

콩나물 부패병 방제를 위해 토양으로부터 분리한 길항균 *Pseudomonas fluorescens*의 이용

김진호* · 주길재¹⁾ · 최용화

상주대학교 식물자원학과*, ¹⁾경북대학교 농화학과

(2000년 11월 25일 접수 · 2001년 3월 11일 수리)

Isolation and Utilization of Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* from Soils for the Protection of Soybean Sprouts Rot

Jin-Ho Kim, Gil-Jae Joo¹⁾ and Yong-Hwa Choi(Dept. of Plant Resources, Sangju National University, Sangju, 742-711, Korea, ¹⁾Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea)

ABSTRACT : Thirty-three bacterial and fungal strains were isolated from the rotten soybeans and soybean sprouts to isolate pathogenic microorganisms which cause soybean sprouts rot during soybean sprouts cultivation. In pathogenicity tests of the isolates on soybean sprouts, two isolates(K-17 and K-28) caused soybean sprouts rot and were identified as *Erwinia carotovora* and *Fusarium* sp., respectively. To isolate antagonists against K-17 and K-28 pathogens, bacteria were isolated from various soybean-cultivated soils and screened by the inhibition zone method. A bacterial isolate(J-232) which inhibited growth of both pathogens was identified as *Pseudomonas fluorescens* and further examined. The culture filtrate of *P. fluorescens* J-232 (dilution rate of 500 times) inhibited the growth of *Erwinia carotovora* K-17 and *Fusarium* sp. K-28 both on potato dextrose agar medium and on soybean sprouts cultivated in vessel. The development of soybean sprouts rots was observed during cultivation by inoculation of soybean seeds with culture filtrate of both pathogens. The combined inoculation of soybean seeds with culture filtrate of antagonistic bacterium and that of pathogens prevented soybean sprouts rot, and the growth of soybean sprouts was similar to that of control. The soybean sprouts inoculated with antagonists culture filtrate alone did not develop soybean sprouts rot, and the growth of the seedlings was shown to be slightly promoted as compared with that of control.

Key words : antagonistic bacteria, *Erwinia carotovora*, *Fusarium* sp., *Pseudomonas fluorescens*, soybean sprouts rot

서 론

콩나물은 특히 우리 나라에서 소비가 많은 전통 기호성 식품¹⁾으로, 그 소비가 증가하는 추세를 보이고 있다. 현재 전국 3,000여 개 업소에서 공급되어 1인당 16.38 g을 섭취하여 10대 다소비 식품 중의 하나이다^{2,4)}. 최근에는 이들 콩나물을 대량생산하게 됨으로서 재배환경과 수입된 원료 콩의 상태 등에 따른 부패문제가 재배업자들은 물론 소비자의 입장에서 심각하게 대두되고 있다⁵⁾. 콩나물은 많은 양의 콩이 제한된 공간 내에서 겹겹이 쌓여 발아하게 되므로 막대한 양의 호흡열이 발생되어 용기내부의 온도가 상승되고, 이로 인하여 특히 여름철에는 미생물 활동 및 증식이 활발하게 되어 콩나물이 부패하게 된다. 또한 종자 발아 시 여러 종류의 유기물이 분비된다는 보고⁶⁻¹⁰⁾로 보아 콩의 발아 시 분비되는 유기물을 이용하는 부패미생물의 생육이 촉진되는 것^{7, 11-14)}이 콩나물 부패의 또 다른 요인이 될 수 있다. 또한 이병된

종자의 사용과 콩나물 콩 종자의 상처, 수질, 주변온도 등이 중요한 요인으로 작용한다고 알려져 있다¹⁵⁾.

콩나물의 부패에 관여하는 병원균으로는 *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomia phaseoli*, *Collectotricum* sp. 등의 진균과 *Bacillus coagulans*, *B. licheniformis*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*¹⁶⁾, *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Xanthomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Micrococcus* sp.¹⁷⁾ 등의 세균이 보고 되어있다. 이러한 미생물에 의한 콩의 부패와 변질 등의 문제는 근본적인 대책이 없이 종자침지시 종자소독제를 처리하거나, 사용이 금지되어 있는 농약을 사용하고 있는 실정이다. 콩나물 부패방지에 관한 연구로는 재배환경 변화에 의한 부패 방지법¹⁸⁾과 합성농약에 의한 부패균 제거법⁴⁾, 오존 처리법¹⁹⁾ 등이 보고되어 있다. 그러나 이미 콩 고투리에 서식하고 있는 미생물이 콩의 표피 내로 침투하거나 상처를 통하여 보균상태가 되면 방제가 사실상 불가능하다. 또한 이런 종자는 시루에 넣

고 발아시켜도 발아가 되지 않고 썩어 다른 종자의 부패를 촉진 시키므로 보통은 침지 후 조리로 떠내고 건전한 종자만 시루에 넣어 사용하는 것이 통상적인 재배법이다.

