

## 포항 부추에 대한 biosurfactant를 생산하는 *Bacillus* sp. LP03, TBM40-3의 항진균성과 생육에 미치는 영향

장혜원<sup>1</sup> · 최용락<sup>2</sup> · 주우홍<sup>3</sup> · 최윤혁 · 도형기 · 황철원\*

<sup>1</sup>한동대학교 생물 식품 과학부, <sup>2</sup>동아대학교 생명자원과학부, <sup>3</sup>창원대학교 생물학과, \*한동대학교 생명공학 연구소

Received September 1, 2004 / Accepted September 30, 2004

**The antifungal activity and growth promotion effects of *Bacillus* sp. LP03, TBM40-3 on Pohang Buchu (Leeks).** Hye-Won Chang<sup>1</sup>, Yong-Lark Choi<sup>2</sup>, Woo-Hong Joo<sup>3</sup>, Yoon-Hyeok Choi and Cher-Won Hwang. <sup>1</sup>School of Bioscience & Food Technology Handong Global University, Pohang, 791-940, Korea, <sup>2</sup>Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan, 604-714, Korea, <sup>3</sup>Department of Biology, Chang Won University, Chang Won, Korea, 941-773, \*Institute of Bioscience and Technology, Handong Global University, Pohang, 791-708, Korea – This report investigates antifungal activity and effects of growth promotion by biosurfactant produced from *Bacillus* sp. LP03 and TBM40-3 against fungus causing plants disease (Glax Mold-*Botrytis cinerea*). Antifungal activity against *B. cinerea* infected to leek (*Allium tuberosum* Rottler) exhibited better than antifungal agent farming drug (smilex, Dong bang agro., Seoul, Korea.) through the field test. After infected by plant's disease, the leaves growth and number are maintained under presenting biosurfactant produced strains. Especially, one of the strains, named *Bacillus* sp. LP03 showed strong antifungal activity on field studies.

**Key words** – biosurfactant, antifungal activity, Glax Mold-*Botrytis cinerea*, *Bacillus* sp. LP03, TBM40-3

식물병원균의 하나인 잭빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*는 생육기간 중 강우가 많고 온도가 낮으며 다습한 조건에 재배되고 있는 곳에서 잎에 잭빛곰팡이병을 유발시키며 병증은 끝부분에 암갈색으로 마르고 나중에 회갈색으로 변하고 감염 부위는 짓무르게 되면서 고사한다[7,17]. 부추에 있어서 잭빛곰팡이의 감염은 초기에 관찰하기 어려우며, 상품화 되어지는 단계에서 급격히 발생하여 수확성 및 상품성을 크게 감소시킨다. 또한 한번 감염이 일어난 토양주변에는 계속해서 감염이 일어나게 되어 장기간 밭을 일구어 온 농가에 큰 피해를 일으킨다. 이를 제어하기 위해서 농약을 쓸 수 있으나, 이는 토양의 산성화를 야기할 뿐 아니라 재배하는 농민의 건강에 큰 피해를 끼치고 또한 뿌리를 제외한 잎의 전체를 섭취하게 되는 부추에 있어서 잔류농약의 존재는 건강을 해치게 되는 큰 위험요소중 하나이다.

미생물 생산 biosurfactant는 화학합성 surfactant와 비교하여 낮은 독성, 높은 생분해성, 월등한 환경 친화성[8,16], 뛰어난 발포능, 극한(온도, pH, 염도)에서의 높은 선별성 및 특이성 등 많은 부문에서 장점을 나타내고 있다[1,2,5,10,13]. 최근 연구동향에 의하면[3,4,18] 미생물 유래 biosurfactant는 그 자체의 유화활성[11,12,15,19] 뿐만 아니라, 비교적 넓은 항균 spectrum 의 강한 antimicrobial activity 및 antifungal activity를 갖고 있음이 밝혀지고 있으며, biomedical science 분야에 있어서 보다 광범위한 응용이 가능한 물질로서 식물

병원체의 제어에 활용 가능성이 알려지고 있다.

