

길항균 *Bacillus subtilis* CAP134의 대량생산을 위한 배양조건*

박흥섭** · 조정일***

전남대학교 농과대학 원예학과**, 생물공학연구소***

Cultural Conditions for Mass Production of Antagonistic *Bacillus subtilis* CAP134

Park Heung-Sub** · Cho Jung-Il***

Dept. of Horticulture**, Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea

Institute of Biotechnology***, Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea

SUMMARY

Cultural conditions for mass production of the antagonistic bacteria, *Bacillus subtilis* CAP134 against pathogens causing major airborne diseases to apple trees, effects of temperature, pH, carbon and nitrogen source in the culture broth were investigated. The bacterial growth was most vigorous when the temperature and pH of the culture broth was 30~35°C and 7, respectively. As for carbon source, dextrose was best followed in order by dextrose(monosaccharides)>sucrose(disaccharides)≥saccharose(di-saccharides)>starch(polysaccharides). Among different sugars, bacterial growth was favored by in the order of brown, black and white sugars, indicating that the bacterial growth might be promoted by the minor elements presented as impurities in the less purified sugars. As for nitrogen source, organic forms were better to bacterial growth than inorganic forms, that is polypeptone was best followed in order by soy sauce, soybean milk and inorganic nitrogens. Differences in bacterial growth among different forms of inorganic nitrogen were negligible.

Key word : *Bacillus subtilis* CAP134, antagonistic bacteria, apple tree, cultural conditions.

* 본연구는 1996년도 농림수산부 특정연구과제(현장에로기술과제)의 연구비로 수행된 연구의 일부임.

I. 緒 言

최근 농약에 의한 중독, 환경잔류, 인간과 가축에 미치는 각종 질병 및 발암성 유발 등의 문제 등이 점차 심각해짐에 따라 생물농약을 이용한 무농약 및 저공해 과수생산에 대한 관심이 크게 증가하고 있다.^{1,2)}

이러한 생물농약은 자연계의 미생물을 이용하는 것으로 안심하고 이용할 수 있다는 큰 장점을 갖고 있으며, 화학농약과 비교하여 방제효과는 큰 차이를 보이지 않으나 약효발현속도에서는 유기합성농약이 속효성인 반면, 미생물농약은 지효성으로 효과의 발현이 약간 늦게 나타나는 특성을 갖고 있다.³⁾

그러나, 장래에 원예산업에서 병해충에 대한 화학적 방제는 줄어드는 반면 환경친화적이고 생태조화적인 생물학적 방제가 환경농법(환경보존형농업)이 정착될것으로 본다. 현재, 유용미생물을 이용한 생물학적 방제는 곤충, 사상균, 세균, 바이러스 및 원생동물 등이 이용되고 있다.⁴⁾ 시판되고 있는 주된 생물학적 방제원은 *Bacillus thuringiensis*(BT) 제가 주종을 이루고 있으며,^{5,6)} 생물농약의 공급은 시판되고 있는 생물농약에 의존하고 있는 실정이다. 일부 유기농업 농가는 시판 생물농약을 원료로 농가에서 자체적으로 조성한 배지로 생물농약을 배양하고 있다. 이러한 길항미생물의 농가별배양법은 이론적으로 부족한 실정이며, 배양단계에서 오염되거나 변질되는 경우가 많다.

그러므로 본 연구에서는 사과나무에서 발생하는 부패병, 탄저병, 반점낙엽병, 갈반병 및 부관병 등에 길항력이 우수한 길항성 세균 *Bacillus subtilis* CAP 134의 대량생산을 위한 배지의 온도, pH, 탄소/질소 비율 등을 실험하여, 장래 환경농업(환경보존형농업)에서 생물농약으로 사용하는 유용미생물의 배양체계를 확립하는데 기초자료로 활용하고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. pH와 온도별 성장반응

Bacillus subtilis CAP 134을 완전배지에서 2~3회 정도 계대배양하여 활성화 시킨 균주를 모균으로 하여, 한 백금이 정도의 균주를 5ml의 NB(nutrient broth)에 넣고 배양한 후 배양한 균주 중에서 1%의 균주를 채취하여 100ml의 NB에 옮겨 12시간 정도 진탕배양하였다.⁷⁾

