

꽃마름병균의 길항세균 *Bacillus amyloliquefaciens* SKU-78의 대량 배양 조건 확립

김신덕 · 조홍범*

서경대학교 화학생명공학과

Fermentation of a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus amyloliquefaciens* SKU-78 Strain

Shin-Duk Kim and Hong-Bum Cho*

Department of Chemical and Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Republic of Korea

(Received September 9, 2013 / Accepted March 19, 2014)

Mass production of biocontrol agent is an essential step for its commercial use. Media composition and culture conditions for production of *Bacillus amyloliquefaciens* SKU-78, a potential biocontrol agent against bacterial wilts, were optimized by a flask culture. Low cost media combining nitrogen and carbon sources were tested. Maximum cell growth ($>2 \times 10^9$ CFU/ml) was obtained in a medium of 5% soy flour combined with 3% corn starch after 24 h cultivation. The optimum initial pH, temperature and shaking speed was 5.5, 30°C and 150–250 rpm, respectively. Fermentation of SKU-78 was scaled up in 30 L fermenter and the profiles of cell density, pH, dissolved oxygen and spore formation were recorded. After 8 h lag phase, exponential growth occurred and reached at maximum viable cell number (1.2×10^{11} CFU/ml) after 20 h. The SKU-78 strain grown in a low cost medium exhibited the high suppression of bacterial wilts. The results indicate that SKU-78 strain can be produced in a low cost medium and provide a basis for scaling up to industrial level.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, bacterial wilt, biocontrol agent, media optimization

화학농약의 오랜 사용에 따른 생태계 파괴, 농산물의 잔류독성 및 내성균의 출현(Lee, 1997) 등의 문제로 인해 환경 친화적인 생물농약 개발의 필요성이 크게 대두되어 다양한 길항균을 선발하고, 이용하기 위한 시도가 이루어져 왔다(Spadaro and Gullino, 2005). *Ralstonia solanacearum*은 고추, 토마토, 감자, 가지, 담배, 파프리카 등 다양한 주요 경제 작물의 뿌리 상처를 통해 식물체에 침투하여 꽃마름병을 유발시킴으로써(Tans-Kersten *et al.*, 2001) 막대한 경제적 손실을 초래하는 토양성 식물 병원균이다(Fusjiwara *et al.*, 2011). 주로 고온 다습한 열대와 아열대 지역을 중심으로 피해가 컸으나, 근래에는 기온 상승 등의 원인에 의해 국내에서도 특히 장마가 지난 뒤 고온 다습한 상태에서 빈번하게 발생하여 피해가 확대되고 있다. *R. solanacearum*의 생태나 발병 기작에 대한 연구는 많이 이루어졌지만(Van Elsas *et al.*, 2000) 이에 대한 확실한 방제법이나 방제제는 아직 개발되어 있지 않다. 본 연구팀은 꽃마름병에 대한 생물학적 방제제를 개발하기 위하여, 토마토와 고추의 근권 토양에서 분리한 균주로, 식물 뿌리에

colonization이 잘되며 *in vivo* pot와 포장 실험에서 강력한 꽃마름병 발병억제 활성을 보인 *Bacillus amyloliquefaciens* SKU-78 균주를 생물농약 후보로 선정, 보고한 바 있다(Sung *et al.*, 2005). 경제성 있는 생물농약을 개발하기 위해서는 방제효과가 뛰어난 균주 선발과 더불어 고농도의 균체를 저렴하게 대량생산할 수 있는 산업용 배지 개발과 배양 조건 확립이 매우 중요하므로(Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012), 본 연구에서는 꽃마름병 방제효과가 뛰어나 생물 농약으로의 개발 가능성이 확인된 *Bacillus amyloliquefaciens* SKU-78 (이하 SKU-78) 균주에 대해 대량 배양을 위한 저가 산업용 배지의 선택과 배양 조건을 확립하였다.

