

천연 담체를 이용한 *Trichoderma harzianum* ATCC 52445의 고정화

†이종수·최영준·*복성해·**이준식

배재대학교 유전공학과

*한국과학기술연구원 생명공학연구소 생물소재그룹

**한국과학기술원 생물공학과

Immobilization of *Trichoderma harzianum* ATCC 52445 into Natural Matrix

Jong-Soo Lee,[†] Young-Jun Choi, Sung-Hae Bok* and Joon-Shick Rhee**

Department of Genetic Engineering, Paichai University, Taejon 302-735, Korea

*Bioproduct Research Group, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST,
P. O. Box 17, Daeduk Science Town, Taejon 305-606, Korea

**Department of Biotechnology, KAIST, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

Spores of *Trichoderma harzianum* ATCC 52445 for control of *Rhizoctonia* stem canker on potato were immobilized in various natural matrix, and germination rate and some rheological properties of the spore-matrix complex were investigated. Germination rate of gelatin gel-spore complex and potato starch gel-spore complex were 2.8% and 2.9%, respectively, but hardness and cohesiveness of the gelatin gel-spore complex were better than those of potato starch-spore complex. The hardness and cohesiveness were increased when the spores were immobilized in hybrid gelatin gel made by mixing several different types of natural matrix, but decreased their germination rate. Addition of corn steep liquor(1%) as spore nutrient in gelatin gel-spore complex was helpful for increasing the germination rate.

서 론

각종 병충해의 화학적 방제에 따른 잔류독성과 저항성 해충의 유발 및 환경오염 문제 등을 해결하는 방안으로 미생물공학을 이용한 무공해농약의 개발에 관한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다(1, 2). 그러나 이들 연구의 대부분은 *Bacillus thuringiensis*를 중심으로 병충해에 대한 살충효과의 증진과 방제 대상 spectrum의 확대 등을 위한 미생물

학적, 분자생물학적 연구들로서(3), 미생물농약이 대상식물체 표면에 안정하게 부착되어 지속적으로 약효를 발휘할 수 있도록 하는 현장 방제시의 안정성에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

미생물농약의 상품화에서 중요한 것은 제품의 방제효과가 기존 화학농약과 비교하여 우수해야 하며 생산비도 저렴해야 하지만 무엇보다도 실제 방제시 토양이나 식물체에서 안정한 효능을 보일 수 있도록 최종제품의 강도, 흡습성과 점착성 등의 물성이 규정되어야 하고 제조공정이 비교적 용이해야 한다. 이를 위해서는 미생물농약 개발시 생산에서 현장방

† Corresponding Author

제에 이르기까지 전체적인 전달체계를 검토할 필요성이 있다.

지금까지 미생물농약의 전달체계를 개선하기 위해서는 주로 균체(포자) 고정화 방법 중 담체와 균체와의 물리적 결합에 근거를 둔 포괄법(피막법)(4)이 많이 사용되고 있다. 즉, 이들 미생물에 대하여 diatomaceous earth 고정법(5), alginic acid-진흙 혼합물 피막법(6), alginic acid gel 피막법(7, 8)과 Carrageenan 겔 고정법(9) 등이 개발되어 식물병 방제에 큰 효과가 있었다. 특히 최근 국내 연구소에서 천연담체 고정화 기술을 이용한 미생물 농약이 개발되어(10) 새로운 미생물 농약의 전달체로서 크게 주목받고 있다. 그러나 이들 고정화 미생물 농약들이 최종 대상 식물체 표면에서 완전한 약효를 나타낼 때까지 안정하게 부착될 수 있도록 천연담체의 물성 개량이 요구된다.

따라서 본 연구에서는 천연담체 고정화 미생물의 물성 개량을 위한 자료를 얻고자 감자 *Rhizoctonia stem canker* 방제용의(11) *Trichoderma harzianum* ATCC 52445의 포자를 값이 싼 천연담체에 고정화시킨 후 이들의 발아율과 강도, 흡습성 및 점착성 등의 물성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

Trichoderma harzianum ATCC 52445는 한국화학연구소에서 분양받아 PDA(Potatoes Dextrose Agar; Potato, infusion from 200g, Bacto dextrose 20g, Bacto agar 15g per liter) 배지에 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

천연담체

대부분의 천연담체는 분말상태의 시판품을 사용하였고 CMC, gelatin, 한천, 아라비아 검 등은 시약용으로 사용하였다.