또한 이 중에서 1%를 취하여 500ml 삼각플라스크내의 100ml NB에서 12시간 정도 진탕배양(105rpm, Hanbaek Sci. Co. HB-201SL) 한 후 인버터 제어 원심분리기(one-chip microprocessor centrifuge, Hanil S750-4B)를 사용하여 생리식염수(NaCl, 0.85%)로 균체를 3번 씻은 후(3,000g, 10min, 4℃) 상정액은 제거하고 균체만을 회수하였다. 배양액의 pH는 1N-HCl과 1N-NaOH를 사용하여 조절하였다. 배양액의 pH별 길항 미생물의 성장

은 pH를 변화에 따라 길항균의 최적생육조건을 조사하기 위하여 배지의 pH를 4~9로 변화시키면서 길항균을 배양하였다. 온도에 따른 *Bacillus subtilis* CAP 134의 성장최적 온도조건을 설정하기 위해서 배양액의 온도를 25℃~45℃ 범위로 각각 조성하여 길항균의 생육도를 조사하였다. 배양액의 온도조절은 유기농법연구회에서 제작한 자동온도 조절기로 조절하였다.

2. 탄소원 및 질소원의 종류와 농도별 성장반응

탄소원⁸⁾으로 white color sugar(백설탕), gray color sugar(갈설탕), blackish color sugar(흑설탕), sucrose, dextrose 및 starch, 질소원⁹⁾으로는 soy source(간장), soy bean milk(두유), polypeptone, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NH_4Cl 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등을 종류와 농도별로 처리하여 길항균의 생육활성도를 측정하였다.¹⁰⁾

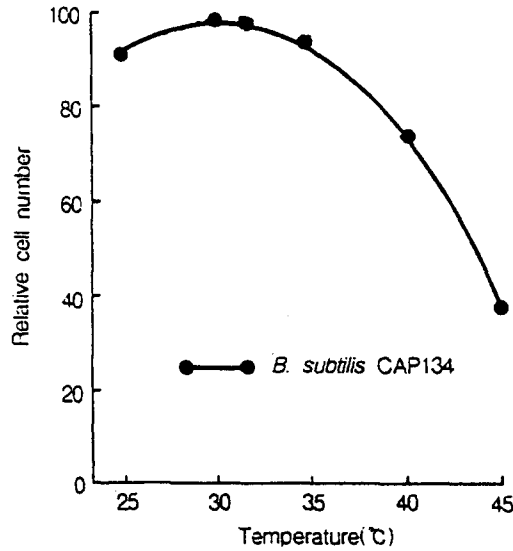
III. 結果 및 考察

선발된 길항균을 실제로 과수원의 포장실험에 적용시키려면 대량 배양하여야 한다. 길항균을 대량 배양하기 위하여 먼저 길항력이 우수한 다량의 cell mass를 얻을 수 있는 값싼 탄소원과 질소원을 이용하여 배양에 필요한 배지재료의 단가를 줄이고저 실험을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 온도변화에 따른 길항미생물의 성장

배양액내에서 *Bacillus subtilis* CAP 134의 성장최적조건을 선정하기위해서 배양액의 온도를 25~45℃ 범위에서 길항균의 생육도를 조사하였다. 실험결과 32℃에서 생장이 가장 좋은 결과를 보였다.<그림 1> 길항균의 경우 생육최적온도보다 30~35℃ 온도범위에서 *B. subtilis* CAP 134의 생장은 양호한 것으로 보여지며, 35℃ 이상의 액온에서는 *B. subtilis* CAP134의 성장 및 활성이 점차 낮아지는 것으로 나타났다. 그러므로 이러한 온도범위는 여름철 고온기에 길항균 배양의 최적온도라고 볼수 있으며, 겨울철에는 길항미생물의 배양시 배양액의 가온이 필요하다고 생각되었다.

