

채소류 모잘록병균에 길항하는 *Bacillus ehimensis* YJ-37의 대량배양 최적조건

주길재* · 김진호¹

*경북대 농화학과
¹상주대 식물자원학과

Optimization of Large Scale Culture Conditions of *Bacillus ehimensis* YJ-37 Antagonistic to Vegetables Damping-off Fungi

Gil-Jae Joo* and Jin-Ho Kim¹

*Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, and
¹Dept. of Plant Resource, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

Abstract

The optimal culture conditions in 500ml flask culture, 5 l jar fermenter and 2,000 l large scale culture were investigated to maximize the production of antibiotic on *Rhizoctonia solani* AG4, the causal agent of vegetables damping-off, by the strain *Bacillus ehimensis* YJ-37. Starch (1.5%) as a carbon source, peptone (0.6%) as a nitrogen source and MgCl₂ (0.15%) as a metal ion in the medium containing Na₂HPO₄ (0.3%) showed the highest production of the antibiotic(s) in a rotary shake (200 rpm). Optimal initial pH of the culture medium, culture temperature and culture time for the antibiotic(s) production were pH 8.0, 32°C and 54hrs, respectively. Under the optimal conditions in flask culture, cell growth and antifungal activity (clear zone size) were 1.42×10^8 cfu/ml (21g-DCW/ l) and 13.9 mm, respectively. In 5 l jar fermenter (medium 3 l), optimal air flow, agitation speed and culture time for the antibiotic(s) production were 2 vvm, 200 rpm and 48hrs, respectively. Under the optimal conditions in 5 l jar fermenter, cell growth and antifungal activity were 2.06×10^8 cfu/ml (30g-DCW/ l) and 13.4 mm, respectively. Under the culture conditions of air flow (30 vvm) and agitation speed (200 rpm) at 32°C for 10 days in 2,000 l large scale culture (medium 1,800 l, pH 8.0), cell growth and antifungal activity were 0.81×10^8 cfu/ml (12g-DCW/ l) and 8.6 mm, respectively.

Key words – Antagonistic, *Bacillus ehimensis*, *Rhizoctonia solani* AG4

서 론

일반적으로 작물에서 모잘록병을 일으키는 병원 미생물

로는 *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *P. aphanidermatum*, *P. echinocarpum*, *P. butleri*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* 등이 알려져 있으며, 채소류 모잘록병균은 주로 *R. solani*에 의해 많은 피해를 보고 있다[1]. *R. solani*는 담자균류에 속하며 완전세대는 *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk로 대부분 일년생 작물에 병을 일으키는 것

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-950-6854, Fax : 053-950-6853
E-mail : gjoo@knu.ac.kr

으로 불규칙하고 짙은 갈색의 균핵을 형성하는 특징을 가지고 있는 병원균이다[11]. *R. solani*는 현재 11개의 균사융합군으로 분류되어 있으며, 각 균사융합군 간에는 다소간의 기주특이성이 존재하며 이들 AG group들 중 AG4에 속하는 균주는 작물에 뿌리썩음병(root rot), 모잘록병(damping-off) 등의 매우 파괴적이고 진전이 빠른 식물병을 일으키는 것으로 알려져 있다[2,12].

최근 길항미생물을 이용한 생물학적 방제가 좋은 효과를 거두고 있음이 보고되고 있으며, 지금까지 *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Gliocladium virens*[9] 등의 진균류와 *Streptomyces lydicus*[14], *Actinomyces* spp.[5] 등 방선균류, *Pseudomonas aeruginosa* 7NS K2[3], *P. cepacia*[7], *P. fluorescens* DR54[13], *Enterobacter agglomerans*[4], *Stenotrophomonas maltophilia* W81[6], *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus*[10] 등의 세균류가 보고되었다.

전보[8]에서 채소류 모잘록병균 *R. solani* AG4와 *Pythium ultimum*에 길항하는 미생물 *Bacillus ehimensis* YJ-37을 토양으로부터 분리 동정하여 보고하였다.