본 연구에서는 농약을 사용하지 않고 청정한 콩나물을 안정적으로 생산할 수 있는 방안을 제시하고자 하였다. 따라서 부패 중이거나 부패된 콩 또는 콩나물로부터 콩나물 부패균들을 분리하고, 이 부패균에 의해 콩나물 부패유무를 확인한 후 그 부패균에 길항하는 미생물을 콩 재배지 토양에서 분리하였다. 그 길항 미생물을 배양한 후 배양 여액으로 실제 콩나물 부패방제 유무를 확인하여 콩나물의 부패병을 방제하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험의 콩나물 콩은 시중에 널리 사용되고 있는 준저리콩 또는 수입산 콩을 구입하여 실온에 보관하며 실험에 사용하였다.

콩나물 재배

콩나물의 재배는 일반 콩나물 재배법을 기준으로 하였다. 콩나물콩 10g~2.5kg을 일반지하수나 또는 다른 침지수 1~5L에 12시간 침지한 후 직경 10×9cm, 25cm×20cm, 45×40cm의 플라스틱 용기에 넣고, 25±1℃의 온도의 암소에서 3시간 간격으로 1분 동안 관수하여 5~7일간 콩나물을 재배하였다. 길항미생물을 이용한 콩나물 재배는 상기방법과 동일하게 재배하였으나 침지수를 달리하였다. 즉 길항미생물 배양액을 원심분리기(15k rpm)로 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 원액으로 사용하거나 또는 그 원액을 10배, 100배, 500배, 1000배 희석하여 침지수로 사용하였다.

부패된 콩과 콩나물로부터 미생물의 분리

콩나물 부패에 관여하는 미생물은 콩나물 재배공장에서 이미 부패된 콩과 콩나물의 자엽 및 배축 부위를 수집하여 다음과 같이 분리하였다. 균원시료 1g을 70% 알콜에 20초간 표면소독하고 멸균 증류수로 3회 수세하여 막자사발로 마쇄한 뒤 살균증류수 1mL을 첨가하고, 그중 100 µL를 각종 배지에 도말하거나 1.5% water agar 9mL에 혼합하여 치상하였다. 세균은 Luria broth agar(LBA) 배지와 Nutrient agar (NA) 배지, Tryptic soy agar (TSBA) 배지에 도말하거나 치상하였으며, 진균은 Potato dextrose agar (PDA) 배지에 도말하여, 세균은 37℃에서 곰팡이는 28℃ 각각 2일과 7일간 배양하여 나타난 단일 colony 또는 균사체를 분리하였다.

콩나물 부패균의 선발

분리된 세균은 100 mL의 Nutrient broth (NB) 배지나 Tryptic soy broth (TSB) 배지에서 24시간 배양한 후 균의 농도를

10^{10} ~ 10^{12} CFU/mL로 조절하여 부패균 접종원으로 이용하였다. 진균은 PDA 배지에 28℃, 15일간 이상 배양하여 살균수 9mL를 넣고 문질러 균사체를 분리시킨 후 살균된 탈지면이 들어 있는 유리주사기에 균사체를 넣어 압력을 가하여 포자를 수거하여 사용하거나, PD broth에 배양한 것을 접종원으로 이용하였다.

부패균은 콩나물 콩 10g을 부패균 접종원 용액에 12시간 침지하고 바로 플라스틱용기에 옮겨 25℃에서 지하수로 관수 재배하면서 콩나물의 형태와 색깔, 부패취 등을 조사하여 부패정도를 확인한 후 선별하였다. 또한 일반 지하수로 먼저 발아시킨 콩나물(평균 배축 길이 0.6cm)을 살균된 면도날로 여러 곳에 상처를 주어 상기와 같은 방법으로 부패균 접종원 용액에 3시간 이상 침지한 후 지하수를 관수하거나 접종원 용액을 관수하여 콩나물 부패를 유발시키는 미생물을 선별하였다.

