

어젠다코드	1 - 2 - 7		구분	부분완결	
기술분야코드	V2	기술유형코드	GS02	작목구분코드	CS-04-CS49
과제종류	기관고유		세세부사업	-	
연구과제 및 세부과제			수행기간	소속	과제책임자
유용미생물 개발 및 농업적 이용 연구			'14~'16	환경농업연구과	최승출
1) 농가 보급용 미생물 생산비 절감 연구			'14~'15	환경농업연구과	최승출
2) 토양 유용미생물 자원 분리, 동정, 수집 및 특성검정			'14~'16	환경농업연구과	최승출
색인용어	유용미생물, 고초균, 효모, 유산균, 저가 실용배지				

## ABSTRACT

The Objective of this study was the development of low-cost practical medium and increase the productivity of 'beneficial microorganism supply business' in Agricultural Technology Centers in Gangwon-do. At first, we examined the media that used for cultivation of beneficial microorganisms such as *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactabacillus plantarum* in Agricultural Technology Centers. All of them used expensive media purchased in the market. The price for 1 ton of *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* production was about 950,000won, *Lactabacillus plantarum* was about 1,300,000won. The optimal temperature for cultivation of *Bacillus subtilis* was 30°C, *accharomyces cerevisiae* 30~35°C and *Lactabacillus plantarum* 35°C. and The optimal pH was *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* 6~7 and *Lactabacillus plantarum* 6, respectively. The composition of low-cost practical medium for *Bacillus subtilis* which optimized carbone source, nitrogen source and minerals was soybeam powder 6g, Sucrose 10g., (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.3g, Magnesium Sulfate 0.4g, CaCl<sub>2</sub> 0.6g per liter for cultivation of *Bacillus subtilis*. *Saccharomyces cerevisiae* was soybeam powder 7g, Sucrose 10g., (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.3g, Magnesium Sulfate 0.7g per liter and *Lactabacillus plantarum* was soybeam powder 6g, Sucrose 9g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, Sodium citrate 2g, Magnesium Sulfate 0.2g, Manganeses Sulfate 0.5g per liter, repectively. The cultivating rate and ability of the developed low-cost medium was almost the same as the media of the Agricultural Technology Centers purchased in the market and typical medium, TSB, YPD, MRS, repectively. The developed media could culture *Bacillus subtilis* over 10<sup>8</sup> cfu/ml, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactabacillus plantarum* could culture over 10<sup>9</sup> cfu/ml. The costs of low-cost practical medium developed from this study was about 190,000won for *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and 200,000won for *Lactabacillus plantarum*.

The costs of developed media were only 15~20% compared to the perched media of Agricultural Technology Centers in Gangwon-do.

## 1. 연구목표

환경자원을 보전하고 안전한 농산물을 생산하기 위하여 친환경농업에 대한 관심이 증가하면서 미생물을 이용한 식물병해 방제뿐만 아니라 작물에 양분을 공급하는 미생물제제, 미생물 비료에 관심도 높아지고 있고 사용이 크게 증가하고 있다. 미생물제제가 효과를 나타내려면 처리되는 미생물의 균수가 매우 중요하며 따라서, 농림부는 비료관리법에 미생물비료 공정규격을 신설하여 2009년부터 각가의 토양미생물제제의 보증 미생물수(cfu/ml)의 엄격히 관리하고 있다.(2009, 농림부) 또한 2015년에 전국적으로 130개 시·군 농업기술센터 158개소에서 미생물제제가 생산·보급되었고, 우리도는 14개 시·군 21개소에서 약 2000톤의 미생물제제가 생산·보급되어 작물 생육 촉진, 축산 악취 제거, 사료 첨가용으로 사용되고 있다. 그러나 현재 시·군 농업기술센터에서 미생물제제 생산을 위하여 사용하고 있는 배지는 대부분 고가의 시판 배지를 구입하여 사용하고 있어 미생물배양사업에 많은 예산이 소요되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 현재 시·군 농업기술센터에서 사용되는 고가의 시판배지를 대체할 저가 실용배지를 개발하여 미생물배양사업의 효율성 증진 및 생산성을 증대하고자 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### <제1세부과제 : 농가 보급용 미생물 생산비 절감 연구>

#### (시험 1) 시·군 미생물제제 생산용 배지 실태조사

본 연구는 2014년 미생물배양사업을 하고 있는 12개 시·군 농업기술센터를 대상으로 미생물제제 즉 고초균, 효모, 유산균 등의 생산에 소요되는 배지의 구입비용, 배지소요량 등을 조사하여 단위생산량(1L)당 소요되는 배지비용을 조사하였다.

