

젯빛곰팡이병균에 대한 길항균 *Bacillus licheniformis* N1의 배양적 특성

이재필 · 문병주*

동아대학교 생명자원과학부

Cultural Characteristics of Antagonistic Bacterium, *Bacillus licheniformis* N1 against *Botrytis cinerea*

Jae-Pil Lee and Byung-Ju Moon*

Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

Abstract

This study was conducted to estimate the cultural characteristics, the production of antibiotic, and the selection of optimal media for mass culture for *Bacillus licheniformis* N1 isolate which was previously reported as an antagonistic bacterium to *Botrytis cinerea*. We investigated initial pH, temperatures and shaking speed for good cultural conditions and antibiotics production by N1 isolate. According to the results, the optimal conditions of initial pH, temperatures, and shaking speed were determined to be pH 5.0~5.5, 30~35°C, and 250 rpm, respectively. Also, the optimal conditions for the antagonism by N1 isolate highly appeared in the initial pH as 5.0, and the mycelial growth inhibition was high when the substances used such as glucose or corn starch as carbon sources, and biji (soybean curd residue) flour as a nitrogen source. Furthermore, inhibitory area was significantly expanded when 3% or 5% of corn starch was added into 5% of Biji flour medium. For the cheap and easy purchasing, corn starch as a carbon source and rice bran, soy flake, and biji flour as nitrogen source, were respectively selected for mass culture of N1 isolate. Among them, 5% Biji flour medium showed higher cell density more than 10 times that in NB medium after 48 hour incubation. Therefore, the optimal medium was determined as 5% biji flour added 3~5% of corn starch for high density of cells.

Key words – *Bacillus licheniformis* N1, Biji (soybean curd residue), corn starch.

서 론

Bacillus 속 균은 대부분이 인간에게 비병원성이고, 쉽게 유전자 조작이 가능하며 배양이 용이한 특성을 가지고 있다. 특히, 프로테아제, 아밀라제, 셀룰라제 등의 효소들을

많이 분비하므로 발효 산업에 이용되기도 한다. 더욱이, 내생포자가 형성되므로 오랜 기간 유지 및 보존이 용이하고 항생물질 생산과 내생포자 형성 등의 이유로 생물학적 방제의 재료로서 다른 균에 비해 광범위하게 이용되고 있다. 이중 생물학적 방제에는 *B. brevis*, *B. cereus*, *B. macerans*, *B. pumilis*, *B. subtilis* 등이 이용되었으며 특히, *B. subtilis*에 관한 연구가 가장 많이 보고되어 있다[4,11,17,18]. 그 외에도, *B. licheniformis*는 토양서식균으로서 주로 아밀라제 생성과 스

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: 051-200-7554, Fax: 051-200-6993
E-mail: bjmoon@mail.donga.ac.kr

펙탄트 등으로 산업에 주로 이용되고 있으며[3], 펩타이드성 항균물질을 생산하고[6,8,9] *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Magnaporthe* 속들과 같은 식물병원균류에 대한 억제 효과도 보고되었다[14]. 또한, 점액성 물질을 많이 생성함으로 잎, 꽃 그리고 열매에 처리할 때 다른 길항균보다 유리할 것으로 생각되나 국내, 외에서 *B. licheniformis*를 이용한 식물병원균의 생물학적 연구보고는 매우 미흡한 실정이다.

일반적으로, 곡물의 전분류는 저렴한 가격으로 미생물의 탄소원으로 많이 이용하지만, 전분을 직접 이용하지 못하는 미생물의 발효를 위해서는 당화시켜 발효기질로 사용하거나 병행발효법으로 발효한다. 그러나, *Bacillus* 속 균의 일부는 아밀라아제를 생성하여 전분을 분해하여 이용할 수 있다. 옥수수전분은 다른 전분에 비해 가격이 저렴하며 구하기가 쉽고, 당질이 약 88%로 양호한 탄소원이다. 한편, 콩가루, 대두박, 비지가루, 미강, 밀기울 등도 가격이 저렴한 질소원으로 미생물의 발효에 많이 사용되고 있다[7]. 본 실험에 공시한 비지는 두부와 두유를 만드는 과정에서 생성되는 부산물로서 단가 면에서 아주 저렴하고 영양분도 두유와 매우 유사하다. 보통 비지에는 수분이 77.4-88.0%, 단백질 3.9-7.2%, 지방 1.7-2.4%, 탄수화물 5.8-12.9% 그리고 미량원소 등이 함유되어 있어 양호한 발효기질이지만[10], 수분함량이 높아 부패하기 쉬워 보관과 저장의 문제로 대부분 폐기되고, 일부만이 동물 사료로 이용되고 있는 실정이다. 비지의 이용은 배지의 단가를 절감시킬 뿐 만 아니라, 폐기물 이용으로 환경 보호적 측면에서도 매우 유리할 것이다.