Trichoderma harzianum ATCC 52445 포자의 고정화

시험균주를 PDA배지에 도말하여 30℃에서 3~5일간 배양한 후 일정량의 멸균수를 가하고 배지 표면을 긁어서 균사와 포자를 회수한 다음 거즈로 여과하여 균사를 제거하고 4000rpm으로 5분간 원심분리하여 포자만을 회수하였다.

한편 각종 담체들을 1~20%(w/v) 되게 물과 섞

Table 1. Measurement conditions for universal testing machine.

Model	: Intron 1,000
Sample height	: 250mm
Clearance	: 4mm
Chart speed	: 100mm/min
Load cell	: 50kg
Cross head speed	: 100mm/min
Plunger diameter	: 12mm

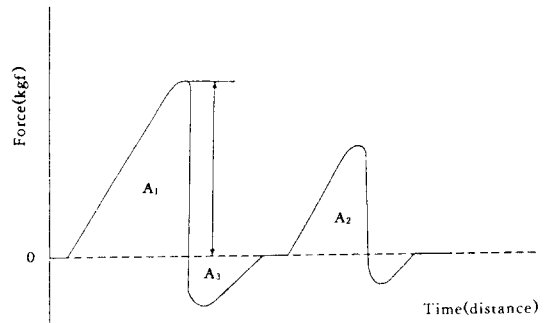


Fig. 1. Textural profile analysis curve.

Hardness : height of A₁, Adhesiveness : area of A₃, Cohesiveness : area of A₂/area of A₁.

어 가열(121℃)한 후 냉각시켜서 반고체상태의 겔을 만들어 위에서 회수한 포자들을 잘 섞은 다음 실온에서 20시간 풍건하여 고정화하였다(10).

또한 혼합담체의 제조와 보호제 및 영양 성분의 영향 등에 관한 실험은 복(10)의 방법을 변형하여 실시하였으며 고정화 효율(발아율)은 고정화하기 전 담체에 첨가한 포자수와 고정화 후 PDA 배지에서 발아된 포자수를 측정하여 이들의 백분율로 계산하였다.

수분흡착도

Lin 등(12)의 방법에 따라 고정화 담체 1g에 멸균수 10ml를 가한 뒤 24℃의 수욕조에서 30분간 진탕시킨 후 3700rpm으로 25분간 원심분리한 다음 유리수의 용적을 측정하여 흡착된 물의 양을 환산한 다음 고정화 담체 1g에 대한 흡착된 물의 ml로 표시하였다.

물성

고정화 담체의 강도와 점착성 등의 물성은 먼저 고정화 담체에 50% 증류수를 가하여 직경 0.8mm

Table 2. Germination rate of the spore-matrix complex.

Spore-matrix complex	Germination rate (%)	Spore-matrix complex	Germination rate (%)
Memil Pd.	0.78	CMC	1.16
Soybean Pd.	0.85	Agar	2.30
Chestnut Pd.	1.10	Soluble starch	0.29
Nogdu Pd.	1.15	Rice starch	0.52
Dashima Pd.	0.22	Potato starch	2.90
Gijang Pd.	2.45	Sweet potato starch	2.50
Barley Pd.	2.25	Arabia gum	0.45
Cornmeal	2.10	Garden soil	1.10
Gelatin	2.81		
Pectin	1.19		

Table 3. Water absorptivity and rheological properties of the spore-matrix complex.

