

토양속의 인산 가용화를 위한 *Pantoea agglomerans* 배양의 최적 조건 및 균주 고정화를 위한 안정성 조사

정일, 양송원, 김길용*, 유의연, 박돈희
전남대학교 화학공학부, 전남대학교 응용생물공학부*
Tel (062) 530-0232, Fax (062) 530-1849

국문초록

토양속의 인산 가용화를 위한 *Pantoea agglomerans* 배양의 최적조건과 균주 고정화를 위한 안정성을 조사한 결과 30°C, pH 7.0, 공기유량 2vvm에서 각각의 흡광도 값이 51시간에서 1.756과 1.713, 50시간대에 1.819로써 가장 균의 성장이 활발한 것으로 나타났으며, 1% CaCl₂ 용액에서 172시간대에 흡광도값 2.361로 가장 안정하였다.

서론

인산은 미생물 구조와 대사에 중요한 영양원으로 세포내·외의 무기인산 농도에 따른 생리적 변화 및 인산 대사조절에 관여하는 것으로 농업에서 가장 필수적이고도 중요한 영양분 중의 하나이지만, 자연계에서 무기와 유기 형태로 존재하는데 대부분이 불용성 또는 난용성 형태로 존재한다. 식물이 흡수할 수 있는 인산의 형태는 H₂PO₄⁻인데 인산을 비료로 사용하게 되면 빠른 시간 내에 식물이 이용할 수 없는 불용성 복합체들과 함께 침전된다. 즉, 작물에 흡수되는 인산의 양은 매우 적어서 10~20%에 지나지 않고 흡수 정도가 낮은 것은 가령 가용성 인산이 토양에 가해진다 하더라도 매우 적은 양이 가용성의 형태로 남고 대부분의 토양에 흡수되어 매우 강하게 결합되어 난용성으로 되기 때문이다.^{1),2),3)}

따라서 본 실험에서는 토양속의 인산 가용화를 위한 *Pantoea agglomerans*^{4),5)}의 배양의 최적 조건을 조사하고자, 온도, pH, 공기유량별로 실험을 수행하였으며, 토양속에서 균의 환경적응성을 높이기 위한 방법으로 고정화를 실시하기 위해 담체에서의 균 안정성 조사를 하였다.^{6),7)}

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 *Pantoea agglomerans*로써 30°C, 120rpm으로 30분간 진탕 배양한 후에 동일한 증류수로 1×10⁶~1×10⁷배 희석한 다음 Agar plate에 도말하였다. 도말한 plate들은 30°C incubator에서 2~3일 동안 배양하면서 투명대를 형성하는 균주들을 선별하여, LB broth(peptone, 10g; NaCl, 10g; yeast extract, 5g;

distilled water 1 liter; pH 7.2)에 접종하여 30°C, 120rpm에서 배양하였다.

2. 온도의 영향

균주의 최적 배양 온도를 조사하기 위하여 LB broth에 각각 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 LB broth에 최종농도(v/v)가 0.1%가 되도록 첨가하였다. 균주가 첨가된 0.1%의 균 배양액을 2회 이상 계대 배양하여 활성을 시킨 후 23°C, 30°C, 37°C의 온도에서 120rpm, 80 시간 동안 시료를 취하여 pH 및 spectrophotometer를 이용하여 OD 600nm에서 흡광도를 각각 측정하였다.

3. pH의 영향

균주를 LB 액체배지에 각각 접종하고 30°C에서 48시간 이상 배양한 후 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 맞추어 30°C, 120rpm으로 100 시간 동안 배양하면서 시료를 취하여 pH와 OD 660nm에서 흡광도를 알아보았다.

4. 공기 유량의 영향

1L 생물 반응기에 공급되는 공기의 양을 각각 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 vvm (air volume/liquid volume/minute)로 조절하여 30°C, pH 7.0 그리고 120rpm의 최적 조건으로 LB broth에서 75시간 배양하면서 pH와 OD 660nm에서 흡광도를 조사하여 최적의 통기량을 알아보았다.