어분, 미강, 밀기울, 비지가루, 깻묵, 맥아, 콩가루 등 7종의 기질을 대상으로 다른 탄소원과 질소원 및 미량원소의 첨가없이 배양하여 경제성 있는 최적 기질을 우선 선발한 후, 다양한 탄소원(corn starch, glucose, glycerol, lactose, fructose, sucrose)과 질소원(casein, soybean meal, tryptone, beef extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast extract)의 첨가에 따른 SKU-78균주의 성장 효과를 검토하였다. 탄소원 선발 시 질소원으로는 1% 효모 추출액(yeast extract)을 사용하고, 질소원 선발 시 탄소원으로는 1% 옥수수 전분(corn starch)을 사용하였다. 선발대상 기질 농도 역시 각

*For correspondence. E-mail: hbcho@skuniv.ac.kr; Tel.: +82-2-940-7017; Fax: +82-2-940-7038

Table 1. Effects of various substrates on cell growth of SKU-78

Substrates (5%)	Cell density ($\times 10^8$ CFU/ml) ^a
Fish meal	9.0 a
Rice bran	4.8 b
Wheat bran	8.0 a
Biji flour	7.5 ab
Sesame oil cake	4.8 b
Malt	7.3 ab
Soy flour	11.9 a
NB	0.9 c

^aCell density was measured by colony count on a nutrient agar plate after dilution with sterilized water. Each value represents the average of three independent replications and different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to LSD test.

1% 농도를 적용하였으며 NB (Nutrient Broth, Difco) 배지를 기준 배지로 하였다. NB 배지에서 24시간 배양(30°C, 160 rpm)한 SKU-78 균주 seed culture를 배양배지 100 ml에 1% (v/v) 접종한 후 30°C에서 160 rpm으로 48시간 진탕 배양한 후 배지에 따른 균체 밀도 변화를 측정된 결과, 저렴한 산업용 기질 후보로 콩가루를 선정하였다(Table 1). 콩가루 기질에 다양한 탄소원 첨가 효과를 검토한 결과는 배양 24시간째에 과당(fructose), 옥수수 전분(corn starch) 그리고 자당(sucrose)을 첨가한 배지에서 균의 생장이 좋았고, 48시간 배양에서는 옥수수 전분과 유당(lactose)에서의 생장이 높았으며, 자당 사용에서도 비교적 균의 생장이 양호하게 나타남으로써(Fig. 1), 상대적으로 저렴하고 장시간 배양 시에도 균 성장에 효과가 높은 옥수수 전분을 탄소원으로 선발하였다. 질소원의 경우는 미강(rice bran)과 콩가루를 사용했을 때 균체 성장이 가장 높게 나타나(Fig. 2) 상대적으로 염가인 콩가루를 질소원으로 선발하였다. 산업용 기질로 사용된 콩가루의 농도에 따른 균체 밀도를 측정된 결과 기질 농도가 높을수록 균체 밀도도 증가하였으나, 5% 이상의 기질 농도에서는 큰 차이가 없었다(자료 미제시). 5% 콩가루 기질에 옥수수 전분, 포도당 또는 soluble starch 탄소원을 3% 첨가하여 48시간 배양한 결과 3% 옥수수 전분을 첨가한 경우에는 탄소원을 별도로 첨가하지 않고 콩가루 배지만으로 배양한 경우에 비해 생균 밀도가 증가

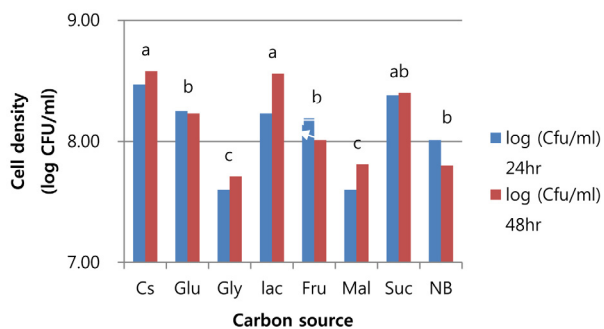


Fig. 1. Effects of carbon sources on cell growth of SKU-78. Each bar represents the average of three independent replications and different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to LSD test. (Cs, Corn starch; Glu, Glucose; Gly, Glycerol; Lac, Lactose; Fru, Fructose; Mal, Maltose; Suc, Sucrose; NB, Nutrient broth)

Table 2. Effect of initial pH on cell growth of SKU-78

Initial pH	Cell density ($\times 10^8$ CFU/ml) ¹⁾		Final pH
	Incubation time (h)		
	24 h	48 h	
5.0	2.4 ^c	5.0	6.58
5.5	1.2	3.9	6.51
6.0	0.4	2.7	6.53
6.5	1.0	0.8	6.60
7.0	0.5	2.5	6.11
7.5	1.7	1.0	6.61
8.0	0.4	3.3	5.74
8.5	0.5	2.6	5.75
9.0	1.3	3.6	5.69
9.5	1.9	3.2	5.33

¹⁾Cell density was measured by colony count on a nutrient agar plate after dilution with sterilized water. Data are means of three independent experiments.