본 연구는 길항미생물 *B. ehimensis* YJ-37을 500ml 플라스크 배양, 5ℓ jar fermenter 배양 및 2,000ℓ 대형탱크 배양 조건에서의 균의 생장 및 길항물질 생성능을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 공시균주는 토양에서 분리 동정[8]한 *Bacillus ehimensis* YJ-37을 사용하였다. 공시균의 보관은 tryptic soy broth (TSB) 영양배지 (pH 6.0~7.0)에서 30~37℃에서 3~5일 동안 진탕 배양시킨 후 미생물 세포의 수가 1ml 당 콜로니 형성단위 (colony forming unit; cfu)로서 10⁸개 포함되어 있는 배양액을 4℃에 보관하거나 동결건조기로 건조하여 분말상태로 보관하면서 사용하였다. 모잘록병균 *Rhizoctonia solani* AG4는 PDA (potato dextrose agar) 배지에 28℃로 4~10일간 배양한 다음 4℃, 또는 살균 증류수에서 보관하면서 사용하였다.

*R. solani*에 대한 길항력 조사

길항력조사는 PDA 배지에서 키운 모잘록병 균체 덩어

리(0.5×0.5 cm)를 PDA 배지 중앙에 올려놓고 가장자리 4곳에 살균된 paper disc (5mm)를 올려놓은 다음 여기에 여러 가지 배양조건에 따라 배양한 *B. ehimensis* YJ-37 배양 무균 상등액 50μl를 적시고 30℃에서 7~10일간 배양한 후 모잘록병균의 균사체의 생장억제 정도 (inhibition zone)를 조사하여 생성된 clear zone (mm)의 크기로 판정하였다.

균수 및 건조 균체량 측정

균수는 균원시료 1ml를 0.85% NaCl 용액에서 삼단 희석하여 2가지 방법으로 계수한 후 그 평균값으로 나타내었다. 첫째, 각종 미생물분리용 배지에 상기 희석액을 0.1ml도말하여 배양한 후 형성된 colony를 계수한 것, 둘째, 균수 측정 kit (3M Co., Petrifilm™ plate)를 이용하여 상기 희석액을 1ml도말하여 배양한 후 계수한 것을 평균하여 cfu/ml²으로 나타내었다. 균체 농도는 균체를 증류수로 세척하고 적당량의 증류수로 희석한 다음 80℃에서 24시간 건조시킨 후 항량을 측정하여 건조 균체량을 계산하여 g-dry cell weight (g-DCW/ℓ)로 나타내었다.

탄소원의 영향

최소배지(yeast extract 0.3%, Na₂HPO₄ 0.3%, MgCl₂ 0.05%, pH 7.0)에 glucose를 포함하여 전분, 당밀, 흑설탕, oatmeal, 쌀겨, 깨묵, 왕겨 등 8종의 탄소원을 1.0%씩 각각 첨가하여 30℃, 72시간 동안 rotary shaker (200rpm)에서 균을 배양한 후 그 원심분리(Ultracentrifuge, Beckman Co., L8-55M, SW28 rotor, 70,000×g, 4℃, 20min)하여 얻어진 배양 상등액을 0.22μm membrane filter로 무균여과하여 상기와 같은 균사체 생육억제 정도에 항진균 활성을 조사하여 최적 탄소원을 선별하고 선별된 탄소원은 다시 탄소원의 농도별로 배양하여 동일한 방법으로 탄소원의 농도를 결정하였다.

질소원의 영향

최소배지에서 yeast extract를 제외시키고 최적 탄소원을 넣어 준 후 yeast extract, peptone, tryptone, corn steep liquor, CO(NH₂)₂, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, KNO₃ 등 각종 질소원을 0.3%씩 첨가하여 30℃에서 3일간 균을 배양한 후 탄소원의 경우와 동일한 방법으로 항진균 활성물질 생산에 대한 질소원의 종류 및 농도를 결정하였다.

무기염의 영향

최소배지에서 무기염을 제외시키고 앞에서 결정한 탄소원과 질소원을 최적농도로 첨가한 후 BaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, HgCl₂, CuSO₄, FeCl₃, CaCl₂ 등 8종의 무기염을 0.1% 농도로 넣고 상기와 같은 방법과 동일하게 항진균성 물질 생산에 미치는 무기염의 종류 및 농도의 영향을 조사하였다.