5. 배지내의 CaCl₂ 농도에 따른 균주의 성장 실험

CaCl₂ 농도를 각각 1%, 2%, 3%로 LB broth 300ml씩 만들어 멸균시켜 30°C, pH 7.0, 120rpm의 조건으로 178 시간 동안 배양하면서 sample을 취하여 pH와 OD 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 온도의 영향

*P. agglomerans*의 온도에 대한 결과는 Fig. 1에 나타냈다. 균주의 적응시간은 23°C에서 12시간, 30°C에서 12시간, 37°C에서 8시간이었으며, 최대 성장은 23°C, 30°C, 37°C에서 모두 51시간으로 나타났다. 최대성장에서 흡광도 값은 23°C에서 1.715, 30°C에서 1.756, 37°C에서 1.397로 차이를 나타냈다. 온도가 높을수록 균주의 적응시간이 짧음을 알 수 있었다. 그리고 각각의 온도에서 *P. agglomerans*가 성장할 때의 pH 변화를 Fig. 2에 나타냈는데, 배양시간에 따른 pH 변화는 배양 후 약간 감소하다가 지수성장기가 끝날 무렵부터 상승하여 최대 성장기에서 pH는 23°C에서 pH는 8.35, 30°C에서 pH는 8.37, 37°C에서 pH는 7.89를 나타냈다. 각각의 온도에서 pH의 변화는 일정한 유형을 나타내며, pH 8부근에 근접하여 있음을 볼 수 있다. 실험 결과 *P. agglomerans*의 최적 성장 온도는 30°C임을 알 수 있었다.

2. pH에 의한 영향

pH에 따른 *P. agglomerans*의 성장을 알아보기 위해 0.1N-HCl와 2N-NaOH로

pH를 고정시켜 배양한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. pH 3.0에서는 균이 거의 사멸함을 보였고, pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0에서 *P. agglomerans*의 적응시간은 배양 후 12시간, pH 4.0일 때 배양 후 36시간 소요되었으며 *P. agglomerans*의 pH 영향에 따른 최대성장 시간은 pH 4.0일 때 배양 후 82시간, pH 5.0, 6.0 7.0, 8.0일 때 51시간이었다. 최대성장일 때 흡광도 값은 pH 7.0, 8.0에서 각각 1.713, 1.712로 크게 차이가 나지는 않았지만 pH 7.0일 때 가장 컸다.

3. 공기 유량에 의한 영향

*P. agglomerans*의 공기 유량에 대한 결과는 Fig. 4와 같이 나타났다. 공기 유량에 대한 균주 성장은 지수 성장기에 들어가는 시간이 각각의 공기유량에 배양 후 6시간, 최대성장은 배양 후 50시간으로 최대성장 시간이 거의 비슷함을 알 수 있었다. 최대성장에서의 흡광도 값은 0.0 vvm에서 1.516, 0.5 vvm에서 1.726, 1.0 vvm에서 1.744, 2.0 v.v.m에서 1.819로 나타났다. 실험결과 최적 공기 유량은 2.0 vvm임을 알 수 있었다.

4. 배지내의 CaCl₂ 농도에 따른 균주의 성장

본 실험에서는 고정화 입자를 안정화시키기 위해 알지네이트를 겔화제인 CaCl₂ 용액에 적하시킬 때, CaCl₂ 용액의 농도를 변화 시켜 균의 안정화 살펴본 결과 Fig. 5와 같이 1%에서는 거의 균의 저해가 이루어지지 않으며 최대 172시간에서 OD값 2.361로 거의 저해가 이루어지지 않음을 알 수 있었다. 2%와 3%에서는 각각 172시간에서 OD값 0.974, 0.320으로 균의 성장에 상당한 저해를 일으킴을 살펴보았다. 각각의 CaCl₂ 용액의 농도별에 따른 pH 변화는 178시간까지 거의 유사하였으며, pH 8 부근으로 집중되는 것을 관찰 할 수 있었다. 따라서 균을 고정화 할 때 균의 성장 저해에 거의 영향을 미치지 않는 1% CaCl₂ 용액으로 나타났다.

