

미생물제조제 생산을 위한 식물병원성 곰팡이 YK101 균주의 액체배양 방법

박선호^{1,2}, 구경본¹, 박재성², 홍연규³
 계명대학교 공학부¹, (주)바이코시스 부설연구소², 농촌진흥청 영남농업시험장³
 전화 (053) 580-5457, (053) 587-1034/5, FAX (053) 587-1034

Abstract

To optimize the culture conditions for fungal pathogen YK101, the effects of culture medium, temperature and agitation on mycelium production were investigated. The optimum temperature and agitation for the cultivation of YK101 were 28°C and 150rpm, respectively. The optimized medium was composed of 1.0~ 2.0% total sugar from sucrose, 1.0% yeast extract and 0.05% MgSO₄ · 7H₂O.

서론

오늘날 국민의 생활수준 향상으로 안전식품에 대한 요구가 강하게 증대되고, 끊임 없이 환경오염 문제와 농약의 위해성이 대두되고 있다. 그러므로 농업 생산 환경의 유지·보전 및 안전농산물의 생산, 자연환경 및 생태계의 보존을 지향하는 유기농법이나 자연농법이 급속히 확대되고 있는 추세에 있으며 화학농약을 대체할 미생물제의 종류 및 사용량이 급속히 증가할 것으로 예상되고 있다¹⁾.

최근 곰팡이를 이용한 생물학적 제조제로 탄소원이 첨가된 영양배지에서 잘 자라며 균총의 색깔이 백색이고 유격균사를 형성하는 담자균이 눈에 발생하는 자귀풀과 잔디포장에 발생하는 클로버에 대한 강한 제조능력을 가지고 있음이 보고 된 바 있다²⁾.

이 균사현탁액을 방제 대상 식물체에 처리하였을 때, 자귀풀이 7일만에 약 95% 이상이 고사되고³⁾, 클로버는 뿌리 주위부터 흰색의 균핵이 형성되면서 균사체가 침입하여 4-5일 이내에 줄기전체가 고사하고 뿌리는 병반이 점차 진전하여 약 10일내에 뿌리 전체가 말라 죽는다. 뿐만 아니라 일년생 및 다년생 잡초 제조제인 파란들입제(일명:flazasulfuron)와 비교 처리시 더욱 강력한 제조활성을 나타내며, 처리 2개월 후 신초의 발생이 3개에 불과하였으나 파란들입제 처리구에서는 뿌리의 생존으로 약 295개의 신초가 발생하였다²⁾.

본 연구에서는 미생물제조제 대량생산을 위한 액체배양 조건 및 경제적 배지를 개발하는데 그 목적이 있으며 이러한 목적에서 제조활성을 띠는 곰팡이인 YK101 균주를 액체 배양할 때 미생물제조제로 이용하기 위한^{4,5)} 최적배양조건을 확립하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 실험에 사용된 YK101 균주는 탄소원이 첨가된 영양배지에서 잘 자라며 균총의 색깔이 백색이고 유격균사를 형성하는 담자균의 일종으로, 영남농업시험장에서 whiteclover로부터 분리한 균주이다²⁾. 균주 보관용 배지는 PDA (Potato Dextrose Agar)배지를 사용하였고, 종균배지로는 PD broth 배지를 사용하였다.

2. 액체배양 및 분석방법

포장에서 발생한 클로버 뿌리에서 분리한 균주를 한천배지에서 순수분리한 후

PDA 배지에 이식하여 28 °C에서 5일간 배양하여 균총을 형성시켰다. 직경 5mm 크기의 균총을 150 mL의 PD broth가 든 250 mL 삼각플라스크에 2개씩 넣고 28 °C, 150 rpm으로 조정된 shaking incubator에 넣고 5일간 진탕배양하였다.

건조 균체량 측정은 100 mL 배양액을 Whatman No. 2 여과지를 이용하여 감압여과 후 증류수로 잔여 배지성분을 세척한 다음 70°C에서 12시간 건조한 후 dry cell weight(DCW)를 측정하였다⁶⁾.

3. 배지조성 최적화

2.0% bacto dextrose가 함유된 배지에 sucrose의 농도를 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%로 첨가하여 배지를 조제한 후 250 mL 삼각플라스크에서 조업부피가 150 mL가 되도록 액체배지를 만들어 PDA배지상에서 배양한 균체 2개를 접종한다. 배양시 온도는 28°C로 하고, 150 rpm으로 5일간 진탕배양하여 그 영향을 조사하였다.

배지내 질소원의 영향을 조사하기 위해서는 bacto peptone, proteose peptone, tryptone, yeast extract 등 여러 종류의 유기질소원을 1.0%로 첨가하여 각각의 경우에 균사의 성장과 균체의 생성을 측정하여 질소원의 영향을 살펴보았다.

또한 다양한 무기염류 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl)를 0.1% 농도로 첨가하여 균사성장과 균체의 생성을 관찰하여 그 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

2.0% bacto dextrose를 함유한 배지에 sucrose의 농도를 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%로 첨가하여 그 영향을 조사한 결과 최대 균체가 농도 2.0%인 경우에 89.31 g/L로 가장 좋은 결과를 보였다(Table 1). 균체의 성장 모습은 육안으로도 잘 자랐음을 확인할 수 있을 정도로 균체의 성장이 왕성하였다. 균체의 성장을 좀 더 자세히 살펴보면 성장초기에는 균체가 균사체 형태로 자라지만 성장이 진행됨에 따라서 pellet형태로 성장함을 알 수 있었다. 균체의 수율은 1.0% sucrose 농도에서 가장 높은 반면, 2.0%이상 증가하면 $Y_{x/s}$ 는 점차 감소되어 최적 sucrose 농도는 1.0~2.0%로 나타났다.