하였으나, 포도당이나 soluble starch를 첨가한 처리구에서는 증가 효과가 나타나지 않았다(자료 미제시). 따라서 SKU-78 균주 배양에 가장 효과적인 산업용 배지는 5% 콩가루 + 3% 옥수수 전분으로 판명되었다(자료 미제시). 아울러 산업용 기본 배지에 무기염(0.1% KH_2PO_4 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% $MgSO_4$, 0.1% $CaCl_2$) 첨가에 대한 영향을 검토한 결과, 무기염 첨가에 따른 균체 성장 효과는 특별히 없는 것으로 나타났다(자료 미제시). 이는 산업용 배지로 선발한 콩가루와 옥수수 녹말에 SKU-78 균주 성장에 필요한 무기염들이 충분히 존재하기 때문으로 생각된다.

선택된 산업용 배지(5% soy flour + 3% corn starch)를 이용하여, 발효조건을 확립하기 위해 배양 온도(25, 30, 35°C)와 교반 속도(100, 150, 200, 250 rpm)에 따른 SKU-78 성장 속도를 측정하였다. 30°C와 35°C의 생육이 유사하였고(자료 미제시), 교반 속도 역시 150-250 rpm 범위 내에서 세균 밀도 증가에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(자료 미제시). SKU-78 균체 성장에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, 24 시간과 48 시간 배양 시 모두 초기 pH를 5.0으로 보정하였을 때 세균 밀도가 가장 높았으며 최종 pH가 6.58로 알칼리화 되는 경향이 나타났다(Table 2). 이상의 결과를 바탕으로 30 L 발효기에서 산업용

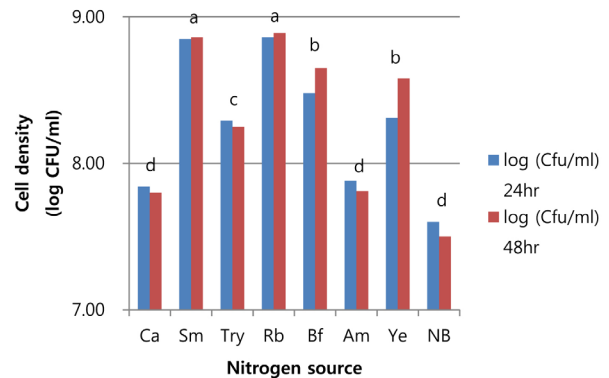


Fig. 2. Effects of nitrogen sources on cell growth of SKU-78. Each bar represents the average of three independent replications and different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to LSD test [Ca, Casein; Sm, Soy bean meal; Try, Tryptone; Wb, Wheat bran; Rb, Rice bran; Be, Beef extract; Am, $(NH_4)_2SO_4$; Ye, Yeast extract; NB, Nutrient broth].

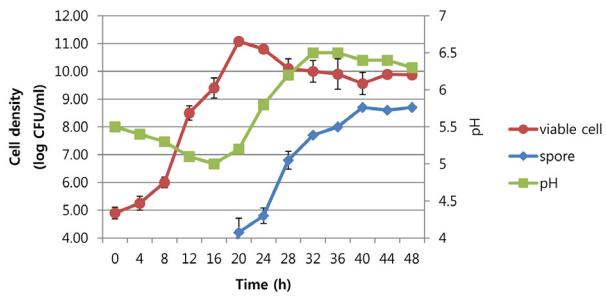


Fig. 3. Profiles of viable cell number, spore number and pH during the culture of SKU-78 in an industrial medium. The data are the means of three replications. Vertical bars indicate standard deviations.

배지 20 L에 seed culture 400 ml을 접종하고, 30°C에서 1 vvm의 통기량과 300 rpm의 교반 속도로 배양하면서 배양시간에 따른 pH, 용존 산소량과 생균 밀도 그리고 포자 수의 변화를 조사하였다. 배양과정에서 발생하는 과량의 foam은 antifoam A (Sigma, USA)를 사용하여 조절하였다. 생균 밀도는 4시간 간격으로 발효액 20 ml씩 회수하여 멸균수로 10 배, 100 배 희석하여 NB 배지에서 10 단계 평판 희석법으로 균체 수를 측정하였고, 포자 수는 희석시킨 시료를 65°C에서 15분간 열처리한 후 NB agar plate에 도말하여 나타난 colony로 측정된 결과, 생균 밀도는 8 시간 이후 급격하게 증가하기 시작하여, 배양 20시간째에 최대값(1.2×10^{11} CFU/ml)에 도달한 후 약간 감소되다가 계속 유지되었다(Fig. 3). pH는 배양 초기에 약간 감소하다가 16시간 이후부터는 계속 서서히 증가되었고, DO는 12시간 이후 계속 0으로 유지되었다. 포자 형성은 20시간부터 서서히 이루어져 40시간에 최대에 도달하였으며 포자 형성 비율은 거의 90%에 달했다. 같은 산업용 배지를 사용하여 혐기적 또는 호기적으로 발효하였을 때 혐기적 발효에서는 최대 균 밀도에 도달하는 시간이 4시간 빨랐으나, 최고 밀도에서는 별 차이가 나타나지 않았다(자료 미제시).

