

*Azospirillum*속 질소고정균의 액체배양을 위한 재료의 탐색

주 수 한

액체배양은 질소고정균비료생산에서 매우 중요한 공정의 하나로서 미생물비료의 질적특성에 큰 영향을 미친다. 지금까지 *Azospirillum*속 세균의 액체배양에는 유기 및 무기시약을 리용하는 합성배지가 널리 리용되어왔다.[2, 3, 6] 특히 *Azospirillum*속 세균의 탄소원으로 사과산을 비롯한 유기산들이 쓰이기때문에 다량배양에서 시약의 제한을 받게 된다. 또한 여러가지 첨가제들을 리용하여 미생물의 배양효과를 높이기 위한 연구들은 진행[1]되었으나 값죽은 원료에 의거한 배양방법을 제기한것은 없다.

우리는 여러가지 천연기질과 버림물의 조성상특성에 기초하여 *Azospirillum*속 질소고정균의 액체배양재료를 탐색하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

액체배양재료로는 감자, 두부순물, 각종 쌀씻음액들을 리용하였으며 균주로는 *Azospirillum brasilense* 371과 *A. lipoferum* 695를 리용하였다.

액체배양물속의 *Azospirillum*의 수와 기타 다른 세균 및 효모의 수는 피알계산판을 리용하여 현미경하에서 세포수를 세는 방법으로 측정하였으며 방선균과 균실의 증체량은 균실의 질량을 측정하여 평가하였다.

결과 및 논의

1) 감자우림액에 의한 배양

균의 증식을 위한 액체배지로는 *Azospirillum*의 생산용배지[2]와 20% 감자우림물배지, 통강냉이와 물을 1 : 3(질량)비로 섞어 삶아낸 물로 만든 배지를 리용하였다.

각이한 배지에서 *Azospirillum lipoferum*과 *A. brasilense*의 증식속도는 그림 1과 2와 같다.

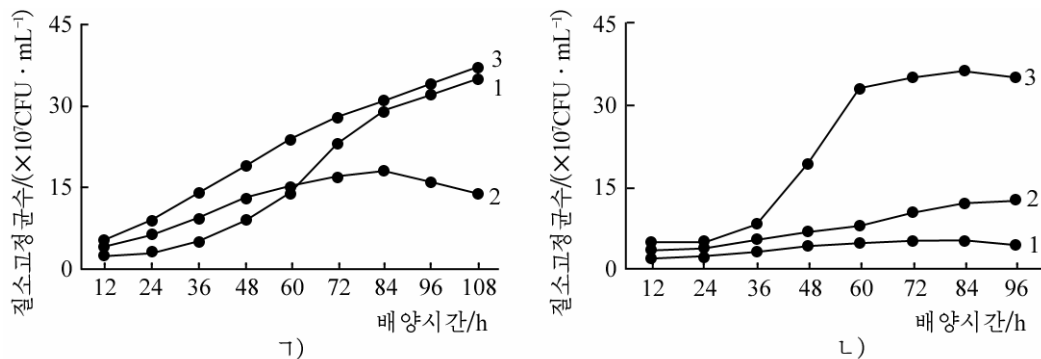


그림 1. 각이한 배지에서 *Azospirillum*의 정지배양속도

1) *A. lipoferum*, 2) *A. brasilense*; 1—합성배지, 2—강냉이배지,
3—감자배지; 배양온도 30℃

그림 1과 2에서 보는바와 같이 진탕배양 때 *A. lipoferum*의 증식속도는 정치배양때보다 약 20배정도 더 높았으며 증식효과가 높은 배지는 정치배양은 물론이고 진탕배양때에도 감자배지였다.

*A. lipoferum*과 마찬가지로 *A. brasilense*의 배양에서도 감자배지가 효과적이였다.

감자배지의 이러한 우월성을 리용하면서 *A. lipoferum*이 비오틴을 비롯한 성장요소들에 대한 요구성이 높다는 선행연구자료[3, 4]에 기초하여 감자배지에 압착효모를 첨가하는 방법으로 정치배양하여 *A. lipoferum*의 증식효과를 높이도록 하였다.(표 1)

