Journal of Life Science 2007 Vol. 17. No. 7. 983~989 ©JLS / ISSN 1225-9918

생물방제능과 식물성장촉진능을 동시에 가지는 *Bacillus licheniformis* K11의 non-siderophore 항진균 물질 및 cellulase의 생산조건 확인

우상민 · 김상달*

영남대학교 응용미생물학과

Received June 19, 2007 / Accepted July 5, 2007

Confirmation of Non-Siderophore Antifugal Substance and Cellulase from *Bacillus licheniformis* K11 Containing Antagonistic Ability and Plant Growth Promoting Activity. Sang Min Woo and Sang Dal Kim*. *Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 721-749, Korea* – *Bacillus licheniformis* K11, a plant growth promoting rhizobacterium was reported as a producer of auxin, siderophore, as well as antifungal cellulase under some culture conditions. *In vitro* test, *B. licheniformis* K11 represented excellent antagonistic ability against *Fusarium oxyspoum* (KACC 40037), and showed broad spectrum against other phytopathogenic fungi. *B. licheniformis* K11 had cellulolytic activity toward not only carboxymethyl-cellulose (CMC) but also insoluble cellulose, such as fungal cell wall cellulose, filter paper (Whatman No. 1), and Avicel. In addition, we confirmed antifungal substance production by butanol-extract methods. The strain produced optimally the antifungal substance when it was cultivated at pH 9.0, 30℃ for 4 days on nutrient medium. The biological control mechanisms of *B. licheniformis* K11 were caused by antifungal substance, cellulase and siderophore against phytopathogenic fungi.

Key words – PGPR (plant prowth promoting rhizobacterium), antifungal substance, cellulase, siderophore, Bacillus licheniformis K11

서 론

우리나라 농업에서 농작물의 생산량의 증대를 이유로 유기합성 농약과 화학비료의 무분별한 사용으로 농업생태계가 파괴되고, 농산물의 잔류농약 과다 검출로 소비자의 건강을 위협하고 있다. 뿐만 아니라 세계화에 따른 FTA 체결로 인해 우리 농산물이 외국산 농산물에 경쟁력을 가지려면, 농산물의 품질향상과 안전성을 재고하여야한다. 아울러 국제화에 대응하고 국민의 건간을 보호가기위해 환경친화적인 농법이 요구되며, 이를 위해 많은 미생물제제들이 개발, 사용되고 있다. 그 중에서 식물성장 촉진능과 식물병원성진균의 방제능을 동시에 가지는 PGPR(Plant Growth Promoting Rhizobacterium)균주를 이용하여 식물체의 면역력을 유도하거나 생물방제능을 이용하는 친환경 미생물농법의 연구가 최근 활발히 진행되고 있다[6,9,13,15,17].

PGPR이란 식물 뿌리주변에 생육하면서 식물에 직 · 간접적인 영향을 줌으로써 식물의 성장을 촉진하는 근권세균을 말하며, 지금까지 보고된 PGPR균주로는 *Azospirillum* sp. *Azotobactor* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter*. sp., *Kluyvera* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. 등 많은 미생물들이 알려져 있다[3,4].

*Corresponding author
Tel : +82-53-810-2395, Fax : +82-53-811-4663
E-mail : sdkim@yumail.ac.kr

PGPR균주들이 식물의 성장을 직접적으로 조절하는 기작으로는 인산가용화, 질소고정, 식물성장촉진 호르몬(auxin, cytokinin, gibberelin)의 생산, 에틸렌 조절 등이 알려져 있고[4], 간접적인 기작으로는 생물방제 기작으로 이용되는 5가지 작용이 있다. 첫 번째는 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 용균작용[5,24], 두 번째는 *Bacillus* sp.[10], *Pseudomonas* sp.[15], *Streptomyces* sp.[16] 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용, 세 번째는 식물병원균에 기생하면서 식물에 대한 진균의 병원성을 억제하는 기생작용[18], 네 번째는 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용[7,22], 마지막으로 미생물이 생산하는 exopolysaccharide(EPS), lipopolisaccharide(LPS), salicylic acid(SA), siderophore, hydrogen cyanide(HCN), 2,3-butanediol 등의 물질들에 의해서 식물의 면역기능을 활성화하여 병에 대한 저항성을 유도하는 유도저항성 작용[12,13,23] 등을 들 수 있다.