본 연구에서는, 포항지역의 주요 농산물중 하나인 부추의 잭빛 곰팡이 병을 유발하는 *B. cinerea*에 대해 화학합성 chemical 이 아닌 생분해가 가능하며 antifungal activity를 보이는 biosurfactant를 생산하는 균주를 실험실 수준에서 항진균성 및 유화능에 대한 조사를 시행하여 확인 한 후에 부추에 적용하여 부추농가에서 하는 green house와 같은 조건으로 확인된 biosurfactant의 항진균성 및 생육을 조사 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

유류 분해능이 우수하며 생분해성 계면활성제를 다량 생산하고, 식물병원균에 대해 항진균성을 나타낼 것으로 기대되는 두 균주 *Bacillus* sp. TBM40-3 균주[9], (이하 TBM40-3)와 *Bacillus* sp. LP03 (이하 LP03)를 동아대학교 최용락 교수 연구실로부터 분양 받아 본 실험에 사용 하였다.

#### 온도에 따른 생육

LB-broth (Gellix, Korea)에 두 균주, LP03, TBM40-3을 접종하여 각 온도 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃에서 24 h 배양한 후 OD<sub>600</sub>에서 흡광도를 측정하였고, 이어서 유화능을 측정하기 위해 유화활성을 측정하였다.

#### 유화활성 측정

배양용액을 0.2 μm membrane filter (Pall, USA)을 통과시켜 멸균시킨 것을 biosurfactant 용액으로 하였다. 여과액 2

#### \*Corresponding author

Tel : +82-54-260-130, Fax : +82-54-261-4603

E-mail : chowon@han.ac.kr

ml를 마개 있는 시험관에 넣고, pH 3.0의 0.1M sodium acetate 완충액 2 ml와 혼합한 용액에 1 ml의 기질을 넣고 2분간 최고속도로 vortex mixing 한 후 10 분간 정치한 후 540 nm에서의 현탁도를 측정하였다[6,14,20].

**항 진균 활성 조사**

LP03, TBM40-3의 *Botrytis. cinerea*에 대한 항진균성 조사는 실험실 내에서 potato dextrose agar (Difco, USA) 상에서 곰팡이에 대해 투명 환이 생기는 것으로 확인을 한 후 본 연구에서는 각각의 시료와 함께 positive control로 농약(살균제, 스미렉스 수화제 :1g/l)을, negative control로 3차 증류수를 사용하여 부추에서 병이 진행되는 정도 및 생육 조사를 야외 포장에서 수행하여 항진균활성을 확인 할 수 있었다.

**부추의 생육조사**

LB-broth (Gellix, Korea)에 두 균주, LP03, TBM40-3을 접종하여 두 균주의 최적 biosurfactant 생산온도에서 200rpm으로 1일간 배양하여 OD<sub>600</sub>에서 OD값을 UV spectrophotometer (UV-1601, UV-VISIBLE, SHIMADZU, JAPAN) 상에서 1.5가 되도록 배양하여 그 배양액을 실험 균으로 사용하였다. 대조구로는 1mg/ml의 농약과 증류수를 사용하여 각각 50ml을 pot 당 7일 간격으로 엽면에 살포하였으며, 각각의 pot 당 10포기의 부추를 무작위로 선정하여 엽장 및 엽수를 측정하였다. 엽장 측정 시 한 포기당 가장 긴 잎(기준 엽)을 측정하였으며 엽수는 기준엽을 기준으로 나머지 잎을 상대적으로 3차례에 걸쳐 측정하였다. 측정된 값은 Microsoft® Excel 2002 를 이용하여 평균값 및 표준편차를 구했으며 이를 그래프로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**온도에 따른 생육 및 유화활성**

두 균주 모두 30℃에서 생육이 가장 활발하였으나, 유화활성의 경우 LP03는 30℃에서, TBM40-3은 40℃에서 그 활성이 가장 높게 나왔다(Fig. 1). 이를 바탕으로 후속 실험에서는 각각 유화활성이 가장 높게 나온 온도에 배양하여 이용하였다.

