

## 인산가용화 사상균, *Penicillium* sp. PS-113 균주의 분리 및 배양특성

†강 선 철 · 최 명 철

대구대학교 공과대학 생물공학과  
(접수 : 1998. 3. 20., 게재승인 : 1998. 8. 18.)

### Isolation and Cultural Characteristics of a Phosphate-solubilizing Fungus, *Penicillium* sp. PS-113

Sun Chul Kang† and Myoung Chul Choi

Department of Biotechnology, College of Engineering, Taegu University, Kyungsan, Kyungbook 712-714, Korea  
(Received : 1998. 3. 20. Accepted : 1998. 8. 18.)

A fungus with high phosphate solubilizing activities was isolated from soil using potato dextrose agar-calcium phosphate medium and identified to *Penicillium* sp. PS-113, based on the morphological characteristics of conidiophore and conidia: flask shape of phialide, simple branching type of conidiophore, and columnar shape of conidial head, in malt extract agar and potato dextrose agar media. The optimum temperature and initial pH to solubilize rock phosphate in potato dextrose broth-rock phosphate medium were 30°C and pH 8.0, respectively. In these conditions phosphate solubilizing activities of *Penicillium* sp. PS-113 against four types of insoluble phosphate like tricalcium-phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite and rock phosphate were quantitatively determined. As results, this fungus highly produced free phosphates to the culture broth with the concentrations of 1,283 ppm against tricalcium-phosphate, 585 ppm against rock phosphate, 528 ppm against aluminium phosphate, and 242 ppm against hydroxyapatite, respectively.

Key Words: phosphate solubilizing activities, *Penicillium* sp., insoluble phosphate

### 서 론

식물체에서 인은 핵산, 인지질, phytates 등의 중요 구성성분이며 식물성장에 필요한 에너지 대사에서도 중요한 역할을 하는 원소이다. 식물에 충분한 양의 인을 공급하기 위해서 인산염 형태의 비료를 공급한다. 그러나 토양에 처리된 인산비료 중에서 실제 식물이 이용하는 인산의 양은 극히 적으며 대부분은 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 비료성분의 불용화나 유실현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 산성토양에서는 철 및 알루미늄 이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화됨으로서 토양중에는 식물이 이용할 수 있는 유리인산(free phosphate)의 양은 거의 없게 되고 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산의 양만 증가되는 결과를 가져다 준다(1) 따라서 인 자원의 재활용이란 측면에서 불용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 토양미생물의 탐색과 실용화는 비료 성분의 이용효율성을 제고시킬 수 있는 하나의 방법이 된다.

인산가용화균을 이용한 환경친화형 생물비료(biofertilizers)의 개발노력은 부단히 이루어져 왔다. 이미 1950년대에 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며 평균 10%의 수량 증가를 보았다(2). 1980년대는 *Penicillium bilaji* 등의 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다(3). 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나 *Bacillus megaterium*(2), *B. polymyxa*(4), *Pseudomonas striata*(4, 5), *Pseudomonas* sp. (PI18/89)(6), *Penicillium simplicissimum*(7), *P. aurantigriseum*(8), *P. bilaji*(3), *Aspergillus awamori*(5, 9), *A. aculeatus*(10), *A. niger*(7) 등의 인산가용화균을 biofertilizers로 사용했을 때 cereals, legumes, potatoes, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고 되고 있다(2).

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 인도 등에서는 일부 실용화되어 사용되고 있지만 국내에서는 균주선발 및 배양특성 조사, 포장시험 등에 관한 폭넓은 연구의 부족으로 아직 실험실 수준의 초보적인 단계에 머무르고 있다(11-14). 2,000년대에는 환경보존을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 biofertilizers의 개발은 중요한 과제가 될 것이다.