본 연구는 auxin, siderophore, 그리고 cellulase를 생산하는 생물방제능과 식물성장촉진능으로 분리, 선발된 *Bacillus licheniformis* K11[8]에서 항진균성 siderophore이외의 또 다른 항진균성 물질을 확인하였다. 그리고 본 균주가 생산하는 cellulase가 *P. capsici*의 세포벽의 분해도 할 수 있었다. 따라서 *B. licheniformis* K11의 배양조건에 따른 항진균성 물질의 생산과 항진균성 cellulase의 활성을 조사 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 PGPR균주로 선발된 *B. licheniformis* K11로써, 식물성장을 촉진하는 auxin과 철이온(Fe^{3+})의 경쟁에서 우위를 선점하기 위해 생산하는 항진균성 siderophore, 및 섬유소를 분해하는 cellulase를 생산하는 세균이다[8]. 항진균성 물질의 생산확인을 위한 대상균주로 토마토 시들음병을 유발하는 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*(KACC 40037)외 6종의 식물병원성진균을 이용하였으며, 사용균주의 상세정보는 Table 1에 나타내었다.

식물병원성 진균의 균사체 성장억제 측정

PGPR균주 *B. licheniformis* K11[8]의 항진균 spectrum을 조사하기 위해 Table 1의 7종의 식물병원성진균을 대상으로 균사체 성장억제능을 조사하였다. 성장억제거리 조사방법은 50% potato dextrose agar(PDA)와 50% nutrient agar를 함유한 평판배지의 우측에 식물병원성 진균들을 6 mm 크기의 disc로 접종하여 28℃에서 48시간 배양 후 4 cm의 간격에 *B. licheniformis* K11을 획선하여 28℃에서 배양하여 서로간의 증식선단까지의 거리를 측정, 비교 하였다.

B. lichniformis K11이 생산하는 항진균성 물질의 조사

B. lichniformis K11이 생산하는 항진균성 물질의 생산을 확인하기위해 균사체 성장억제거리 측정에서 가장 강력히 억제된 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*(KACC 40037)을 대상으로 항진균성 물질을 조사하였다. 항진균성 물질의 곰팡이 성장억제 활성은 건조균체량 측정[24]방법으로 조사하였으며, non-siderophore 항징균성 물질의 생산을 확인하기 위해 많이 이용된 유기용매 분획방법[19]을 사용하였다. 건조균체량을 측정하기 위해서 *B. lichenformis* K11를 nutrient broth에 접종하고 3일간 진탕배양 후 배양상등액을 회수하였으며, 50 ml PDB에 여과한 배양상등액 25 ml를 혼합 후 미리 준비해둔 *F. oxysporium*의 분생포자(conidia) 100 μl를 접종하여 30℃, 4일간 배양하였다. 이 배양액을 Whatman® No. 2에 여과하여 80℃에서 1시간 건조한 후 건조균체량을 측정하였고, 대조군은 nutrient broth를 25 ml 첨가하여 *F. oxysporium*을 배양한 것으로 하여 비교하였다. 추가적으로 균사의 성장을 눈으로 확인하기 위해 여과한 배양상등액 10 ml를 45℃로 식혀둔 15 ml PDA에 혼합하여 고체배지를 만든 후, 6 mm disc 크기의 *F. oxysporium*를 고체배지 중앙에 계대하고 28℃, 4일간 배양한 후 균사체의 성장에 따른 곰팡이 성장억제 활성을 확인하였다. 대조군은 배양상등액 대신 10 ml nutrient broth와 혼합한 고체배지를 사용하였다. 그리고 지금까지 항생물질의 조정제 방법으로 많이 보고된 유기용매 분획방법은 *B. licheniformis* K11의 배양 상등액을 n-butanol과 1 : 1로 교반 후 n-butanol 분획만 모아서 50℃에서 감압 농축하여 조정제액의 항진균성 물질을 얻었다. 그 후 멸균 증류수에 녹인 후 여지 disc를 이용해 항진균성 활성을 확인하였다. 또한 조정제 된 항진균성 물질에서 *B. licheniformis* K11이 생산하는 catechol type의 siderophore의 존재 유무를 확인하기 위해 Arnow assay[1]를 통해 확인하였다.

