

복합기능성 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 대량배양 최적화 및 특성*

박준경** · 김주은*** · 이철원*** · 송재경**** · 서선일** · 봉기문***** · 김대혁***** · 김평일*****

Mass Cultivation and Characterization of Multifunctional *Bacillus velezensis* GH1-13

Park, Jun-Kyung · Kim, JuEun · Lee, Chul-Won · Song, JaeKyeong ·
Seo, Sun-Il · Bong, Ki-Moon · Kim, Dae-Hyuk · Kim, Pyoung Il

Bacillus genus are found abundantly in various sites and their secondary metabolites were used as potential agents in agriculture, notably plant growth promoting and bio-control. The objective of this study was to develop the culture conditions of GH1-13 strain including higher cell growth, stable endospore-forming and enhancement of potential agents which are related with plant growth promoting and phytopathogen suppression. The optimal carbon and nitrogen sources were determined by glucose and soy bean flour, respectively, then resulted in 7.5×10^9 cells/mL, 6.8×10^9 endospore cells/mL and sporulation yield of 90% after 30 h cultivation in 500 L submerged fermenter at 37°C, pH 7.0. Cells and cell-free supernatant of GH1-13 strains showed the potent antifungal activity against phytopathogenic fungi of *Colletotrichum gloeosporioides*. It was also confirmed that indole-3-acetic acid (IAA) production of GH1-13 strain was greatly increased by addition of 0.3% tryptophan.

Key words : *antifungal activity, bacillus velezensis GH1-13, IAA production, mass cultivation, multifunctional microorganism*

* 본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ012467)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

** (재)농축산용미생물산업육성지원센터

*** 전남대학교 자연과학대학 화학과

**** 국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과

***** 국립환경과학원 영산강물환경연구소

***** (재)농축산용미생물산업육성지원센터, 전북대학교 자연과학대학 분자생물학과

***** Corresponding author, (재)농축산용미생물산업육성지원센터(pikim30@cials.or.kr)

I. 서 론

농업미생물은 작물의 생육촉진, 유도저항성, 면역활성, 병해충 방제, 토양개량 등 매우 다양한 범위에서 응용되고 있으며 그에 따라 새로운 농업환경의 변화에 맞춰 새로운 미생물 제제의 개발에 대한 요구가 증가하고 있다. 이러한 현상은 화학비료 및 화학농약 사용에 대한 소비자와 생산자들의 우려와 독성을 갖는 화학농약의 잔류, 환경독성 및 생태계에 미치는 건강과 환경에 대한 악영향으로 인하여 화학비료와 화학농약의 대체제로 각광받고 있기 때문이다(Avis *et al.*, 2008; Santoyo *et al.*, 2012). 따라서 작물의 병해충 방제와 생육촉진용 유용미생물의 수요 급증에 따라 다양한 작물생육 및 병 방제 효능을 지닌 미생물제의 사회적 요구가 증가하고 있으며 그로인해 많은 연구그룹에서 이와 관련 기초연구에서부터 현장적용 기술개발까지 폭넓게 이루어지고 있다(Nam *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2018). 현재까지 다수의 농업용 유용미생물이 개발되어져 왔고 다양한 농업미생물이 농업현장에서 폭넓게 활용되고 있다. 예를 들어 국내의 지역단위 농업기술센터에서 다양한 유용 미생물을 배양하여 농가에 공급하고 있다. 그중 많은 부분을 차지하고 있는 미생물으로써 바실러스(*Bacillus*)가 주를 차지하고 있으며, 추가적으로 유산균(*Lactobacillus*), 효모(*Saccharomyces*), 광합성균(*Photosynthetic bacteria*) (Verschuere *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2009; Glick, 2012) 등이 있으며 곰팡이나 방선균등도 활용되고 있다(Velivelli *et al.*, 2014). 특히 가장 많은 부분을 차지하고 있는 바실러스 균주는 작물의 병 방제, 생육촉진, 병 저항성증진 등 다기능성 활성물질을 생산하여 응용 가능성이 매우 크고 상업적으로도 성공한 농업미생물중의 하나다(Bernal *et al.*, 2002; Mondol *et al.*, 2013). 예를 들어 AgraQuest사에서 *Bacillus subtilis* 균주를 이용해 개발한 미생물제제는 전 세계 25개국에서 판매되고 있을 정도로 대표적으로 성공한 미생물제제 중 하나이다. 바실러스균은 자연계에서 흔히 발견되는 균주로서 다양한 생리활성 물질을 생산하는데 특히 농작물의 생육과 관련이 있는 식물의 생육촉진과 식물병에 저항할 수 있는 항생기작 및 식물에 방어기작을 부여하고 근권 내 미생물의 정착을 돕는다고 알려져 있다.