† Corresponding Author · Department of Biotechnology, College of Engineering, Taegu University, Kyungsan, Kyungbook 712-714, Korea  
Tel · 053-850-6553, Fax : 053-850-6509  
e-mail · sckang@biho.taegu.ac.kr

따라서 본 연구는 난용성인을 가용화시킬 수 있는 미생물을 탐색하여 경제적, 환경조화형, 고효율의 biofertilizer를 개발함에 있으며 이를 달성하기 위한 기초 연구로서 난분해성 인산염의 가용화 촉진 미생물을 토양으로부터 선발하고 그 미생물의 배양적 특성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 인산가용화균의 분리

난용성 인산염의 분해능이 우수한 토양미생물을 선발하기 위하여 경상남도 일대의 인산축적지 토양과 제주도 일대의 화산회토 등에서 토양시료를 채취하였다. 균주 선별방법은 토양 1 g을 0.5% peptone을 포함한 5 mL의 수용액에 잘 혼합하여 이를 10~1,000배의 적절된 농도로 희석하고 PDA-calcium phosphate 분리용 평판배지(배지 제조방법: PDA; potato dextrose agar, 20 g/L을 121°C에서 15분간 멸균하고 55°C로 식힌다. 여기에  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 를 각각 따로 멸균하여 최종농도가 0.5% 되도록 배지에 첨가하여 PDA-calcium phosphate 분리용 평판배지를 만든다.)에 도말하고, 30°C에서 1~4일간 배양한 후 균체 주위에 투명대를 형성하는 균체를 난용성 인산염 분해능이 있는 균으로 판정하고 그 중에서 상대적으로 투명대가 큰 균주를 1차 선별하였다. 상기의 방법에 의해 분리된 균주들을 PDB(potato dextrose broth, potatoes infusion 200 g, dextrose 20 g, 증류수 1 liter)배지 5 mL에 인광석(중국산)을 0.5%(w/v) 첨가한 후 30°C에서 3~7일 동안 200 rpm으로 진탕 배양하면서 매일 배양상등액 내의 유리인산의 농도를 측정하여 난용성 인산의 분해능이 가장 높은 균주를 최종 선별하였다.

### 유리인산의 농도측정

균체배양액 1.5 mL을 취하여 Eppendorf tube에 담은 후 microfuge로 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 1.0 mL을 취하여 증류수 4 mL을 첨가하여 총 5 mL이 되게 하였다. 여기에 몰리브덴산 암모늄용액 0.2 mL과 염화제일주석용액 0.025 mL을 가하여 잘 섞은 후 30°C에서 10분간 방치한 다음 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 실험에 사용한 용액은 다음과 같은 방법으로 제조하였다(14). 몰리브덴산 암모늄용액: 몰리브덴산 암모늄(4수화물) 25 g을 증류수 175 mL에 녹인 다음 황산 280 mL을 증류수 약 400 mL에 천천히 넣고 방냉하면서 혼합한 다음 최종적으로 1,000 mL이 되도록 한다. 염화제일주석용액: 염화제일주석(2수화물) 25 g을 글리세린 100 mL에 넣어 수용액상에서 유리용으로 섞으면서 팔리 녹인다.

### 분리균주의 동정

상기방법에 따라 최종 선별된 사상균 PS-113 균주의 동정은 MEA 배지(malt extract agar; glucose 2.0%, malt extract 2.0%, peptone 0.1% and agar 2.0%)와 PDA 배지 등에 이 균주를 접종하여 25°C에서 10일간 배양하면서 형태학적인 특징을 LWD(long working distance) 대물렌즈가 장착된 광학현미경(Nikon, Labophoto-2)과 육안으로 관찰하면서 Amsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi(7th ed.)의 분류체계에 따라 동정하였다(15).

### 배양특성조사

인산가용화균 PS-113 균주의 인광석 분해능이 최대가 되는 배양온도를 결정하기 위하여 PDB배지에 인광석을 0.5%(w/v)로 첨가하여 제조한 액체배지(pH 7.5)를 100 mL 삼각플라스크에 20 mL씩 분주하고 여기에 PDB 배지에서 5일 동안 진탕배양한 균체배양액 1 mL을 접종하여 각각 25, 30, 37°C의 배양온도에서 200 rpm으로 8일 동안 진탕배양하면서 하루간격으로 이 균주에 의한 유리인산 생성능을 측정하였다.

또한 분리균주의 인광석 분해능이 최대가 되는 배양 초기 pH를 결정하기 위하여 PDB 배지에서 5일 동안 진탕배양한 균체배양액 1 mL을 위와 동일한 배지에 접종한 후 다양한 초기 pH(6.0, 7.0, 8.0)에서 30°C, 200 rpm의 조건으로 8일 동안 진탕배양하면서 매일 유리인산의 농도를 측정하였다.