배양 온도 및 초기 pH의 영향

길항균의 항진균성 물질생성에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 길항균을 TS broth (pH 7.0)와 PD broth (pH 6.8)에 접종하여 배양온도 (20, 25, 30, 32, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60℃)를 달리하여 배양한 다음 배양 상등액으로부터 무균 여과액을 조제하여 항진균 활성을 조사하였다.

길항균의 항진균성 물질생성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 1N NaOH와 1N HCl로 pH 3~11로 조정된 PD broth에 접종하여 배양한 후 각각의 배양상등액으로부터 회수한 무균여과액으로 모잘록병균의 균사 생장억제 유무를 관찰하였다.

배양 시간의 영향

배양시간에 따른 균 생육도를 조사하기 위하여 PD broth를 최적 pH로 조정된 후 길항균을 1% 접종하고 최적 온도에서 진탕 배양하면서 3시간 간격으로 배양액을 회수하고 원심분리 (70,000 x g, 4℃, 20min)하여 얻어진 배양 상등액을 0.22µm membrane filter로 무균여과한 다음 항진균 활성을 조사하였다.

Jar fermenter (5 l) 배양

Jar fermenter ((주)한국발효기상사, 용량 5 l, 원지름 20 cm, 높이 25cm, baffle 10 x 2 cm 4개 부착, impeller 1 x 5 cm ㄱ형) 배양은 상기 플라스크 배양에서와 동일한 배지를 살균하여 사용하였고, 3 l 배지에 종균은 삼각플라스크 배양액 (50 ml, 1.4×10⁸ cfu/ml)을 사용하였다. 공기 주입량은 각각 1~3vvm, 교반 속도는 각각 100~400rpm으로 등구간 설정하여 72시간 동안 배양 기간별 균체 성장 및 길항물질 생산능을 조사하였다.

대량배양 (2,000 l)

대량배양기(제작, 용량 2,000 l, 원지름 2.0m, 높이 2.5m, baffle 30×90 cm 4개 부착, impeller 10×1.5m ㄱ형) 배양은 토양미생물제제 생산을 대량생산할 목적의 일환으로 배양하였다. 배양조건은 상기와 같은 배양배지 1,800 l를 steam 살균한 후 상기 5 l jar fermenter 배양액(3 l, 2.0 x 10⁸ cfu/ml)을 종균으로 접종하여 배양하였다. 이때 공기 주입량은 30vvm, agitater 교반 속도는 200rpm으로 임의 설정하였고 초기 pH는 8.0, 배양온도는 32℃로 하여 10일간 배양 기간별 균의 성장 및 길항물질 생산능을 조사하였다.

결과 및 고찰

길항균 *B. ehimensis* YJ-37의 길항물질 생산을 위한 탄소원의 영향

채소류 모잘록병균 *R. solani*에 길항하는 미생물 *B. ehimensis* YJ-37의 길항물질 생산을 위한 최적 탄소원의 영향 및 농도를 조사한 결과, Table 1에서와 같이 균의 생육은 전분, 당밀, 흑설탕 및 포도당이 대부분 1.3×10⁸ cfu/ml

Table 1. Influences of carbon sources and it's concentration on the production of antifungal substances by *B. ehimensis* YJ-37

Carbon Sources (1.0%)	Growth (×10 ⁸ cfu/ml)	Inhibition zone (mm)
None	0.44	2.6
Glucose	1.30	8.5
Starch 1.0	1.32	9.8
1.5	1.33	10.3
2.0	1.33	10.2
3.0	1.33	10.1
Molasses	1.32	6.2
Black sugar	1.34	8.7
Oatmeal	1.20	5.4
Wheat bran	1.18	3.5
Seed cake	0.87	3.6
Rice bran	0.98	5.7

B. ehimensis YJ-37 was grown in medium (yeast extract 0.3%, Na₂HPO₄ 0.3%, MgCl₂ 0.05% pH 7.0) containing carbon sources at 30℃ for 72 hrs.