B. lichniformis K11이 생산하는 cellulase의 기질특이성 조사

Auxin, siderophore, 그리고 cellulase를 동시에 생산하는 균주로 선발된 *B. licheniformis* K11에서 cellulase의 기질 특이성을 조사하기 위해 여러 기질들과 반응하여 효소활성을 확인하였다. Avicel, filter paper(Whatman No. 1), CMC, pNPG, *P. capsici*의 건조 cell wall 등 cellulase의 기질특이성을 확인 할 수 있는 여러 기질들과 반응하여 cellulase의 활성을 확인하였으며, 활성측정 방법은 정 등에서 활용된 방법[2]으로 확인하였다. *P. capsici*의 건조 cell wall은 PDB에서 배양한 *P. capsici*의 균체를 멸균거즈를 이용해 모은 후 멸균 증류수로 2회 세척하였으며, 60℃의 dry oven에서 건조하여 이

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain	KACC	Relevant characterization
Bacillus licheniformis K11	this study	Plant growth promoting and antifungal activity could produce auxin, siderophore, and cellulase.
Alternaria alternata	40019	Alternaria leaf blight disease in red-pepper.
Colletotrichum acutatum	40700	Athracnose disease in red-pepper.
Corynespora cassiicola	40964	Corynespora leaf spot disease in red-pepper.
Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici	40037	Fusarium wilt disease in tomato.
Phytophthora capsici	40483	Phytophthora blight disease in red-pepper.
Rjizoctinia solani AG-1	40101	Damping-off disease in tomato and red-pepper.
Rhizopus stolonifer var. stolonifer	41364	Rhizopus soft rot disease in tomato. Rhizopus fruit rot disease in red-pepper.

용하였다. 효소반응 시 *P. capsici* 기질은 50 mM phosphate buffer (pH 6.0)에 건조된 cell wall을 일정량 넣은 후, Ultraschallprozessor(UP200s, Dr. Hielscher GmbH, Stuttgart)를 이용해 파쇄 후 멸균 증류수와 원심분리기를 이용해 3회 수세하였으며, 침전물을 동일한 buffer에 현탁하여 기질로 이용하였다. 그리고 효소 반응시 효소액으로는 본 균주가 생산하는 cellulase의 조효소액을 사용하였으며, 이는 *B. licheniformis* K11을 nutrient broth에서 30℃에서 72시간 배양 후 배양상등액을 염석과 투석 과정을 거쳐 조제하였다. Cellulase의 활성은 DNS 방법[21]으로 확인하였고, cellulase의 활성도 1 unit는 1분 동안 0.1 μg의 glucose를 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

배양시간, 배양온도, 그리고 pH에 따른 항진균성 물질의 생산 및 cellulase의 활성 확인

배양시간, 배양온도, 그리고 pH에 따른 *B. licheniformis* K11의 항진균성 물질의 생산과 cellulase의 효소활성을 확인하기 위해서, 30℃에서 24시간 배양한 전배양액을 0.1% 농도로 100 ml nutrient broth에 접종하고 10℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃에서 각각 4일 동안 배양하였으며, 배양시간은 4일 동안 매일 배양액을 회수하여 균 생육도와 항진균성 물질과 siderophore의 생산과 cellulase의 활성을 각각 조사하였다. 균 생육도는 흡광도 600 nm에서 확인하였으며, 항진균성 물질의 생산확인은 균체량 측정법[26]으로 cellulase의 활성은 CMC를 기질로 이용하여 DNS방법[21]으로 확인하였고, siderophore의 생산은 Arnow assay방법[1]을 이용하였다. Arnow assay방법 시 표준시약은 Sigma-Aldrich Co., U.S.A. 사의 2,3-dihydroxybenzoic acid를 사용하였다.

탄소원과 질소원에 따른 항진균성 물질 및 cellulase의 활성 확인

탄소원과 질소원의 변화에 따라 *B. licheniformis* K11의 균 생육도와 항진균성 물질과 siderophore의 생산 그리고 cellulase의 활성을 측정하기 위해서 Davis minimal medium (0.7% K_2HPO_4, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% sodium citrate · $2H_2O$, 0.01% $MgSO_4$ · $7H_2O$, 0.1% glucose)중 glucose와 $(NH_4)_2SO_4$ 대신 10가지 탄소원과 16가지의 질소원을 각각 0.1%로 첨가한 Davis minimal medium을 제조하여 30℃에서 4일간 진탕배양 후 위와 동일한 방법으로 균 생육도, 항진균성 물질과 siderophore의 생산, 그리고 cellulase의 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

B. licheniformis K11의 non-siderophore 항진균성 물질의 생산

식물성장 촉진호르몬인 auxin, 식물병원성 진균의 생육을 저해하는 siderophore, 그리고 cellulase를 동시에 생산하는 것으로 분리, 선발된 *B. licheniformis* K11[8]을 여러 식물병원성진균을 대상으로 항진균 spectrum을 조사하였다(Table 2).

