

고정화된 *Pantoea agglomerans*에 의한 불용성 인산염의 가용화임원봉, 정 일, 박노동¹, 김길용¹, 강춘형², 박돈희^{2,3}전남대학교 생물화학공학과, 농화학과¹, 화학공학부², 생물산업기술연구소³

전화(062)530-0232, FAX (062)530-1849

Abstract

In this study, phosphate was produced through the solubilization of hydroxyapatite and rock phosphate by *Pantoea agglomerans*, and it was examined the possibility of solubilizing insoluble phosphate salt by immobilized *P. agglomerans* on Ca-alginate bead as support. 520mg/L of phosphate was solubilized when *P. agglomerans* was cultured in HY medium at 30°C, pH7, 100rpm, during 48hours culture. And solubilized phosphate amount was 86.09mg/L when hydroxyapatite in the HY medium was exchanged to rock phosphate.

In case of being used immobilized *P. agglomerans*, 740mg/L of phosphate was solubilized in the HY medium, during 120hrs in the same condition. And 182mg/L of phosphate was solubilized when rock phosphate was added instead of hydroxyapatite.

서론

인산은 일반적으로 토양 내에서 기후나 지질에 따라 분포에 있어서 큰 차이를 갖으며, 토양내에서 식물에 사용되는 회수율도 10% 정도이며, 그에 따른 축적률도 높아지기 때문에 평균 583.3~1042.5 mg-P/kg-Soil 정도의 축적된 상태를 보이기도 하며, 시설 재배지 같은 경우에는 최소 196mg-P/kg-Soil에서 최대 2197mg-P/kg-Soil 정도의 큰 차이를 갖기도 한다. 이렇게 토양내에서 존재하는 인산은 98~99% 정도는 2가의 미네랄과 결합해 있거나 또는 토양 유기물의 형태로 존재한다. 그리고 나머지 1~2%정도가 미생물의 조직을 구성하며 단지 0.01% 정도의 인산만이 용해성 인산으로서 존재한다. 따라서 식물에 충분한 양의 인산을 공급하는 것은 상당히 난해한 문제가 된다. 그것은 앞서 말한 바와 같이 토양내 인산 이온의 농도가 적을 뿐 아니라 비료로서 공급된 인산 이온도 토양내 양이온과 재빨리 결합하여, 용해도가 낮은 물질로 고정되기 때문이다. 이러한 이유로 인산 가용화 균을 이용한 환경 친화적인 생물 비료의 개발이 지속적으로 이루어 졌다. 이는 미생물에 의해 생산되는 유기산 혹은 무기산이 Al, Fe, Ca 등과 결합한 난용성 인산염을 가용화 시키는 점을 이용하여 토양내 유리 인산의 농도를 지속적으로 유지시킬 수 있는 사실에 기인한다. 이러한 이유로 본 실험에서는 토양에서의 미생물의 안정화를 위하여 균의 고정화를 수행하였고, 이는 인산 가용화 미생물을 이용한 미

생물제재에 가능성을 제시하였다. 일반적으로 미생물의 고정화를 수행하면 토양에서의 균의 유출을 막을수 있고, pH나 온도등의 외부환경의 변화에 안정적이어서 이를 토양에 시비할 경우 위에서 언급하였던 미생물 제재의 단점을 해소 할 수 있다.

본 연구에서는 불용성 인산염을 가용화 시킬수 있는 미생물로 알려진 *P. agglomerans*를 이용하여 불용성 인산염인 hydroxyapatite와 인광석을 분해하여 유리 인산 생산능을 조사하였고, Ca-alginate에 고정화된 *P. agglomerans*를 이용하여 이를 불용성 인산염을 가용화시키는 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주와 배지

본 실험을 위해 사용한 미생물은 *P. agglomerans*로서 생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행에서 분양을 받아 LB배지에서 2-3일 간격으로 계대 배양을 하면서 실험에 사용하였다.

2. *P. agglomerans*의 불용성 인산염의 가용화

불용성 인산염으로서 hydroxyapatite와 인광석을 첨가 하였을때의 인산의 생성량과 기질의 소비량 pH의 변화 등을 조사하였다. HY 배지에 각각 4g/L가 되도록 hydroxyapatite와 인광석을 첨가하여 균의 최종 농도를 2%가 되도록 *P. agglomerans*를 접종하고 72시간동안 30°C, 100rpm으로 배양하면서 생성되는 인산의 양과 소모하는 글루코스의 양을 각각 확인하였다.

3. 고정화된 *P. agglomerans*에서의 불용성 인산염의 분해

미생물의 고정화를 위하여 2~3일 간격으로 계대 배양을 한 *P. agglomerans*를 3%의 sodium alginate에 균의 최종 농도가 2%가 되도록 하여 2%의 CaCl₂용액에 적하시켰다. 이를 4°C의 CaCl₂용액에서 12시간 침지 한 후 실험에 사용하였다.

0.4%의 hydroxyapatite가 포함된 배지에 균의 최종 농도가 2%가 되도록 고정화된 *P. agglomerans*를 접종하고 120시간동안 30°C, 100rpm으로 배양하면서 인산의 생성량과 glucose의 소비량 및 pH의 변화를 살펴보았다.

또한 다른 종류의 불용성 인산염에서의 *P. agglomerans*의 인산 가용화 정도를 알아보기 위하여 hydroxyapatite 대신, 같은 양의 인광석을 배지에 넣고 인산의 생성량 및 기질의 소비량, pH의 변화를 알아보았다.