로 비슷하게 나타났으나 모잘록병균에 대한 생육억제는 전 분야에서 배양할 경우 생육억제환의 길이가 9.8mm로 가장 우수하였으며, 그 다음 흑설탕, 포도당 순으로 나타났다. 일반적으로 길항물질을 생산하는 균주 대부분의 경우 포도당에 의하여 catabolite repression이 쉽게 일어난다고 알려져 있으나 본 결과에서는 비교적 높은 길항효과를 가지고 있었다. 또한 전분을 농도별로 길항효과를 검정한 결과 1.5% 농도일 때 모잘록병균에 대한 생육억제환의 길이가 10.3mm로 높은 활성을 나타내었다.

질소원의 영향

길항 물질을 생산하기 위한 최적 질소원의 영향 및 농도를 조사한 결과, Table 2에서와 같이 질소원으로 0.3% peptone을 이용할 경우 모잘록병균의 생육을 가장 많이 억제시켰으며, 그 다음 tryptone, 요소 순으로 나타났고, peptone의 농도는 0.6%일 때 가장 높은 활성을 나타내었다. 이때 균의 생육은 1.36×10^8 cfu/ml이며, 모잘록병균에 대한 생육억제는 12.8mm로 나타났다.

무기염의 영향

길항 물질을 생산하기 위한 최적 무기염의 영향 및 농도

Table 2. Influences of nitrogen sources and it's concentration on the production of antifungal substances by *B. ehimensis* YJ-37

Carbon Sources (0.3%)	Growth ($\times 10^8$ cfu/ml)	Inhibition zone (mm)
None	1.18	6.3
Yeast extract	1.33	10.3
Peptone 0.3	1.35	12.4
0.6	1.36	12.8
1.0	1.36	12.7
2.0	1.35	11.9
Tryptone	1.37	11.3
Corn steep liquor	1.22	9.7
CO(NH ₂) ₂	1.24	10.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.23	9.5
NH ₄ Cl	1.20	9.6
KNO ₃	0.98	9.7

B. ehimensis YJ-37 was grown in medium (starch 1.5%, Na₂HPO₄ 0.3%, MgCl₂ 0.05% pH 7.0) containing nitrogen sources at 30°C for 72 hrs.

를 조사한 결과, Table 3에서와 같이 무기염은 0.1% MgCl₂가 모잘록병균의 생육을 가장 많이 억제시켰으며, 그 다음 MnCl₂, ZnCl₂ 순으로 나타났고, MgCl₂의 농도는 0.15%일 때 가장 높은 활성을 나타내었다. 이때 균의 생육은 1.37×10^8 cfu/ml이며, 모잘록병균에 대한 생육억제는 13.6mm로 나타났다.

배양온도 및 초기 pH의 영향

길항 물질생성에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 길항균 *B. ehimensis* YJ-37을 상기 최적배지인 1.5% starch, 0.6% peptone, 0.3% Na₂HPO₄, 0.15% MgCl₂ (pH 7.0)에 접종하여 배양온도 20°C~60°C까지 배양한 후 모잘록병균에 대한 항진균 활성을 조사한 결과, Table 4에서와 같이 배양온도가 32°C일 경우 가장 높은 항진균 활성을 나타내었다. 이때 균의 생육은 1.41×10^9 cfu/ml이며, 모잘록병균에 대한 생육억제는 13.8mm로 우수하였다.

길항균 *B. ehimensis* YJ-37에 의한 항진균성 물질생성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, Table 4에서와 같이 pH가 높아질수록 항진균 활성이 증가되어 pH 8에서 가장 높았으며, 이때 균의 생육은 1.42×10^8 cfu/ml (21g-DCW/ℓ)

Table 3. Influences of metal ions and it's concentration on the production of antifungal substances by *B. ehimensis* YJ-37

Carbon Sources (0.3%)	Growth ($\times 10^8$ cfu/ml)	Inhibition zone (mm)
None	1.05	10.8
BaCl ₂	1.14	10.9
MgCl ₂ 0.05	1.36	12.8
0.1	1.40	13.4
0.15	1.37	13.6
0.3	1.34	13.4
MnCl ₂	1.33	12.5
ZnCl ₂	1.38	10.4
HgCl ₂	1.20	10.3
CuSO ₄	1.34	10.9
FeCl ₃	1.31	11.5
CaCl ₂	1.15	10.4

B. ehimensis YJ-37 was grown in medium (starch 1.5%, peptone 0.6% Na₂HPO₄ 0.3%, pH 7.0) containing metal ions at 30°C for 72 hrs.

