

길항세균 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 대량배양을 위한 최적 배양조건

박종영 · 김한우¹ · 김현주 · 전옥주 · 정순재 · 최우봉² · 이선우 · 문병주*

동아대학교 생명자원과학대학, ¹동아대학교 농업생명과학연구소, ²동의대학교 생명공학과

Cultivation Conditions for Mass Production of an Antagonistic Bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13

Jong-Young Park, Han-Woo Kim¹, Hyun-Ju Kim, Ok-Ju Chun, Soon-Je Jung, Woobong Choi²,
Seon-Woo Lee and Byung-Ju Moon*

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

¹Center for Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Department Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

(Received on May 6, 2005)

Stenotrophomonas maltophilia BW-13 is a potent biocontrol agent to control crisphead lettuce bottom rot caused by *Rhizoctonia solani*. To define the optimum conditions for the mass production of the *S. maltophilia* BW-13, we have investigated optimum culture conditions and effects of various carbon sources on the bacterial growth. The optimum initial pH and temperature were determined as pH 6.0~7.0 and 35°C, respectively. For the selection of effective carbon source for the mass production, we tested the low molecular carbon sources such as sucrose, glucose, lactose, maltose, manose and the high molecular carbon source such as dough conditioner, rice bran, corn starch, sweet potato starch. As the results, the addition of dough conditioner in a basal medium (1.25% K₂HPO₄, 0.38% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.5% Yeast extract) was able to achieve higher cell density and the antifungal activity than others. Therefore, the basal medium containing 3% dough conditioner (named as dough conditioner medium) was finally selected the optimized media for the mass production of BW-13 strain.

Keywords : Antagonistic bacteria, Bottom rot, *Rhizoctonia solani*, Dough conditioner medium, *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13

결구상추의 병해에 관해서는 밀둥썩음병(*Rhizoctonia solani*)(김 등, 2003, 2004), 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)(백 등, 2004)과 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)(문, 2002)만이 보고되어 있으나, 같은 국화과 식물인 상추에서는 밀둥썩음병, 균핵병, 잿빛곰팡이병 등 13종이 보고되었다(한국식물병리학회, 1998). 이 중 균핵병과 밀둥썩음병에 의한 1차적인 피해가 가장 심각하다(김 등, 2004, 2005).

밀둥썩음병(bottom rot)을 일으키는 병원균인 *R. solani* Kuhn(완전세대 ; *Thanatephorus cucumeris* (Frank))는 토양전염성 병원균으로서 전 세계적으로 폭넓은 기주범위

를 가지고 있는 다범성 균이며, 국내에서도 이 균에 의한 피해가 많이 보고되어 있으나 이 균의 생리, 생태학적 특성상 동정이 매우 어렵고 병해의 진단 및 방제 또한 어렵다(김 등, 2003, 2004). 이 균은 밀둥썩음병 이외에도 모잘록병(damping off), 뿌리썩음병(root rot), 줄기썩음병(basal stem rot), 줄기궤양병(stem canker)등의 증상을 유발하는데 때로는 작물의 수확 후 저장 중 부패를 유발하거나 지표면에서 가까운 잎의 마름 또는 점무늬증상을 유발시키기도 한다(김 등, 1995). 이러한 식물병원균인 *R. solani*의 방제를 위하여 농가에서는 프로파, 베노밀 등의 약제를 사용하고 있으나, 그 효과가 미미한 실정이다.

한편 미생물농약은 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물 대사산물을 이용하여 병원균을 방제하기 때문에 유

*Corresponding author

Phone)+82-51-200-7554, Fax)+82-51-200-6993

E-mail) bjmoon@dau.ac.kr

기합성 농약에 비하여 환경 친화적이며, 대사산물 및 그 구조가 다양하고 쉽게 분해되며, 내성균 출현의 빈도가 격감하는 등의 장점이 있어 천연물유래 무공해 살균제 개발 및 길항미생물을 이용한 생물학적 방제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Fruh, 1996; Knight 등, 1997; Emmert와 Handelsman, 1999; Montersinos, 2003). 따라서 환경 친화적인 미생물농약의 개발이 현대농업에서 절실히 요구된다.