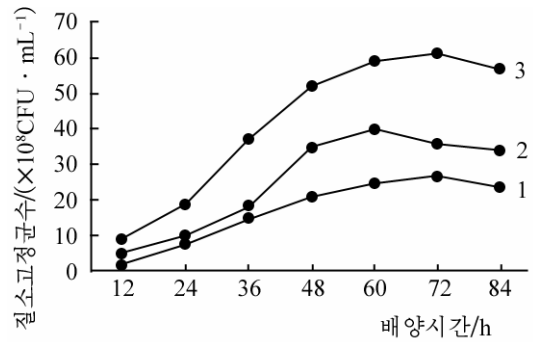


그림 2. 각이한 배지에서 *A. lipoferum*의 진탕배양속도
1-합성배지, 2-강냉이배지, 3-감자배지;
배양온도 30℃

표 1. 감자배양액에 효모첨가때 *A. lipoferum*의 정치배양속도

| 효모첨가 량/% | 배양시간에 따르는 <i>A. lipoferum</i> 의 수 /($\cdot 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) | | | | | | | |
|-------------|---|------|------|------|------|------|------|----------|
| | 12h | 24h | 36h | 48h | 60h | 72h | 84h | 96h |
| 0.10 | 5.8 | 12.8 | 20.8 | 34.4 | 35.6 | 52.8 | 37.8 | 37.236.4 |
| 0.25 | 2.9 | 18.0 | 31.6 | 32.8 | 40.4 | 34.4 | 13.6 | 13.3 |
| 0.50 | 3.7 | 13.2 | 19.6 | 34.4 | 44.8 | 43.2 | 37.2 | 37.2 |

배양온도 30℃, 배양액량 250mL들이 삼각플라스크에 100mL

표 1에서 보는바와 같이 효모첨가량이 0.1%일 때 72h만에 감자배양액으로 진탕배양할 때와 거의 같은 수준으로 *A. lipoferum*이 증식하였으며 효모첨가량을 그이상 높이면 증식효과가 떨어졌다. 그러나 *A. brasilense*의 경우에는 *A. lipoferum*과 달리 효모첨가효과가 거의 나타나지 않았다.(표 2)

표 2. 감자배지와 효모첨가배지에서 *A. brasilense*의 증식속도비교

| 배양시간 /h | <i>A. brasilense</i> 수 /($\cdot 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) | | | |
|------------|--|---------|------|---------|
| | 정치배양 | | 진탕배양 | |
| | 감자배지 | 감자배지+효모 | 감자배지 | 감자배지+효모 |
| 8 | 0.28 | 0.28 | 0.6 | 0.42 |
| 16 | 0.44 | 0.52 | 2.04 | 2.42 |
| 24 | 0.54 | 0.54 | 2.20 | 3.24 |
| 32 | 0.84 | 0.99 | 2.64 | 4.12 |
| 40 | 1.20 | 1.26 | 3.52 | 4.76 |
| 48 | 2.12 | 1.40 | — | — |
| 56 | 3.68 | 1.68 | 5.04 | 7.32 |
| 64 | 3.76 | 2.32 | 6.36 | 8.36 |
| 72 | 3.82 | 1.55 | 7.60 | 7.68 |

— 측정못함, 배양온도 30℃

표 2에서 보는바와 같이 *A. brasilense*는 정치배양때에는 물론 진탕배양때에도 효모첨가에 의한 균수의 증가효과가 나타나지 않았는데 이것은 *A. lipoferum*과 대조되는 *A. brasilense*의 특성과 관련된다고 본다. 즉 *A. brasilense*는 비오틴을 비롯한 성장촉진물질을 요구하지 않기때문에 효모첨가에 반응하지 않은것이다. 따라서 *A. brasilense*는 *A. lipoferum*

의 배양과는 다른 방법으로 정치배양효과를 높여야 한다는것을 알수 있다.

선행연구[5]에서 제기한 *Azospirillum*의 산소에 대한 낮은 요구성으로부터 출발하여 감자배지에 우무를 넣고 반고체화하여 시험하였다.(표 3)

표 3. 정치배양때 반고체감자배지에서 *Azospirillum*의 증식속도

| 배양시간 /h | <i>A. brasilense</i> /($\cdot 10^9$ CFU \cdot mL $^{-1}$) | <i>A. lipoferum</i> /($\cdot 10^9$ CFU \cdot mL $^{-1}$) |
|------------|--|---|
| 12 | 0.48 | 0.60 |
| 24 | 2.56 | 3.00 |
| 36 | 3.76 | 3.64 |
| 48 | 5.60 | 3.76 |
| 60 | 5.65 | 3.96 |

배양온도 30℃, 우무첨가량 0.2%

표 3에서 보는바와 같이 감자배지에서 *A. brasilense*의 정치배양은 반고체화하는것이 효과적이며 *A. lipoferum*의 경우에도 반고체배지를 리용하는것이 좋았다.

이상의 결과를 통하여 감자배지를 *Azospirillum*용 액체배양재료로 쓸수 있으며 액체진탕배양에 소모되는 에너르기문제는 몇가지 첨가제를 리용하여 해결할수 있다고 본다.