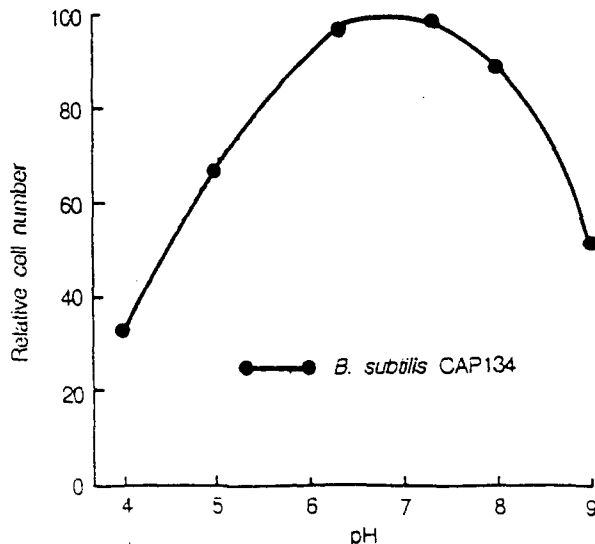
Fig. 1. Effect of temperature on relative cell growth of antagonistic *Bacillus subtilis* CAP134



2. pH별 길항미생물의 성장

pH 변화에 따라 길항균의 최적생육조건을 조사하기 위하여 배지의 pH를 변화시키면서 길항균을 배양하였다. *Bacillus subtilis* CAP 134의 성장에 가장 적합한 pH의 범위는 7 내외인 것으로 측정되었다. 본 실험의 결과 *Bacillus subtilis* CAP 134는 pH 6.5~7.5의 범위에서 성장 및 활성이 가장 좋았던 것으로 나타났다.<그림 2>

Fig. 2. Effect of pH on relative cell growth of antagonistic *Bacillus subtilis* CAP134



3: 배지중의 탄소원 및 질소원에 따른 길항균의 성장

1) 두유(질소원)와 설탕(탄소원) 이용

질소원으로는 시판용 두유(Soy bean milk)를 사용하여 1~7%의 농도로 처리하고, 탄소원으로는 백설탕(white color), 갈색설탕(gray color) 및 흑설탕(blackish color)을 5~20%의 농도로 각각 조성하여 *Bacillus subtilis* CAP 134를 배양한 결과는 표 1과 같다.

시판용 두유를 질소원으로 사용하고, 탄소원으로 사용한 설탕의 색깔에 따른 균주의 성장을 보면 흑설탕에서 균주의 생장이 가장 우수한 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 질소원을 간장으로 이용하였을 경우와 유사한 것으로 보였다. 향후 설탕색 차이에 따라서 시판용 설탕내에 정제 및 함유되어 있는 각 성분이 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하여, 정확한 성장요인을 구명할 필요성이 있다고 생각되었다. 균주의 생장이 가장 좋은 처리구는 흑설탕(blackish color sugar) 15%와 두유(soy bean milk) 5%로 배지를 조성한 처리구였으며, 처리전반적으로 두유 3~5%의 범위가 균주의 성장에 좋은 것으로 보였다. 간장 및 두유 등은 우리 주위에서 구입이 용이한 질소원으로서의 이용가능성을 조사하기 위하여 본 실험에서 기초적으로 이용하였던 바 앞으로 구입이 용이하고 단가가 낮은 질소원의 개발이 요구되었다.

Table 1. Relative cell growth(%) of *Bacillus subtilis* CAP 134 as affected by sugar and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 500 μ l into 50ml Erlenmeyer flask containing cultural media, and incubated at 34 $^{\circ}$ C for 5 days.

Carbon(%)\Nitrogen(%)		Soy bean milk (%)			
		1	3	5	7
White color sugar	5	15.4	13.9	9.9	8.6
	10	58.2	55.0	53.1	49.2
	15	81.2	81.3	77.5	74.6
	20	69.0	68.5	66.5	66.0
Gray color sugar	5	15.2	15.7	24.1	15.8
	10	62.2	60.9	63.4	62.2
	15	83.1	82.3	81.7	79.1
	20	74.2	74.8	73.3	60.8
Blackish color sugar	5	34.5	29.1	35.0	36.3
	10	70.2	73.1	77.3	78.0
	15	90.4	93.6	100.0	80.1
	20	83.7	86.6	86.9	89.6

*Relative to soy bean milk(nitrogen) 5%, blackish color sugar(carbon) 15%.