최근에 우리는 작물의 생육촉진, 염 내성 및 작물의 주요 병원균에 대한 길항 활성을 갖는 신규 바실러스 균주(*Bacillus velezensis* GH1-13)를 분리·동정하였다(Kim *et al.*, 2016). GH1-13 균주는 식물생장촉진 물질인 인돌 아세트산(Indole-3-acetic acid, IAA)을 생산하고 다양한 식물병원성 곰팡이에 강한 길항작용을 하는 물질인 bacillomycin, bacilysin, fengycin, iturin, surfactin 등의 생합성 유전자를 가지고 있음을 확인 하였다(Kim *et al.*, 2017). 다양한 non-ribosomal peptide 합성효소와 polyketide 합성효소 유전자를 포함하고 있어 식물의 생육촉진과 항균작용을 하는 2차 대사산물의 생산으로 작물을 대상으로 한 친환경 미생물 제제의 균주로서 그 가능성이 확인되었다. 따라서 다기능 활성을 갖는 GH1-13 균주는 친환경 농업용 미생물제제로 개발가능성이 매우 큰 것으로 예상된다.

본 연구에서는 GH1-13 균주를 이용하여 새로운 농업미생물제제로 개발하기 위해 우선 대량배양을 위해 최적의 탄소원 및 질소원을 선발 하였고, 다양한 탄소원과 질소원을 사용하여 최적배지를 선발 하였다. 또한 선발된 최적배지를 이용하여 500 L 발효기를 이용하여 대량배양을 시도 하였다. 개발된 최적배양법을 적용하여 배양된 GH1-13 균주는 다양한 식물 병원성 곰팡이에 강한 길항활성을 보였고 식물생장촉진 물질인 IAA를 생산하는 것을 Salkowski assay (Salkowski, 1885; Glickmann and Dessaux, 1995) 방법을 이용해 확인하였다. 본 연구에서 GH1-13 균주에 최적화된 배지조성 및 배양조건을 기반으로 하여 GH1-13 균주를 농업용 미생물제제로 사용한다면 현재 요구되고 있는 친환경 제제로의 응용가능성이 매우 클 것으로 예상된다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주는 농촌진흥청 농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection (KACC), www.genebank.go.kr)에서 분양 받았으며, 20% glycerol stock 형태로 -80°C 초저온 냉동고에 보존한 후 실험에 이용하였다. GH1-13 균주에 대한 실험을 수행하기 위하여 각각 R2A (yeast extract 0.5 g, proteose peptone 0.5 g, cassamino acid 0.5 g, dextrose 0.5 g, soluble starch 0.5 g, Na-pyruvate 0.3 g, K₂HPO₄ 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, agar 15 g, pH 7.0, per liter)와 TSB (tryptone 17 g, soytone 3 g, dextrose 2.5 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, agar 15 g, pH 7.3, per liter) 한천배지에 도말하여 37°C 항온배양기에서 24시간 이상 배양한 후 집락을 순수분리 하였다.

2. 최적 탄소원 및 질소원 선발

B. velezensis GH1-13 균주의 대량배양에 적합한 저비용 고효율 최적배지 개발을 목적으로 최적 탄소원과 질소원 선발을 수행하였다. GH1-13 균주의 최적 탄소원을 선발하기 위하여 질소원으로 yeast extract 0.8%가 첨가된 기본배지(NaCl 0.15%, K₂HPO₄ 0.25%, Na₂CO₃ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, pH 7.5)에 각각 1% 농도의 glucose, fructose, sucrose, lactose, glycerol, maltose, xylose, dextrin, soluble starch를 첨가하여 37°C, 150 rpm에서 48시간 진탕배양한 후 영양세포수와 내생포자 균수를 측정하였다. GH1-13 균주의 대량배양용 최적 질소원을 조사하기 위하여 탄소원으로 glucose 0.5%가 첨가된 기본배지에 각각 1% 농도의 yeast extract, peptone, tryptone, soytone, (NH₄)₂SO₄, soy bean flour를 첨가한 후 위에서 언급한 것과