난용성 인산염의 종류에 따른 분리균주의 유리인산 생성능을 조사하기 위해서 PDB배지에 aluminium phosphate, hydroxyapatite, rock phosphate 및 tricalcium phosphate를 각각 0.5%(w/v)씩 첨가하여 액체배지(pH 7.5)를 제조하였다. 이것을 100 mL 삼각플라스크에 각각 30 mL씩 넣고 여기에 PDB 배지에서 5일 동안 진탕배양한 PS-113 균체배양액 1 mL을 접종하여 30°C, pH 7.5, 200 rpm의 조건에서 18일간 진탕배양하면서 하루간격으로 생성되는 유리인산의 양을 측정하였다. 이상의 배양특성에 관한 모든 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 구함으로써 실험오차를 최소화하였다.

## 결과 및 고찰

### 인광석의 성분분석

본 연구에 사용한 인광석은 중국산으로서 (주)경기화학으로부터 공급받아 사용하였다. 인광석의 성분분석은 비료관리법상의 공정분석법에 따라 실시하였으며(16) 그 결과 인산( $\text{P}_2\text{O}_5$ )이 34.23%,  $\text{CaO}$ 가 50.21%,  $\text{SiO}_2$ 가 7.16% 등으로 나타나 이들 세 가지 성분이 전체의 약 92%를 차지하였다. 이것은 B.P.L (bone of phosphate lime=총인산함량 $\times$ 2.185) 기준으로는 76.76%의 중급 품질의 인광석으로 판명되었다.

### 인산가용화균의 분리 및 동정

다양한 토양시료로부터 PDA-calcium phosphate 평판배지에서 난용성 인산염 분해능이 우수한 미생물 균주를 1차 선별한 결과 약 1,000종의 세균과 200여종의 사상균 균주를 선별하였다. 1차 선별한 균주 진부를 인광석이 0.5%(w/v) 포함된 PDB배지에서 액상배양하면서 유리인산의 생성능을 조사해 보면 투명대의 크기가 클수록 대체적으로 인광석의 분해능이 우수하였지만 투명대의 크기가 작아도 분해능이 우수한 것도 일부 발견되었다. 뿐만아니라 calcium phosphate는 인산염 가용화 균주에 의해 가장 쉽게 분해되기 때문에 1차선별로는 적합하지만 실제 토양내에 존재하는 난용성 인산염인 aluminium phosphate, hydroxyapatite, rock phosphate 등에 대해서는 각각의 균주가 다른 기질특이성을 보였기 때문에 투명대가 적은 균주도 일부 선별하였다. 이상에서 선별한 균주를 순수분리한 후 상업적 응용가능성이 가장 높은 인광석을 효율적으로 분해하여 유리인산을 방출하는 균주를 2차선별의 주대상으로 삼았다. 각각의 균주를 3~7일간 PDB-rock phosphate 액체배지에서 배양하면서 매일

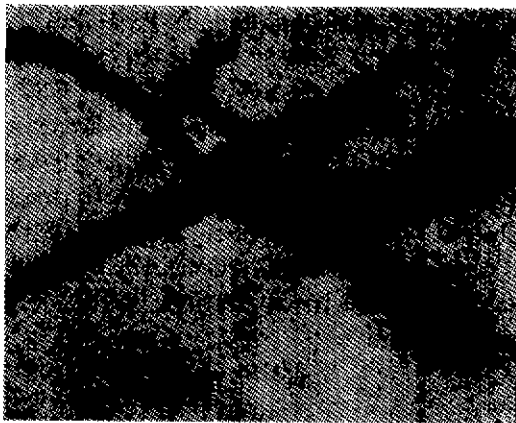


Figure 1. Micrograph showing the conidial head structure of *Penicillium* sp. PS-113. The fungus was cultured at 25°C for 3 days on malt extract agar. (Bar: 10 μm)

Table 1. Morphological characteristics of *Penicillium* sp. PS-113

Characteristics	MEA(malt extract agar)
Growth	fast
Colony color	green(dark)
Colony reverse color	yellow
Colony type	convex
Conidial head	columnar, radiate
Type of conidiophore branching	simple
Conidiophores hyalide	smooth
Phialide	flask shape
Conidia shape	globose, 2.5 μm(dia)
Exudate	absent

유리인산의 양을 정량하여 인광석 분해능이 우수한 PS-113 균주를 최종 분리하여 다음 연구를 위한 공시균주로 사용하였다.