현재까지 결구상추 밀둥썩음병을 포함한 엽채류의 뿌리썩음병에 대한 뚜렷한 방제 약제가 공시된 바가 없으며, 미생물농약 개발의 일환으로서 최근 밀둥썩음병원균인 *R. solani*에 대한 길항세균으로서 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13이 도양으로부터 분리되었으며, 유묘와 성체식물에서 방제효과를 검정한 결과 유의적으로 높은 방제가를 나타내었다(김 등, 2005). 본 연구에서는 길항세균 *S. maltophilia* BW-13 균주를 이용하여 미생물 농약을 개발하기 위해 대량배양을 위한 배양조건 및 탄소원을 선별하였다.

재료 및 방법

공시세균 및 배양. 밀둥썩음병원균 *Rhizoctonia solani*에 대하여 길항력이 높은 것으로 확인된 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 균주를 공시하였다(김 등, 2005). 이하의 모든 실험에 Nutrient broth (NB)배지에서 180 rpm, 30°C, 16시간 배양한 BW-13 균주 2 ml을 500 ml용 삼각플라스크의 공시배지 200 ml에 접종하였다.

배양적온. BW-13 균주의 배양적온을 조사하기 위해, NB 배지에 BW-13 균주를 접종한 후 20°C에서 50°C까지 5°C 간격으로 조정된 진탕배양기(180 rpm, 48시간)에 배양하면서 24, 48시간째에 배양액(2 ml)을 회수하여 살균수로 10배 희석한 다음 550 nm에서 흡광도를 조사하여 세균의 밀도를 측정하였다.

초기 pH의 영향. 초기 pH에 따른 BW-13 균주의 생육 정도를 조사하기 위해 NB 배지를 1 N NaOH와 1 N HCl을 이용하여 pH 4.0에서 pH 8.0까지 pH 1.0 간격으로 조정하고, 진탕배양기(180 rpm, 30°C)에서 BW-13 균주를 48시간 배양하면서 24시간 간격으로 배양액을 각각 2 ml씩 채취하여 10배 희석하여 550 nm에서 흡광도를 조사하여 세균밀도를 비교하였다.

탄소원에 따른 길항세균의 증식과 항진균 활성에 미치는 영향. 탄소원이 길항세균의 생장과 항진균 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 기초배지(Basal medium; 1.25% K_2HPO_4 , 0.38% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5%

Yeast extract)에 다양한 저분자 탄소원 또는 고분자 탄소원을 사용하였다. 저분자 탄소원으로는 fructose, glucose, lactose, sucrose, maltose, mannitol, mannose, sorbitol 등을 사용하였으며, 고분자 탄소원으로는 개량제(dough conditioner), 미강(rice bran), 옥수수전분(corn starch), 고구마전분(sweet potato starch) 등을 각각 3%씩 첨가하였다. 각 탄소원이 포함된 기초배지에 길항세균을 접종한 후 30°C, 5일간 진탕배양하면서 24시간마다 균체를 회수하여 살균수로 10배 희석한 후 550 nm에서 흡광도를 조사하여 세균밀도를 측정하였다. 탄소원에 따른 항진균물질 생산에 대한 영향을 조사하기 위해, 각 배지에서 배양된 상층액을 pore size 0.2 μm 의 membrane filter (Millipore, USA)로 여과한 다음, Rotary vacuum evaporator를 이용하여 5배로 농축하고 ethanol로 희석하여 활성을 측정하였다. 활성측정은 조제된 시료를 50 μl 를 흡수시킨 0.8 cm paper disk을 PDA 배지에 치상하고, 병원균의 균사절편과 대치배양하여 25°C에서 7일간 배양 후 저지대를 측정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

배양적온. BW-13 균주의 생육 적온을 구명하기 위하여 BW-13 균주 접종 후 24시간과 48시간 배양 후 균주의 생육을 조사한 결과, 24시간 배양과 48시간 배양 모두에서 20°C에서 35°C까지 온도가 올라갈수록 생육 정도가 완만하게 증가하는 양상을 보였으나, 40°C 이상에서는 급격하게 생육이 저하되었다(Fig. 1). 따라서 BW-13 균주의 최적 배양온도는 35°C인 것으로 확인되었다.

초기 pH의 영향. BW-13 균주를 공시한 pH로 보정된 NB 배지에서 24시간과 48시간 배양하였을 때 생육정도를 조사한 결과, 초기 pH가 4.0일 때 거의 세균의 생육이 저지되는 것을 확인하였으며, pH 5.0에서 pH 8.0 사이의 조건에서는 생육정도가 완만하게 증가되었다. 초기 최적 pH는 6.0에서 8.0 사이의 조건에서 배양하였을 때 세균밀도가 높았다(Fig. 2).