2) 간장(질소원)과 백설탕, 갈설탕 및 흑설탕(탄소원) 이용

질소원으로 간장(soy sauce)을 사용하여 1~7%의 농도로 처리하고, 탄소원으로는 시중

에서 시판하고 있는 설탕을 배지의 원료로 사용하여 각 농도별로 처리할 경우 *Bacillus subtilis* CAP 134의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과는 <표 2>와 같다.

Table 2. Relative cell growth(%)* of *Bacillus subtilis* CAP 134 as affected by sugar and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 500 μ l into 50ml Erlenmeyer flask containing cultural media, and incubated at 34 $^{\circ}$ C for 5 days.

Carbon(%) \ Nitrogen(%)		Soy sauce (%)			
		1	3	5	7
White color sugar	5	57.2	52.5	44.3	42.8
	10	76.3	77.4	66.6	57.8
	15	79.1	72.8	69.8	52.7
	20	68.4	74.3	59.1	48.0
Gray color sugar	5	59.0	58.1	53.1	47.0
	10	83.4	76.0	71.0	65.3
	15	82.4	74.8	69.1	63.9
	20	77.5	66.4	67.0	58.0
Blackish color sugar	5	64.3	63.90	69.0	60.0
	10	88.4	89.0	84.8	82.1
	15	88.3	100.0	75.7	70.0
	20	73.0	78.0	67.0	49.4

*Relative to soy sauce(nitrogen) 3%, blackish color sugar(carbon) 15%.

탄소원으로 이용한 시판용 설탕은 하얀색(white color) 갈색(gray color) 및 흑색(blackish color)을 각각 5~20%로 사용하였다. 실험전반적으로 흑설탕으로 *Bacillus subtilis* CAP 134을 배양했을 경우에 균주의 생장이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 흑설탕 15%와 간장 3%로 배양하였을 경우에 길항균의 생장이 가장 좋은 것으로 나타났다. 설탕의 색깔에 따라서 균주의 생장이 다른 것은 설탕내에 함유되어 있는 성분이 약간씩 차이가 있는 것으로 생각되었으며, 질소원으로 사용한 간장의 농도는 3% 내외의 범위에서 균주의 생장이 양호한 것으로 보였는데, 향후 C/N ratio의 실험시 더욱 다양한 범위에서 이러한 결과를 검토해 볼 필요성이 요구되었다.

3) 간장, NH₄Cl(질소원)과 dextrose, saccharose 및 백설탕(탄소원) 이용

질소원으로서 NH₄Cl을 1~7%로 처리하고, 탄소원으로는 dextrose, saccharose 및 백설탕의 농도를 5~20%로 조성하여 길항균을 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양하였다. NH₄Cl 3%와 saccharose 5%에서 균주의 생장이 가장 양호하였는데<표 3> 차후에 5%이하 범위의 saccharose농도로 길항균을 배양해 볼 필요성이 있었으며, 탄소원과 질소원별 적정 C/N ratio 조성에 따른 저비용 균주생산 시스템의 체계화가 요구되었다.

Table 3. Relative cell growth(%) of *Bacillus subtilis* CAP 134 as affected by sugar and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 500 μ l into 50ml Erlenmeyer flask containing cultural media, and incubated at 34 $^{\circ}$ C for 5 days.

Carbon(%) \ Nitrogen(%)		NH ₄ Cl			
		1.0	3.0	5.0	7.0
Dextrose	5	12.0	18.9	20.8	20.3
	10	17.0	18.9	21.3	21.3
	15	18.5	20.9	31.7	22.7
	20	18.4	18.4	21.8	23.6
Saccharose	5	50.3	69.0	77.8	18.2
	10	65.1	100.0	79.0	21.3
	15	45.1	81.0	50.8	25.2
	20	39.1	46.4	50.1	26.0
White color sugar	5	72.9	63.9	30.3	18.3
	10	22.7	33.1	40.7	36.9
	15	23.6	52.6	50.7	37.3
	20	23.6	53.1	60.1	37.8

*Relative to NH₄Cl(nitrogen) 3.0%, Saccharose(carbon) 10%.