Spore-matrix complex	Water absorptivity (H ₂ Oml/g)	Hardness (g)	Adhesiveness (dyn/cm ²)	Cohesiveness
Memil Pd.	6.6	15.7	3.3	0.97
Soybean Pd.	6.1	16.3	3.9	0.72
Chestnut Pd.	6.3	8.1	2.5	1.11
Nogdu Pd.	5.1	23.0	5.9	0.86
Dashima Pd.	4.4	6.2	1.6	0.96
Gijang Pd.	8.6	6.0	3.4	1.21
Barley Pd.	5.6	14.0	2.5	1.06
Cornmeal	4.8	8.6	2.5	1.08
Gelatin	4.4	27.9	5.3	0.90
Pectin	2.3	21.6	5.6	0.84
CMC	5.5	31.9	4.6	0.59
Agar	5.0	36.9	5.1	0.59
Soluble starch	1.9	31.6	5.3	0.63
Rice starch	7.4	6.2	1.6	1.03
Potato starch	3.8	20.2	2.9	0.82
Sweet potato starch	7.2	16.9	2.4	0.86
Arabia gum	1.6	0.3	0.13	1.88
Garden soil	0.8	0	0	0

로 정형한 후 Universal Test Machine(Instron Model 1000)를 이용하여 Table 1의 조건으로 Textural Profile Analysis(TPA) curve(Fig. 1)를 얻은 다음 이들로부터 강도와 점착성 및 응집성 등을 계산하였다.

Table 4. Germination rate of the spore-hybrid gelatin gel complex.

Spore-hybrid gelatin gel*	Germination rate (%)
Gelatin + Pectin	2.98
Gelatin + Nogdu Pd.	2.11
Gelatin + CMC	1.00
Gelatin + Agar	1.12
Gelatin + Soluble starch	2.80
Gelatin	2.75

* Hybrid gelatin gel were made by mixing with 5 : 1.

Table 5. Water absorptivity and rheological properties of the spore-hybrid gelatin gel complex.

Spore-hybrid gelatin gel complex	Water absorptivity (H ₂ Oml/g)	Hardness (g)	Adhesiveness (dyn/cm ²)	Cohesiveness
Gelatin + Pectin	6.0	17.8	3.5	0.71
Gelatin + Nogdu Pd.	6.4	24.4	4.2	1.09
Gelatin + CMC	8.8	41.6	7.0	1.37
Gelatin + Agar	6.0	35.6	6.1	1.27
Gelatin + Soluble starch	6.7	24.2	3.4	8.26
Gelatin	4.5	27.9	5.3	0.90

결과 및 고찰

Trichoderma harzianum 포자의 고정화

20여 종의 각종 천연담체 겔에 시험균주의 포자를 고정화하여 발아율을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 대부분 1~2%의 발아율을 보였으며 특히 gelatin과 감자전분 겔에 고정화시켰을 때 비교적 높은 발아율을 보였다. 이들을 복(10)의 결과와 비교하여 볼 때 정원토양 담체에서 다소 낮은 발아율을 보였을 뿐 비슷하였다.

한편, 이들 고정화 담체의 수분 흡착도와 물성을 조사한 결과(Table 3), 고정화 미생물 농약의 실제 적용시 중요한 물성인자인 강도와 점착성 등은 gelatin, pectin, CMC, 한천, 가용성 전분 등이 우수하였으며 위의 발아율과 비교하여 gelatin을 최적 담체로 선정하였다.

혼합 담체의 제조와 특성

고정화 담체의 물성을 개량할 목적으로 gelatin에 강도와 점착성이 우수한 pectin, CMC, 한천, 가용성

Table 6. Effect of dry protectants of the spore on germination rate of the spore-gelatin complex.

Protectants of the spores	Germination rate (%)
Skim milk (10%)	2.91
Glycerol (20%)	—
Tween 80 (10%)	2.20
Triton X-100 (10%)	1.20
Soybean oil (10%)	1.30
Milk (10%)	1.50
Control	2.70

Table 7. Effect of the spore nutrients on germination rate of the spore-gelatin complex.