길항미생물 선별을 위한 미생물의 분리

콩나물 부패균에 길항하는 미생물을 분리하기 위한 균원시료로는 각종 콩재배지 토양에서 채취한 시료를 사용하였다. 상기 균원시료액 1mL를 0.85% NaCl 용액으로 생균수 10^3 ~ 10^5 배까지 희석한 뒤 NA 배지와 LBA 배지, PDA 배지, TSA 배지에 각각 100 µL씩 도말하여 30℃로 3일간 배양하였다. 각 colony의 형태 및 색깔 등으로 분류하여 각기 다른 colony를 확보하고, 현미경으로 형태상 순수성을 확인한 후 길항력 조사를 위한 미생물 시험균주로 사용하였다.

콩나물 부패균에 길항하는 미생물의 선발

콩나물 부패균에 길항하는 미생물은 한천 확산법(agar diffusion method)이나 대치배양하여 억제환 생성법(inhibition zone method)으로 선별하였다. 즉, TSBA 배지나 PDA 배지에 길항균과 부패균을 섞은 중층용 agar(0.2%)를 배지 표면에 문질러서 분리 미생물을 접종하여 30℃에서 생육억제환을 나타내는 것을 길항미생물로 판정하거나, 각종 배지의 1/3 정도의 가장자리 4곳에 길항력 조사를 위한 균주를 1 colony 접종하고 중앙에 부패 곰팡이균을 각각 접종하여, 세균은 37℃에서 곰팡이는 28℃에서 각각 2일과 7일간 배양하여 생육억제환을 생성하는 것을 길항균으로 판정하였다.

총균수 측정

총균수는 상기방법에 따라 세균은 균원시료를 삼단희석하고 각종 배지에 도말하여 배양한 후 형성된 colony를 계수한 것과 총균수 측정 kit인 Petrifilm™ plate (3M Co.)를 이용하여 계수한 것, 현미경하에서 hemacytometer로 계수한 것 등 3가지 계수치의 평균 값(CFU/g)으로 결정하였다. 진균은 Petrifilm™ plate (3M Co.)를 이용하여 계수하였다.

미생물의 동정

분리균주의 동정은 MIDI system(Microbial Co., Newark, Del.)

을 이용하거나 일반 동정법을 이용하였다. 분리된 균주를 TSA 배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하여 loop로 10 mg정도를 떠서 test tube 밑바닥에 옮긴 후, 1번 시약(sodium hydroxide 45 g, methanol 15 mL, H₂O 150 mL)을 각각 1 mL씩 첨가하고 잘 혼합하여 100°C에서 5분간 반응시키고 다시 잘 섞은 후 100°C에서 25분간 반응시켰다. 이어서 2번 시약(6N HCl 325 mL, methanol 275 mL)을 2 mL 넣고 80°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 3번 시약(haxane 200 mL, *t*-butyl methyl ether 200 mL)을 1.25 mL 넣고 10분간 orbital shaker로 흔든 후 아래층 부분을 Pasteur pipet으로 제거하고 남은 위층에 4번 시약(sodium hydroxide 10.8 g, H₂O 900 mL)을 3 mL 첨가하여 5분간 부드럽게 섞은 후 포화 NaCl을 몇 방울 넣고 분리된 두 층의 상정액을 injection sample로 이용하였다. 또한 일반적 세균의 동정을 위하여 분리균을 각종 배지에 접종하여 30~37°C에서 18시간 이상 배양하고 그 균락의 형태, 색깔 및 운동성을 현미경으로 관찰한 후 각각의 colony를 슬라이드에 도말하여 고정된 후 그람염색하였다. 기타 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 준하여 실험한 후 분리균주를 동정하였다. 또한 곰팡이는 곰팡이용 배지에 접종하여 28°C에서 7일 이상 배양하고 그 체제의 형태, 포자의 운동성, 유성생식 기관의 유무 및 형태를 현미경으로 관찰하였다.

길항균에 의한 콩나물의 부패 유무조사

길항미생물에 의한 콩나물의 부패 유무를 확인하기 위하여 길항미생물을 TSB 배지에서 24시간 배양한 후 준저리 콩 10 g을 12시간 침지하고 바로 플라스틱용기에 옮겨 25°C에서 7일 동안 재배하면서 콩나물의 형태와 색깔 및 부패취 등을 조사하였다. 실제로 콩나물 대량재배 시에 *P. fluorescens* J-232의 배양액이 콩나물 부패병을 효과적으로 방제하는지와 생육에 영향을 주지 않는지를 조사하기 위해 콩나물은 수입 준저리 콩 2.5 kg을 일반 콩나물 재배법에 따라 다음 네 가지 방법으로 침지하였다. 지하수(5 L)에 침지하거나, *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28의 배양액을 각각 혼합(5 L)하여 침지, 부패균 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28의 배양액(2.5 L) 및 *P. fluorescens* J-232의 배양액(2.5 L)을 혼합(5 L)하여 침지, *P. fluorescens* J-232의 배양액(2.5 L)에 지하수(2.5 L)를 혼합(5 L)하여 12시간 침지하였다. 침지한 후 각각을 직경 45 cm x 40 cm 플라스틱 시루 용기에 넣고 25±1°C의 온도의 암상태에서 3시간 간격으로 1분 동안 관수하여 7일간 콩나물을 재배하면서 부패 유무를 육안으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

