포자낭을 많이 형성하였다. 균사는 처음 white에서 배양시간이 경과됨에 따라 pale grey를 나타냈으며 뿌리모양의 가근을 형성하였다. 광학현미경 상에서 포자낭경과 포자낭은 갈색을 나타냈으며 포



**Fig. 1.** Morphological characteristics of *Botrytis cinerea* KACC 47369. A. Symptoms on persimmon, Colonies on MEA (B) and OA (C) for 7 days at 25°C, D. conidiophores by stereomicroscope, E. conidiophores, F. conidia, scale bar=20  $\mu$ m.



**Fig. 2.** Morphological characteristics of *Penicillium expansum* KACC 47368. A. Symptoms on persimmon, Colonies on CYA (B) and MEA (C) for 7 days at 25°C, D. Conidial heads by stereomicroscope, E. conidiophore, F. conidia. scale bar=20  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Morphological characteristics of *Rhizopus delemar* KACC 47370. A. Symptoms on persimmon, Colonies on MEA (B) and OA (C) for 7 days at 25°C, D. sporangiophores by stereomicroscope, E. collumella, F. sporangiospores. scale bar=20 μm.

자낭의 크기는 69.6-70.2 × 69.3-69.8 μm이었다. 포자낭포자는 7.1-7.8 × 5.4-5.6 μm의 크기로 표면에 세로로 길게 줄이 그어져 있는 주름이 진 형태(Fig. 3)로 *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar* 균주와 유사한 형태적 특징을 보였다. rDNA-LSU 유전자 분석 결과 *R. delemar* CBS 278.38 균주와 염기서열이 100% 일치(Fig. 4C)하고 *R. oryzae*와는 다소 차이를 보임으로써 KACC 47370 균주는 *Rhizopus delemar* (Boidin) Wehmer & Hanzawa로 최종 동정되었다.

냉장중인 청도 반시에서 가장 흔하게 발생된 *Botrytis cinerea*는 양면성이 있는 것으로 알려져 있다. 이는 채소류, 화훼류, 과수류 등에서 병을 일으키는 다범성 식물병원균으로 경제적으로 심각한 피해를 일으키는 반면[14], 포도에서는 과피에 붙어서 과피 왁스질을 분해하여 포도가 쉽게 건조될 수 있게 한다. 이때 이 균은 당분과 유기산을 일부 소모하지만 그 이상으로 수분이 증발하므로 결과적으로 과즙의 성분은 평소의 몇 배로 농축이 되어 와인의 풍미와 맛을 풍부하게 해주어 귀부와의 제조에 사용되기도 한다[15].

냉장 저장중인 반시에서 흔히 발견되었던 *Penicillium expansum*은 저장병 중 가장 흔하고 피해도 심하며 대부분의 과일의 상처를 통해 침입하며 운송, 저장 및 유통 중에 일어나는 부패에 관여[16]할 뿐만 아니라 신경독인 patulin과 신장 장해를 발생시키는 citrinin을 생산하는 곰팡이