탄소원으로는 dextrose, saccharose 및 백설탕을 공시하고 질소원으로는 간장을 사용하여 길항균을 배양한 결과 설탕 10%와 간장 3%에서 균주생장이 가장 양호하였다.<표 4>

Table 4. Relative cell growth(%) of *Bacillus subtilis* CAP 134 as affected by sugar and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 500 μ l into 50ml Erlenmeyer flask containing cultural media, and incubated at 34 $^{\circ}$ C for 5 days.

Carbon(%) \ Nitrogen(%)		Soy sauce (%)			
		1	3	5	7
Dextrose	5	73.3	69.7	54.9	28.5
	10	76.7	8.2	7.0	6.8
	15	12.6	10.4	9.8	9.2
	20	15.1	13.7	12.0	12.0
Saccharose	5	99.9	91.5	80.1	46.2
	10	78.4	66.6	58.7	13.8
	15	12.1	10.3	10.7	9.7
	20	13.2	13.1	12.8	12.2
White color sugar	5	68.0	89.2	69.6	45.9
	10	75.7	100.0	70.9	69.0
	15	60.6	76.1	60.4	59.9
	20	45.8	60.0	52.8	42.2

*Relative to soy sauce(nitrogen) 3%, white color sugar(carbon) 10%.

균주배양에 필요한 적정 C/N ratio에 대해서는 앞으로 상세한 연구가 필요하며, 우리

나라 농업환경에서 농업부산물로 배출되는 왕겨, 혼탄 및 각종 축산폐기물 등 각종 소재의 배지로의 이용에 관한 연구가 필요한 것으로 생각되었다.

또한, 본 실험에서 탄소원으로는 시판용 설탕, 질소원으로는 간장이 길항균의 성장에 가장 효과적으로 나타났는데, 이것은 설탕과 간장에 다소 함유되어 있지만 정제되지 않은 각종 미량원소의 영향으로 여겨지며, 앞으로 탄소원과 질소원 뿐만 아니라 미량원소 농도에 따른 균주의 배양 최적화 및 길항활성조절이 필요하다고 생각된다.

4) 황산암모늄(질소원)과 dextrose, saccharose 및 백설탕(탄소원) 이용

질소원으로는 황산암모늄을 사용하고, 탄소원으로는 dextrose, saccharose 및 설탕을 사용하여 탄소원 및 질소원별 농도가 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.<표 5> 탄소원으로 이용한 재료중에는 설탕이 균주의 성장에 가장 좋은 것으로 보였는데, 이것은 설탕중에 완전히 정제되지 않고 잔존해 있는 미량원소의 영향으로 생각되었다. 설탕과 황산암모늄의 농도를 각각 10%와 1%로 조합하여 배지를 조제한 처리구의 길항균의 생장이 가장 우수하였던 것으로 보였다.

현재, 도시음식물 찌꺼기의 처리가 심각한 문제로 대두되고 있으며, 이러한 측면에서 도시음식물 찌꺼기의 비료로서의 가공 및 농업으로의 재활용 및 유용미생물을 이용한 음식물의 퇴비화와 가축의 사료화를 추진할 필요성이 있다.

그러므로, 본 연구에서 이용한 탄소원과 질소원 뿐만아니라 다양한 탄소원 및 질소원의 개발이 요구된다.

Table 5. Relative cell growth(%) of *Bacillus subtilis* CAP 134 as affected by sugar and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 500μl into 50ml Erlenmeyer flask containing cultural media, and incubated at 34°C for 5 days.

Carbon(%) \ Nitrogen(%)		(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)			
		0.1	0.5	1.0	3.0
Dextrose	5	49.4	57.5	60.9	57.7
	10	74.1	67.0	76.3	63.0
	15	74.0	67.9	70.0	44.4
	20	41.0	53.2	43.6	19.8
Saccharose	5	80.4	83.5	80.3	76.9
	10	91.6	94.5	87.3	82.0
	15	93.2	80.9	80.4	75.7
	20	53.4	55.4	50.0	34.3
white color sugar	5	47.4	36.3	64.0	58.4
	10	51.2	50.5	100.0	88.3
	15	51.6	54.8	80.9	71.1
	20	38.7	46.5	42.2	40.9

*Relative to (NH₄)₂SO₄(nitrogen) 1.0%, white color sugar(carbon) 10%.