탄소원에 따른 생육의 영향. 기초배지에 다양한 탄소원을 3% 첨가하고 BW-13 균주의 증식을 조사하였다. 그 결과 고분자 탄소원인 개량제와 미강을 첨가한 배지에서 흡광도는 각각 $A_{550} = 2.6$ 및 2.4로서 현저하게 높았으며, 다음으로는 저분자 탄소원인 sucrose와 glucose를 첨가한 배지에서 비교적 높은 생장을 유지하였다(Fig. 3). 공시된 탄소원들 중에서 높은 생육도를 나타낸 개량제, 미강, sucrose를 각각 24시간 간격으로 시간에 따른 세균 밀도(OD)를 조사한 결과, sucrose의 경우 48시간 이후부터 생

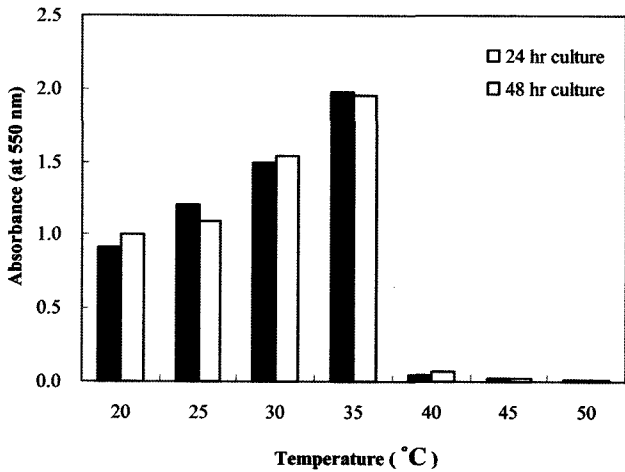


Fig. 1. Effects of temperature on the cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* strain BW-13 in NB medium.

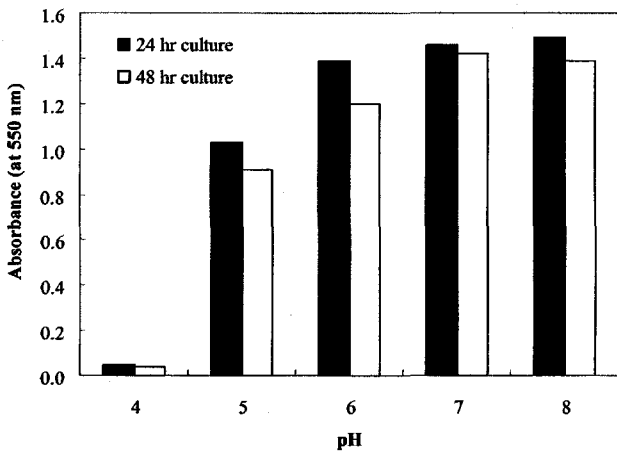


Fig. 2. Effect of initial pH on the cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* strain BW-13 in NB medium.

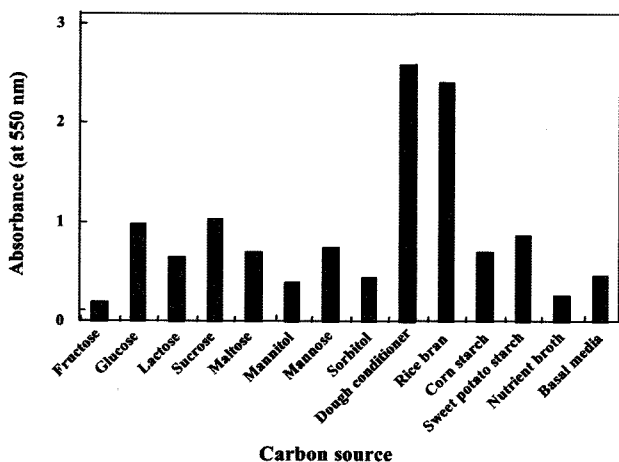


Fig. 3. Effect of various carbon sources on the cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* strain BW-13. The bacterial cells were grown at 30°C in a basal medium containing each carbon source (3%).