**항진균 효과의 확인**

실험을 행하기 전 두 균주의 항진균성을 확인하기 위해서 potato dextrose agar 상에서 paper disk test를 행하였고 이로써 두 균주가 잿빛곰팡이의 성장을 저해하는 antifungal activity를 갖고 있음을 확인 할 수 있었다. 각각의 시료를 잿빛 곰팡이가 발생한 부추의 엽면에 1주 간격으로 2회 살포하여 병의 진행 상태를 관찰 한 결과, 증류수를 투여한 부추의 경우 Fig. 2A에서 보이는 것과 같이 2주 만에 잿빛곰팡이에 의해 잎이 고사됨을 확연하게 볼 수 있었다. 한편 LP03 및

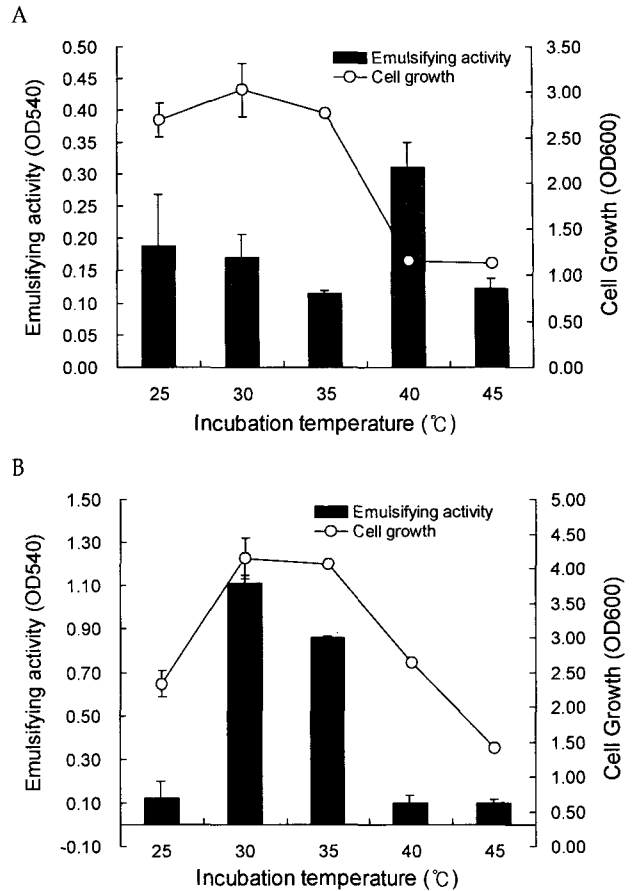


Fig. 1. Growth and emulsifying activity at various temperature of the strains.

A. *Bacillus sp.* TBM40-3, the temperature of maximum growth is 30℃, but the temperature of maximum emulsifying activity is 40℃.

B. *Bacillus sp.* LP03, the temperature of maximum growth is 30℃, the same with that of the maximum emulsifying activity.

TBM40-3을 투여한 부추의 경우 병증이 일어난 잎의 말단은 고사되었으나 이후 병증의 확산이 없었으며 2주가 경과한 뒤에도 잎의 정상적인 생육이 이루어져 *in vitro*에서 관찰한 항진균활성을 확인할 수 있었다(Fig. 2C, D). 특히 LP03 균주의 경우 positive control 로서 농약이 투여된 부추에서 보인 강한 항진균성과 거의 유사한 경향을 보였으나 농약처리 부추의 경우 병증확산의 억제가 이루어진 반면 추후 생장이 시료처리 부추에 비해 원활하게 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

**Green house에서 부추의 생육조사**

위의 실험결과를 바탕으로 LP03 및 TBM40-3이 잿빛곰팡이 병증확산을 차단할 뿐 아니라 생장을 촉진시키는 효과가 기대되어 부추의 생육조사를 실시하였다.