사상균 PS-113 균주를 동정하기 위하여 MEA배지 및 PDA 배지에서 균체를 배양하면서 육안과 광학현미경을 이용하여 형태관찰을 수행한 결과 위의 두종류의 배지에서 유사한 형태관찰 결과를 얻었다. 선발 균주는 위의 두배지에서 빠른 성장을 보였으며, colony 표면의 색은 녹색을 띠었다(Table 1) 이 균주는 광학현미경 상에서 Figure 1에 보여주는 것과 같이 빗자루 모양의 전형적인 *Penicillium* sp.의 분생포자 형태를 나타내었다. 즉 conidial head의 형태는 칼럼형이었으며, 분생자의 직경은 2.5 μm이었다. 경자의 형태는 플라스크형이었으며, 분생자병의 hyalide는 평활하였으며, 분절형태는 simple type이었다. 이상의 결과들로부터 분리균주는 *Penicillium* sp. PS-113 균주로 동정되었다.

인산가용화균의 배양특성조사

배양온도(25, 30, 37°C)에 따른 *Penicillium* sp. PS-113 균주의 인광석 분해능에 대한 정량적 분석 결과는 Figure 2와 같다. 이 균주는 30°C에서 배양했을 때 배양 8일경에 최대 585 ppm의 유리인산을 생성하였으며, 25°C에서는 420 ppm, 37°C에서는

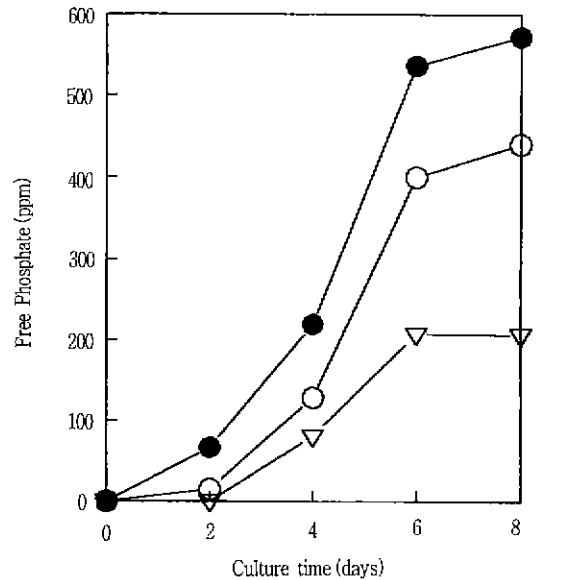


Figure 2 Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. PS-113 at various temperatures with time courses. ○-○; 25°C, ●-●; 30°C, ▽-▽; 37°C

205 ppm 등의 순서로 유리인산을 생성하였다. 이것은 30°C에서 배양했을 때 이 균주는 37°C에 비해 약 3배 정도 유리인산 생성능이 높음을 나타낸다 이와같은 인광석 분해능은 최근 서 등이 보고한(14) *Penicillium* sp. 균주의 인광석 분해능이 최대 80 ppm의 수준인 점과 비교했을 때 월등히 높은 결과였다. 지금까지 알려진 유리인산 생성 기작은 황화수소 생성, 황 및 암모니아 산화에 의한 황산과 질산 생성, 2-ketogluconate 등의 킬레이트 물질의 생성, 유기산 생성 등이다(17, 18) 본 균주가 어떤 기작으로 유리인산을 생성하는지 정확히 알기 위해서는 배양액의 성분분석이 필요할 것이다.

배양 초기 pH에 따른 *Penicillium* sp. PS-113 균주의 인광석 분해능에 대한 정량적 분석 결과는 Figure 3과 같다. 이 균주는 배양 초기 pH가 8.0일 때 배양 6일경에 최대 530 ppm의 유리인산을 방출하였으며, pH 7.0에서는 배양 8일경에 580 ppm, pH 6.0에서 배양 8일경에 575 ppm 등의 거의 유사한 수준의 유리인산을 방출하였다. 이상의 결과로부터 이 균주는 pH 6.0-8.0 범위의 중성 pH에서 유리인산 생성능이 높게 나타남을 알 수 있다.