결과 및 고찰

1. *P. agglomerans*의 성장에 의한 불용성 인산염의 분해

4g/L의 hydroxyapatite의 농도를 가진 HY배지에서 *P. agglomerans*의 성장에 의해 생성되는 인산의 양과 글루코스의 소모량을 Fig 1에서 나타내었다. 배양 후 48시간이 지났을 때 520mg/L정도의 양의 인산이 생성되었다.

또한 hydroxyapatite 대신 인광석을 첨가한 배지에서 균체의 성장에 따른 인산의 생산량과 글루코스의 소비량을 Fig 2에서 나타내었다. 이때 생성된 인산의 양은

86.09mg/L 정도로 나타났다.

2. 고정화된 *P. agglomerans*에 의한 불용성 인산염의 분해

고정화된 *P. agglomerans*의 인산 가용화 정도를 확인하기 위하여 고정화한 *P. agglomerans*를 HY 고체 배지에 정지하여 비드 주위의 투명환을 확인하였다.

4g/L의 hydroxyapatite의 농도를 가진 HY 배지에서 고정화된 *P. agglomerans*의 성장에 따른 생성된 인산의 양과 글루코스의 소모량 및 pH변화를 Fig 3에서 나타내었다. Free cell의 배양에서와 달리 48시간이 지나도 계속적으로 인산이 생성되었으며 120시간에서의 생성된 인산은 740mg/L정도가 되었다. 또한 Fig 4에서는 hydroxyapatite대신 인광석을 첨가한 배지에서 고정화된 *P. agglomerans*의 성장에 따른 인산의 생성량을 보여준 것이며, 120시간째에 최종적으로 182mg/L 정도로 생산되었다.

요약

본 연구에서는 *P. agglomerans*를 이용하여 불용성 인산염인 hydroxyapatite와 인광석을 가용화 하여 유리 인산을 생산하였고, *P. agglomerans*를 Ca-alginate에 고정화하여 이를 불용성 인산염을 가용화시키는 가능성을 조사하였다. HY배지에서 30℃, 100rpm으로 pH 7에서 48시간 배양한 경우 520mg/L의 유리인산이 생성되었고 hydroxyapatite대신 같은 농도의 인광석을 첨가하였을 때 생성되는 유리 인산의 양은 86.09mg/L였다. 또한 *P. agglomerans*를 Ca-alginate에 고정화하였을 때 HY배지에서 같은 조건으로 120시간 동안 계속적으로 인산이 생성되었고, 이때 생성된 인산의 농도는 740mg/L였으며, 인광석을 첨가한 경우에서도 182mg/L 정도의 유리 인산이 생성되었다.

사사

이 연구는 2000년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Rodriguez, Hilda and Reynold Fraga (1999), Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnology advances*, **17**, 319-339.
2. Kim, Sheng Ai (1999), Growth of plant and changes in phosphorous availability in phosphorous accumulated soils, *The Journal of Society of Soil Science and Fertilizer*, **32**(3), 261-267.
3. Suh, Jang Sun , Yo Sung Song , Kwang Sik Kim (1995), Distribution of phosphate fractions in greenhouse soils located on southwest regions in Korea

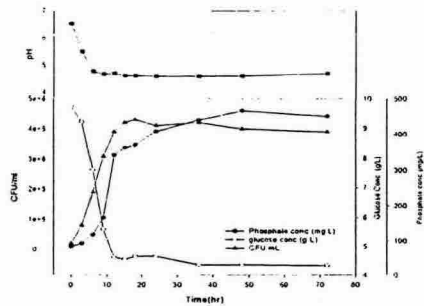


Fig. 1 changes of pH, amount of produced phosphate, and amount of consumed glucose during culture period of 72hrs in HY broth at 30°C pH7, and 100rpm..

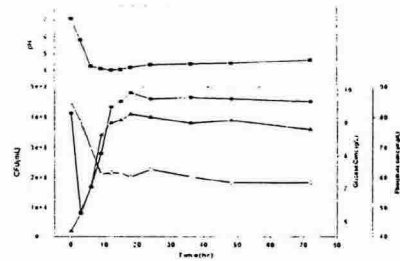


Fig. 2.. Changes of pH, amount of produced phosphate, and amount of consumed glucose during *P. agglomerans* culture period of 72hrs in HY broth containing 0.4% rock phosphate instead of hydroxyapatite at 30°C pH7, and 100rpm.

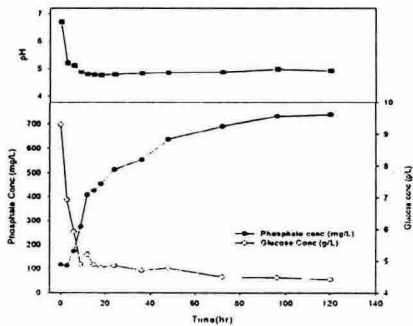


Fig. 3. Changes of pH, amount of produced phosphate, and amount of consumed glucose of *P. agglomerans* cultivation during 120hrs in HY broth at 30°C 100rpm..

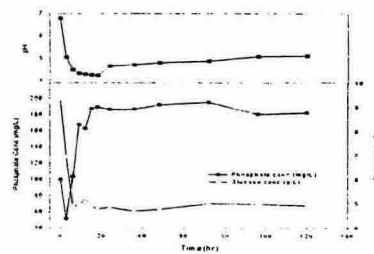


Fig.4 Changes of pH, amount of produced phosphate, and amount of consumed glucose of immobilized *P. agglomerans* cultivation during 120hrs in HY broth containing 0.4% rock phosphate instead of hydroxyapatite at 30°C 100rpm..