생육에 미치는 영향을 조사하기 위해 항진균활성 조사와

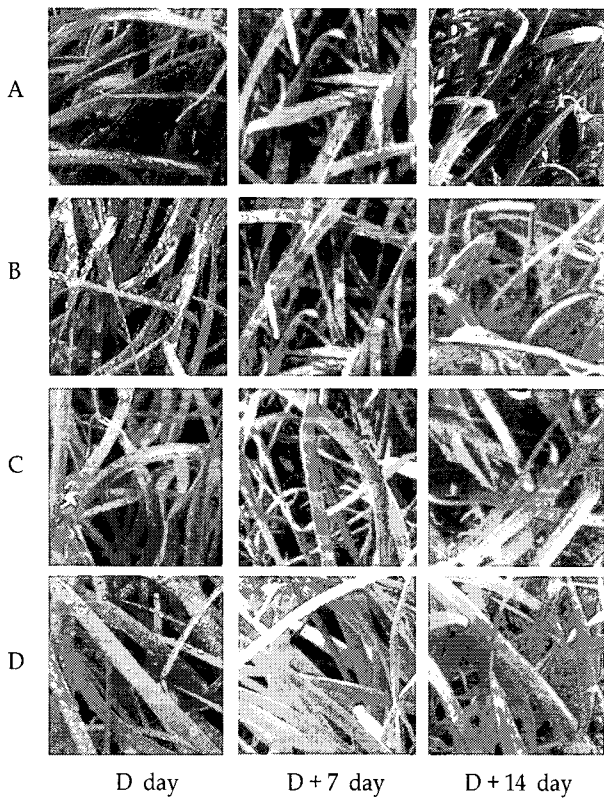


Fig. 2. Antifungal activities of biosurfactant forming bacterial strains (*B. sp.* LP03, TBM40-3) on the plants (*Allium tuberosum* Rottler) infected with *B. cenerea*.  
 A. negative control (D.W)  
 B. positive control (farm drug only, 1g/l-50ml input)  
 C. treated by *B. sp.* LP03 (50 ml)  
 D. treated by *B. sp.* TBM40-3 (50 ml)

는 달리 병반이 오기 전, 잎의 길이가 약 12 cm 가량 되었을 때 각각의 시료를 1주 간격으로 엽면 살포한 후 엽장(Fig. 3A) 및 엽수(Fig. 3B)를 관찰하였다.

증류수 처리 부추의 경우 2주가 경과 되었을 때 엽수의 증가는 확인 되었으나 엽장의 증가는 이루어 지지 않았다. 즉 기준 엽의 생장이 미미한 채(Fig. 3A) 나머지 작은 잎들의 생장이 비교적 느린 속도로 이루어져(Fig. 3B) 잎의 길이 생장이 원활하지 못함을 알 수 있었다. 또한 농약 처리 부추의 경우, 1주간 기준 엽의 길이생장이 이루어지나 1주가 경과한 뒤에는 기준 엽의 길이가 증가하지 않았으며 전체적인 엽수에도 변화가 없었다(Fig. 3B).

반면 균주를 처리한 부추의 경우 대조 구에 비해 길이생장이 원활하게 이루어짐을 확인할 수 있었다. TBM40-3 처리 부추의 경우 엽수는 일정하나 기준 엽의 길이생장이 시료처리 1주 후에도 느린 속도로 증가함을 (Fig. 3A) 보였다. 즉 기준 엽의 길이생장과 비례하여 나머지 잎들의 생장이 이루어져 엽수는 일정한 것으로 사료된다. 또한 LP03의 경우 2주간의 시료처리기간 동안 기준 엽의 길이생장이 시간에 비례하여 성장할 뿐만 아니라 나머지 잎들의 성장도 빠르게 이루어져 엽수 또한 일정하게 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 위의 결과를 토대로 농약의 살포는 식물의 호흡 및 대사에 필요한 효소의 활성을 저해하여 식물의 성장을 저해하나 biosurfactant 생산균주의 경우 항진균활성 뿐 아니라 식물의 성장을 촉진하는 효과를 보아 농약에서 기대할 수 있는 방제 효과 뿐만 아니라 생육에의 효과도 기대할 수 있다. 특히 LP03의 효과가 생육보전과 항햇빛곰팡이 효과에 우수하였는데 이는 이 균주에서 생산되는 항진균 및 생육촉진 효과가 TBM40-3에 비해 우수한 것으로 사료된다. 한편 작물의 생육