육이 억제되었으나, 고분자 물질로 구성된 개량제와 미강의 경우 120시간까지 지속적인 세균의 생육이 이루어졌다(Fig. 4). 특히, 이들 탄소원 중 가장 높은 세균밀도(OD)를 나타낸 개량제 배지를 71 발효기에서 3일간 배양(35°C, 300 rpm, 1.5 atm)한 후 생균수를 확인해 본 결과, 다른 탄소원보다 월등히 높은 3.1×10^{22} CFU/m이었다.

탄소원에 따른 항진균 활성. 각 탄소원에 따른 BW-13 균주의 항진균 활성을 검정하기 위하여 5일간 배양한 배양상등액을 농축하여 paper disk assay한 결과 개량제

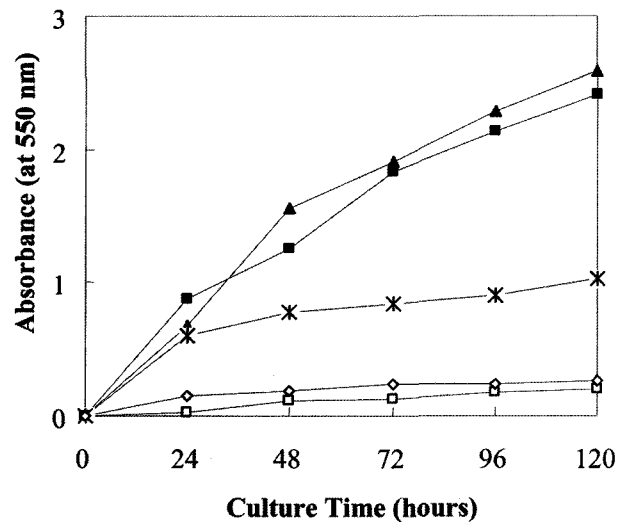


Fig. 4. Growth curves of *Stenotrophomonas maltophilia* strain BW-13 in a basal medium supplemented with various carbon sources. Symbols; ▲, dough conditioner; ■, rice bran; ×, sucrose; ◇, nutrient broth; □, only basal medium.

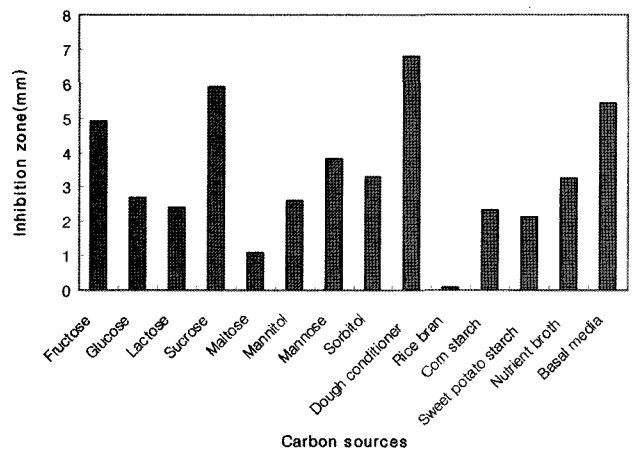


Fig. 5. Comparison of inhibition zones (mm) in mycelial growth of *Rhizoctonia solani* PY-1 induced by cultural extracts of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 supplemented with various carbon sources. The bacterial cells were grown at 30°C for 120 hrs in basal medium containing each carbon source (3%). The paper disk assay was carried out using 5-fold concentrate of the culture supernatant of strain BW-13.

에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다(Fig. 5).