부패한 콩 및 콩나물로부터 미생물의 분리

부패한 콩 및 콩나물 등의 균원시료에서는 부패과정 중의 콩나물보다 부패한 콩에서 미생물의 함량이 많았으며, 부패한 콩 g당

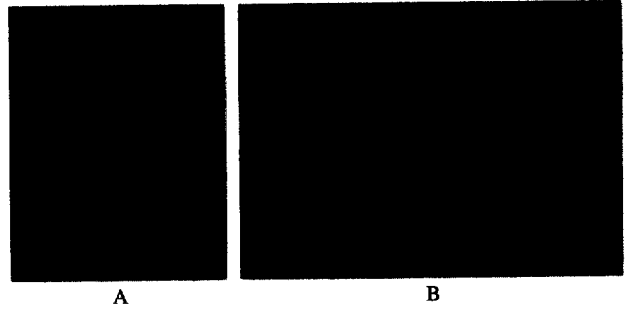


Fig. 1. Optical microscopic photograph of the isolated strains, K-17 and K-28. A; K-17(x 1000), B; K-28(x 1000)

평균 7.2×10^6 (CFU/g)의 각종 세균 및 1.3×10^3 개의 균사체를 형성하는 진균이 함유되어 있었다. 각 배지별 분리한 미생물상기 고체배지에서 재분리하고 독립 colony 및 균사체를 확보하여 현미경으로 순수성을 확인한 후 형태와 색깔, 배양 양상이 다른 세균 30종과 진균 3종 등 총 33주(K-1 ~ K-33)를 분리하였다.

분리균들이 콩의 발아 및 콩나물의 부패에 미치는 영향

부패한 콩에서 분리한 33주의 미생물을 이용하여 콩의 발아 및 콩나물의 부패에 미치는 영향을 조사한 결과, 분리 균주 K-3, K-8, K-17, K-28 균주는 다른 균주들에 비해 콩의 발아를 하루에서 이틀 지연시켰다. 특히 K-3과 K-8 균주는 발아 후 콩나물의 부패에는 큰 영향을 미치지 않았으나, K-17과 K-28 균주는 콩나물 뿌리와 자엽의 색을 점차 갈색으로 변하게 하였다. 또한 이미 발아시킨 콩나물에 상기 분리균 33종을 접종하고 7일 동안 배양한 후 콩나물의 부패 유무를 조사한 결과, K-17과 K-28 균주 처리구는 배양 초기부터 부패양상을 나타내었고, 5일 후 뿌리와 배측뿐만 아니라 자엽부분도 점차 갈색으로 바뀌며 부패하였으며, 대조구에 비해 콩나물의 생육도 약간 억제되는 경향을 보였다. 그러나 분리주 K-3과 K-8 균주는 발아한 콩나물에서는 초기생육에 영향을 주어 대조구에 비해 생육은 약간 억제시켰지만, 부패에는 큰 영향을 주지 않았다. 따라서 세균인 K-17 균주와 진균인 K-28 균주를 콩나물 부패균으로 판정하여 실험에 사용하였다.

콩나물 부패균에 길항하는 미생물의 분리

콩나물 부패 균주 K-17(그림 1A)과 균주 K-28(그림 1B)에 동시에 길항하는 미생물을 분리하기 위한 미생물은 각종 콩재배지 토양을 균원시료로 하여 colony를 형태 및 색깔 등이 각기 다른 500여 colony를 확보하고, 현미경으로 형태적 순수성을 확인한 후 최종 350여종의 세균을 분리하였다(J-1 ~ J-350). 콩나물 부패균 K-17과 K-28 균주에 길항하는 미생물을 선별하기 위해, 부패 세균 K-17 균주와 진균인 K-28 균주를 대상으로 분리한 350여 세균과 각각 길항력을 조사하여 K-17 균주와 K-28 균주의 생육을 동시에 억제시키는 J-232를 최종 선별하였다(그림 2).