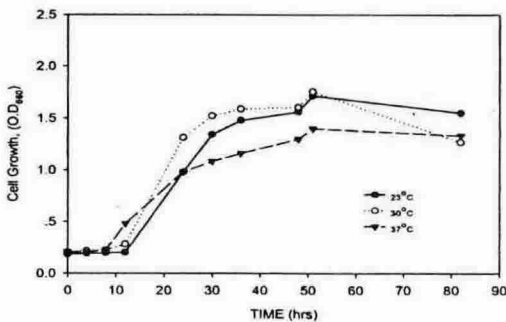


Fig. 1. Effect of several temperatures on the cell growth of *P. agglomerans*.

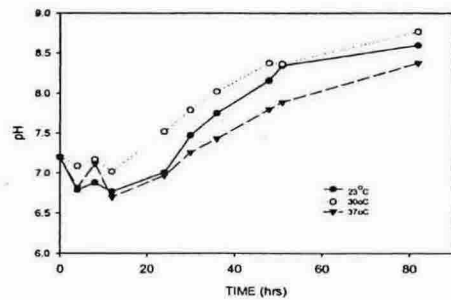


Fig. 2. Time trajectory of pH changes as temperature function.

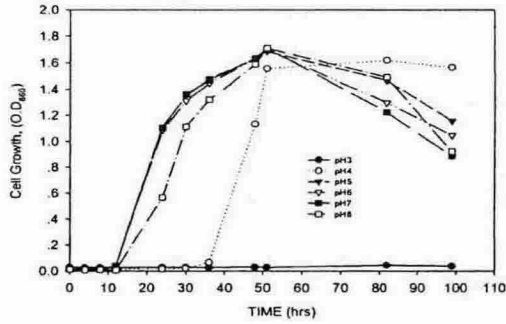


Fig. 3. Effect of pH change on the cell growth of *P. agglomerans*.

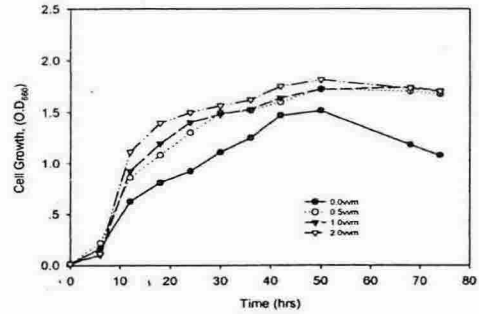


Fig. 4. Effect of air flow rates on the cell growth and pH changes of *P. agglomerans*.

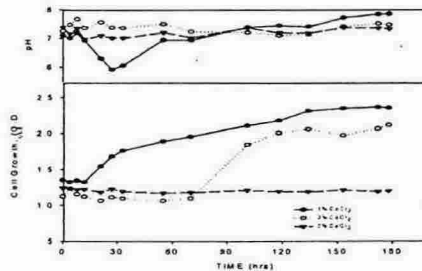


Fig. 5. Effect of CaCl_2 concentration on the cell growth and pH change of *P. agglomerans*.

참고문헌

1. Sperber J. I., "Solution of mineral phosphates by soil bacteria."(1957), *Nature*, 180, 994-995.
2. Struthers P. H. and G. H. Seiling, "Effect of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminum as influenced by pH."(1960), *Soil Science*, 69, 202.
3. Trasar-Cepeda M. C. and T. Carballas, "Liming and the phosphatase activity and mineralization of phosphorus in an andic soil."(1991), *Soil Biol. Biochem*, 23, 209-215.
4. Laheurte, F. and Berthelin, J., "Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus."(1998), *Plant and Soil.*, 105, 11-17.
5. Kil-Yong Kim., "Hydroxyapatite solubilization and organic acid production by *enterobacter agglomerans*."(1997), *J. Korean Soc. Soil Sci.*, 30(2), 189-195.
6. Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T., (1974), *Appl. Microbiol.*, 27, 878
7. Mori, T., Tosa, T. and Chibata, I., (1974), *Cancer Res.*, 34, 3066.