#### (시험 2) 미생물제제 생산용 저가 실용배지 개발

본 시험에 사용한 고초균(*Bacillus subtilis*)과 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 홍천군 농업기술센터에서 유산균(*Lactobacillus plantarum*)은 철원군 농업기술센터에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 유용미생물들의 적정 배양 조건을 확인하기 위하여 각각의 미생물의 최적 배지 즉 고초균은 TSB배지, 효모는 YPD배지, 유산균은 MRS배지에서 온도범위를 5℃ 간격으로 20~40℃사이에서 120rpm 12시간 배양 후 희석평판법(2012)에 의하여 생균수(cfu/ml)를 측정하였고, pH는 pH4~pH9사이에서 pH1간격으로 조사하였다. 또한 저가 실용배지 개발을 위하여 탄소원, 질소원 및 무기염류의 조성을 달리하여 최적 영양원을 탐색하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### <제1세부과제 : 농가 보급용 미생물 생산비 절감 연구>

##### (시험 1) 시·군 미생물제제 생산용 배지 실태조사

시·군 농업기술센터에서 미생물제제 생산을 위하여 사용되는 배지를 조사한 결과, 우리도 모든 농업기술센터에서는 시판배지를 조달 구입하여 사용하고 있었으며 고초균과 효모용 배지는 kg 당 47,520원~47,820원, 유산균용 배지는 51,560원~52,250원 이었고, 미생물제제 생산에 소요되는 배지 비용은 고초균, 효모는 톤당 950,400원~956,400원, 유산균은 1,289,00~1,306,250원 이었다.(표 1)

표 1. 시·군 농업기술센터 농가보급용 미생물제제 생산용 배지 비용(2014)

미생물 종류	배지구입단가(원/kg)	배지소요량(kg/1ton)	배지 비용(원/1L)	
고초균	H 군	47,820	20	956
	W 시	47,520	20	950
효모균	H 군	47,820	20	956
	W 시	47,520	20	950
유산균	H 군	51,560	25	1,289
	W 시	52,250	25	1,306

##### (시험 2) 미생물제제 생산용 저가 실용배지 개발

###### 가. 고초균, 효모, 유산균의 최적 배양 조건

###### (1) 배양 온도의 영향

일반적으로 미생물은 각각의 생육에 적당한 온도를 가지고 있으며 온도에 따라 고온균, 중온균, 저온균으로 구분된다. 기온이 매우 낮은 극지방이나 매우 높은 온천수에도 미생물은 존재하는데 이는 그 곳에서 생존하는 미생물의 세포막의 지방성분의 차이로 보고되고 있다. 즉 불포화지방산의 농도가 높으면 고온 적응성이 높고, 포화지방산의 농도가 높으면 저온 적응성이 높다.(2006) 고초균, 효모, 유산균의 배양 최적 온도를 알아보기 위하여 각각의 최적배지인 TSB, YPD, MRS배지로 120rpm, 12시간 배양하여 희석평판법에 의한 생균수를 측정 한 결과, 고초균은 30℃에서 10<sup>8</sup>cfu/ml이상 배양됨을 알 수 있었고, 효모는 생육온도 범위가 넓었으나 30℃~35℃, 유산균은 35℃가 최적 배양 온도였다.