여러 종류의 유기질소원 (bacto peptone, proteose peptone, tryptone, yeast extract)을 1.0%로 첨가하여 그 영향을 살펴본 결과 yeast extract를 이용한 경우가 다른 유기 질소원을 사용한 경우 (17.5~19.7 g/L) 보다 균체농도가 43.97 g/L로 약 45~63% 정도 높았다(Table 2).

무기염류를 종류별로 0.1% 농도로 첨가하여 균사성장과 균체의 생성을 관찰한 결과, 대부분 control보다 균체농도가 비슷하거나 저조하였다(Table 3). 그러나 무기염류 중에서도 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가한 경우 균체농도가 41.01 g/L로 control보다 약간 높게 나타나 농도별로 그 영향을 다시 조사하였다.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.05~0.2% 농도별로 첨가하여 배양한 결과, 균체농도가 무기염류의 농도에 따라 크게 변하지 않았지만 이중 가장 나은 균사의 성장과 균체의 생성을 보인 것은 0.05%인 것으로 나타났다(Table 4). 따라서 이상의 결과에서 최적의 기본배지 조성은 1.0~2.0% total sugar, 1.0% yeast extract, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 나타났다. 그러나 액체배양에 따른 균사의 성장조건이 달라 고체배양시 균사의 제조활성과 비교하기 위하여 그 fungal pathogen에 대한 Bioassay를 진행중에 있다.

요약

강한 제초활성을 띠는 곰팡이 균주 YK101의 배양조건을 최적화하기 위하여 균사와 균체 생산에 대한 온도, 교반속도 그리고 배양배지의 영향을 조사하였다. YK101의 최적 배양온도와 교반속도는 각각 28°C, 150rpm이었다. 최적화된 배지조성은 1.0~2.0% total sugar, 1.0% yeast extract 그리고 0.05% MgSO₄ · 7H₂O 이었다.

감사

본 연구는 2001년 한국과학재단 RRC(전통미생물자원개발 및 산업화연구센터)의 연구비에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김창진, "미생물제초제"(1998), 산업과 미생물, 433-453
2. 홍연규, 엄재열, 조재민, 조현재, 김순철, "Pathogenicity to whiteclover of fungal pathogen YK101 and its host range"(1998), *한국잡초학회지*, **18**(2), 37-38
3. 홍연규, 엄재열, 조재민, 신동범, 박경배, "Weeding efficiency of pathogen isolate YK101 to northern jointvetch from whiteclover"(1998), *한국잡초학회지*, **18**(2), 36
4. 김판경, 박동진, 최순용, 김창진, "토끼풀(*Trifolium repens* L.)에 제초활성을 나타내는 *Penicillium* sp.의 탐색"(1996), *한국농화학회지*, **39**, 455-459.
5. 김판경, 박동진, 최정섭, 황인택, 홍경식, 김창진, "*Penicillium* sp.를 이용한 토끼풀의 생물학적 방제"(1997), *한국농화학회지*, **40**, 65-70
6. 김병혁, 강성우, 윤철식, 성재모, 홍석인, 김승욱, "Spore production of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* 726, using molasses"(1999), *한국생물공학회지*, **14**(3), 365-370

Table 1. Effect of total sugar concentration on cell growth of YK101 strain.

Initial total sugar (g/L)	Final pH	Cell conc. (g/L)	Y _{X/S}
10	2.79	65.96	6.60
20	2.74	89.31	4.47
30	2.75	85.29	2.84
40	2.60	85.12	2.13

Culture was carried out in the medium containing 1.0% bacto peptone as a nitrogen source.

Y_{X/S} : yield constant (g dry cell weight / g carbon source used)

Table 2. Effect of various organic nitrogen sources on cell growth of YK101 strain.

Organic nitrogen source (1.0%)	pH	Cell conc. (g/L)	$Y_{X/N}$
Control	2.56	39.78	39.78
Bacto peptone	3.29	19.72	19.72
Proteose peptone	3.32	17.54	17.54
Tryptone	4.93	6.19	6.19
Yeast extract	3.46	43.97	43.97

Culture was carried out in the medium containing 1.0 % organic nitrogen source.

$Y_{X/N}$: yield constant (g dry cell weight / g nitrogen source)

Control : nitrogen source was not added.

Table 3. Effect of inorganic salts on cell growth of YK101 strain.

Concentration (0.1%, w/v)	pH	Cell conc. (g/L)
Control	2.56	39.78
K_2HPO_4	4.29	5.91
KH_2PO_4	2.79	29.67
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	4.56	0.55
$ZnCl_2$	4.64	0.43
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.65	41.01
NaCl	2.83	38.11

Control : inorganic salt was not added.

Table 4. Effect of concentration of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ on cell growth of YK101 strain.

Concentration (%, w/v)	pH	Cell conc. (g/L)
0.05	2.66	42.86
0.10	2.59	42.45
0.15	2.65	42.53
0.20	2.62	42.52

Control : inorganic salt was not added.