Table 4. Influences of temperatures and pHs on the production of antifungal substances by *B. ehimensis* YJ-37

Temp.	Growth ($\times 10^8$ cfu/ml)	Inhibition zone (mm)	pHs	Growth ($\times 10^8$ cfu/ml)	Inhibition zone (mm)
20°C	1.01	8.6	pH 5.0	1.03	4.8
25°C	1.28	12.5	pH 5.5	1.21	8.3
30°C	1.34	13.5	pH 6.0	1.30	12.1
32°C	1.41	13.8	pH 6.5	1.38	13.6
35°C	1.40	13.6	pH 7.0	1.39	13.7
37°C	1.40	13.5	pH 7.5	1.39	13.8
40°C	1.37	12.8	pH 8.0	1.42	13.9
45°C	1.03	9.4	pH 8.5	1.41	13.5
50°C	0.41	2.2	pH 9.0	1.20	12.2
55°C	0.12	0	pH 9.5	0.88	6.7
60°C	0.00	0	pH 10.0	0.42	4.0

pHs of medium were adjusted by dropwise addition of stock solution of 1N NaOH and 1 N HCl. *B. ehimensis* YJ-37 was grown in medium containing starch 1.5%, peptone 0.6%, Na_2HPO_4 0.3%, MgCl_2 0.15% for 72 hrs.

이며, 모잘록병균에 대한 생육억제는 13.9mm로 우수하였다. pH 9.5 이상에서는 균생육과 항진균활성 모두 감소하였으나 pH 5~9까지 항진균 활성은 비교적 높게 나타났다.

배양시간의 영향

배양시간에 따른 균 생육도를 조사하기 위하여 상기 최적배지에 길항균을 접종한 후 32°C에서 진탕 배양하면서 6간 간격으로 배양액을 회수한 다음, 항진균 활성을 측정한다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양 24시간째에 대수증식기, 42시간째에 정지기를 거쳐 66시간 후에 사멸기에 이르렀다. 각 시간별로 얻어진 배양상등액을 이용하여 모잘록병균에 대한 항진균 활성을 측정한다. 대수증식기 초기인 배양 24시간의 상등액에서부터 항진균 활성이 나타나기 시작하였으며, 정지기 이후 66시간 사이에서 가장 항진균 활성을 보여주었다. 따라서 *B. ehimensis* YJ-37에 의한 항진균성 물질의 생성은 균 생육도가 42시간에 정지기에 도달하였으나(1.42×10^8 cfu/ml, 21g-DCW/l) 항진균성 물질의 생성은 정지기 중반인 54에 13.9mm로 가장 왕성하게 생성되는 것을 알 수 있었다.

Jar fermenter 배양(5 l)

5 l Jar fermenter 배양은 상기 플라스크 배양에서의 최적조건인 1.5% starch, 0.6% peptone, 0.3% Na_2HPO_4 , 0.15% MgCl_2 , pH 8.0, 배양온도 32°C로 하여 공기 주입량을 1, 2,

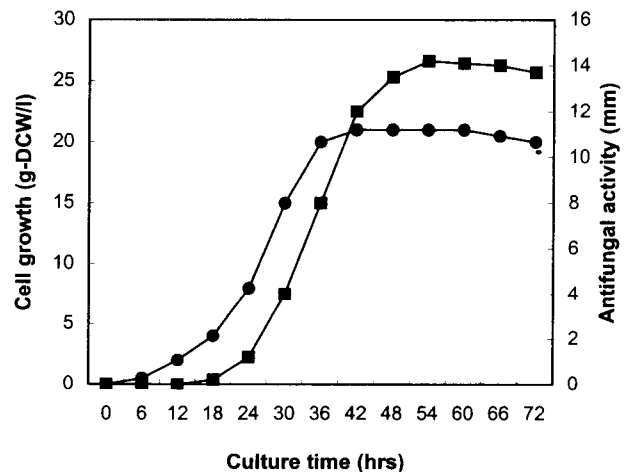


Fig. 1. Change of antifungal activity and growth during the cultivation of *B. ehimensis* YJ-37 in 500ml flask culture.