2) 버림물을 리용한 배양

먼저 쌀씻음액에서 *Azospirillum*의 배양효과를 보았다.(표 4)

표 4에서 보는바와 같이 쌀씻음액도 *Azospirillum*의 좋은 배양재료로 될수 있다. 그런데 흰쌀씻음액보다 밀쌀씻음액의 배양효과가 더 높았는데 이로부터 씻음액의 종류에 따라 차이가 크다는것을 알수 있다.

또한 쌀씻음액의 방치도 배양균 증식에 좋은 영향을 주었다.(표 5)

표 4. 쌀씻음액(1:1)에서 *A. brasilense*의 정치배양속도

| 구분 | <i>A. brasilense</i> 수/($\cdot 10^8$ CFU \cdot mL $^{-1}$) | | | |
|-------|--|------|------|------|
| | 24h | 48h | 72h | 96h |
| 흰쌀씻음액 | 1.4 | 10.0 | 10.4 | 13.6 |
| 밀쌀씻음액 | 5.0 | 27.3 | 26.0 | 19.2 |

배양온도 30℃

표 5. 옥쌀씻음액(1:1)의 배양효과

| 구분 | <i>A. brasilense</i> /($\cdot 10^9$ CFU \cdot mL $^{-1}$) | <i>A. lipoferum</i> /($\cdot 10^9$ CFU \cdot mL $^{-1}$) |
|--------------|--|---|
| 방치하지 않고 배양 | 2.7 | 2.1 |
| 1d동안 방치하고 배양 | 4.6 | 2.7 |

정치배양, 배양시간 72h, 배양온도 30℃

표 5에서 보는바와 같이 *Azospirillum*의 배양에 옥쌀씻음액도 밀쌀씻음액에 못지 않았으며 방치후 배양효과는 더 좋았다. 그것은 옥쌀씻음액의 방치과정에 유기산이 생성되는것으로 해석할수 있다.

다음으로 식료공장에서 나오는

폐수의 일종인 두부생산버림물(두부순물)을 *Azospirillum*의 액체배지로 리용하기 위한 시험을 하였다.(표 6)

두부순물은 표 6에서 보는바와 같이 감자우림물보다 *A. brasilense*의 증식에 더 좋은 영향을 주었다.

두부순물에서 미생물의 증식속도가 빠른 원인은 거기에 당을 비롯한 여러가지 영양물질이 많기때문이다. 자료에 의하면 기름뽕 콩으로 만드는 두부순물에는 조단백질 0.28g/100mL, 총당질 0.29g/100mL, 비타민 B₁ 48.8g/100mL 들어있어 영양가치가 있다.

표 6. *A. brasilense*의 증식에 미치는 감자우림물과 두부순물의 영향비교

| 배지종류 | <i>A. brasilense</i> 수/($\cdot 10^9$ CFU \cdot mL $^{-1}$) | | | | |
|-------|--|------|------|------|------|
| | 24h | 48h | 72h | 94h | 108h |
| 감자우림물 | 4.4 | 10.4 | 14.0 | 49.2 | 44.6 |
| 두부순물 | 5.8 | 13.6 | 22.4 | 90.0 | 79.8 |

배양조건 30℃에서 정치배양

맺 는 말

- 1) 감자우림물을 *Azospirillum*속 질소고정균의 액체배양에 효과적으로 리용할수 있으며 거기에 압착효모와 우무를 첨가하는 방법으로 그 효과를 더 높일수 있다.
- 2) 두부순물과 쌀씻음액을 리용하여 *Azospirillum*속 질소고정균을 배양하는것은 버림물을 리용하는 측면에서도 좋고 그 효과도 매우 높다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 55, 7, 162, 주체98(2009).
- [2] J. Dobereiner et al.; Can. J. Microbial., 22, 1464, 1976.
- [3] M. Lakshmi et al.; Curr. Sci., 49, 438, 1980.
- [4] Y. Oken et al.; J. Bacterial., 127, 1248, 1976.
- [5] Y. Oken et al.; Appl. Environ. Microbial., 33, 85, 1977.
- [6] S. B. Patricia et al.; Current Biology, 24, 652, 2014.

주체106(2017)년 10월 5일 원고접수

Search of Material for Liquid Culture of Nitrogen Fixing Bacteria in *Azospirillum*

Ju Su Han

Potato extract can be used effectually for liquid culture of *Azospirillum* and it is more effective with pressed yeast and agar being added.

It is effective to culture *Azospirillum* by using bean curd extract and rice bran liquid.

Key words: nitrogen fixing bacteria, liquid culture