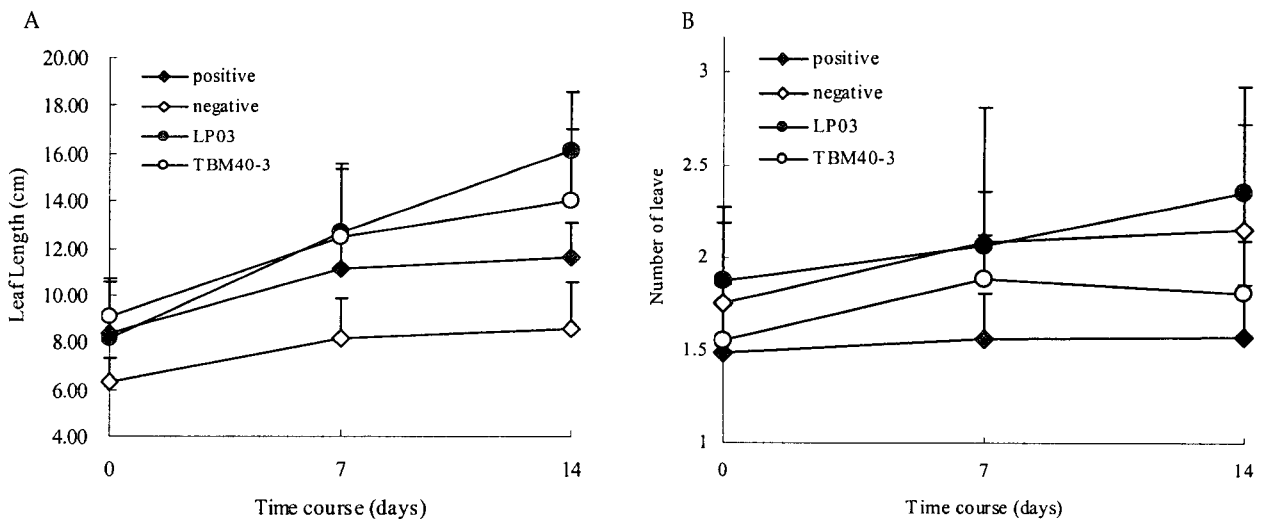


Fig. 3. Growth promoting efficacy of biosurfactant forming bacterial strains (*B. sp.* LP03, TBM40-3) on the plants (*Allium tuberosum* Rottler)

- A. Effects on the length of leaves.
- B. Effects on the number of leaves.

촉진이 두 균주의 항진균성에 의한 생육의 보전에 의한 것인지 아니면 균이 생산하는 생육촉진 인자에 의한 것인지는 좀 더 연구를 진행하여야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림기술관리센터(ARPC)의 2002년도 농림기술개발연구과제 사업(과제번호: 203067-03-HD120)의 일환으로 수행된 연구과제이며, 이의 지원에 감사드립니다.

### 요 약

본 연구에서는 두 균주, *Bacillus sp.* LP03, TBM40-3의 bio-surfactant에 대한 생육 시 적절한 온도와 유화활성에 대한 실험을 행한 후 가장 적절한 조건에서 배양하였고, 이미 항진균성과 유화활성에 대해 실험실 수준에서 검증된 TBM40-3 뿐 아니라 분리되어 보관되어 있는 균주, LP03 또한 실험실 수준에서 항진균성 및 유화활성이 확인되었고 이후에 시행한 부추에 생기는 병인 *B. cinerea*에 대한 항진균성 및 생육조사를 시행한 결과 이미 항진균성과 유화활성이 확인되어 있던 TBM40-3에 비해 그 효과가 우수할 뿐 아니라 생육 촉진 효과를 확인할 수 있었다.