Table 2. Antifungal spectrum of *B. licheniformis* K11 against various plant pathogenic fungi

Test fungi		Antifungal activity	
Strain	KACC	Paring culture	Inhibition distance (mm)[1]
Alternaria alternata	40019	+	27.6±0.5[2]
Colletotrichum acutatum	40700	+	18.7±0.4
Corynespora cassiicola	40964	+	22.8±0.6
Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici	40037	+	31.2±0.4
Phytophthora capsici	40483	+	11.7±1.7
Rjizoctinia solani AG-1	40101	+	6.5±0.4
Rhizopus stolonifer var. stolonifer	41364	-	-

+: inhibited, -: non-inhibited.

[1]Distance between the edges of the bacterial agar pices (about 7 mm square) and fungal mycelium on PDA plate after 5 days of incubation at 28℃. The data values are the means from five replication.

[2]STD: standard deviation.

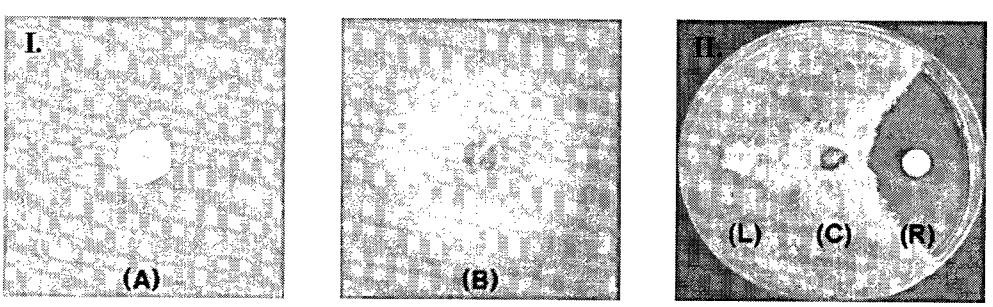

Fig. 1. Mycelial growth inhibition of *Fusarium oxysporum* (C) by *B. licheniformis* K11 on PDA. A: PDB + *B. licheniformis* K11 culture broth. B: PDB (negative control). L: Control (n-butanol). C: *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (KACC 40037). R: Extract from culture broth of *B. licheniformis* K11 with n-butanol.

그 결과 *B. licheniformis* K11균주는 토마토 무름병과 고추 꼭지썩음병을 유발하는 일으키는 *R. stolonifer var. stolonifer* (KACC 41365)균주를 제외하고 6종의 식물병원성진균에 대한 균사 억제능을 확인 할 수 있었고, 가장 강력한 억제능을 보이는 *F. oxysporum*(KACC 40037)을 대상으로 항진균성 물질을 확인 조사하였다. 그 결과 n-butanol 분획에서 siderophore 존재를 확인 할 수 없었지만, 강력한 항진균 활성은 나타내는 항진균성 물질을 확인 할 수 있었다.(Fig. 1). 이는 *B. licheniformis* K11가 항진균성 siderophore 뿐만 아니라 항진균성 물질을 생산하는 것을 의미한다. 그리하여 PGPR균주인 *B. licheniformis* K11는 auxin, siderophore 그리고 cellulase, 뿐만아니라 항진균성 물질도 생산하는 것을 확인하였다. 차후 *B. licheniformis* K11이 생산하는 항진균성 활성물질을 분리, 정제하여 확인할 것이다.

B. licheniformis K11의 항진균성 cellulase의 생산

토양미생물 중 식물병원성 미생물들의 cellulase는 식물뿌리의 cellulose를 분해 후 식물에 침투하여 병원성을 나타낸다는 보고[20]와, PGPR들이 생산하는 cellulase들은 식물 근권에 유익균의 microflora 형성에 좋은 영향을 미친다는 보고[14]도 있다. 이중에서 PGPR균주 *B. licheniformis* K11의 cellulase의 기능을 확인하기 위해 여러 기질들을 대상으로 효소활성을 확인하였다. 그 결과, 가용성 섬유소인 CMC(carboxymethyl-cellulose) 뿐만 아니라 불용성섬유소인 filter paper(Whatman® No. 1), Avicel과 *P. capsici*의 cell wall도 잘 분해하였다(Table 3). 이는 Kumar 등[14]이 보고한 cellulase가 PGPR균들의 근권 형성에 중요한 요인이라는 결과를 뒷받침하며, 세포벽이 cellulose와 glucan등으로 이루어져있는 것으로 알려진 고추역병을 유발하는 *Phytophthora capsici*[11]의 세포벽을 분해하여 방제력을 나타낼 수 있을 것으로 예상된다. 차후 추가적인 실험을 통해 생물방제능을 확인할 것이다.