■—■, antifungal activity (clear zone, mm); ●—●, cell growth (g-DCW/l). *B. ehimensis* YJ-37 was grown in medium containing starch 1.5%, peptone 0.6%, Na_2HPO_4 0.3%, MgCl_2 0.15% at 32°C for 72 hrs.

3 vvm으로 각각 고정하고 교반 속도를 100, 200, 300, 400rpm으로 72시간 각각 배양한 결과, 공기주입량이 1 vvm일 경우 균의 성장 및 길항물질 생산능이 교반속도가 증가함에 따라 조금 증가되었을 뿐 전체적으로는 큰 영향이 나타나지 않았으나 공기 주입량이 2 vvm일 경우 비교적 높은 활성을 가졌으며 교반속도가 증가함에 따라 높았

다. 그러나 공기주입량을 3 vvm으로 고정하고 교반속도를 증가시킨 결과 교반속도 증가에 따른 길항력은 증가되지 않았다(데이터 미제시). 이는 공기 주입량을 증가시킨다고 해서 균의 생육이 동시에 증가되지 않음을 입증하는 것이다. 따라서 공기주입량을 2 vvm으로 고정하고 교반속도도 200 rpm으로 고정시킬 경우 Fig. 2에서와 같이 배양 24시간째에 대수증식기, 42시간째에 정지기를 거쳐 66시간 후에 사멸기에 이르렀다. 정지기때의 균의 수는 2.06×10^8 cfu/ml (30g-DCW/ℓ)로 나타났다. 각 시간별로 얻어진 배양상등액을 이용하여 모잘록병균에 대한 항진균 활성을 측정 한 결과 대수증식기 중기인 배양 36시간의 상등액에서부터 항진균 활성이 다소 강하게 나타나기 시작하여 정지기인 48시간 이후에서 13.4mm로 높은 항진균 활성을 보여주었다.

대량생산(2,000 ℓ)

2,000 ℓ 대형탱크 배양은 배지 1,800 ℓ (pH 8.0)에 상기 5 ℓ jar fermenter 배양액을 종균으로 접종하고 32℃에서 공기주입량 30 vvm, 교반속도 200 rpm으로 배양하여 배양 시간별 균의 성장 및 길항물질 생산을 조사 결과, Fig. 3에서와 같이 pH의 변화는 초기배양 pH 8.0에서 배양 3일 이

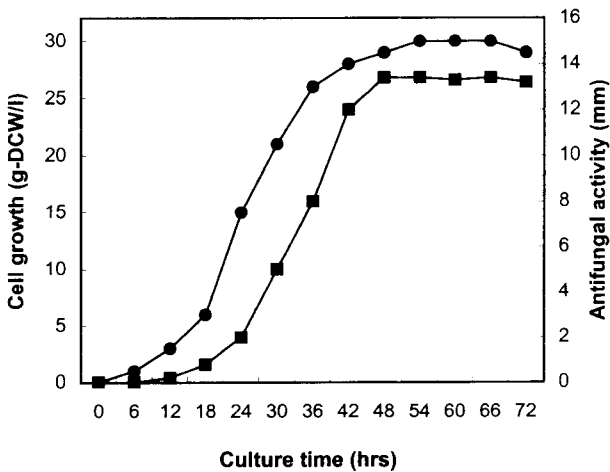


Fig. 2. Cell growth and antifungal activity profiles by *B. ehimensis* YJ-37 in 5 ℓ jar fermenter culture.