동일한 방법으로 진행하였다. 액체배양액 1 mL를 생리식염수에 10배 연속희석하여 tryptic soy agar (TSA) 배지에 도달한 후 37°C에서 48시간 배양하여 영양세포 생균수를 측정하였다. 또한 GH1-13 균주의 내생포자 생균수는 액체배양액을 60°C에서 1시간 동안 열처리하여 TSA 배지에 도달한 후 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

3. 배지 최적화 및 균주 배양

9종 탄소원과 6종 질소원을 사용하여 배양한 후 GH1-13 균주의 생균수, 내생포자 형성을 및 대량배양에 소요되는 비용을 고려하여 최적배지(Modified Medium to Subtilis, MMS)를 선발하였다. 최적배지와 상용화 배지(tryptic soy broth, TSB)를 사용하여 5 L jar fermenter에서 37°C, 48시간 배양한 후 총 균체수, 내생포자 형성 균체수, 최종 pH를 비교 분석하였다. 5 L jar fermenter의 배양조건은 통기량 0.5~0.6 vvm, 교반속도 100~130 rpm, 내부압력 0.4 kg/cm²로 설정하였다.

4. 최적배지를 이용한 대량배양

500 L 발효기(KoBioTech Co., Ltd.)를 이용하여 최적배지를 대상으로 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양을 수행하였다. 500 L 배양은 100 mL TSB 배지가 포함된 500 mL 삼각플라스크에서 1차 종균 배양을 진행하였으며, 2차 종균의 경우 TSB 2 L를 포함한 5 L 삼각플라스크에서 배양한 후 500 L 발효기에서 300 L 대량배양을 위한 접종원으로 사용하였다. 대량배양 조건은 온도 37°C, 통기량 0.4 vvm, 교반속도 100 rpm, 내부압력 0.4 kg/cm²로 설정하여 30시간 이상 배양하였다.

5. 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성 검정

식물 병원성 곰팡이에 대한 *in vitro* 항진균활성을 조사하기 위해 농촌진흥청 농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection (KACC), www.genebank.go.kr)로부터 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40690 (탄저병), *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* KACC 40031 (시들음병), *Fusarium solani* KACC 44891 (뿌리썩음병), *Botrytis cinerea* KACC 40574 (갯빛곰팡이병)을 분양 받아 사용하였다. 최적배지에서 배양한 GH1-13 균체, 제균된 배양상층액의 병원균에 대한 항진균활성을 조사하였다.

Potato dextrose Agar (PDA) 배지 중앙에 식물 병원균을 직경 5 mm 정도의 크기로 치상하고 병원균 주위로 약 2~3 cm 떨어진 위치에 각각 GH1-13 균체, 최적배지에서 배양한 상층액(10 uL)을 집적한 후 5일 이상 배양하면서 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성을 조사하였다.

6. Indole-3-acetic acid (IAA) 생산성

GH1-13 균주가 생산하는 식물생장촉진 물질(Indole-3-acetic acid, IAA)의 함량을 측정하기 위해 비색법(colorimetric method)을 사용하였다. GH1-13 균주의 IAA 생산성 검정을 위해 IAA의 전구물질인 L-tryptophan을 0.3% (wt/v) 첨가한 최적배지(MMS), TSB, R2A 배지와 L-tryptophan 무첨가 배지에 GH1-13 균주를 접종하여 37°C, 150 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. 균주 밀도가 1×10^8 cfu/mL 이상 되었을 때 배양을 완료하였으며, 4°C, $10,000 \times g$ 조건에서 20분 동안 원심분리한 배양 상등액 1 mL에 salkowski 용액(H_2SO_4 150 mL, H_2O 250 mL, 1.5 M $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 7.5 mL) 2mL를 혼합하여 상온에서 20분 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 530 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 Sigma사의 IAA를 0, 5, 10, 30, 50, 100 mg/L 농도로 제조하여 얻어진 값을 이용하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 대량배양용 배지조성 최적화