본 연구에서는 잿빛곰팡이병균, *Botrytis cinerea*의 길항균으로 보고된 *B. licheniformis* N1 균주[13]를 이용하여 미생물농약을 제조하기 위한 기초실험으로서, 대량배양을 목적으로 *B. licheniformis* N1 균주의 배양적 특성을 조사하고 가격이 저렴하면서 길항균의 생육에 우수한 기질을 선발하고자 실험하였다.

재료 및 방법

공시세균 및 배양

들깨 및 토마토 잿빛곰팡이병균, *Botrytis cinerea*의 균사생육, 분생포자 발아 및 발병 억제 효과가 높은 것으로 확인된 *Bacillus licheniformis* N1 균주를 공시하였다[13]. 이

하의 모든 실험에 NB (Nutrient broth)배지에서 160 rpm, 30℃, 16시간 배양한 N1 균주 2 ml 씩을 500 ml 삼각 플라스크에 200 ml씩 넣은 공시배지에 접종하였다.

탄소원

N1 균주의 배양에 가장 적합한 탄소원을 선발하기 위해 미생물의 생장에 우수한 포도당과 가격이 저렴한 편인 옥수수전분, 백설탕, 흑설탕, 노란설탕과 에탄올, 글리세롤, 유당, 과당, 맥아당, 정제한 자당(Sucrose)를 각각 1%씩 첨가하고, 질소원으로는 Yeast extract를 1% 첨가하여 30℃, 160 rpm의 진탕배양기에서 N1 균주를 배양한 후, 24, 48시간째에 배양액 2 ml를 채취하여 분광광도계로 660 nm에서 흡광도를 조사하여 세균 밀도를 비교하였다.

질소원

N1 균주의 배양에 우수한 질소원을 선발하기 위해 기존에 성장 효과가 우수하다고 보고된 콩가루와 가격이 저렴한 비지가루, 미강, 밀기울, 대두박, 두유, 카세인, 트립톤, Beef extract, Yeast extract, Malt extract 그리고 황산암모늄을 각각 1%씩 첨가하고, 탄소원으로는 옥수수전분을 2% 첨가하여 30℃, 160 rpm의 진탕배양기에서 N1 균주를 배양한 후, 24, 48, 120시간째에 배양액 2 ml를 채취하여 660 nm에서 흡광도를 조사하여 세균 밀도를 비교하였다.

배양적온

N1 균주의 배양적온을 조사하기 위해 25℃에서 35℃까지 5℃ 간격으로 조정된 진탕배양기 (160 rpm, 48시간)에서 NB 배지에 N1 균주를 배양하면서 24, 48시간째에 배양액을 2 ml 채취하여 660 nm에서 흡광도를 조사하여 세균의 밀도를 측정하였다. 또한, 30℃와 35℃에서 24시간 배양하면서 2시간 간격으로 배양액 2 ml를 채취하여 세균밀도의 변화를 흡광도 660 nm에서 조사하였다.

교반속도

N1 균주의 배양에 적합한 교반 속도를 조사하기 위해 100 rpm에서 250 rpm까지 50 rpm 간격으로 조정된 진탕배양기에서 NB 배지에 N1 균주를 각각 30℃와 35℃에서 배양하면서 20시간, 24시간 그리고 48시간 후의 배양액을 2 ml 채취하여 세균밀도를 흡광도 660 nm에서 조사하였다.

초기 pH의 영향

초기 pH에 따른 N1 균주의 생육 정도를 조사하기 위해 NB 배지와 2% 비지배지를 1N NaOH와 1N HCl를 이용하여 pH 5.0에서 pH 9.5까지 pH 0.5 간격으로 보정하고, 진탕배양기 (160 rpm, 30°C)에서 N1 균주를 48시간 배양하면서 24시간 간격으로 배양액을 각각 2 ml씩 채취하여 NB 배지는 10배 희석하고, 비지배지는 100배 희석하여 660 nm에서 흡광도를 조사하여 세균밀도를 비교하였다. 또한 세균 배양 말기의 배지내 pH의 변화를 조사하기 위해 배양 48시간째 pH를 각각 측정하였다.