배양시간에 따른 풋마름병 방제효과를 검정한 결과 20시간 배양 한 배양액을 관주 처리하였을 때 풋마름병 발병억제 효과가 최대(65% 이상)를 나타내었고 배양시간이 증가됨에 따라 점차 감소하여 생균 밀도가 최대일 때 발병 억제효과도 최대이고 포자를 형성 함에 따라 점차 감소하는 것으로 나타났다. 또한 배양액, cell 현탁액, cell free 배양 여액을 관주 처리시 배양액은 65%, cell 현탁액은 32%, cell free 배양 여액은 58%의 발병 억제를 각각 나타내어 배양액에 의한 발병 억제 효과가 가장 크게 나타났다. 본 실험의 결과, 저가의 산업용 배지 콩가루와 옥수수 전분 사용에 의한 길항균의 대량 배양 가능성을 확인하였으며, 포자 형성이 이루어지지 않고 생균 밀도가 최대로 유지되는 20시간 배양 시 최대 발병 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 선행 연구 결과에서 SKU-78 균주의 풋마름병 억제 기작에 대해 완전하게 밝혀지지 않았지만 *in vitro* antibiosis를 나타내지 않았으며, root colonization이 잘되었고, *in vivo* plant assay에서 강한 발병 억제 효과를 보였다(Sung *et al.*, 2005). 따라서 SKU-78 균주가 뿌리 근착을 통해 병원균의 뿌리 표면의 접근을 막아 발병을 억제하는 기작 외에 biofilm 형성을 촉진시키거나 또는 induced

systematic resistance에 관여하는 활성 물질이 배양액에 존재하는 것으로 추정할 수 있다. 그러므로 SKU-78 균주의 생물농약으로 개발하기 위해서는 포자 형성이 억제되는 조건에서 배양한 배양액 내 생균과 이차 대사산물의 농도가 유지되는 조건 확립이 가장 중요하다고 사료되며, 이에 대한 후속 연구 결과에 따라 생물농약 제제화 조건이 완전히 규명될 수 있을 것으로 판단된다.

적요

길항균을 생물 농약으로 개발하기 위해서는 저렴한 산업용 배지를 이용한 대량 생산 체계를 확립하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 풋마름병 방제 효과가 뛰어난 *Bacillus amyloliquefaciens* SKU-78 균주의 배양조건을 확립하였다. 저가의 산업용 기질로는 콩가루와 옥수수 전분 배지가 균 성장에 가장 효과적이었고, 최초 pH 5.5, 배양 온도 30°C, 교반속도 150–250 rpm의 조건으로 30 L fermenter를 이용한 배양에서 20 시간째에 최대 생균수 (1.2×10^{11} CFU/ml)에 도달하였다. 저가의 산업용 배지로 배양한 배양액을 관주 처리하였을 때 65%의 발병 억제 효과를 나타냄으로써 SKU-78 균주의 산업용 배지를 이용한 대량배양의 기초가 마련되었다.

감사의 말

본 연구는 2012년 서경대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasak, i T., Fujie, M., and Yamada, T. 2011. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4155–4162.
- Lee, K.S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* **16**, 80–93.
- Spadaro, D. and Gullino, M. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* **24**, 601–613.
- Sung, P.J., Shin, J.K., Cho, H.B., and Kim, S.D. 2005. Isolation, identification and biological control activity of SKU-78 strain against *Ralstonia solanacearum*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 48–52.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., and Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* **183**, 3589–3605.
- Van Elsas, J.D., Kastelein, P., Bekkum, V., Van der Wolf, J., de Vries, P.M., and Van Overbeek, L. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathol.* **90**, 1358–1366.
- Yáñez-Mendizábal V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., and Teixidó, N. 2012. Production of the post harvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol. Control* **60**, 280–289.