표 2. 온도 변화에 따른 유용미생물의 배양 특성

미생물	균수(cfu/ml)				
	20℃	25℃	30℃	35℃	40℃
고초균	4.1 x 10 <sup>5</sup>	5.3 x 10 <sup>7</sup>	1.8 x 10 <sup>8</sup>	1.3 x 10 <sup>7</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>
효 모	6.0 x 10 <sup>7</sup>	2.8 x 10 <sup>8</sup>	8.8 x 10 <sup>8</sup>	9.1 x 10 <sup>8</sup>	3.0 x 10 <sup>7</sup>
유산균	4.1 x 10 <sup>5</sup>	5.1 x 10 <sup>6</sup>	1.8 x 10 <sup>7</sup>	2.3 x 10 <sup>8</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>

(2) 배지 pH의 영향

고초균, 효모, 유산균의 배양에 미치는 배지 pH의 영향은 표 3과 같다. 고초균과 효모는 pH4와 pH9에서 생육이 극히 불량하였고, pH6~pH7에서 최적이었으며, 유산균은 pH6에서  $2.2 \times 10^8$  cfu/ml 배양된 균수가 최대였다.

표 3. pH 변화에 따른 유용미생물의 배양 특성

미생물	균수(cfu/ml), (O.D at 600nm)					
	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
고초균	$2.8 \times 10^2$	$4.2 \times 10^3$	$1.4 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$2.6 \times 10^4$	$3.1 \times 10^2$
효모	$1.2 \times 10^2$	$2.4 \times 10^3$	$2.3 \times 10^9$	$1.8 \times 10^9$	$9.4 \times 10^4$	$8.6 \times 10^3$
유산균	$3.8 \times 10^4$	$4.2 \times 10^5$	$2.2 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$	$6.8 \times 10^4$	$4.6 \times 10^2$

나. 유용미생물 종류별 저가 실용배지의 균주 배양 정도

(1) 균주별 저가 실용배지

미생물은 생존하고 증식하기 위하여 끊임없이 대사작용을 하며 따라서 미생물 배양을 위해서는 적절한 탄소원, 질소원, 무기염류와 함께 반드시 물이 필요하다. 본 실험에서 유용미생물 배양에 필요한 영양원을 검토한 결과 각각의 유용미생물에 대한 선발배지의 조성은 표 4와 같다. 저가 실용배지를 구성하기 위하여 질소원으로 고가의 yeast extract, soytone 등은 대두단백으로 대체하였고, 탄소원은 구하기 쉽고 값싼 설탕으로 또한 무기염류는 최적화하였다.

표 4 유용미생물 종류별 저가 실용배지 조성

미생물	배지 조성	비고
고초균	대두단백 6g, Sucrose 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.3g, Magnesium Sulfate 0.4g, $\text{CaCl}_2$ 0.6g/ L	
효모균	대두단백 7g, Sucrose 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.3g, Magnesium Sulfate 0.7g/ L	
유산균	대두단백 6g, Sucrose 9g, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1g, Sodium citrate 2g, Magnesium Sulfate 0.2g, Manganeses Sulfate 0.5g/ L	

(2) 균주별 저가 실용배지와 최적배지의 성장곡선

미생물의 성장은 온도, 산도, 용존산소 등 물리적 조건과 탄소원, 질소원, 무기염류 등 대사에 필요한 영양물질에 의해 좌우된다. 미생물의 성장곡선은 미생물이 특정배지 및 환경에 적응하는 유도기, 기하급수적으로 증가하는 대수증식기, 증식과 사멸이 균형을 이루는 정체기 그리고 사멸기 등으로 구별된다. 개발된 유용미생물 균주별 저가 실용배지와 최적배지에서의 고초균, 효모, 유산균의 성장곡선을 분광광도계 600nm에서 O.D값을 측정하여 그림 1에 나타내었다. 고초균, 효모, 유산균 모두 저가 실용배지와 최적배지와의 균체증식 속도가 유사하였고, 최대 증식량도 같은 수준이었다. 고초균, 효모는 배양 32시간에 최대값에 이르렀고, 유산균은 24시간 배양에서 정체기에 도달하였다.