■—■, antifungal activity (clear zone, mm); ●—●, cell growth (g-DCW/ℓ). *B. ehimensis* YJ-37 was grown in medium containing starch 1.5%, peptone 0.6%, Na_2HPO_4 0.3%, MgCl_2 0.15% at 32℃ for 72 hrs under air flow (2 vvm) and agitation speed (200 rpm) in 5 ℓ jar fermenter.

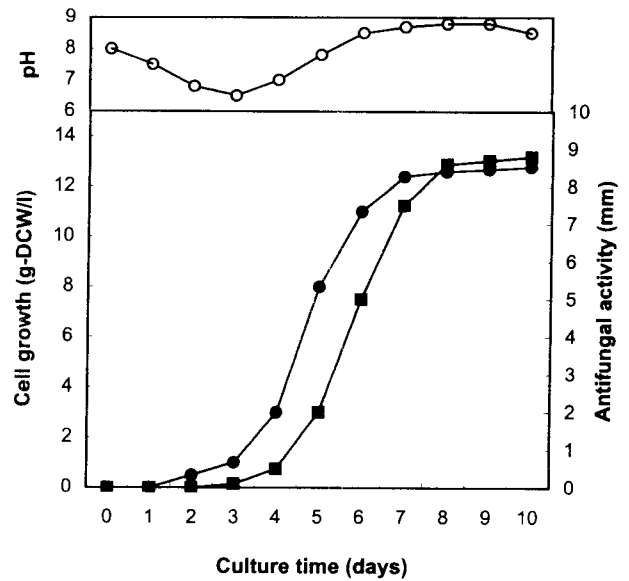


Fig. 3. Cell growth and antifungal activity profiles by *B. ehimensis* YJ-37 in 2,000 ℓ large scale culture.

■—■, antifungal activity (clear zone, mm); ●—●, cell growth (g-DCW/ℓ), ○—○, pH. *B. ehimensis* YJ-37 was grown in medium containing starch 1.5%, peptone 0.6%, Na_2HPO_4 0.3%, MgCl_2 0.15% at 32℃ for 10 days under the culture conditions of air flow (30 vvm) and agitation speed (200 rpm).

후 6.5까지 떨어졌다가 배양 4일째부터 증가하기 시작하여 배양 5일째 8.0, 배양 7일째 8.8 까지 증가한후 배양 10일째 까지 큰 변화없이 유지되었으며, 균의 성장은 5 ℓ jar fermenter 배양과 거의 동일한 양상으로 나타났으나 배양시간이 더 증가되었다. 배양 4일째에 대수증식기, 6일째부터 거의 정지기 상태이나 아주 소량씩 균의 성장은 이루어 지고 있었다. 배양 10일째 의 균의 수와 균체의 양은 0.81×10^8 cfu/ml 및 12g-DCW/ℓ로 나타났다. 각 시간별로 얻어진 배양상등액을 이용하여 모잘록병균에 대한 항진균 활성을 측정 한 결과, 대수증식기 중기인 배양 5일째 상등액에서부터 항진균 활성이 나타나기 높기 시작하여 배양 8~10일에 8.6mm로 항진균 활성을 보여주었다.

결론적으로 500ml 플라스크 배양, 5 ℓ jar fermenter 배양 및 2,000 ℓ 대형탱크 배양에서 미생물의 수는 각각 1.42×10^8 (21g-DCW/ℓ), 2.06×10^8 (30g-DCW/ℓ), 0.81×10^8 cfu/ml (12g-DCW/ℓ)로 나타났으며, 항진균 길항력은 13.9, 13.4, 8.6mm로 나타났다. 따라서 플라스크배양에서는 길항력

이 가장 우수하였고 jar fermenter 배양에는 균의 생육이 우수하였으나 2,000 ℓ 대형탱크에서는 길항력과 균의 생육이 모두 감소하였다. 이러한 이유는 대형탱크의 크기가 jar fermenter에 비해 400배 이상 증가하였고 공기주입량과 교반속도 뿐만 아니라 배지의 성분, 압력, 접종량, agitater의 회전속도, impeller의 크기, 형태, 위치 등 많은 요인의 변화에 의한 것으로 추정되며 토양미생물제제 생산을 위한 대량배양을 위해서는 앞으로도 계속 연구가 진행되어야 할 것으로 본다.