### 참 고 문 헌

- Borjana, K. Tuleva, George R. Ivanov and Nelly E. Christova., 2002. Biosurfactant Production by New *Pseudomonas putida* Strain., *Z. Naturforsch.*, **57c**, 356-360.
- Cairns, W. L., D. G. Cooper, J. E. Zajic, J. M. Wood, and N. Kosaric. 1892. Characterization of *Nocardia amaree* as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 362-366.
- Deleu M., and M. Paquot, 2004. From renewable vegetable resources to microorganism : new trends in surfactants, *C. R. Chimie*, **7**, 641-646.
- Folman, L. B., M.J.E.M. De Klein, J. Postma, and J. A. van Veen, 2004. Production of antifungal compounds by *Lyso-bacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber, *Biological Control*, **31**, 145-154.
- Georgiou, G., S. C. Lin, and M. M. Sharma, 1992. Surface active compounds from microorganisms. *Bio/Technology.*, **10**, 60-65.
- Jae-Young Cha, Hae-Sun Kim, Young-Su Cho, Young-Choon Lee and Yong-Lark Choi., 2000. Characterization of Crude Oil Degradation by *Klebsiella sp.* KCL Isolated from Sea Water, *Korean Journal of Life Science*, **10**(3), 300-306.
- Jin-Hyeuk Kwon, Soo-Woong Kang, Kyung-Ae Son and Chang-Seuk Park., 2000. Gray Mold of Safflower Caused by *Botrytis cinerea*. *The Korean Journal of Mycology*, **28**(1), 46-48.
- Joel Chopineau, Frank D. McCafferty, Michal Therlsod, and Alexander M. Kilbanov., 1988. Production of Biosurfactants from Sugar Alcohols and Vegetable Oils Catalyzed by Lipase in a Nonaqueous Medium. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**, 208-214.
- Kim Sun-Hee, Sang-Cheol Lee, Ju-Soon Yoo, Woo-Hong Joo, Soo-Yeol Chung and Yong-Lark Choi., 2004. Characterization of oil-degradation Biosurfactant produced by *Bacillus sp.* TBM40-3., *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **47**(2), 170-175.
- K. S. M. Rahman, I. M. Banat, J. Thahira, Tha. Thayumanavan, P. Lakshmanaperrumalsamy., 1999. Bioremediation of gasolin contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant., *Bioresource Technology.*, **81**, 25-32.
- Michael C. Cirigliano and George M. Carman, 1984. Isolation of Bioemulsifier from *Candida Lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(4), 747-750.
- Michael C. Cirigliano and George M. Carman., 1985. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida Lipolytica*., *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(4), 846-850.
- Nielsen TH, C Christophersen, U Anthoni, J Sorensen., 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J Appl Microbiol* **87**(1):80-90.
- Sang-Cheol Lee, Youn-Ju Jung, Ju-Soon Yoo, Young-Su Cho, In-Ho Cha and Yong-Lark Choi., 2002. Characteristic of Biosurfactants produced by *Bacillus sp.* LSC11., *Korean Journal of Life Science*, **12**(6), 745-751.
- Shaw, A., 1994. Surfactants-94., *Soap Cosmet. Chem. Specialities*, **70**, 24-34.
- Sarah J. Macnaughton, John R. Stephen, Albert D. Venosa, Gregory A. Davis, Yun-Juan Chang, and David C. White., 1999. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill., *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(8), 3566-3574.
- Seog-won Chang, Sung-Kee Kim, Eun-Sup Yi and Jin-Won Kim., 2001. Occurrence of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on *Cryptotaenia japonica* in Korea, *The Korean Society of Mycology*, **29**(4), 227-229.
- Singh P., and S. S. Cameotra, 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *TRENDS in Biotechnology*, **22**(3), 142-146.
- Singer, M. E., 1985. Microbial biosurfactants., *Microbes Oil Recovery*, **1**, 19-38.
- Zajic, J. E., H. Gignard, and D. F. Gerson, 1977. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corneybacterium hydrocarboclastus*., *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1303-1320.