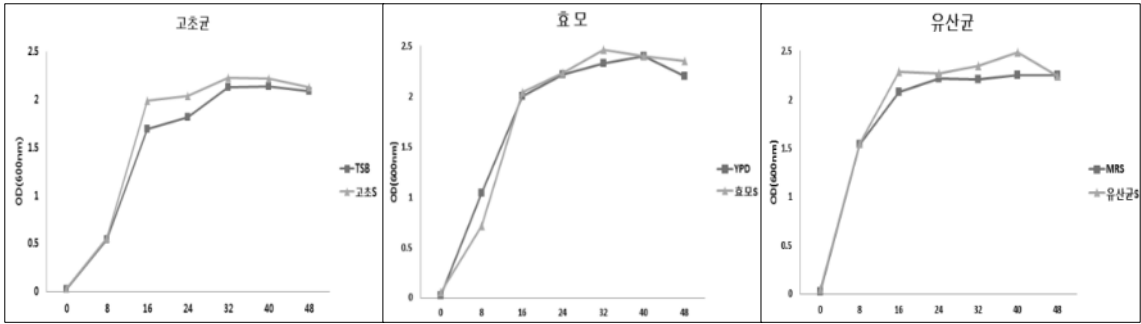


그림 1. 저가 실용배지와 최적배지에서 유용미생물(고초균, 효모, 유산균)의 성장곡선

(3) 유용미생물의 배지종류별 균수

시·군 농업기술센터에서 미생물배양사업으로 보급되고 있는 고초균, 효모, 유산균에 대한 개발된 저가배지, 시·군에서 조달로 구매로 사용하고 있는 배지 그리고 최적배지로 공인되어 시약으로 유통되고 있는 배지의 생균수 생산력을 비교하기 위하여, 최적조건에서 즉 고초균과 효모는 30℃에서 32시간, 유산균은 35℃에서 24시간 배양하여 희석평판법으로 생균수를 측정 한 결과, 고초균은 개발된 저가실용배지, 시군사용배지, 최적배지 모두 10<sup>8</sup>cfu/ml 이상 배양되었고, 효모와 유산균은 10<sup>9</sup>cfu/ml 이상 배양되었다. 따라서 현재 시·군 농업기술센터에서 구입 사용하고 있는 각 균주별 배지를 개발된 저가 실용배지로 대체 사용이 가능하여 미생물배양사업의 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

표 5. 고초균 배지종류별 균수

배지	균수(cfu/ml)			
	1반복	2반복	3반복	평균
저가 실용배지	1.1x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>8</sup>
시·군센터배지	8.5x10 <sup>8</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	7.7x10 <sup>8</sup>	8.4x10 <sup>8</sup>
TSB	5.9x10 <sup>8</sup>	4.3x10 <sup>8</sup>	3.8x10 <sup>8</sup>	4.7x10 <sup>8</sup>

표 6. 효모균 배지종류별 균수(2014)

배지	균 수(cfu/ml)			
	1반복	2반복	3반복	평균
저가 실용배지	2.4x10 <sup>9</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>
시·군센터배지	1.2x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>
YPD	1.3x10 <sup>9</sup>	0.7x10 <sup>9</sup>	0.5x10 <sup>9</sup>	0.8x10 <sup>9</sup>

표 7. 유산균 배지종류별 균수

배지	균 수(cfu/ml)			
	1반복	2반복	3반복	평균
저가 실용배지	4.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	2.3x10 <sup>9</sup>
시·군센터배지	2.2x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	2.1x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>
MRS	1.7x10 <sup>9</sup>	8.2x10 <sup>9</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	3.8x10 <sup>9</sup>

#### 다. 저가 실용배지의 경제성

시·군 농업기술센터에서 사용되고 있는 배지 대비 개발된 저가 실용배지 사용으로 얻어지는 경제적 효과를 표 8에 정리하였다. 1톤 생산에 소요되는 저가 실용배지 비용은 고초균이 195,000원, 효모 190,000원, 유산균 200,000원이었고 이는 현재 미생물배양사업에 구매하여 사용하는 배지구입 비용의 15~20% 수준이었다. 이는 2015년 우리도에서 보급된 미생물제제 2,000톤에 대비하면 대략 15억원 이상의 경비를 절약할 수 있을 것으로 사료된다.