항균물질 생산능

N1 균주의 항균물질 생산능은 초기 pH의 영향 실험, 탄소원 및 질소원 선발 실험, 다양한 기질 선발 실험 그리고 옥수수전분 첨가량에 따른 성장효과 실험과 함께 항균물질 생산능도 조사하였다. 각 배지에서 N1 균주를 48시간 배양 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 동량의 부탄올로 2회 추출하여 회전 진공 증발기에서 감압 건조하였다. 메탄올 0.5 ml로 물질을 완전히 용해시킨 다음, Paper disk (직경 8mm) 상에 60 µl씩 처리하고 자연건조하였다. 항균물질이 처리된 Paper disk를 PDA 배지에서 25°C로 7일 간 배양한 *B. cinerea* 균총 절편과 대치배양하고, 25°C의 배양기에서 5일간 배양한 후, 저지대의 크기를 조사하여 항균물질의 생산 능력을 조사하였다. 대조구로 메탄올 60 µl만을 처리한 Paper disk를 대치배양하였다.

배양기질 선발

가격이 저렴한 기질인 미강, 대두박, 비지가루, 밀기울과 단술, 어묵, 간장생산 부산물, 사과껍질, 오렌지껍질, 쌀가루, 콩깻묵, 맥아, 볶짚을 각각 5% 첨가한 배지와 이들 배지에 각각 2% 옥수수전분을 첨가하여 만든 배지에 N1 균주를 접종하고 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에서 48시간 배양하여 세균 밀도를 10단계 희석법으로 조사하였다. 수분을 함유하고 있는 기질들은 60°C에서 24시간 건조한 후, 브랜드로 분쇄하여 사용하였다. 간장생산부산물은 간장을 제조하고 남은 찌꺼기를 사용하였고, 어묵은 생선혼합물을 사용하였다.

옥수수전분의 첨가량에 따른 성장효과

탄소원인 옥수수전분의 첨가량에 따른 세균의 성장 정

도를 조사하기 위해 5% 비지배지 200 ml에 옥수수전분을 각각 1, 3, 5%씩 첨가한 것과 Soluble starch 3%, 포도당 3%를 각각 첨가하여 진탕배양기 (30°C, 160 rpm)에서 N1 균주를 배양한 후, 24, 48시간째에 배양액을 2 ml 채취하여 10배와 100배로 희석하여 세균 밀도를 흡광도 660 nm에서 조사하였다.

결 과

탄소원

탄소원을 달리하여 *B. licheniformis* N1 균주를 배양한 결과(Fig. 1.A), 24시간째에서는 흑설탕, 과당, 노란설탕, 옥수

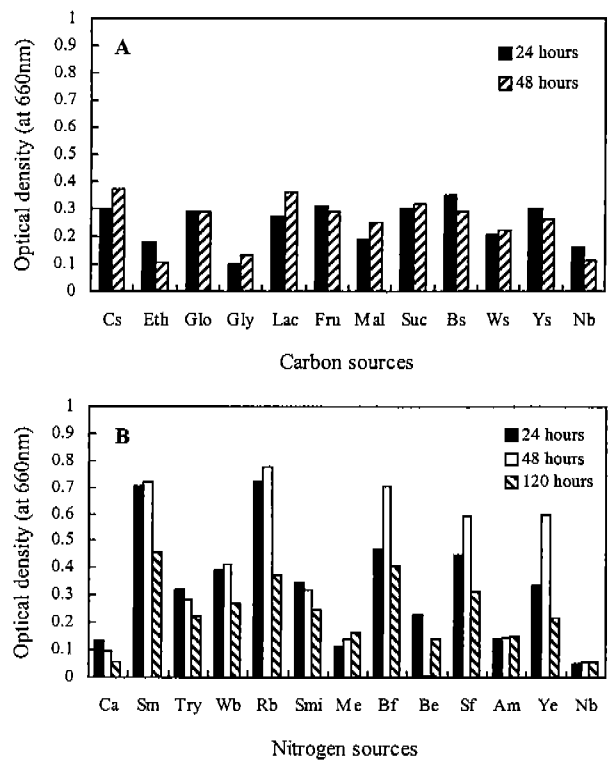


Fig. 1. Effects of carbon sources (A) and nitrogen sources (B) for cell growth of *B. licheniformis* N1 at 30°C, 160 rpm.

Cs: Corn starch; Eth: Ethanol; Glo: Glucose; Gly: Glycerol; Lac: Lactose; Fru: Fructose; Mal: Maltose; Suc: Sucrose; Bs: Black sugar; Ws: White sugar; Ys: Yellow sugar; Nb: Nutrient broth; Ca: Casein; Sm: Soy meal; Try: Tryptone; Wb: Wheat bran; Rb: Rice bran; Smi: Soy milk; Me: Malt extract; Bf: Biji flour; Be: Beef extract; Sf: Soy flake; Am: (NH₄)₂SO₄; Ye: Yeast extract; Nb: Nutrient broth

수전분, 정제사당(sucrose)을 첨가한 배지에서 균의 생장이 좋았고, 48시간 배양에서는 옥수수전분과 유당에서 생장이 높았으며, 정제사당과 흑설탕, 노란설탕에서도 비교적 균의 생장이 양호하였다. 따라서, 염가이면서 탄소원으로서는 길항균의 생육에 효과가 높은 옥수수전분을 우수한 탄소원으로 선발하였다.