본 연구에 사용한 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양용 저비용 고효율의 최적 배지 조성 및 배양 조건을 확립하였다. 최적의 탄소원을 선별하기 위하여 9종의 탄소원을 대상으로 배양효율(총균체수, 내생포자 형성 균체수, 내생포자 형성률)을 조사하였다(Table 1). 그 결과 maltose (6.8×10^8 cfu/mL, 5.6×10^8 cfu/mL, 82.4%), glucose (3.9×10^8 cfu/mL, 3.2×10^8 cfu/

Table 1. Culture profile of *Bacillus velezensis* GH1-13 using 9 carbon sources

Carbon source	Total viable cells (cfu/mL)	Endospore cells (cfu/mL)	Sporulation (%)
Glucose	3.9×10^8	3.2×10^8	81.4
Fructose	1.8×10^8	2.3×10^6	1.3
Sucrose	4.2×10^8	1.0×10^7	2.4
Lactose	2.6×10^8	1.2×10^8	46.2
Glycerol	1.8×10^8	9.5×10^5	0.5
Maltose	6.8×10^8	5.6×10^8	82.4
Xylose	3.2×10^8	2.5×10^8	77.4
Dextrin	1.8×10^8	4.3×10^6	2.4
Soluble starch	2.4×10^8	1.9×10^7	7.6

mL, 81.4%), xylose (3.2×10^8 cfu/mL, 2.5×10^8 cfu/mL, 77.4%), lactose (2.6×10^8 cfu/mL, 1.2×10^8 cfu/mL, 46.2%), soluble starch (2.4×10^8 cfu/mL, 1.9×10^7 cfu/mL, 7.6%), sucrose (4.2×10^8 cfu/mL, 1.0×10^7 cfu/mL, 2.4%), dextrin (1.8×10^8 cfu/mL, 4.3×10^6 cfu/mL, 2.4%), fructose (1.8×10^8 cfu/mL, 2.3×10^6 cfu/mL, 1.3%), glycerol (1.8×10^8 cfu/mL, 9.5×10^5 cfu/mL, 0.5%) 순으로 높은 배양효율을 나타내었다. Maltose의 경우 총균체수, 내생포자 형성 균체수, 내생포자 형성률 측면에서 최적의 배양효율을 보였으나, 대량생산에 소요되는 비용을 고려하였을 때 maltose의 경우 glucose보다 2배 이상 높은 것으로 파악되었다. 따라서 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량생산에 적합한 저비용 고효율의 최적 탄소원으로 glucose를 최종 결정하였다.

6종의 질소원을 사용하여 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량생산에 적합한 최적의 배양효율(총균체수, 내생포자 형성 균체수, 내생포자 형성률)을 나타내는 질소원을 선발하였다 (Table 2). 저비용 고효율의 대량생산에 필수적인 생산비용과 균주 생산성을 고려한 결과, soy bean flour (8.8×10^8 cfu/mL, 7.0×10^8 cfu/mL, 79.5%), yeast extract (3.7×10^8 cfu/mL, 3.0×10^8 cfu/mL, 81.1%), soytone (2.1×10^8 cfu/mL, 1.8×10^8 cfu/mL, 85.0%), peptone (4.2×10^7 cfu/mL, 2.9×10^7 cfu/mL, 69.6%), tryptone (4.3×10^7 cfu/mL, 8.0×10^6 cfu/mL, 18.6%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5.3×10^6 cfu/mL, 6.1×10^5 cfu/mL, 11.6%) 순으로 높은 배양효율을 나타내었다. 따라서 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량생산에 적합한 저비용 고효율의 최적 질소원으로 soy bean flour를 최종 결정하였다.

Table 2. Culture profile of *Bacillus velezensis* GH1-13 using 6 nitrogen sources

Nitrogen source	Total viable cells (cfu/mL)	Endospore cells (cfu/mL)	Sporulation (%)
Soy bean flour	8.8×10^8	7.0×10^8	79.5
Yeast extract	3.7×10^8	3.0×10^6	81.1
Soytone	2.1×10^8	1.8×10^8	85.0
Peptone	4.2×10^7	2.9×10^7	69.6
Tryptone	4.3×10^7	8.0×10^6	18.6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.3×10^6	6.1×10^5	11.6

B. velezensis GH1-13 균주의 대량생산에 적합한 배지 조성의 최적 탄소원과 질소원 농도를 결정하기 위해 각각 0.5, 0.8, 1.0% 농도의 glucose와 soy bean flour를 사용하여 배양한 후 총 균체수, 내생포자 균체수 및 내생포자 형성률을 조사하였다(data not shown). 그 결과 0.5% glucose, 0.8% soy bean flour 농도에서 최적의 생산성을 보였으며, 최종적으로 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량생산용 최적배지로 glucose 0.5%, soy bean flour 0.8%, NaCl 0.15%, K_2HPO_4 0.25%, Na_2CO_3 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%를 결정하였다.

