

## Isolation and production of biosurfactant (lipopeptide) for biological control of plant pathogen

이백석, 이재호\*, 최기현\*, 최성원\*, 김은기\*

인하대학교 생물공학과, 그린바이오텍(주)\*

전화 : (032) 860-7514, FAX : (032) 875-0827

Antagonistic *Bacillus* sp. to phytopathogenic fungi were isolated based on the growth rate and lipopeptide production. The lipopeptide, a biosurfactant reduced surface tension, showed the antifungal activity, caused lysis of blood cell.

### 서론

현재 식물전염병 방제를 위해 사용된 맹독성 화학농약의 잔류에 의한 생물농축, 토양 및 수질오염은 심각한 실정이다. 특히 토양전염병의 방제는 기존 화학 살균제 사용이 거의 불가능하거나 방제효과가 극히 낮고 기존 화학농약에 대한 내성 병원균 발생하여 사용량이 증가하고 있어 인체에 안전한 무공해 농산물을 생산하기 위해서 미생물이 농약 필요하다. 또한 종자에 미생물을 처리하여 작물의 생장을 촉진시키고 식물병을 방제하는 기술이 선진국에서 개발·경쟁하고 있는 실정이고 환경보전형 농업에 대한 소비자의 인식 제고와 정부의 관련법 제정 등의 지원으로 미생물농약 부분에 대한 관심이 고조되고 있다. 따라서 항균성 물질을 생산하는 균주의 개발은 엄청난 부가가치 창출할 수 있고 생물학적 방제를 통한 농산물의 품질향상으로 수출에 기여하리라 예상된다.

국내에서 미생물농약 부분 중 가장 큰 시장이 형성되어 있는 골프장 잔디병을 일으키는 *Pythium* sp. 및 *Rhizoctonia* sp.를 방제·억제하는 미생물농약에는 *Bacillus* sp. 계열의 균주가 많이 사용되고 있다.<sup>1)</sup>

미생물농약(제제)의 주요 구성 미생물은 *Bacillus* sp.로서 lipopeptide 계열의 항균물질이 생산되고 있으며 포자를 형성하여 토양 유래의 식물병원균에 대해 지속적인 방제·억제 효과를 나타낼 수 있다.<sup>2)</sup>

따라서 본 연구에서는 무병토양 및 퇴비로부터 분리한 길항후보균 100 여종을 식물병원균에 대한 길항력과 성장속도를 고려한 2차원적인 선정방법인 RPI (Relative Performance Indies) 기법을 이용하여 우수균을 선정하고 lipopeptide 계열의 항균물질을 분리하는 것을 목적으로 하였다.

### 재료 및 방법

후보균 (#1 ~ #79) 중 길항균의 선정은 식물병원균인 *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp.에 대한 길항력과 성장속도를 고려하여 길항균 선정시 RPI (Relative Performance Indies) 기법을 도입하였다.<sup>2)</sup>

i) 식물병원균의 길항력에 대한 RPI<sub>Efficacy</sub>

$$RPI_{Efficacy} = [ \{ (x - \bar{x}) / \sigma \} - 2 ] \times 25$$

$x$  ; single observation value,  $\bar{x}$  ; average of all observations,

$\sigma$  ; standard deviation

ii) 후보균의 성장속도에 대한  $RPI_{Kinetics}$

$$RPI_{Kinetics} = [ \{ (x - \bar{x}) / \sigma \} + 2 ] \times 25$$

Efficacy는 PDA (Potato Dextrose Agar) plate에서 대칭배양하여 후보균들의 inhibition rate를 측정하였다 (Fig. 1).

$$\text{inhibition rate} = (\text{control} - \text{examination}) / \text{control} \times 100$$

*Pythium* sp.의 경우 성장속도가 빨라 대칭배양시 후보균과의 거리를 5cm로 하였고 (2일 배양) *Rhizoctonia* sp.는 4cm로 하였다 (3일 배양).

Kinetics는 후보균들을 15mL test tube에 5mL LBS배지 (soluble starch ; 10g/L, tryptone ; 10g/L, yeast extract ; 5g/L, NaCl ; 5g/L)에서 30°C, 16시간 1차 사면배양 후 30mL test tube에 10mL의 LBS에서 2차 사면배양 (30°C, 12hr)하여 최종 OD<sub>600</sub>값을 이용하였다.

계면활성제 생산 유무를 확인하기 위해 #65, #66, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Bacillus* sp. H6를 각각 배양한 후 상등액을 분리하여 표면장력 (Surface Tensiomat21, Fisher)을 측정한 결과 각각 30 dyne/cm 이상의 표면장력 감소효과를 보였다.

#65 균주를 LBS 배지에서 20시간 배양 후 원심분리 (9000rpm, 4°C, 15min)하여 상등액을 분리하였다. 상등액을 conc. HCl을 이용하여 pH 2로 적정한 후 (흰색 침전 형성) 4°C에 24시간 보관하였다. 이를 2차 원심분리 (12000rpm, 4°C, 15min)하여 침전물을 회수한 후 dichloromethane으로 추출한 후 rotary vacuum evaporator (Eyela N-1, Tokyo Rikakikai co. Japan)로 감압하여 용매를 증발시켜 yellowish white 결정체를 회수하였다.