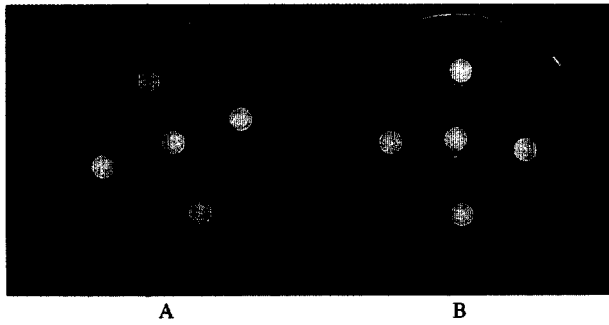


Fig. 2. Inhibitory effect of bacterial antagonists, J-232, on the growth of the isolated strains No. K-17(A) and K-28(B). The isolated strain j-232 supernatant was spotted on the disc paper of PDA and then incubated at 28°C for 7 days.



Fig. 3. Scanning electron microscopic photograph (x 15,000) of the isolated strain J-232. The isolated strain No. J-232 is antagonistic to soybean sprouts rot.

콩나물 부패균 및 길항균의 동정

콩나물 부패균 K-17과 K-28 균주 및 길항균 J-232 균주(그림 3)를 동정하기 위하여 MIDI system으로 동정한 결과, Table 1에 서와 같이 K-17 균주는 *Erwinia carotovora* (similarity; 0.865)로, J-232 균주는 *Pseudomonas fluorescens*(similarity; 0.945)로 각각 동정되었다(그림 3). 곰팡이인 K-28 균주는 MIDI system으로 동정한 결과 유사성이 너무 낮게 나타나 동정에 실패하였기에 일반동정법으로 동정한 결과, 균사는 처음에는 무색에서 생장함에 따라 보라색으로 변하였고, 불안전균류의 자실체인 분생자좌

Table 1. Identification of isolated strains

strains	Identification (MIDI system similarity)
K-17	<i>Erwinia carotovora</i> (0.865)
J-232	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (0.945)
K-28	<i>Fusarium</i> sp. ^a

^aDue to the poor matches with profiles in the MIDI library, the isolate was identified as *Fusarium* sp. by general methods.

Table 2. Characteristics of isolated strains from putrefying soybean sprouts and soil

Characteristics	K-17	Characteristics	J-232
Morphological charact.		Morphological charact.	
Form	Rod	Form	Rod
Size	0.8-2.2 µm	Size	0.7-2.4 µm
Gram stain	-	Gram stain	-
Physiological charact.		Physiological charact.	
Catalase	+	Catalase	+
Pectate degradation	+	Citrate utilization	+
Gelatin liquefaction	+	Gelatin liquefaction	+
Indole production	-	Indole production	-
Phosphatase	-	Methyl red test	-
Nitrate reduction	+	Hydrogen sulfide test	-
Oxidase	-	Nitrate reduction	+
Carbon assimilation		OF test	fer
Cellobiose	+	Oxidase	+
Melibiose	+	Urease test	+
Starch	+	Carbon assimilation	
Dextrin	-	Glycerol	+
Peratinose	+	Inositol	=
Glucose	+	Starch	-
Lactose	+	Mannose	+
Maltose	±	Fructose	+
Sucrose	+	Glucose	+
Utilization of organics		Lactose	-
Malonate	-	Maltose	-
Galacturonate	+	Sucrose	-
Tartarate	-	Arabinose	+

+: positive, -: negative, ±; intermediate, fer; fermentation

(sporodochium)층 위에 타원형의 분생포자를 형성하였고 양끝 쪽으로 구부러져 있는 모습으로 보아 전형적인 *Fusarium* 속으로 판정하였다. 또한 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 준하여 실험한 결과도 거의 상기와 동일하였다(Table 2). 따라서 상기 분리·동정된 균주를 *Erwinia carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28, *Pseudomonas fluorescens* J-232로 각각 명명하였다.

이러한 결과와 유사한 보고로 박 등⁵⁾은 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*가 콩나물의 세균성 무름병을 유발한다고 보고하였으며, 일본에서는 녹두나물 재배시 부패에 *Erwinia carotovora*가 관여하는 것으로 분리·확인되었다¹⁶⁾. Schroth 등^{8,14)}은 *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*가 콩나물의 부패를 유발한다고 보고하였다. 따라서 이들 분리·동정된 부패균은 이미 발표된 균들과 유사한 것으로 본다.