2. 최적배지를 이용한 대량배양 조건 확립

저비용 고효율의 대량배양용 최적배지를 대상으로 5 L jar-fermenter를 이용하여 대량배양 scale-up을 위한 기초연구를 진행하였다. 대조군으로 TSB 배지를 사용하였으며, 배양조건은 37°C, 100 rpm에서 배양액의 1%를 접종하여 48시간 배양하였다. 최적배지의 경우 배양 36시간 후 최대 균체수 1.2×10^9 cfu/mL, 배양 48시간 후 내생포자 균체수 8.6×10^8 cfu/mL, 내생포자 형성률 71.7%의 결과를 보였으며, 배양공정을 scale-up 할 경우 전체적으로 배양효율은 증가될 것으로 판단된다. 반면에, TSB 배지의 경우 배양 42시간 후 최대 균체수 4.5×10^8 cfu/mL, 배양 48시간 후 내생포자 균체수 1.2×10^7 cfu/mL로 내생포자 형성률은 2.7%에 불과했다(Fig. 1). 배양 39시간 이후 최적배지와 TSB 배지 모두 총 균체수에는 큰 차이가 없으나, 내생포자를 형성한 균체수를 조사한 결과 최적배지의 경우 안정된 상태의 내생포자로 대부분 전환된 반면 TSB 배지에서는 내생포자 형성이 매우 저조한 것으로 조사되었다.

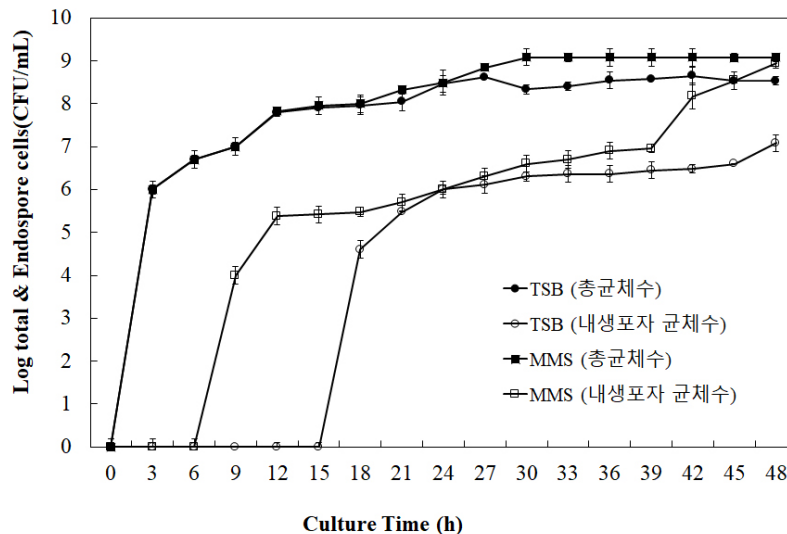


Fig. 1. Culture profile of *Bacillus velezensis* GH1-13 between MMS and TSB medium by 5 L jar fermenter.

500 L 발효기를 이용하여 최적배지를 대상으로 *B. velezensis* GH1-13 균주의 대량배양 scale-up을 수행하였으며, 배양조건은 위의 5 L jar-fermenter와 동일하게 하였다. 500 L 대용량 발효기의 경우 배양 21시간 후 총균체수 7.5×10^9 cfu/mL, 배양 30시간 후 내생포자 균체수 6.8×10^9 cfu/mL, 내생포자 형성률 90%의 배양효율을 보였다. 또한 배양 시 pH 변화는 초기 pH 7.12에서 최종 pH 7.46으로 측정되었으며, 용존산소량의 경우 균주가 급격히 성장하는 배양 9~15시간 후 43%까지 감소된 후, 균체 성장이 완료되는 21시간 후에 100% 회복되

는 것으로 조사되었다(Fig. 2). 용존산소 측정은 발효기에 DO sensor를 부착하여 최초 기본 값을 100%로 설정한 후 배양 시간별로 용존산소의 변화량을 조사하였다.