5) Polypeptone(질소원)과 dextrose, saccharose 및 설탕(탄소원) 이용

질소원으로서 polypeptone을 이용하여 1~7%로 처리하고, 탄소원으로는 dextrose, saccharose 및 설탕 등을 5~20%로 상호조합하여 길항균 CAP141을 32℃에서 2일간 배양한 결과 polypeptone 3%와 설탕 10%로 배지를 조성한 처리구의 균주 생장이 가장 양호하였다.<표 6>

탄소원 농도별 polypeptone의 적정범위를 보면 대체적으로 polypeptone 1~3%의 농도에서 균주생장이 좋았다. 5~7%의 농도보다 낮은 저농도의 polypeptone에서 균주의 생장이 양호하였는데, 차후에 이 보다 더 낮은 농도에서 미생물의 생장을 실험할 필요성이 요구되었다.

Table 6. Comparison of relative cell growth(%) of *Bacillus subtilis* CAP 134 by carbon and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 100μl into 300ml Erlenmeyer flask containing cultural media various carbon and nitrogen and incubated at 32℃ for 5 days.

Carbon(%) \ Nitrogen(%)		Polypeptone			
		1	3	5	7
Dextrose	5	82.6	98.0	64.0	8.8
	10	82.2	96.7	64.6	11.1
	15	72.3	80.1	35.0	12.1
	20	29.4	87.0	26.7	13.4
Saccharose	5	87.0	94.2	86.0	82.6
	10	87.5	95.3	74.0	57.7
	15	81.6	91.6	62.9	45.8
	20	72.3	87.3	58.3	29.6
white color sugar	5	90.7	95.1	95.4	89.7
	10	90.2	100.0	86.5	50.2
	15	86.0	95.5	75.9	60.5
	20	76.6	88.4	65.7	55.3

*Relative to polypeptone(nitrogen) 3.0%, white color sugar(carbon) 10%.

6) 설탕, starch(탄소원)와 간장, (NH₄)₂SO₄ 및 (NH₄)₂CO(질소원) 이용

길항균 *Bacillus subtilis* CAP 134를 대량배양함에 있어서 배지중의 탄소원으로서 설탕과 질소원으로서 간장, (NH₄)₂SO₄ 및 (NH₄)₂CO 등을 농도별로 처리하여 균성장 정도를 비교검토하여 최적배양에 알맞는 배지성분을 실험하여 선택하였다.<표 7>

Table 7. Comparisons of relative cell growth(%)* of *Bacillus subtilis* CAP 134 by carbon and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 100 μ l into 300ml Erlenmeyer flask containing various carbon and nitrogen cultural media and incubated at 32 $^{\circ}$ C for 2 days.

Carbon(%) Nitrogen(%)		Sugar conc. (%)			
		5	10	15	20
Soy	1	30.5	41.1	42.5	34.4
	3	66.5	81.2	79.8	58.3
	5	53.2	100.0	95.0	70.1
	7	48.3	76.7	72.2	62.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	10.3	11.4	12.0	10.3
	3	12.3	12.5	8.7	5.9
	5	7.8	2.9	2.9	2.3
	7	2.4	2.6	2.8	2.4
(NH ₄) ₂ CO	1	2.9	6.1	2.8	2.7
	3	2.6	2.8	2.7	2.5
	5	2.4	2.5	2.5	2.4
	7	2.5	2.7	2.6	2.4

*Relative to soy(nitrogen) 5.0%, white color sugar(carbon) 10%.