P. fluorescens J-232에 의한 콩나물의 부패 유무 및 부패균에 대한 길항력 조사

P. fluorescens J-232에 의한 콩나물의 부패 유무를 확인한 결과, 콩의 발아 및 콩나물의 생육에 전혀 나쁜 영향을 나타내지 않았으며, 이미 발아시킨 콩나물을 상기와 같은 방법으로 *P. fluorescens* J-232의 TSB 배양액을 침지하여 시루에 배양하면서 조사한 결과도 콩나물의 부패와는 전혀 무관하였고, 오히려 콩나물의 생육이 촉진되는 현상을 확인하였다(테이타 미제시).

靑木陸夫¹⁶⁾은 *P. fluorescens*가 콩나물의 부패를 유발한다고 보고하였으나 본 연구에서는 전혀 다른 결과가 나타났다. 이러한 *Pseudomonas*속 미생물에 의한 콩나물 부패병은 많이 알려져 있고 *Pseudomonas glycinea*가 콩 종자의 발아를 저해한다는 보고도 있으며, 명¹⁸⁾도 *Pseudomonas* spp.가 콩나물 부패에 관여한다고 보고하였다. Yeom 등²⁰⁾은 *Pseudomonas fluorescens* MC07이 광범위의 진균 길항세균으로서 모잘록병의 생물학적 방제에 효과가 있으며, 특히 낮은 온도에서 그 활성이 높다고 보고하였다. 그러나 *Pseudomonas fluorescens*가 콩나물 부패균인 세균 *E. carotovora*와 진균 *Fusarium* sp.를 동시에 방제한다는 사실은 아직 보고된 바 없다.

콩나물 부패병의 방제를 위한 길항미생물의 이용

실제로 콩나물 대량재배 시에 *P. fluorescens* J-232의 배양액이 콩나물 부패병을 효과적으로 방제하면서 생육에 미치는 영향을 조사한 결과, 그림 4A와 같이 대조구인 일반 지하수에 침지한 콩나물은 거의 정상적 수준으로 성장한 반면 부패균 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28의 배양액에 침지하여 배양한 콩나물은 시루 아래 부분의 콩나물이 30% 정도 부패하였다(그림 4B). 부패균 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28의 배양액과 함께 *P. fluorescens* J-232의 배양액을 혼합하여 침지한 후 재배한 콩나물은 전혀 부패되지 않았고 생육은 일반 재배구와 비슷하였다(그림 4C). *P. fluorescens* J-232의 배양액만 침지하여 재배한 경우에는 전혀 부패되지 않았고, 생육은 일반 지하수 침지 재배 콩나물보다 건조중량이 약 5% 가량 증가하는 경향을 나타내었다(그림 4B).

부패균 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28의 배양액에 길항균 *P. fluorescens* J-232의 원심분리 상정액을 0.22 μ m filter로 균체를 제거한 배양액(원액)과 10배, 100배, 500배, 1000배 희석액을 각각 동일하게 혼합한 침지수를 이용하여 콩나물을 재배하였을 때, 원액과 희석배율에 관계없이 동일한 양상의 콩나물이 재배되었다. 그러나 희석배율이 1000배를 넘어가면 시루 하단부의 콩나물에서 약간의 부패 양상이 나타났다. 따라서 실제 *P. fluorescens* J-232의 배양액을 침지할 경우에는 500배까지 희석하여 사용하면 부패병이 방제될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 일반 지하수로 콩나물을 재배한 경우와 길항미생물 *P. fluorescens* J-232의 배양액을 이용하여 콩나물을 재배한 경우의 총균수를 조사한 결과, 일반 지하수 재배에서는 콩나물시료 g당 평균 6.4×10^5 (CFU/g)