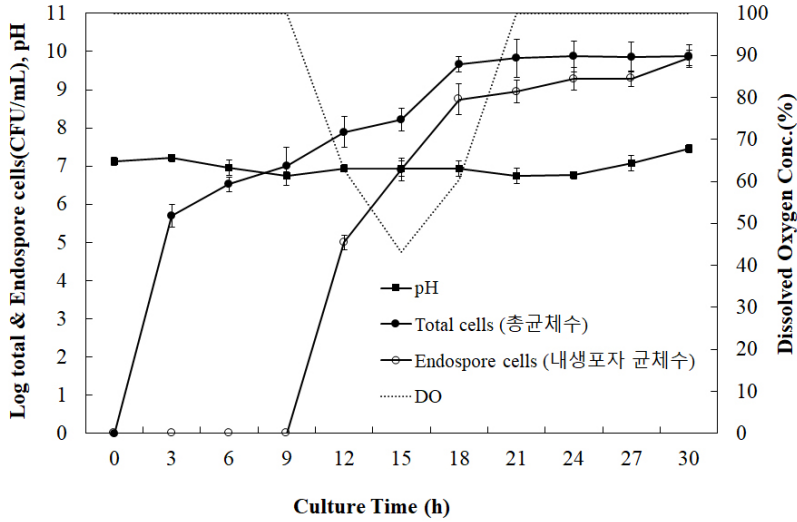


Fig. 2. Culture profile of *Bacillus velezensis* GH1-13 in MMS medium by 500 L fermenter. DO means dissolved oxygen.

3. 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성 검정

최적배지에서 배양한 *B. velezensis* GH1-13 균체와 배양 상층액을 이용하여 4종의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성을 검정하였으며, 대조군으로 증류수를 사용하였다. GH1-13 균체와 배양 상층액의 경우 *Colletotrichum gloeosporioides* (고추 탄저병), *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* (시들음병), *Fusarium solani* (뿌리썩음병), *Botrytis cinerea* (갯빛곰팡

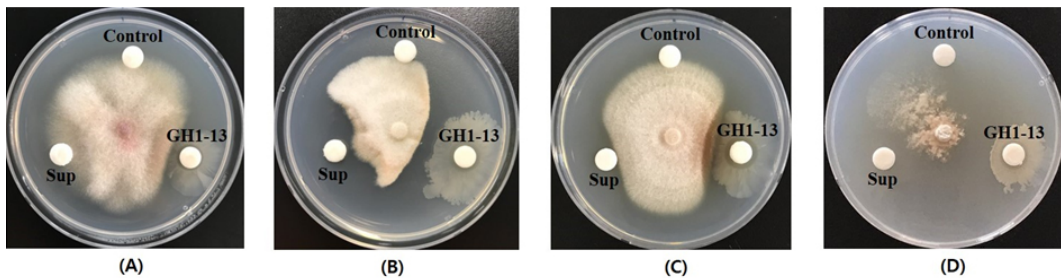


Fig. 3. Antifungal activity of *Bacillus velezensis* GH1-13 against phytopathogenic fungi. (A) *Colletotrichum gloeosporioides*, (B) *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*, (C) *Fusarium solani*, (D) *Botrytis cinerea*. Control: water, GH1-13: cells, Sup: supernatant.

이병)에 대해 강력한 항진균활성을 보였다(Fig. 3). 위의 결과로부터 GH1-13 균체와 대사산물이 포함된 배양 상층액의 경우 다양한 작물의 병해 방제를 위한 생물학적 제제로서 잠재적 가치가 클 것으로 판단된다. 향후 GH1-13 균주를 이용한 미생물제제 시제품의 현장 적용성 평가를 통해 친환경 생물학적 제제로서의 사용 가능성을 진행하여 할 것으로 여겨진다.

4. IAA 최대 생산을 위한 배양기술 확립

GH1-13 균주의 최대 IAA 생산을 위해 배지 종류, L-tryptophan 첨가 및 온도에 따른 IAA 생산조건을 조사하였다. 배양액에 포함되어 있는 IAA 정량을 위해 합성 IAA 표준품을 이용한 표준곡선을 얻었고 R^2 값이 0.999 이상의 매우 좋은 상관성을 보여 주었다(Fig. 4).