이 균주의 tricalcium-phosphate, rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite 등의 다양한 난용성 인산염 기질에 대한 인산 가용화능을 비교조사해 보면(Figure 4) tricalcium phosphate를 기질로 사용했을 때 최대 1,283 ppm의 유리인산을 생성하였으며, rock phosphate에서 585 ppm, aluminium phosphate에서 528 ppm, hydroxyapatite에서 242 ppm 등의 순서로 유리인산 생성능이 감소하였다. 이상의 결과로부터 이 균주는 상업적 이용 가능성이 가장 높은 인광석에 대해서 상대적으로 높은 분해능을 보임을 알 수 있다 그러나 이 균주를 biofertilizers로 실용화하기 위해서는 탄소원, 질소원, 미량원소첨가 등에 따른 균체의 배양특성조사 및 포자형성능이 가장 높은 공업용 배지의 개발, 포장실험을 통한 유리인산의 작물 생육에 미치는 영향 등에 관한 폭넓은 연구가 필요할 것이다.

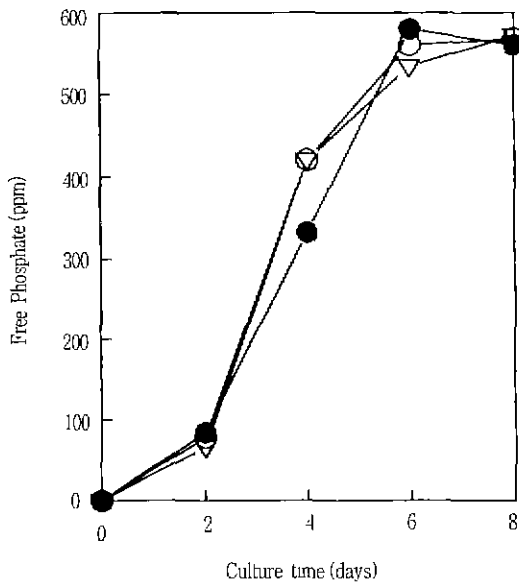


Figure 3. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. PS-113 at various initial pHs with time courses ▽-▽, pH 6.0, ○-○, pH 7.0, ●-●: pH 8.0

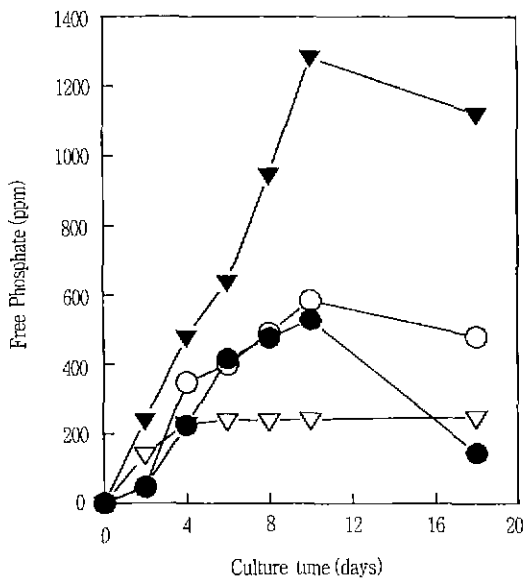


Figure 4. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. PS-113 in the PDB media containing various insoluble-phosphates with time courses. ○-○, rock phosphate, ●-●: aluminium phosphate, ▽-▽, hydroxyapatite, ▼-▼: tricalcium phosphate

요약

PDA-calcium phosphate 평판배지를 이용하여 토양으로부터 인산가용화능이 매우 우수한 사상균 PS-113 균주를 분리하여 MEA와 PDA 배지에서 배양하면서 분생자병과 분생자의 형태적 특성을 조사한 결과 플라스크형의 phialide, 분생자병의 branching type이 simple type이며, conidial head가 columnar

shape 등의 특징을 갖는 *Penicillium* sp. PS-113으로 동정되었다. 이 균주의 인광석 분해능이 최대가 되는 최적 배양온도와 초기 pH는 각각 30℃와 pH 8.0이었다. 이와같은 배양조건에서 tricalcium-phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite, 인광석 등의 난용성 인산염에 대한 이 균주의 인산가용화능을 살펴보면 배양 8-10일경에 최대값을 보였으며, tricalcium-phosphate에 대해서는 1,283 ppm, 인광석에 대해서는 585 ppm, aluminium phosphate에 대해서는 528 ppm, hydroxyapatite에 대해서는 242 ppm의 유리인산을 생성하였다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