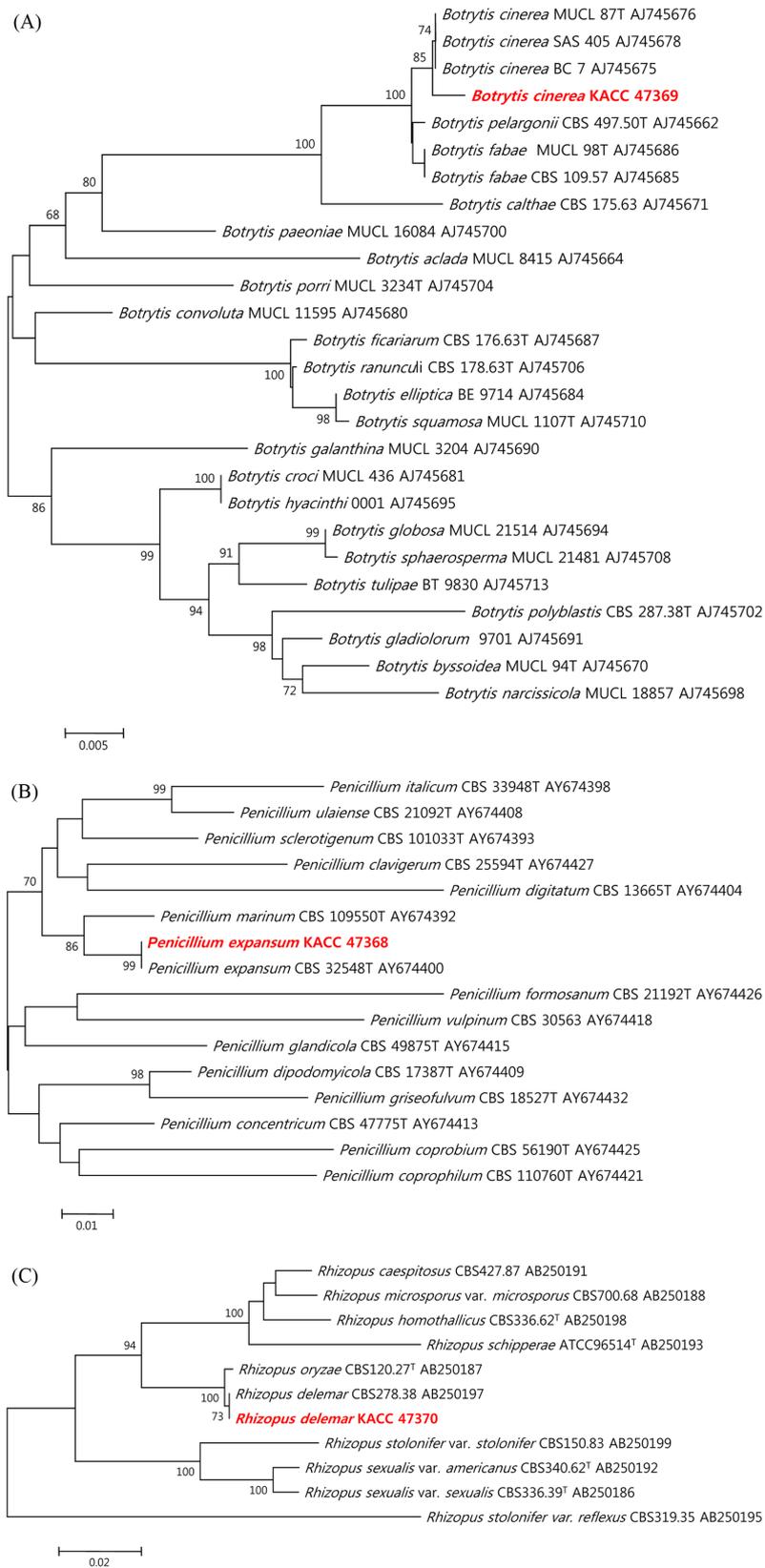
로 알려져 있어 주의가 요구된다[17]. 특히 patulin은 과일 주스의 비위생적인 관리의 척도로 이용되는 만큼 이 곰팡이의 적절한 방제와 오염된 과실을 사용하지 않는 품질관리가 중요하다[18].

*Rhizopus delemar*는 우리나라 전통누룩에서 흔히 분리되는 균으로 당과 단백질 분해력으로 매우 강한 것으로 알려져 발효산업에서 그 중요성이 주목되는 종이다[19].

이상의 결과로 볼 때에 냉장 저장중인 감에서 분리된 곰팡이는 기회와 주의사항을 동시에 제공하는 것으로 생각된다. *Botrytis cinerea*와 *Rhizopus delemar*는 산업적으로 활용이 가능한 균주를 선발하여 제어된 환경에서 이 균주를 활용할 수 있는 방안을 강구할 필요성이 있는 것으로 사료되는 반면에, patulin, citrinin 등의 독소를 생산할 가능성이 있는 *Penicillium expansum*은 이들의 발생 억제를 위한 주의와 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 적 요