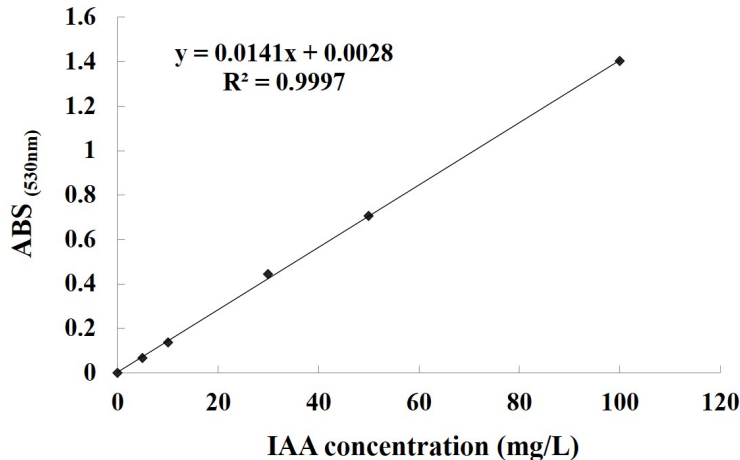


Fig. 4. Standard curve of synthetic IAA (indole-3-acetic acid) using Salkowski assay.

배양조건에 따른 IAA의 생산량을 확인한 결과, 전체적으로 L-tryptophan 첨가에 의해 IAA의 생산성이 매우 향상되는 것을 확인하였다(Table 3). 배양온도 37°C에서 상용배지인 TSB와 R2A배지에서 L-tryptophane 첨가한 결과 각각 16.94, 20.77 mg/L의 IAA 생산량을 보였다. 또한 본 연구에서 확립한 최적배지(MMS)를 이용하여 배양한 결과 IAA의 생산량이 28.50 mg/L로 상용배지보다 높게 조사되었다. GH1-13 균주의 배양온도에 따른 IAA 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 30°C에서 배양한 결과 IAA 생산량은 26.79 mg/L로 37°C에 비해 매우 소량 낮아지는 것을 관찰하였다. *B. velezensis* GH1-13 균주의 경우 최적배지와 상용배지 모두에서 전반적으로 IAA를 생산하였으며, 전구물질을 첨가한 경우 IAA 생산 수율이 크게 증가되는 것으로 조사되었다. 특히 최적배지의 경우 상용배지에 비해 높은 수준의 IAA 생산성을 보였으며, 대량배양 시 소요되는 배지 비용을 고려한 결과 부대비용을 크

게 줄일 수 있을 것으로 판단되었다.

Table. 3. Comparison of IAA production by GH1-13 strain under various culture conditions

Media	Final pH	Tryptophan concentration (g/L)	IAA concentration (mg/L)	Culture temperature (°C)
MMS ^a	7.18	0	9.99±0.50	30°C
MMS	7.18	3	26.79±1.61	30°C
MMS	6.69	0	7.08±0.35	37°C
MMS	6.92	3	28.50±1.28	37°C
TSB ^b	8.43	0	2.82±0.13	37°C
TSB	8.41	3	16.94±1.02	37°C
R2A ^c	6.68	0	0.55±0.02	37°C
R2A	6.43	3	20.77±1.04	37°C

^a Modified Medium to Subtilis, ^b Tryptic soy broth, ^c Reasoner's 2A

결론적으로 0.3% L-tryptophan을 첨가한 최적배지(MMS)를 이용해 37°C에서의 배양을 통해 최대의 IAA 생산효율을 달성할 수 있었다. IAA는 천연에서 널리 분포하는 옥신 화합물로 식물의 성장을 촉진하는 식물 호르몬의 한 종류이다(Lambrecht *et al.*, 2000). GH1-13 균주와 같이 미생물에 의해 생산되는 IAA는 미생물과 식물과의 신호전달 물질로 작용하며 (Spaepen *et al.*, 2007) 작물의 뿌리를 자극하여 세포분열과 발근을 촉진하고 줄기와 뿌리의 성장을 유도하여 기주 식물에 의한 토양 양분의 흡수를 증가시키게 된다. *B. velezensis* GH1-13 균주를 이용한 미생물제제의 실용화 연구는 화학비료와 농약을 대체할 수 있는 친환경 생물학적 제제의 개발을 위한 중요한 기초연구 자료를 제공하고 있으며 향후 시제품 제작 및 현장 적용성 평가를 통해 최종 현장적용 가능한 미생물제제로 개발할 계획이다.