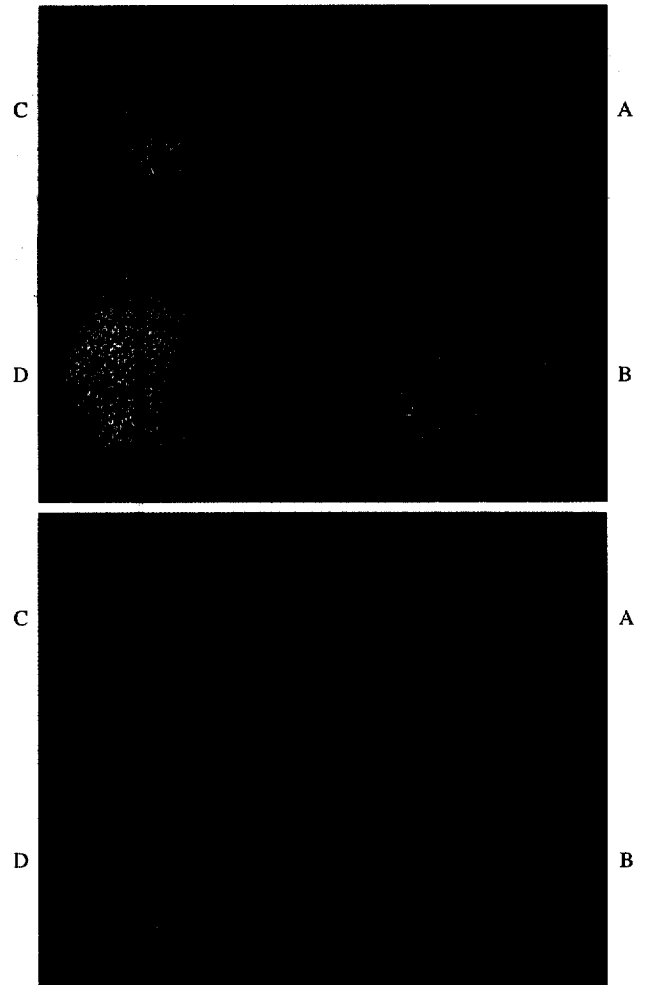


Fig. 4. Suppression of soybean sprouts rot caused by *E. carotovora* K-17 and *F. solani* K-28. Soybeans were treated with antagonistic bacterial(*P. fluorescens* J-232) and/or pathogenic *E. carotovora* K-17 and *Fusarium* sp. K-28) culture broth. Disease severity was measured 7 days after incubation. A; control, B; K-17 and K-28, C; K-17, K-28 and J-232, D; J-232.

에 달하였으나, 길항미생물의 배양액을 이용한 경우에는 평균 4.2×10^4 (CFU/g)정도의 비교적 적은 양의 미생물이 존재함을 확인하였다.

*E. carotovora*는 extracellular pectate lyase, polygalacturonase, cellulase, protease 등의 효소를 생산하는 미생물로 알려져 있고²²⁾, pectin 및 세포벽 구조를 변형시키는 특성²³⁾을 가진 세균이다. 또한 *Fusarium* sp.도 cellulose나 xylan을 분해하는 효소를 생산하는 균으로 알려져 있다²⁴⁾. 본 연구 결과에서 *E. carotovora* K-17 및 *Fusarium* sp. K-28가 생산하는 상기 효소활성을 조사하지는 못하였으나 *E. carotovora* K-17는 pectate를 분해하는 것으로 보아 extracellular pectate lyase를 생산하는 것으로 판단되며, cellobiose를 분해하는 것으로 보아 cellulase의 활성도 있어 콩나물의 세포벽에 존재하는 pectin 및 세포벽 구조를 변형시킬 것으

로 사료된다. 부패균 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28을 각각 처리하여 콩나물의 부패도를 조사하지는 않았지만, 상기 콩나물 부패균 분리 실험의 결과에서처럼 독립적으로 처리해도 콩나물이 부패되었으므로 정확한 원인은 알지 못하지만 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28은 콩나물 부패균으로 판정된다.

본 연구결과는 일반 재배 콩나물의 미생물 농도가 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g에 달한다는 보고²¹⁾에 비해 절대적으로 적은 농도이었고, 길항미생물 *P. fluorescens* J-232의 배양 여과액은 콩나물재배과정 중 배양여액 성분이 계속 씻겨나가기 때문에 문제가 되지 않을 것으로 생각되나 정확한 안전성 평가가 요구된다.

요 약

부패된 콩이나 콩나물에 존재하는 33종(K-1~K-33)의 각종 미생물로부터 콩나물 부패에 관여하는 세균(K-17)과 진균(K-28)을 각각 1종류씩 분리하였으며, 이들은 각각 *Erwinia carotovora*와 *Fusarium* sp.로 동정하였다. 콩나물 부패균에 길항하는 미생물은 각종 토양 균원시료로부터 분리한 350여종의 세균을 이용하여 콩나물 부패세균인 K-17 균주와 진균인 K-28 균주에 각각 길항력을 나타내는 J-232 세균을 최종 선발하였다. 길항균 J-232는 *Pseudomonas fluorescens*로 동정되었다. 콩나물 부패균 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28의 배양액으로 재배한 콩나물은 시루 아랫부분이 부패하였으나, 길항균 *P. fluorescens* J-232는 PDA 한천배지에서도 부패균들의 생육을 억제하였을 뿐만아니라 길항균 배양여액을 단독으로 콩나물재배에 처리할 경우에도 시루 내 콩나물은 부패되지 않았다. 콩나물 부패균 *E. carotovora* K-17과 *Fusarium* sp. K-28의 배양액에 길항균 *P. fluorescens* J-232의 배양액을 원액 또는 500배까지 희석하여 침지한 후 재배한 콩나물도 전혀 부패되지 않았으며 생육이 약간 촉진되는 경향이었다.