요 약

본 연구는 채소류 모잘록병균인 *R. solani* AG4에 길항하는 미생물 *B. ehimensis* YJ-37의 500ml 플라스크 배양, 5 ℓ jar fermentor 배양, 2,000 ℓ 대형탱크의 배양 조건 및 길항물질 생성능을 조사하였다. 500ml 플라스크 배양에서의 길항물질 최적생산조건은 1.5% starch, 0.6% peptone, 0.3% Na₂HPO₄, 0.15% MgCl₂, pH 8.0, 배양온도 32℃, 배양시간 54시간으로 나타났고, 이때 미생물의 수는 1.42×10⁸ cfu/ml(21g-DCW/ℓ), 항진균 활성은 13.9mm로 나타났다. 5 ℓ jar fermenter 배양에서의 길항물질 최적생산조건은 플라스크배양에서의 최적 생산조건에서 공기주입량과 교반속도를 변화시켜 조사한 결과, 공기주입량 2 vvm, 교반속도 200 rpm, 배양시간 48시간 이후 미생물의 수와 균체의량은 2.06 × 10⁸ cfu/ml 및 30g-DCW/ℓ, 항진균 활성은 13.4 mm로 나타났다. 2,000 ℓ 대형탱크 배양에서는 교반속도 200 rpm, 산소주입량 30 vvm으로 고정하고 10일간 배양하여 미생물의 생육 및 길항물질 생성능을 조사한 결과는 미생물의 수와 균체의량은 0.81 × 10⁸ cfu/ml와 12g-DCW/ℓ, 항진균 활성은 8.6mm로 나타나 5 ℓ jar fermenter 배양에 비해 균의 수는 1/10로 줄었으며 항진균 활성도 64%로 낮게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2000년 제8차 산학연공동기술개발 지역컨소시엄(과제번호:2000-11) 연구지원비에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Agrios, G. N. 1988. *Plant pathology*. pp. 803-846, 3rd eds., Academic press, New York.
2. Baker, K. F. 1970. Types of Rhizoctonia diseases and their occurrence, pp.125-133, In J. R. Parmeter(ed.), *Biology and Pathology*, University of California Press, Berkeley.
3. Buysens, S., K. Heungens, J. Poppe and M. Hofte. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdinin in suppression of *Pythium*-induced damping-off tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NS K2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 865-871.
4. Chernin L., Z. Ismailov, S. Haran and I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1720-1726.
5. Crawford, D. L., J. M. Lynch, J. M. Whipps and M. A. Ousley. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3899-3905.
6. Dunne, C., Y. Moenne-Loccoz, F. J. de Bruijn and F. O'Gara. 2000. Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. *Microbiol.* **146**, 2069-2078.
7. Fridlender M., J. Inbar and I. Chet. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1211-1221.
8. Joo, G. J., J. H. Kim and S. J. Kang. 2002. Isolation and antifungal activity of *Bacillus ehimensis* strain YJ-37 as antagonistic against vegetables damping-off fungi. *Kor. J. Life Sci.* **12**, 200-207.
9. Koch, E. 1999. Evaluation of commercial products for microbial control of soil-borne plant diseases. *Crop Protection* **18**, 119-125.
10. Nielsen, P. and J. Sorensen. 1997. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**, 183-192.
11. Sneh, B. and Y. Henis. 1972. Production of antifungal substances active against *Rhizoctonia solani* in chitin-amended soil. *Phytopathol.* **62**, 595-600.
12. Stanghellini, M. E. and J. G. Hancock. 1971. Radial

- extent of the bean spermosphere and its relation to the behavior of *Pythium ultimum*. *Phytopathol.* **61**, 165-168.
13. Thrane, C., T. H. Nielsen, M. N. Nielsen, J. Sorensen and S. Olsson. 2000. Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**, 139-146.
14. Yuan, W. M. and D. L. Crawford. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3119-3128.

(Received February 27, 2002; Accepted May 10, 2002)