회수한 결정체가 lipopeptide 계열물질임을 확인하기 위해 TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany) plate에 전개시킨 후 (mobile phase ; CH<sub>3</sub>Cl : CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O = 65 : 25 : 4) 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% ninhydrin으로 발색시켜 확인하였다.

시판되는 lipopeptide인 surfactin (Wako Chemical, Japan)과 생산물질을 비교하기 위해 #65 균주의 배양액 0.5 mL에 0.5 mL methanol을 첨가하여 추출한 후 원심분리 (13000rpm, 15min)하여 상등액을 0.45 μm filter로 여과하였다. 여과액 20 μL를 HPLC (GBC, Austrailia)에 주입하였고 UVdetector (205nm)로 측정하였다 (mobile phase ; acetonitrile/3.8mM trifluoroacetic acid = 4/1 (v/v), column ; 4.6 mm φ × 250 mm ODS-2, flow rate ; 1.5 mL/min).

## 결과 및 고찰

### 대칭배양

*Pythium* sp. 및 *Rhizoctonia* sp.에 대한 대칭배양은 Fig. 1에서와 같이 후보균을 streaking하지 않은 대조구와 streaking한 실험구에서의 각각 균사길이를 측정하여 inhibition rate를 계산하였다. 후보균 중 *Pythium* sp.에 대한 inhibition rate는 일반적으로 작았고 가장 큰 값은 #49, #70의 27.1%였으며 *Rhizoctonia* sp.에 대한 가장 큰 inhibition rate는 #43의 51.5%였다.

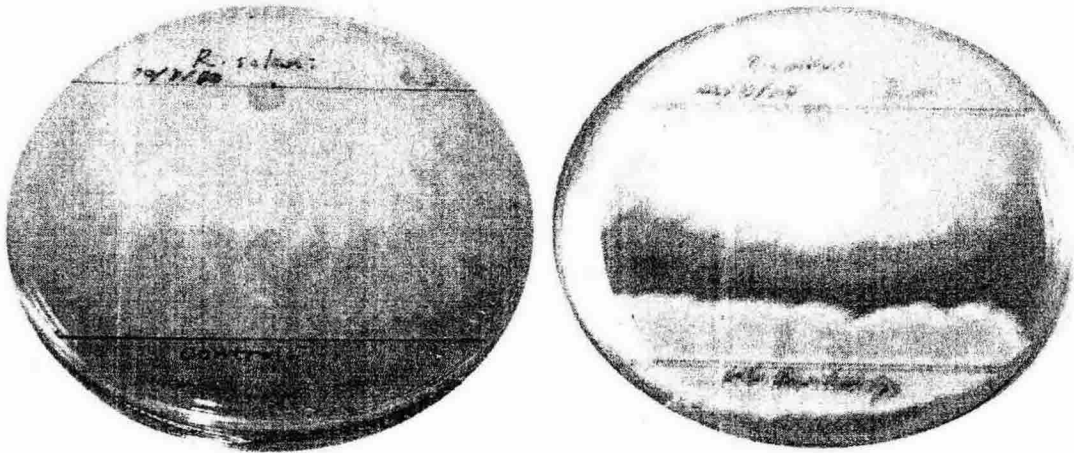


Figure 1. Dual culture of *Rhizoctonia* sp.

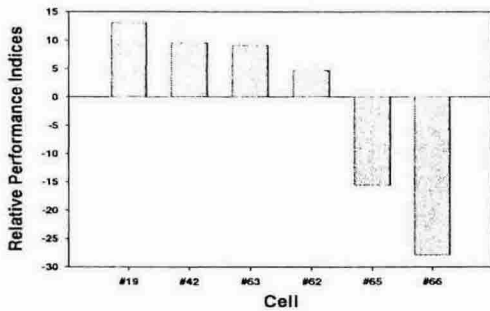


Figure 2. Use of relative performance indices (RPI) to achieve a 2-dimensional assessment of antagonistic organism based on growth and efficacy of liquid-grown cells

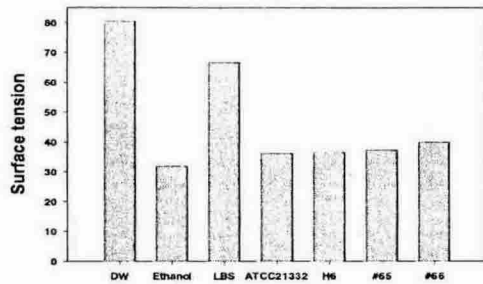


Figure 3. Surface tension of antagonistic organisms, respectively

세포생장에 대한  $RPI_{Kinetics}$ , *Pythium* sp.에 대한 길항력 효과 ( $RPI_{Efficacy-P}$ ), *Rhizoctonia* sp.에 대한 길항력 ( $RPI_{Efficacy-P}$ )를 각각 계산한 후 세 값의 평균으로  $RPI_{Overall}$  값을 구하여 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서와 같이 후보군 중 #19 균주가 13.1의 가장 큰 RPI값을 보였다.