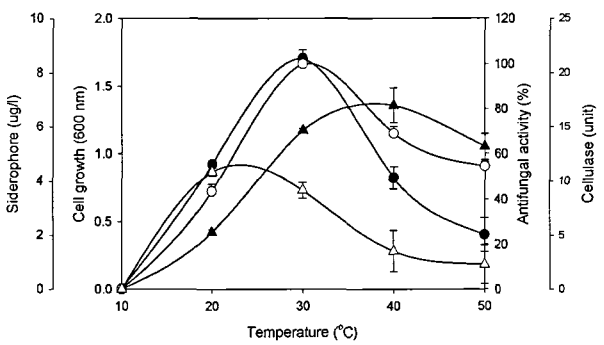

Fig. 2. Effect of temperature on cell growth and production of the antifungal substance and the cellulase of *B. licheniformis* K11. -●-: cell growth, -○-: antifungal activity, -▲-: cellulase, -△-: siderophore.

Table 3. Substrate specificity of the cellulase from *B. licheniformis* K11

Substrates	Relative activity (%)
CMC (carboxymethyl-cellulose)	100
Avicel	39.1±2.5[1]
Filter paper (Whatman® No. 1)	53.3±3.7
Phytophthora capsici cell wall cellulose	42.5±2.6
pNPG (p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside)	no activity

B. licheniformis K11 was cultured in nutrient medium for 72 hr at 30℃. The mixture was subjected to the enzyme assay. The numbers were presented enzymatic capacity as percentage (%) relative to buffer control.
[1]TD : standard deviation.

배양조건에 따른 항진균성 물질의 생산 및 cellulase의 활성 확인

B. licheniformis K11의 온도에 따른 항진균성 물질의 생산을 확인한 결과 30℃에서는 가장 높은 균 생육과 항진균성 활성을 나타내었다. 하지만 항진균성 siderophore는 20℃에서 최대 생산을 나타내었고, cellulase의 활성은 40℃에서 최대를 나타내었다(Fig. 2). 배양시간에 따른 항진균 물질의 생산을 확인한 결과 균 생육과 cellulase, 그리고 siderophore는 72시간 배양 시 최대를 나타내었으나, 항진균성 활성은 96시간 배양 시 최대로 나타났다(Fig. 3). 또한 *B. licheniformis* K11의 pH에 따른 항진균성 물질 및 siderophroe의 생산과 cellulase의 활성을 조사한 결과, pH 7.0에서 최대 균 생육을 나타내었고, 항진균 활성은 pH 8.0에서 가장 높게 나타났다. 하지만 siderophore의 생산은 pH 9.0에서 가장 높았고, cellulase의 최대 활성은 pH 6.0에서 가장 높았다(Fig. 4). 그리고 여러 종류의 탄소원을 첨가하여 확인한 결과 균 생육은 trehalrose, starch, D(+)-maltose, D(+)-galactose 순이었고, 항진균 활성은 starch에서 가장 높았으며, 그 다음으로 D(-)-

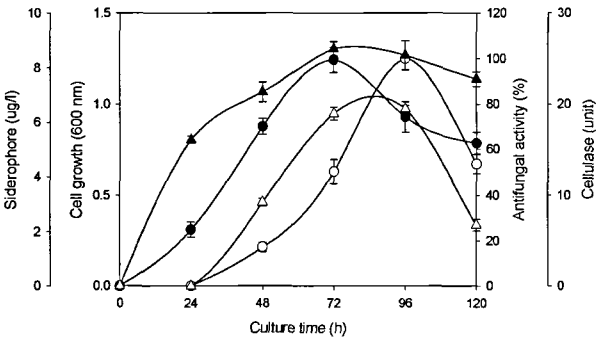

Fig. 3. Effect of time on cell growth and production of the antifungal substance and the cellulase of *B. lichenformis* K11. -●-: cell growth, -○-: antifungal activity, -▲-: cellulase, -△-: siderophore.