질소원

질소원을 달리하여 N1 균주를 배양한 결과(Fig. 1,B), 24시간배에서는 미강, 콩가루를 첨가한 배지에서 균의 생장이 좋았고, 48시간 배양에서는 미강, 콩가루, 비지가루와 대두박, yeast extract에서 균의 생장이 좋았다. 120시간 배양에서도 역시 콩가루, 비지가루, 미강, 대두박에서 균의 생장이 높았다. 하지만, 콩가루는 비지가루와 미강보다는 가격이 약간 비싸고, 48시간 이상 배양에서 세균 성장에 큰 차이를 보이지 않아 질소원으로 염가인 미강과 비지가루를 선발하였다.

배양적온

N1 균주의 생육 적온을 구명하기 위하여 24시간 배양과 48시간 배양으로 나누어 조사한 결과, 24시간 배양과 48시간 배양 모두 30℃와 35℃에서의 균 생육에는 별 차이가 없었다(Fig. 2,A). 따라서, 이를 30℃와 35℃에서 2시간 간격으로 시간별로 조사한 결과, 30℃와 35℃에서 모두 10시간까지는 세균의 밀도가 비슷하게 증가하였으나, 10시간 이후부터는 30℃에서는 24시간까지 완만하게 증가되지만, 35℃에서는 급격히 증가하여 20시간째에 최고의 생육을 보여 주었다. 하지만, 22시간째에 다시 급격히 감소하여 30℃와 유사한 결과를 보여 주었다(Fig. 2,B). N1 균주는 30~35℃ 사이에서 가장 배양이 잘 되었음을 알 수 있었다.

교반속도

N1 균주를 NB 배지에 배양하면서 교반속도를 온도와 시간별로 달리하여 세균의 밀도를 조사한 결과, 30℃와 35℃를 비교하여 보면 35℃에서 훨씬 균의 생장이 좋았으며, 시간별로 나누어 20, 24, 48시간 배양할 경우, 모두 교반속도가 100 rpm에서 250 rpm으로 증가할 경우 세균밀도도 증가하는 경향이였다(Table 1). 그러나, 본 실험에서는 일반적인 배양속도인 160 rpm을 정하여 모든 실험에 이용하였다.

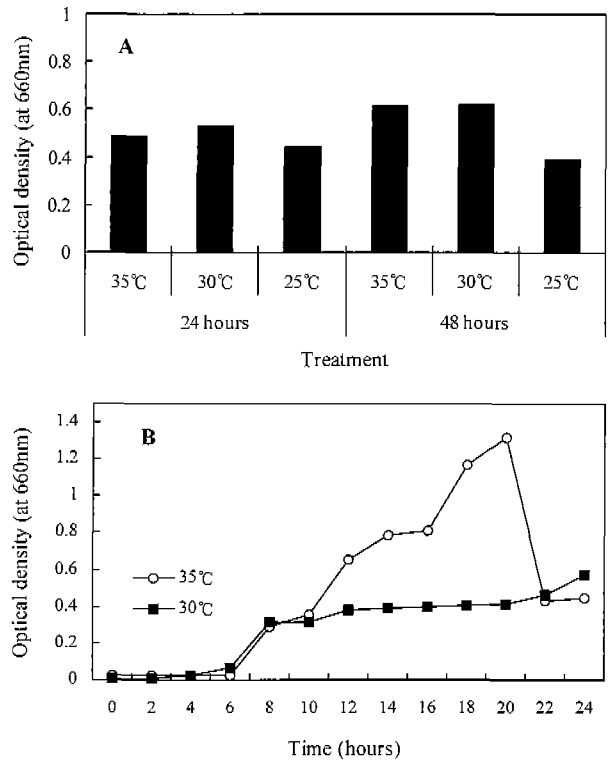


Fig. 2. Cell growth of *B. licheniformis* N1 strain at 25℃, 30℃, and 35℃ (A) and time course of *B. licheniformis* N1 strain at 30℃ and 35℃ in NB (Nutrient broth) medium (B).