탄소원으로서는 시판용 설탕을 이용하고, 질소원으로는 간장, (NH₄)₂SO₄ 및 (NH₄)₂CO 등을 이용하여 길항균 CAP141을 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양한 결과 설탕 10%와 간장 5%로 조제한 배지에서 배양한 균주의 생장이 가장 우수한 것으로 나타났다. 질소원별 길항균의 생장은 황산암모늄과 요소를 질소 배양원으로 이용한 것보다 간장을 이용한 것이 좋은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 간장내에 함유되어 있는 질소원 뿐만 아니라 각종 미량원소가 길항균의 생장에 좋은 영향을 미쳤을 것으로 생각되었다. 현재, 일반 유기농가에서도 간장을 질소원으로 하여 균주배양에 이용하는 경우가 있는데, 앞으로 간장내에 함유되어 있는 성분을 분석하여 미생물의 배양에 이용하는 것이 좋을 것으로 보인다.

탄소원으로 starch를 사용하고, 질소원으로는 (NH₄)₂SO₄, polypeptone 및 간장을 사용하여 길항균의 배양시 균주의 생장에 미치는 영향을 측정한 결과는 다음 표 8과 같다.

본 실험결과에 따르면 polypeptone 3~5%와 starch 10~15%로 조합한 배지에서 배양하였을 경우에 *Bacillus subtilis* CAP 134의 생장이 가장 양호하였던 것으로 나타났다.

탄소원으로 사용한 starch의 적정 농도는 10~15%로 보였으며, 질소원으로 사용한 (NH₄)₂SO₄, polypeptone 및 간장 중에서는 대체적으로 polypeptone이 가장 좋았으며, 간장의 경우는 15%에서 starch 15%와 조합하여 배지를 조성했을 때 *Bacillus subtilis* CAP 134의 생장이 좋았다. 그러므로 구입이 용이한 간장을 질소원과 미량원소원으로 이용할 경우에는 15% 내외의 농도가 좋을 것으로 생각되었다.

Table 8. Relative cell growth(%)* of *Bacillus subtilis* CAP 134 as affected by sugar and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 500 μ l into 50ml Erlenmeyer flask containing cultural media, and incubated at 34 $^{\circ}$ C for 5 days.

Carbon(%) Nitrogen(%)		Starch (%)			
		5	10	15	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	15	17	20	17
	3	30	36	37	28
	5	32	22	24	19
	7	18	19	22	15
Polypeptone	1	40	60	40	60
	3	60	100	100	60
	5	60	100	100	80
	7	80	60	80	80
Soy	1	40	60	60	40
	3	40	80	80	60
	5	80	80	98	80
	7	60	60	80	80

*Relative to polypeptone(nitrogen) 3~5%, white starch(carbon) 10~15%.

7) 탄소원과 질소원의 최적조건

본 실험에서 이용한 탄소원과 질소원의 종류와 농도별로 배양액을 조제하여 균주를 배양한 결과 균주의 생장에 가장 좋았던 탄소와 질소원 조합을 나타낸 결과는 표 9와 같다.

탄소원으로는 시중에서 판매하고 있는 설탕(백설탕, 흑설탕 및 갈색설탕), starch, dextrose 및 saccharose를 이용하였고, 질소원으로는 간장, 두유, 황산암모늄, 요소, 염화암모늄 및 polypeptone 등을 이용하였다.

실험 전반적으로 균주의 생장이 가장 우수한 탄소와 질소원 조합은 탄소원으로 갈색설탕:polypeptone=2:1(v/v)로 조합하여 균주를 배양한 처리구로 나타났다.

균주의 생장에 좋은 탄소원으로는 흑설탕이 가장 좋았으며, 질소원으로는 polypeptone을 이용한 것이 좋은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 탄소원과 질소원 뿐만아니라 미생물의 생장에 필요한 황(S) 등의 영향을 탄소원과 질소원과 더불어 종합적으로 검토할 필요성이 있다. 또한, 균주의 길항활성은 배지의 조성 및 농도에 따라서 각각 다르게 나타나므로 적정배지의 개발은 앞으로도 계속적으로 이루어져야 한다.

Table 9. Relative cell growth(%)^{*} of *Bacillus subtilis* CAP 134 as affected by sugar and nitrogen source. Antagonistic bacteria were inoculated with 500 μ l into 50ml Erlenmeyer flask containing cultural media, and incubated at 34 $^{\circ}$ C for 5 days.