냉장 저장 중에 있는 청도반시로부터 서로 다른 모양을 나타내는 곰팡이 7 균주를 분리하였다. 분리한 곰팡이를 형태적 특성과 분자적 특성에 근거하여 동정한 결과 이들은 *Botrytis cinerea* Pers. (4 균주), *Penicillium expansum* Link (2 균주), *Rhizopus delemar* (Boidin) Wehmer & Han-



**Fig. 4.** Phylogenetic trees depicting taxonomic positions of (A) *Botrytis cinerea* KACC 47369, (B) *Penicillium expansum* KACC 47368 and (C) *Rhizopus delemar* KACC 47370. The trees are based on Neighbor-joining analysis of (A) RPB2, (b)  $\beta$ -tubulin and (c) rDNA D1D2 gene sequences. Numbers at the nodes are bootstrap values greater than 60% (out of 1,000 bootstrap replication) and the subscript T after strain no. denotes type strain of the species.

zawa (1 균주)로 동정되었다. 이들 중에서는 *B. cinerea*와 *P. expansum*이 빈번하게 관찰되었고 *R. delamar*는 낮은 빈도로 발생하였다. *P. expansum*과 *R. delamar*는 국내의 감에서 아직 보고되지 않은 종이기에 본고에서 보고하고자 한다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구과제(과제번호: PJ00866601)의 일부 지원에 의하여 수행되었습니다.

### REFERENCES

- Han EJ, Lee SG. Wine market segmentation and its determinants by wine consumption types. *Kor J Tourism Hosp Res* 2013;27:157-71
- Joo OS, Kang ST, Jeong CH, Lim JW, Park YG, Cho KM. Manufacturing of the enhances antioxidative wine using a ripe Daebong persimmon (*Diospyros kaki* L.). *J Appl Biol Chem* 2011;54:126-34.
- Kwon DH, Choi WJ, Kim SH, Park DC, Kang BT. Antioxidant and antiviral activities of polyphenolics in plum wine. *Kor J Food Preserv* 2008;891-6.
- Jeong MR, Cha JD, Yun SI, Han JH, Lee YE. Manufacturing of wine with Korean figs (*Ficus carica* L.) and quality improvement by adding fig leaves. *J East Asian Soc Dietary Life* 2005;15:112-8.
- Achiwa Y, Hibasuzaki H, Iami K, Komiya T. Inhibitory effects of persimmon (*Diospyros kaki*) extract and related polyphenol compounds on growth of human lymphoid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;61:1099-101.
- Lee YR, Chung HS, Moon KD. Change in the polyphenol content of cheongdobansi persimmon fruit during development. *Kor J Food Preserv* 2011;18:13-7.
- Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for using with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1323-30.
- Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Mol Biol Evol* 1999;16:1799-808.
- Siti Hajar MD, Noorhisham TK, Nurina. Short technical communication yeast identification from domestic ragi for food fermentation by PCR method. *Int Food Res J* 2012;19:775-7.
- Martijn Staats, Peter van Baarlen, Jan AL, van Kan. Molecular Phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity; 2004
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-9.
- Ellis MB, Waller JM. *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). *CMI Desc. Pathog. Fungi Bact.* 1974; 431.
- Tzean SS. Taxonomic study of deuteromycotina and related teleomorphs in Taiwan. *Inst Bot Acad Sinica Monogr Ser* 1994; 14:203-14.
- Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR. The biology of *Botrytis*. Academic Press; 1980.
- Rosslensbroich HJ, Stuebler D. *Botrytis cinerea*-history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot* 2000;19:557-61.
- Agrios GN. Plant pathology. (5th ed.). Academic Press; 2005.
- Santos IM, Abrunhosa L, Venancio A, Lima N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. *Lett Appl Microbiol* 2002;35:272-5.
- Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. Springer; 2009.
- So MH, Lee YS. Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on production of saccharifying amylase during the preparation of rice koji. *Kor J Food Nutr* 2009;22:644-9.
- Samson RA, Houbraeken J, Thrane U, Frisvad JC, Anderson B. Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center; 2010.