Table 1. Effects of shaking speed on the growth of *Bacillus licheniformis* N1 for 48 hours at 30℃ and 35℃

Incubation time (hours)	Optical density (at 660nm)							
	Shaking speed (rpm)							
	100		150		200		250	
	30℃	35℃	30℃	35℃	30℃	35℃	30℃	35℃
20	0.36	1.32	0.40	1.34	0.44	1.32	0.47	1.31
24	0.39	1.30	0.41	1.31	0.45	1.36	0.50	1.41
48	0.89	0.59	1.23	0.62	1.27	0.65	1.28	0.71

초기 pH의 영향

N1 균주를 NB 배지에서 24시간 배양하였을 경우, 세균 밀도는 초기 pH를 5.0으로 보정 하였을 때가 세균밀도가 가장 높았고, 48시간 배양에서는 초기 pH를 5.5로 보정하였을 때가 가장 높았다. 또한, 세균 밀도를 높여 주는 기질로 선발되었던 비지배지에서는 24, 48시간 배양 시 모두 초

Table 2. Effects of initial pH on the cell growth of *Bacillus licheniformis* N1 in NB and Biji medium and inhibition zone on PDA medium

Initial pH	Optical density (at 660nm)						Inhibition zone (mm) ^d
	NB medium			Biji medium			
	Incubation time (hours)		Final pH ^a	Incubation time (hours)		Final pH	
24	48	24		48			
5.0	0.12 ^b	0.03	6.63	0.24 ^c	0.50	6.58	150
5.5	0.08	0.09	7.15	0.12	0.39	6.51	124
6.0	0.07	0.02	7.26	0.04	0.27	6.53	113
6.5	0.05	0.02	7.30	0.10	0.08	6.60	110
7.0	0.06	0.02	7.39	0.05	0.25	6.11	100
7.5	0.06	0.02	7.35	0.17	0.10	6.61	94
8.0	0.05	0.01	7.35	0.04	0.33	5.74	-
8.5	0.05	0.02	7.58	0.05	0.26	5.75	-
9.0	0.07	0.02	7.49	0.13	0.36	5.69	-
9.5	0.06	0.03	7.45	0.19	0.32	5.33	-

^aFinal pH was measured in medium after 48 hours.

^bSamples in NB medium were diluted to 10 times.

^cSamples in Biji medium were diluted to 100 times.

^dGrowth inhibition was determined after 7 days at 25°C on PDA medium.

기 pH를 5.0으로 보정하였을 경우, 세균밀도가 가장 높은 결과를 보여 주었다(Table 2). 48시간 후의 배지내 pH의 변화는 NB 배지에서는 pH 6.6에서 7.5로 증가되었으나, 비지 배지에서는 pH 6.5에서 pH 5.3으로 산성화되는 경향을 보여주었다(Table 2).

항균물질 생산능

pH에 따른 N1 균주의 항균물질의 생산능에 의한 젯빛곰팡이병균의 균사생육 저지대는 초기 pH가 5.0 일때가 가장 높았고, pH가 높을수록 저지대는 감소하였다(Table 2). 반면, 탄소원과 질소원에 따른 항균물질 생산은 탄소원으로 포도당에서 가장 높았고 옥수수전분에서도 높았으며, 질소원으로는 비지가루를 이용하였을 때가 가장 높았다(Table 3). 또한, 5% 비지배지에 옥수수전분 5%를 첨가할 경우, 항진균물질에 의한 저지대가 가장 높았으며, 다음은 3%로서 5% 비지배지 단독 또는 여기에 3% 포도당이나 soluble starch를 첨가한 경우보다 높았다(Table 5).

배양기질 선발

여러 가지 다양한 기질에 N1 균주의 세균밀도를 증가시

Table 3. Effects of various carbon and nitrogen sources on the antibiotics production^a of *B. licheniformis* N1 after 48 hours incubation

Carbon source	Inhibition zone(mm)	Nitrogen source	Inhibition zone(mm)
Glucose	105	(NH ₄) ₂ SO ₄	-
Fructose	-	Soybean flour	122
Lactose	98	Casein	98
Maltose	-	Tryptone	97
Sucrose	-	Beef extract	92
Corn starch	97	Malt extract	-
Ethanol	92	Yeast extract	106
Glycerol	-	Soy flake	102
White sugar	-	Biji flour	124
Black sugar	-	Soy milk	-
Yellow sugar	-	Wheat bran	96
Nutrient broth	95	Rice bran	125

^aAntibiotics production was determined by inhibition zone on PDA after 5 days dual incubation.