#### 표면장력

#65, #66, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Bacillus* sp. H6를 각각 배양한 후 상등액을 분리하여 표면장력 (Surface Tensiomat21, Fisher)을 측정된 결과 30dyne/cm 이상의 표면장력 감소효과를 보였다. 따라서 각 균주는 표면장력을 감소시키는 생물계면활성제를 생산한다고 사료된다 (Fig. 3).

#### HPLC

Fig. 4에서와 같이 시판되는 Wako chemical (Japan)사의 surfactin과는 다른 retention

time에서 peak가 형성되어 #65 균주가 생산하는 생물계면활성제는 동일물질이 아니라 판단된다.

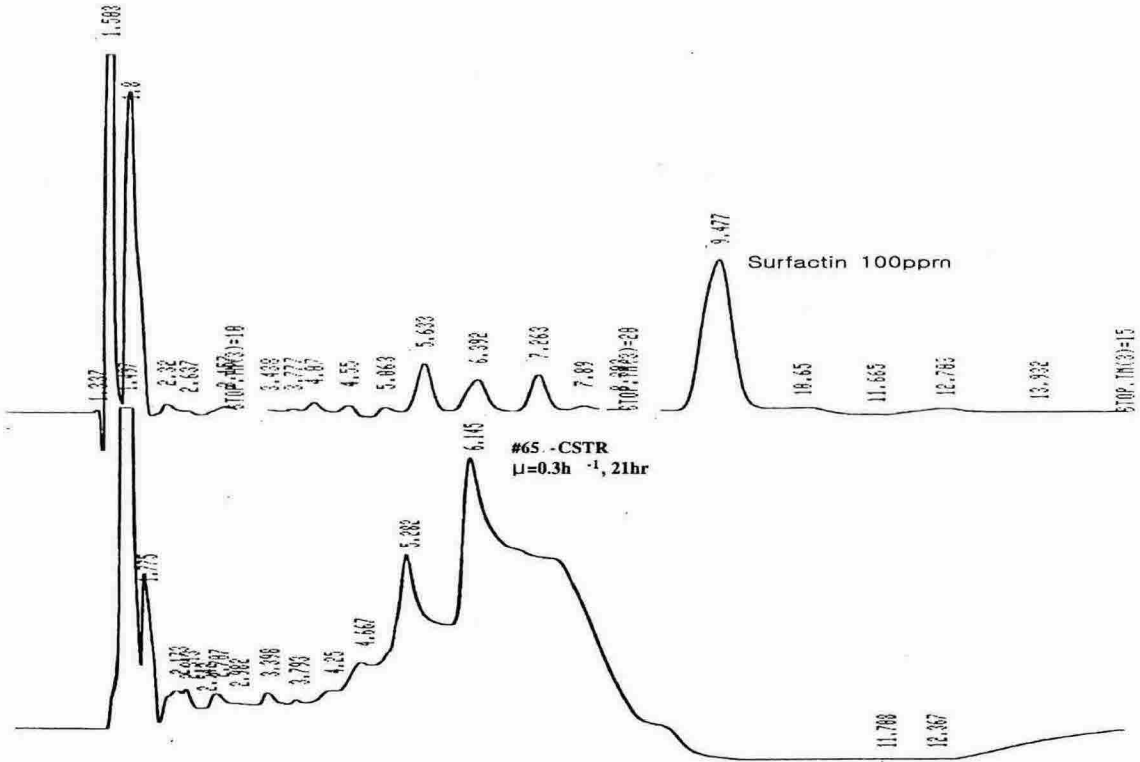


Figure 4. Comparison of HPLC peak (Surfactin, #65-BS)

### 요약

식물의 토양전염병을 유발하는 *Pythium* sp. 및 *Rhizoctonia* sp.에 대한 길항력과 성장속도를 고려한 RPI (relative performance indices) 기법을 이용하여 100 여개 후보균 중 #19, #42 등 길항균을 선정하였다. 후보균들은 일반적으로 *Pythium* sp.보다 *Rhizoctonia* sp.에 대한 길항력이 우수하였고 *Bacillus* sp.의 배양 상등액은 항진균활성과 blood agar에서 용혈현상을 보여 상등액으로부터 항균물질인 lipopeptide 계열물질을 분리하였다.

### 참고문헌

1. Asaka O. and Makoto Shoda, "Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off tomato with *Bacillus subtilis* RB14" (1996), *Appl and Environ Microbiol.*, **62**(11), 4081-4085
2. Ohno A., Takashi Ano and Makoto Shoda, "Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation" (1995), *J of Fermen and Bioeng.*, **80**(5), 517-519
3. Schisler D. A. and P. J. Slininger, "Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products" (1997), *J Indust Microbiol Biotechnol.*, **19**, 172-179