Carbon(%) Nitrogen(%)	Commercial sugar			Starch	Dextrose	Saccharose
	White color	Gray color	Blackish color			
Soy sauce	3:10 ²⁾ (38.6)	3:2 (45.1)	3:15(40.8)	3:0.5 (24.4)	3:10 (45.6)	3:10 (37.3)
Soy bean milk	1:10(21.1)	1:2 (22.4)	3:10(20.8)	1:0.5 (10.4)	3:10 (33.0)	1:5 (19.2)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1:10(17.9)	1:2 (31.4)	1:10(23.3)	3:0.5 (10.2)	1:2.5 (33.2)	1:2.5 (12.4)
(NH ₄) ₂ CO	0.5:1 (10.8)	1:2 (17.6)	1:3 (15.3)	1:0.5 (7.2)	1:2 (20.5)	0.5:1 (9.5)
NH ₄ Cl	1:5 (19.6)	1:2 (21.4)	1:5 (20.8)	3:0.5 (9.4)	1:5 (25.4)	1:5 (15.6)
Polypeptone	1:10 (83.4)	1:2 (91.0)	1:10(90.7)	3:0.5 (76.2)	1:5 (100.0)	1:10 (85.9)

²⁾ Nitrogen : carbon ratio (v/v ratio)

Blank represents relative cell growth in cultural medium broth after incubation at 37 $^{\circ}$ C for 24 hours

^{*}Relative to polypeptone(nitrogen) 1.0%, gray color sugar(carbon) 5.0%.

IV. 摘 要

사과나무의 부패병, 반점낙엽병, 탄저병, 문우병 및 부란병 등의 지상부 병해에 대하여 길항성을 갖는 *Bacillus subtilis* CAP134의 대량배양시 균주의 생장에 미치는 배양액의 온도, pH, 탄소원의 종류 및 농도별 효과를 조사한 바 그 결과는 다음과 같다.

길항균은 30~35 $^{\circ}$ C의 액온에서 생장이 가장 왕성하였으며, 배양액의 pH는 7내외에서 가장 좋은 생장을 보였다. 탄소원은 dextrose(1당류) > sucrose(2당류) \geq saccharose(2당류) > starch(다당류)의 순으로 길항미생물의 배양에 좋았는데, 다당류보다는 단당류가 미생물 배양에 좋았다. 설탕류는 갈색설탕 > 흑설탕 > 백설탕 순으로 나타났는데, 이것은 설탕내에 완전히 정제되지 않고 남아있는 미량성분의 영향으로 여겨졌다.

질소원은 무기태 질소보다는 유기태 질소가 균주의 생장에 좋은 영향을 미쳤다. 질소 형태별 균주생장에 미치는 영향을 보면 polypeptone > 간장 > 두유 > 무기태질소의 순으로 나타났고, 무기태 질소의 종류에 따른 영향은 별로 받지 않은 것으로 나타났다.

주요어 : 사과나무, *Bacillus subtilis* CAP134, 배양조건, 길항성 세균

引用文獻

1. 송재득, 1992, 사과와 밀의 조기 다수확 기술. 한국원예기술정보센터.
2. Cook, R.J. 1985b. Biological control of plant pathogens : theory to application. *Phytopathology* 75:25-29.
3. Vasudeva, R.S. and B.P. Chakravarthi. 1954. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitic fungi, with special reference to *Alternaria solani*. *Ann. Appl. Biol.* 41:612-618.
4. Sztetzjinberg, A., Freeman, S., Chet, I. and Katan, J. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 71:365-369.
5. Elad, Y., Kohl, and Fokkema, N.J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on Bean and Tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 100:315-336
6. Janisiewica, W.J. and Roitman, J. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78:1697-1700.
7. Gerhardt, P., ed. 1981. Manual of methods for general bacteriology. Am. Soc. Microbiol. Washington, DC. p.524.
8. Pirt, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwall Scientific Publisher. London.
9. Cooney, C.L. 1979. *Proc. Biochem.* 14. 5.
10. Rehm, H.J. and G. Reed. 1981. *Biotechnology Vol. 1. Chap. 3. Growth of Microorganisms.* pp.104-122.