키는 옥수수전분을 2%로 첨가하여 배양한 배지와 첨가하지 않고 배양한 배지로 나누어, 그 기질들의 효과를 조사해

Table 4. Effects of various substrates with or without corn starch on the cell growth of *B. licheniformis* N1

Substrates (5%)	Cell density ($\times 10^8$ cfu/ml) ^a	
	Substrate only	Substrate with 2% corn starch
Fish meal	9.0	9.9
Sweet rice drink	4.0	5.3
Soy sauce residue	0.1	0.1
Apple peel	0.1	0.2
Orange peel	0.1	0.1
Rice flour	3.6	5.2
Rice bran	4.8	8.8
Wheat bran	8.0	5.2
Soy flake	7.5	8.3
Sesame oil cake	4.8	5.2
Malt	7.3	9.4
Rice straw	2.5	2.4
Biji flour	11.9	13.2
NB medium	0.9	1.2

^aCell density was measured by colony count on a Nutrient agar plate after dilution with sterilized water

보았다. 그 결과, 옥수수전분을 첨가하지 않았을 경우, 비지가루, 어묵, 미강, 대두박, 맥아의 순으로 세균 밀도가 높았으며, 여기에 옥수수전분을 첨가할 경우, 세균 밀도가 현저하게 증가되었는데 비지가루, 어묵, 밀기울, 대두박, 맥아 순으로 세균 밀도가 높았다. 기질에 옥수수전분을 첨가하면 전반적으로 세균의 밀도가 증가하는 경향이었는데, NB 배지와 미강에서 세균 밀도수는 약 2배 정도로 증가하였다.

가장 높은 N1 균주의 밀도를 보인 우수한 기질은 비지배지나 비지배지에 옥수수전분을 첨가한 배지이었다(Table 4).

옥수수전분의 첨가량에 따른 성장효과

비지배지나 기타 기질에 2% 옥수수전분을 첨가할 경우 N1 균주의 밀도 증가 효과가 확인되었으므로, 5% 비지배지에 옥수수전분 농도에 따른 N1 균주의 밀도를 조사한 결과, 5% 비지배지에 옥수수전분을 1, 3, 5% 첨가할 경우 농도가 높을수록 N1 균주의 밀도도 증가되었으며 5% 비지배지 단독 또는 여기에 3% 포도당이나 soluble starch를 첨가할 경우보다도 높았다(Table 5).

고 찰

본 실험에서는 각종 작물에 발생하는 *B. cinerea*의 방제에 우수한 효과를 나타낸 길항세균인 *B. licheniformis* N1 균주의 생물농약 제조를 위한 대량배양의 기초 자료를 얻기 위해 본 실험들을 수행하였다. 일부 연구자들의 *B. licheniformis*의 항진균성 물질에 관한 보고와 균주를 작물에 직접 처리하여 효과를 얻었다는 보고가 있으나[8,14], 구체적인 적용 사례가 적고, *B. licheniformis*를 이용한 *B. cinerea* 방제에 관한 보고는 없으며, 대부분의 생물학적 방제에는 *B. subtilis*가 많이 이용되었다[11]. 본 실험실에서 공시된 *B. licheniformis* N1 균주는 토마토 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제효과에 있어서 토양에서 분리한 *B. subtilis* 보다 효과가 높은 것으로 확인된 바가 있다[계재 예정].

Table 5. Effects of addition of corn starch on the cell growth of *Bacillus licheniformis* N1 strain

5% Biji with	Optical density (at 660nm)				
	24 hours		48 hours		Inhibition zone (mm) ^a
	10 times dilution	100 times dilution	10 times dilution	100 times dilution	
Corn starch 1%	1.09	0.19	1.05	0.13	87.4
3%	1.24	0.23	1.13	0.41	136.2
5%	1.26	0.34	1.34	0.28	164.2
Glucose 3%	0.56	0.12	0.85	0.15	112.8
Soluble starch 3%	0.56	0.10	0.45	0.04	100.6
Only Biji 5%	0.57	0.12	0.97	0.17	92.4

^aGrowth inhibition was determined after 5 days at 25°C on PDA medium.

본 실험에 이용된 N1 균주는 30℃에서는 35℃보다 초기 생육이 느렸으나, 24시간 이상 배양하면 두 온도 범위에서 세균밀도는 유사하여 N1 균주의 배양적온은 30~35℃로 판단되었으며, 최적 pH는 5.0~5.5로서 약간 낮은 편이었는데 이러한 배양적 특성은 타 연구자들의 배양적온은 30~50℃보다는 다소 낮은 편이었다[14,15,21]. 이는 균주에 따라서 42℃ 또는 50℃가 생육적온이라는 보고도 있어서[12], *B. licheniformis*는 균주에 따라 적은 범위의 차이가 큰 것으로 판단되었다.