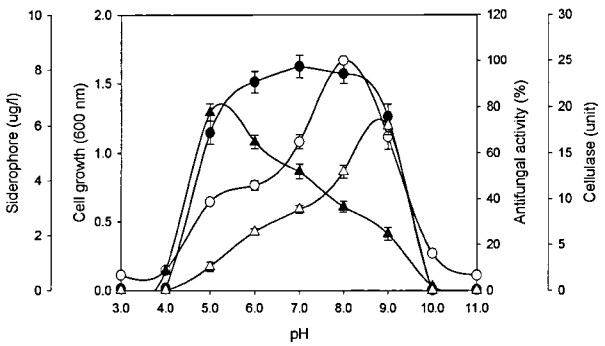

Fig. 4. Effect of pH on cell growth and production of the antifungal substance and the cellulase of *B. lichenformis* K11. -●-: cell growth, -○-: antifungal activity, -▲-: cellulase, -△-: siderophore.

fructose, D(+)-maltose 순이었다. 이에 반해 siderophore는 trehalrose를 첨가시 생산이 가장 높았고, cellulase의 활성은 D(+)-galactose, D(+)-maltose, starch 순이었다(Table 4). 또한 질소원으로 beef extract, tryptone, yeast extract 순으로 균생육이 높았으며, 항진균성 활성은 urea, $NaNO_3$, alanine 순으로 높았지만, siderophore의 생산은 NH_4Cl, KNO_3, urea 순이었다. 그리고 cellulase의 활성은 malt extract, bacto peptone, proteose peptone No. 3 순으로 높았다(Table 5). 지금까지 결과들을 종합해보면 본 균주 *B. licheniformis* K11이 생산하는 항진균성 siderophore를 제외한 또 다른 항진균성 물질이 존재함을 확인할 수 있었으며, 이는 지금까지 알려진 *Bacillus* sp. 들이 생산하는 항생물질로 추정된다[10]. 또한 본 균주의 항진균성 물질의 생산시 첨가된 탄소원과 질소원은 임 등[19]이 보고한 xylose와 proteose peptone No. 3와 윤 등[25]이 보고한 CMC(carboxymethyl-cellulose)와 NH_4Cl의 첨가시 항진균성 활성이 높았다는 보고와는 상이한 결과가 나타났다.

요 약

Auxin, siderophore, 그리고 cellulase를 동시에 생산하는 생물방제균주 *B. licheniformis* K11을 식물병원성진균을 대상으로 균사 성장억제능을 확인결과 6종의 식물병원성 진균에서 균사체 성장억제능을 확인하였으며, 그 중에서 토마토 시들음병을 유발하는 *F. oxysporum*(KACC 40037)에 가장 강력한 억제능을 나타내었다. 그리고 본 균주가 생산하는 항진균성 siderophore이외에 세포벽이 cellulose로 구성된 *P. capsici*의 cell wall을 분해하는 cellulase를 생산하는 것을 추가적으로 확인하였다. 뿐만아니라 *B. licheniformis* K11은 nutrient broth(pH 8.0), 30℃에서 96시간 배양시 토마토 시들음병에 대한 항진균 활성이 가장 높았고, 이는 cellulase의 활성과 sideropore의 최대 생산조건과는 상이하였다. 또한 탄소원과 질소원으로 starch와 urea를 각각 첨가시 항진균성 활성이 가장 높았고, 이 역시는 cellulase의 활성과 항진균성 siderophore의 최대 생산조건과 일치하지 않았다. 그리하여 본 균주 *B. licheniformis* K11은 식물성장촉진 물질은 auxin, 항진균성 siderophore와 cellulase를 생산함과 동시에 또 다른 강력한 항진균성 물질을 생산하는 것을 추가로 확인하였다.