Spore nutrients	Germination rate (%)
Yeast extract (0.5%)	2.10
Corn steep liquor (1.0%)	3.30
Soybean dusk Pd. (1.0%)	2.00
Control	2.69

전분 및 녹두가루 등을 5:1로 혼합하여 겔을 만든 후 포자를 고정화시켜 이들의 발아율과 물성을 측정 한 결과 Table 4와 5에서와 같이 gelatin-CMC와 gelatin-한천 혼합담체의 강도와 점착성 등이 gelatin 단일 담체에서보다 더 높아 물성은 개량되었지만 발아율은 오히려 매우 낮았다. 따라서 이들 발아율을 높이고자 혼합담체에 포자발아에 필요한 영양분으로 yeast extract와 corn steep liquor 등을 첨가하여 고정화시켰을 때 역시 gelatin 단일 담체보다 더 우수하지 못하였다(not data).

포자 건조 보호제 및 영양 성분의 영향

고정화시 포자를 건조로부터 보호하여 발아율을 상승시키고자 시험균주의 포자 현탁액에 탈지유, tween 80, triton X-100, 대두유 및 우유를 각각 10%, 글리세롤을 20%씩 첨가한 후 gelatin에 고정화시킨 다음 이들의 발아율을 조사한 결과 10%의 탈지유를 첨가하여 고정화시켰을 때 발아율이 약 0.2% 정도 상승하였을 뿐 다른 보호제의 첨가효과는 인정되지 않았다(Table 6).

또한, 포자 발아의 활성을 촉진시키기 위해 gelatin에 yeast extract 0.5%, 대두박 분말 1.0%, corn steep liquor 1.0%를 가하여 고정화시킨 후 발아율을 조사한 결과 corn steep liquor 첨가시 발아율이 약 0.6% 상승되었다(Table 7).

현재 Table 2에서와 같이 발아율이 높으면서 강도와 점착성이 떨어지는 감자 전분담체의 물성 개량을 위한 혼합 담체실험과 천연담체 고정화 미생물 농약을 이용한 감자 *Rhizoctonia* stem canker 방제효과 실험이 진행 중이다.

요 약

감자 *Rhizoctonia* stem canker 방제용의 *Trichoderma harzianum* ATCC 52445의 포자를 각종 천연담체에 고정화시킨 후 발아율과 강도 및 점착성 등의 물성을 조사하였다. 천연담체 중 gelatin과 감자 전분 겔에 포자를 고정화시켰을 때 각각 2.81%와 2.90%의 발아율을 보였고 강도와 점착성은 감자 전분 고정화 겔보다 gelatin 고정화 겔이 우수하였다. Gelatin에 몇 종의 물성이 우수한 담체를 섞어서 만든 혼합담체에 포자를 고정화시켰을 경우 물성은 개선이 되었으나 발아율은 오히려 낮아졌고 1%의 corn steep liquor를 gelatin에 첨가하여 포자를 고정화시켰을 때 발아율이 약 0.6% 상승되었다.

참고 문헌

- 이형환 (1984), 농약과 식물보호, p. 47, 한국농약공업 협회.
- 최홍철, 강석권, 유용만, 복성해, 유익동 (1993), 농약정보, p. 18, 한국농약공업협회.
- 임성렬 (1994), 생물공학 NEWS, 1(2), 24
- J. Klein and K. D. Vorlop (1985), *Comprehensive Biotechnology* (Murray Moo-Young ed.) Vol. 2, 204, Pergamon Press, Oxford.
- P. A. Backman and R. Rodriguez-Kabana (1975), *Phytopathology*, **65**, 819
- D. R. Fravel, J. J. Marois, R. D. Lumsden and W. J. Connick, Jr (1985), *Phytopathology*, **75**, 774.
- J. A. Lewis (1987), U. S. Patent, 4,668, 512.
- J. J. Marois, D. R. Fravel, W. J. Connick, Jr, H. L. Walker and P. C. Quimby (1988), U. S. Patent, 4,724, 147.
- H. Shigemitsu, H (1987), U. S. Patent, 4,647, 537.
- 복성해 (1991), 미생물 공학을 이용한 신규 무공해 살균제의 개발(1), 과학기술처, p. 25
- J. E. Beagle-Ristaino and G. C. Papavizas (1985), *Phytopathology*, **75**, 560.
- M. J. Lin, E. S. Humbert and F. W. Sosalski (1974), *J. Food Science*, **37**, 94.