일반적인 미생물의 발효공정에는 탄소원으로 옥수수전분, 맥아 등의 탄수화물이, 질소원으로는 단백질성 질소원인 옥수수 침출액, 콩가루, 생선가루, 효모 추출물 등이 많이 사용되고 있다[7]. *Bacillus* 속 균의 발효에는 당밀, 콩단백질, 콩가루, 밀기울 등이 많이 사용되고, 바나나 줄기, 레몬껍질, 해바라기씨, 가축의 도축 부산물들도 이용된다[1,5,16,19,20]. 특히, *B. licheniformis*의 발효를 위한 Xylanase 생산에는 밀기울, 깃털, 펄프 등이 이용된다[3,21]. 본 실험에서 N1 균주의 발효를 위한 질소원 기질은 가격이 저렴하고 경제적인 비지가루가 선발되었는데, 이 기질의 장점은 두유와 비슷한 풍부한 영양원이 되며, 일부만이 가축 사료로 이용되고 대부분 버려지므로 저렴한 가격으로 쉽게 구할 수 있어 단가면이나 자원 재활용 측면에서도 유리하다[10]. 이러한 비지를 이용한 예로서, 시판하는 아밀라아제를 이용하여 비지의 다당류 성분을 분해한 후, 이를 균의 발효에 사용하거나[10], *B. subtilis*를 고형상태의 비지에 배양하여 iturin을 생산하기도 하였다[2]. 하지만, 두부비지를 이용할 시에는 쉽게 변질되어, 냉동 보관해야 하는 저장문제 등의 단점 때문에 두부비지를 건조하여 만든 비지가루가 더 적합할 것으로 생각되었다. 또한, 비지가루 등 여러 가지 기질을 이용한 배양은 대부분 NB 배지에서 보다도 세균 밀도가 높았고, 5가지 기질에 탄소원으로서 옥수수전분 2% 씩을 첨가하여 배양한 결과, 기질만을 첨가하였을 때보다 훨씬 생장이 좋았다. 또한, 기질의 양을 많이 첨가할수록 세균의 밀도는 증가하였으나, 기질의 양을 10% 이상 첨가할 때는 고형화(겔화)되는 경향을 보였다. 하지만 배양 시간이 경과하면서 서서히 분해되어 큰 영향은 없었으므로, 발효기를 이용할 시에는 기질의 총량이 배지의 10%를 초과하지 않는 것이 좋을 것으로 생각되었다.

탄소원으로서 가장 효과적인 기질로 선발된 옥수수전분 또한, 장점이 많은데 포도당에 비해 가격도 저렴하고, 세균의 밀도를 매우 증진시킨다. 발효 공정에서 배지의 성분을 가격이 저렴한 옥수수전분을 포함한 비지가루, 미강, 콩가루, 밀기울 등으로 대체하면 충분히 상업성이 있을 것으로 생각된다. 또한, 발효과정을 거쳐 분해된 이 기질들과 배양한 세균을 바로 건조하여 생물농약 제제로 제조하면 공정의 단계도 줄일 수 있고, 단가도 낮출 수 있을 것으로 생각되었다.

pH, 탄소원 및 질소원 배지에 따른 항진균물질의 생산능 검정은 플라스크 배양에서는 물질의 생산량이 적어 그 결과를 정확하게 확인하기가 어려웠다. 하지만, 다량의 항진균성 물질을 분리하기 위해서는 기초자료를 바탕으로 배지내 초기 pH를 5.0으로 조정하고, 탄소원인 포도당 및 옥수수전분 그리고 질소원인 비지가루를 이용한 배지를 조성하여 발효기에서 배양한다면 항진균물질을 대량으로 생산할 수 있으리라고 생각된다. 크로마토 그래피, HPLC 등으로 항진균물질을 분리, 순화하여 동정한 후 정확한 항진균물질의 검정이 이루어져야 할 것으로 생각되며, 현재 결과들을 바탕으로 발효기를 이용해 발효시험 중이고 항생물질을 동정 중에 있다.