참 고 문 헌

1. 이홍석 (1994). 콩-유전 육종 및 재배 생리. 서울대학교 출판부 p.21-26.
2. 정송희 (1982). 콩나물과 숙주나물의 재배 및 몇 가지 생장조절물질 처리효과. 경희대학교 석사학위논문.
3. 김길환 (1979). 콩나물 제조방법의 개선에 관한 연구. 한국과학기술연구소.
4. 천명기 (1989). 식품중의 잔류농약분석 및 규격기준에 관한 연구, 한국식품연구소.
5. 박원목, 명인식, 이용세 (1996). 콩나물 부패병의 생물학적 방제. 한국 콩연구회지, 3(2), 4-9.
6. Jalali, B. L. and Suryanarayana, D. (1971) Shift in the carbohydrate spectrum of root exudates of wheat in relation to its root-rot disease, *Plant and Soil*. 34, 261-267.
7. Rovira, A. D. and Ridge, E. H. (1973) Exudation of

- ¹⁴C-labelled compound from wheat root : Influence of nutrients, microorganism and adds organic compounds. *New Phytol.* 72, 1081-1087.
8. Schroth, W. C. (1967) Effect of contain constituents of bean exudates on germination of chlamydospores of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in soil, *Phytopathology*. 51, 389-393.
9. Vancura, V. and Hanzlikova, A. (1972) Root exudates of plants. IV. Differences in chemical composition of seed and seedling exudates, *Plant and Soil*. 36, 271-283.
10. Vancura, V. and Stanek. M. (1975) Root exudates of plants. V. Kinetics of exudates from bean roots as related to the presence of reserve compounds in cotyledones, *Plant and Soil*. 43, 547-559.
11. Bürner, H. (1960) Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem, *Bot. Rev.* 26, 393-424.
12. Katznelson, H. J. V. and Payne, T. M. B. (1955) The liberation of amino acids and reducing compounds by plant roots, *Plant and Soil*. 7, 35-48.
13. Rovira, A. D. (1956) Plant root excretion in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oat and peas, *Plant and Soil*. 7, 178-194.
14. Schroth, M. N. and Snyder. W. C. (1961) Effect of host exudate on chlamydospore germination of the bean root fungus *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in soil, *Phytopathology*. 53, 809-812.
15. 오병준 (1989) 철분 및 염분이 콩나물 생육과 부패에 미치는 영향 및 콩나물 부패병균. 고려대학교 석사학위논문.
16. 青木隆夫, 沼田邦雄, 官尾茂雄 (1986) もやし製造技術に關する研究. 東京農業試験場研究報告. 第19, 103-109.
17. 官尾茂雄, 沼田邦雄, 佐藤區 (1987) 調味大豆もやし加工品の變敗および防止對策について. 東京農業試験場研究報告. 第20, 40-45
18. 명인식 (1987) 콩나물 부패의 원인과 방제. 고려대학교 석사학위논문.
19. 内勝茂三, 志賀 三 (1989) Effect of ozone treatment on elongation of hypocotyl and microbial counts of bean sprouts. 日本食品工學會誌. 36(3), 159-169.
20. Yeom, J. R. and Park. C. S. (1995). Enhancement of plant growth and supression of damping-off of cucumber by low temperature growing *Pseudomonas fluorescens* isolates, *Korean J. Plant Pathology*. 11, 252-257.
21. Nicholson, J. F. and Sinclair. J. B. (1971) Detection of *Pseudomonas glycinea* in soybean seed lots, *Phytopathology*. 61, 1390-1393.
22. Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., Wei Lei Ma, Chatterjee, A. K. (1999) *kdgR*(Ecc) negatively regulates

- genes for pectinase, cellulase, protease, harpin(Ecc), and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. of Bacteriology*. 181, 2411-2421.
23. McNeil, M., Darvill, A. G. Fry, S. C. and Albersheim, P. (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants, *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625-663.
24. Biely, P. (1985) Microbial xylanolytic system, *Trends in Biotechnology*. 3, 286-290.