이 등(1998)은 NB배지에 각각 탄소원과 질소원을 첨가하여 항균물질 생산성에 대해 보고한 바 있다. 본 연구에서는 길항세균 BW-13 균주의 대량배양을 위한 영양원으로 비교적 시중에서 구입이 용이하고, 저렴한 천연고분자 물질인 개량제, 미강, 옥수수전분 등을 기초배지에 첨가하여 다른 저분자 탄소원들과 비교하였는데, 이들 중 개량제가 길항세균 *S. maltophilia* BW-13의 증식과 항진균 활성에 가장 효율적인 탄소원으로 조사되었다. 또한, 개량제에 Yeast extract를 첨가하거나 첨가하지 않을 경우 세균의 증식과 항진균 활성은 비슷한 양상을 보였는데, 이는 BW-13 균주가 개량제에 다량 함유되어 있는 대두유 성분을 효과적인 질소원으로 이용하기 때문인 것으로 생각된다. 이상의 결과로, 개량제는 BW-13 균주의 항균 활성과 대량 증식에 유용한 영양원인 것으로 확인되었다. 개량제의 구성성분은 대두유 이외에도 포도당, 소맥분, 글리세린, 지방산 에스테르, 주석산, 초산 및 비타민 C를 함유하고 있어 대량배양시 세균의 영양원으로 손색이 없으며, 더욱이 개량제 구성성분의 12%를 차지하는 대두유는 질소원의 기능을 발휘하기 때문에 추가 질소원을 필요로 하지 않으므로 미생물 농약 개발에 있어서 생산단가의 절감 효과를 가져올 수 있을 것으로 생각된다. 개량제가 포함하는 성분들은 제빵시 pH 고정, 점성 유지, 보존성 향상 등의 기능이 있어서 이들 성분이 미생물에도 유사하게 상승효과를 제공할 것으로 생각된다. 따라서 기초배지에 개량제 3% 첨가한 것을 BW-13 균주의 대량배양배지로 선발하였다.

요 약

결구상추 밀둥썩음병원균인 *Rhizoctonia solani*에 대한 길항세균으로 보고된 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 균주의 배양적 특성과 항균물질의 생산능을 조사하고 대량배지를 선발하였다. BW-13 균주의 초기 pH와 배양적온을 조사한 결과, pH는 6.0~8.0에서, 온도는 35°C에서 세균의 생육이 가장 높았다. 대량배양을 위한 효율적인 탄소원을 선발하기 위하여 glucose, sucrose, lactose, maltose, manose 등의 저분자 탄소원과 개량제, 미강, 옥수수전분, 고구마전분 등의 고분자 탄소원을 사용하여 BW-13 균주의 성장과 항균활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 기초배지에 3% 개량제를 첨가했을 때 BW-13 균주의 세균 증식과 항균활성에 가장 효과적이었다. 따라서 기초배지(1.25% K_2HPO_4 , 0.38% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4$ ·

7H₂O, 0.5% Yeast extract)에 개량제 3% 첨가한 배지(dough conditioner media)를 BW-13 균주의 대량배양용 배지로 선발하였다.

감사의 글

이 논문은 농림부 농림기술개발연구과제(2002-2005)의 연구개발비에 의하여 수행된 결과의 일부임.

참고문헌

- 백정우, 김한우, 김현주, 박종영, 이광열, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. *Sclerotinia sclerotiorum*에 의한 결구상추 균핵병(*Sclerotinia rot*)의 발생과 병원성. 식물병연구 10: 324-330.
- Emmert, E. A. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 1-9.
- Fruh, T., Chemla, P., Ehrler, J. and Farooq, S. 1996. Natural products as pesticides: two examples of stereoselective synthesis. *Pestic. Sci.* 46: 37-47.
- 한국식물병리학회. 1998. 한국식물병명목록. 436 pp.
- 김한규, 조원대, 류화영. 1995. 작물 라이족토니아병 진단 및 방제. 농업과학기술원 작물보호부 병리과. 농촌진흥청 167 pp.
- 김한우, 이광열, 백정우, 김현주, 박종영, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. 결구상추 균핵병균(*Sclerotinia sclerotium*)에 대한 길항세균의 분리 및 동정. 식물병연구 10: 331-336.
- 김한우, 박종영, 김현주, 이광열, 이진우, 최우봉, 이선우, 문병주. 2005. *Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밀둥썩음병 방제 균주 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 분리 및 동정 11: 152-157.
- 김현주, 박종영, 이진우, 정순재, 문병주. 2003. *Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밀둥썩음병 발생과 병원성검정을 위한 접종원 선발. 농업생명자원연구 12: 37-49.
- 김현주, 박종영, 백정우, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. *Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밀둥썩음병(Bottom rot)의 발생과 병원성. *J. Life Science* 14: 689-695.
- Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., Powell, K. A., Schulz, M. A., Sinks, C. A., Worthington, P. A. and Youle, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 349-372.
- 이기성, 김근언, 강태섭. 1998. 생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물 살균제의 상업적 개발. 농림부 연구보고서. 113 pp.
- Montersinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6: 245-252.
- 문병주. 2002. *Botrytis cinerea* 제어용 환경친화적 미생물농약개발 및 실용화. 농림부 연구보고서. 97 pp.