표 8. 시군보급 유용미생물 배지종류별 단가

미생물종류	배 지	단 가	
		원 / 톤	지 수
고초균	저가 실용배지	195,000	20
	시·군센터배지	960,000	100
효모	저가 실용배지	190,000	20
	시·군센터배지	960,000	100
유산균	저가 실용배지	200,000	15
	시·군센터배지	1,300,000	100

#### 4. 적 요

##### <제1세부과제 : 농가 보급용 미생물 생산비 절감 연구>

- 가. 우리도 시·군 농업기술센터에서 미생물배양사업 사용하는 미생물 배양을 위하여 사용하는 배지는 전 시·군이 고가의 배지를 조달 구매하여 사용하고 있었다. 고초균과 효모용 배지는 kg당 47,520원~47,820원, 유산균용 배지는 51,560원~52,250원이었고, 미생물제제 생산에 소요되는 배지 비용은 고초균, 효모는 톤당 950,400원~956,400원, 유산균은 1,289,000원~1,306,250원 이었다.
- 나. 시·군 농업기술센터에서 미생물배양사업 사용하는 유용미생물의 종류별 최적 배양조건을 검토한 결과, 고초균(*Bacillus subtilis*)의 배양 최적온도는 30℃, 최적 pH는 6~7 이었고, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 최적온도 30~35℃, 최적 pH는 6~7, 유산균은(*Lactobacillus plantarum*)은 최적온도 35℃, 최적 pH는 6이었다.
- 다. 탄소원, 질소원, 무기염류 등이 최적화된 유용미생물 균주별 저가 실용배지 조성은 고초균(*Bacillus subtilis*)이 리터 당 대두단백 6g, Sucrose 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.3g, Magnesium Sulfate 0.4g, CaCl<sub>2</sub> 0.6g 이었고, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 대두단백 7g, Sucrose 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.3g, Magnesium Sulfate 0.7g, 유산균은(*Lactobacillus plantarum*)은 대두단백 6g, Sucrose 9g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, Sodium citrate 2g, Magnesium Sulfate 0.2g, Manganeses Sulfate 0.5g 이었다.
- 라. 개발된 유용미생물 균주별 저가 실용배지와 최적배지에서의 고초균, 효모, 유산균의 성장곡선을 측정한 결과, 고초균, 효모, 유산균 모두 저가 실용배지와 최적배지와의 균체

증식 속도가 유사하였고, 최대 증식량도 같은 수준이었다.

마. 고초균은 개발된 저가실용배지, 시균센터사용배지, 최적배지 모두  $10^8$ cfu/ml 이상 배양되었고, 효모와 유산균은  $10^9$ cfu/ml 이상 배양되었다.

바. 미생물제제 1톤 생산에 소요되는 저가 실용배지 비용은 고초균이 195,000원, 효모 190,000원, 유산균 200,000원이었고 이는 현재 미생물배양사업에 구매하여 사용하는 배지구입 비용의 15~20% 수준이었다.

## 5. 인용문헌

- 농림부. 2009. 비료관리법. 『별표 1』 비료의 구분 및 종류
- 유민, 김병오, 이해영. 2012. 미생물 실험서(제2판). 보문각
- Michael T Madigan; John M Martinko; Brock. 2009. Biology of Microorganisms. Boston Pearson Education.
- 이강형, 송홍규. 2007. 근권에서 분리한 *Bacillus* sp.의 적용에 의한 토마토의 성장 촉진. Kor. J. Microbiol., 43(4):279~284..
- Arkhypova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.L., Martynenko E.V. and Kudoyarova G.R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to production of cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant and Soil 272:201~209.

## 6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2015(2년)	영농활용	농가보급용 미생물 배양용 저가 실용배지 및 배양법

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도	
					'14	'15
과제책임자	환경농업연구과	농업연구사	최승출	과제 총괄	○	○
1세부책임자	환경농업연구과	농업연구사	최승출	세부주관 수행	○	○
공동연구자	환경농업연구과	농업연구사	허수정	결과분석 지원	○	○
	환경농업연구과	농업연구사	임수정	조사 지원	○	○
	환경농업연구과	연구원	남현수	미생물배양	○	○