요 약

젯빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*의 길항세균으로 보고된 *Bacillus licheniformis* N1 균주의 배양적 특성과 항진균물질의 생산능을 조사하고 대량배지를 선발하였다. N1 균주의 초기 pH, 온도 및 교반속도 등의 배양적 특성을 조사한 결과, pH는 5.0~5.5에서, 온도는 30~35℃, 교반속도는 250 rpm에서 세균 밀도가 가장 높았다. 또한, N1 균주의 항진균물질에 의한 젯빛곰팡이병균의 균사생육저지대는 배지의 초기 pH가 5.0이고, 탄소원으로 포도당 또는 옥수수전분 그리고, 질소원으로 비지가루를 이용할 경우 높았으며, 5% 비지배지에 옥수수전분을 5% 또는 3% 첨가할 경우, 저지대가 현저히 증가되었다. N1 균주의 탄소원으로서 염가이면서 쉽게 구할 수 있는 옥수수전분, 질소원로서는 비지가루, 미강, 대두박을 선발하였는데, 농도별로 조사해 본 결과, 기질의 농도가 높을수록 N1 균주의 밀도도 증가하여 5% 비지배지에 옥수수전분 3~5%를 첨가한 배지를 N1 균주의 발효를 위한 대량배양 배지로 최종적으로 선발하였다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 1999년 농림기술개발사업에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- Adams, T. T., M. A. Eiteman and M. J. Adang. 1999. *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media. *Bioresource Technol.* **67**, 83-87.
- Akihiro, O., T. Ano and M. Shoda. 1996. Use of soybean curd residue, Okara for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. *Process Biochem.* **31(8)**, 8524-8530.
- Archana, A. and T. Satyanarayana. 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enz. and Microbial Technol.* **21**, 12-17.
- Bapat, S. and A. K. Shah. 2000. Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*. *Canadian J. of Microbiol.* **46**, 125-132.
- Christian, L., I. Besson and J. B. Gros. 1999. High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochem.* **34**, 667-674.
- Galvez, A. and M. Maqueda. 1993. Isolation and physicochemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **39**, 438-442.
- Jun, H. K. and J. Y. Kong. 1996. *Engineering of Microorganism*. pp. 191-217, Dong hwa Technology. Seoul.
- Lebbadi, M., A. Galvez, M. Maqueda, M. Martinez-Bueno and E. Valdivia. 1994. Fungicin M4: A narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. *J. of Appl. Bacteriol.* **77**, 49-53.
- Lebbadi M., A. Galvez, E. Valdivia, M. Martinez-Bueno and M. Maqueda. 1994. Purification of amebolytic substances from *Bacillus licheniformis* M-4. *Arch. of Microbiol.* **162**, 98-102.
- Lee, M. S., W. J. Lee, D. S. Kim, J. H. Park and J. H. Kang. 1999. Production of the bacteriocin from the tofu-residue. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 74-80.
- Leifert, C., H. Li, S. Chidburee, S. Hampson, S. Workman, D. Sigee, H. A. S. Epton and A. Harbour. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Canadian J. of Microbiol.* **41**, 247-252.
- Mendo, S. A. L. V., I. S. Henriques, A. C. M. Correia and J. M. C. Duarte. 2000. Genetic characterization of a new thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. *Current Microbiol.* **40**, 137-139.
- Moon, B. J., J. P. Lee, Y. J. Son, C. S. Kim, S. H. Lee and J. H. Son. 1999. Biological control of *Botrytis cinerea* on perilla with *Bacillus* spp. *The Plant Pathol. J.* **15**, 365.
- Neyra. 1997. *Bacillus licheniformis* producing antifungal agents and uses thereof for control of phytophthogenic fungi. United States Patent. Number: 5,665,354.
- Peter, H., A. Sneath, S. M. Nicholas, M. S. Elisabeth and G. H. John. 1986. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, 1133, Williams & Wilkins. Baltimore.
- Shah, A. K., S. S. Sidid, A. Ahmad and M. V. Rele. 1999. Treatment of bagasse pulp with cellulase-free xylanases from an alkalophilic *Bacillus* sp. Sam-3. *Bioresource Technol.* **68**, 133-140.
- Sharga, B. M. 1997. *Bacillus* isolates as potential biocontrol agents against chocolate spot on faba beans. *Canadian J. of Microbiol.* **43**, 915-924.
- Silo-Suh, A. L., J. L. Benjamin, J. R. Sandra, H. Haiyin, C. Jon and J. Handelsman. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. and Environ. Microbiol.* **60**, 2023-2030.
- Takeshi M., S. Yoshitomo, K. Akihiko and F. Hideki. 2000. Efficient production of protopectinases by *Bacillus subtilis* using medium based on soybean flour. *Biochem. Engineer. J.* **6**, 81-86.
- Tzeng, Y. M. and Y. H. Young. 1995. Penicillin-G enhanced production of thuringiensin by *Bacillus thuringiensis* sp. *darmstadiensis*. *Biotechnol. Prog.* **11**, 231-234.
- Wang, J. J. and J. Shih. 1999. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *J. of Industrial Microbiol. and Biotechnol.* **22**, 608-616.

(Received March 12, 2001; Accepted March 30, 2001)