IV. 적 요

작물생육촉진과 병 방제 기능을 지닌 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 대량배양을 위한 최적배지(glucose 0.5%, soy bean flour 0.8%, NaCl 0.15%, K₂HPO₄ 0.25%, Na₂CO₃ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.1%) 조성을 확립하였다. 최적배지(MMS)를 이용하여 500 L 대용량 발효기에 배양한 결과 총 균체수 7.5×10⁹ cells/mL, 6.8×10⁹ endospore cells/mL 및 90% 내생포자 형성률 등 안정된 대량생산을 확인하였다. 최적배지에서 배양한 GH1-13 균체와 배양 상층액의 경우 *Colletotrichum gloeosporioides*를 포함한 4종의 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균활

성을 보였다. 또한 식물생육촉진 호르몬의 일종인 IAA 생산량을 비교한 결과, 최적배지에서 배양한 경우 상업용 배지(TSB, R2A)에 비해 2.5~13배 이상 높은 생산성을 보였다. 더불어, 최적배지에 0.3% tryptophan을 첨가하여 배양했을 경우 28.50 mg/L의 IAA 최대 생산량을 보였으며, 이는 tryptophan을 첨가하지 않고 배양한 경우보다 약 4배 높은 수준이었다. 이러한 결과로 볼 때 본 연구에 사용된 *B. velezensis* GH1-13 균주는 작물생육촉진 및 곰팡이 병 방제 측면의 복합기능 생물학적 제제로서 매우 유용할 것으로 판단된다.

[Submitted, November. 16, 2018 ; Revised, December. 5, 2018 ; Accepted, December. 17, 2018]

References

1. Avis, T. J., V. Gravel, H. Antoun, and R. J. Tweddell. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1733-1740.
2. Bernal, G., A. Illanes, and L. Ciampi. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electron. J. Biotechnol.* 5: 12-20.
3. Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica.* 2012: 1-15.
4. Glickmann E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793-796
5. Kang, B. R., A. J. Anderson, and Y. C. Kim. 2018. Hydrogen cyanide produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6 exhibits nematicidal activity against *Meloidogyne hapla*. *Plant Pathol. J.* 34(1): 35-43.
6. Kim, S. Y., M. K. Sang, H-Y. Weon, Y-A. Jeon, J. H. Ryoo, and J. Song. 2016. Characterization of multifunctional *Bacillus* sp. GH1-13. *Korean J. Pestic. Sci.* 20: 189-196.
7. Kim, S. Y., H. Song, M. K. Sang, H-Y. Weon, and J. Song. 2017. *J. Biotechnology.* 259: 221-227.
8. Kim, Y. H., S. K. Park, J. Y. Hur, and Y. C. Kim. 2017. Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA73. *Plant Pathol. J.* 33(3): 318-328

9. Lambrecht, M., Y. Okon, A. V. Broek, and J. Vanerleyden. 2000. Indole-3-acetic acid : a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8: 298-300.
10. Mondol, M. A. M., H. J. Shin, and M. T. Islam. 2013. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: Chemistry and biological activity. *Mar. Drugs.* 11: 2846-2872.
11. Nam, H-S., H-J. Yang, B. J. Oh, A. J. Anderson, and Y. C. Kim. 2016. Biological control potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 isolated from the feces of *Allomyrina dichotoma* larvae. *Plant Pathol. J.* 32(3): 273-280.
12. Salkowski, E., Uber das verhalten der skatolcarbonsaure im organisms. 1885. 9: 23-33.
13. Sharma, R. R., D. Signh, and R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control.* 50: 205-221.
14. Santoyo, G., M. D. C. Orozco-Mosqueda, and M. Govindappa. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22: 855-872.
15. Spaepen, S., J. Vanderleyden, and R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 425-448.
16. Velivelli, S. L. S., P. De Vos, P. Kromann, S. Declerck, and B. D. Prestwich. 2014. Biological control agents: From field to market, problems, and challenges. *Trends Biotechnol.* 32: 493-496.
17. Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64: 655-671.