참고 문헌

- Paul, E. A., and F. E. Clark (1989), Soil Microbiology and Biochemistry, Academic press, New York.
- Dubey, S. K., and S. D. Billore (1992). Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) as Inoculant and Their Role in Augmenting Crop Productivity in India - A Review, *Crop Res. Hissar*, 5, 11.
- Kucey, R. M. N. (1988), Effect of *Penicillium bilaji* on the Solubility and Uptake of P and Micronutrients from Soil by Wheat, *Can. J. Soil Sci.*, 68, 261-270.
- Tiwari, V. N., A. N. Pathak, and L. K. Lehri (1993), Rock Phosphate - Superphosphate in Wheat in Relation to Inoculation with Phosphate Solubilizing Organism and Organic Waste, *Ind. J. Agr. Res.*, 27, 137-145.
- Agasman, C. A., Mudlaguriyappa, and M. N. Sreenivasa (1994), Response of Groundnut to Phosphate Solubilizing Microorganisms, *Groundnut News*, 6, 5.
- Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner (1995), Solubilization of Hardly-soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing Microorganisms, *Soil Biol. & Biochem.*, 27, 265-270.
- Sayer, J. A., S. L. Raggett, and G. M. Gadd (1995), Solubilization of Insoluble Metal Compounds by Soil Fungi: Development of a Screening Method for Solubilizing Ability and Metal Tolerance, *Mycological Res.*, 99, 987-993
- Illmer, P. and F. Schinner (1995), Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates-solubilization Mechanisms, *Soil Biol. & Biochem.*, 27, 257-263
- Varsha, N., T. Jugnu, and H. H. Patel (1993), Solubilization of Natural Rock Phosphates and Pure Insoluble Inorganic Phosphates by *Aspergillus awamori*, *Ind. J. Exp. Biol.*, 31, 747-749
- Varsha, N., T. Jugnu, and H. H. Patel (1995), Mineral Phosphate Solubilization by *Aspergillus aculeatus*, *Ind. J. Exp. Biol.*, 33, 91-93.
- 김형욱, 유장결, 이신찬, R. M. N. Kucey (1984), 제주도 감

- 굴원 토양의 V. A-mycorrhizae 분포 및 사상균에 의한 인광석의 용해에 관한 연구, *제주대 논문집*, **17**, 45-50.
12. 김형욱, 이신찬, 현해남 (1989), 화산회토에서 고정 인산 장애 경감 연구, *농약시험논문집*, **32**, 109-115.
  13. 유장걸, 김형욱, 이신찬 (1985), 인광석의 인산비료증진에 관한 연구 - 토양중 mycorrhizae 포자밀도조사 및 인광석용해성 사상균의 분리와 배양-, *제주대논문집*, **20**, 81-92
  14. 서장선, 이상규, 김광석, 성기영 (1995), 한국 토양에서 분리된 *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. 및 *Aspergillus niger*에 의한 난용성 인산염의 가용화, *한국토양비료학회지*, **28(3)**, 278-286.
  15. Hawksworth, D. L., B. C. Sutton, and G. C. Ainsworth (1983), Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (7th ed.), Commonwealth Mycological Institute, England.
  16. 김영일 (1985), 비료분석법 해설, 중앙문화사, pp. 101-152.
  17. Berrow, M. L., S. Davidson, and J. C. Burridge (1982), Trace Elements Extractable by 2-Ketogluconic Acid from Soils and Their Relationship to Plant Contents, *Plant and Soil*, **66**, 161-171.
  18. Cline, G. R., P. E. Powell, P. J. Szanislo, and C. P. P. Reid (1982), Comparison of the Abilities of Hydroxamic, Synthetic, and Other Natural Organic Acids to Chelate Iron and Other Ions in Nutrient Solution, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **46**, 1158-1164.