Table 4. Effect of carbon sources for the production of antibiotic and cellulase from *B. licheniformis* K11

Carbon Sources[1]	Cell Growth (600 nm)	Antifungal activity (%)[2]	Cellulase (unit)[3]	Siderophore (μg/ml)[4]
Control[5]	0.124±0.010[6]	100	17.69±0.60	2.54±0.32
Starch	0.478±0.012	**174.1±7.6**	29.72±1.35	2.11±0.18
D(-)-Fructose	0.222±0.019	136.9±1.4	19.32±0.57	4.12±0.32
D(+)-Maltose	0.360±0.019	132.5±6.1	30.59±0.77	2.11±0.17
Trehalrose	**0.694±0.013**	130.5±4.4	23.66±0.49	**7.08±0.48**
Mannose	0.092±0.013	116.7±7.7	21.12±0.68	2.54±0.55
D(+)-Galactose	0.347±0.018	92.8±5.3	**32.53±0.71**	4.44±0.32
Lactose	0.274±0.020	92.2±3.3	21.12±0.48	2.96±0.18
Dextran	0.196±0.008	91.5±6.1	4.96±0.49	4.23±0.48
Sucrose	0.185±0.013	71.9±4.7	19.83±1.13	2.32±0.18
Mannitol	0.167±0.026	71.0±4.3	20.05±1.29	2.97±0.18

[1]Carbon sources (0.1%) were added to the basal medium (0.7% K_2HPO_4, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% Sodium citrate · $2H_2O$, 0.01% $MgSO_4$ · 7H2O).

[2]Antifungal activity (%) = [(control-sample)/(control)] × 100.

[3]One unit will liberate 0.1 μg of glucose from CMC (carboxymethyl-cellulose) for one minute under standard conditions.

[4]The value is the concentration of 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents (μg/l).

[5]Davis minimal medium(0.7% K_2HPO_4, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% sodium citrate · $2H_2O$, 0.01% $MgSO_4$ · $7H_2O$, 0.1% glucose).

[6]STD : standard deviation.

Table 5. Effect of nitrogen sources for the production of antibiotic from *B. licheniformis* K11

Nitrogen Sources[1]	Cell Growth (600 nm)	Antifungal activity (%)[2]	Cellulase (unit)[3]	Siderophore (μg/ml)[4]
Control[5]	0.199±0.004[6]	100	9.77±0.49	1.91±0.52
Urea	0.195±0.008	**166.9±2.4**	7.53±0.49	3.00±0.66
$NaNO_3$	0.389±0.389	160.2±0.8	8.33±0.56	1.00±0.25
Alanine	0.243±0.243	107.8±1.7	9.03±0.43	2.41±0.52
Proteose peptone No. 3	0.254±0.006	98.6±2.9	15.08±0.53	2.66±0.38
$NaNO_2$	0.330±0.010	94.2±0.9	10.08±0.72	1.08±0.14
$(NH_4)_2HPO_4$	0.285±0.012	61.4±4.5	10.65±0.41	1.91±0.52
Bacto peptone	0.364±0.013	87.0±3.5	19.39±0.76	2.66±0.76
NH_4Cl	0.222±0.010	79.9±1.2	9.90±0.48	**3.99±0.90**
KNO_3	0.356±0.010	77.9±4.9	10.70±0.41	3.33±1.44
glutamic acid	0.259±0.009	77.3±1.2	13.42±0.82	0.83±0.29
$NH_4H_2PO_4$	0.175±0.022	70.8±3.2	10.78±0.67	1.41±0.14
L-Asparagine	0.233±0.010	70.1±5.1	9.14±0.39	2.08±0.29
Tryptone	0.492±0.006	60.7±5.5	12.88±0.65	3.41±0.76
Malt extract	0.056±0.006	56.6±3.6	**48.43±0.32**	2.33±0.38
Yeast extract	0.428±0.025	38.4±7.2	13.31±0.42	3.00±0.68
Beef extract	**0.635±0.008**	31.7±2.0	18.15±0.57	2.41±0.54

[1]Nitrogen sources (0.1%) were added to the basal medium (0.7% K_2HPO_4, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% glucose, 0.05% sodium citrate · $2H_2O$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

[2]Antifungal activity (%) = [(control-sample)/(control)] × 100.

[3]One unit will liberate 0.1 μg of glucose from CMC (carboxymethyl-cellulose) for one minute under standard conditions.

[4]The value is the concentration of 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents (μg/l).

[5]Davis minimal medium(0.7% K_2HPO_4, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% sodium citrate · $2H_2O$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% glucose).

[6]STD : standard deviation.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 사업(과제번호: 105649) 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Arnow, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**, 531-537.
2. Chung, Y. C., Y. W. Kim, S. K. Kang, J. S. Rho, J. H. Park and N. K. Sung. 1991. Cloning of thermophilic alkalophilic *Bacillus* sp. F204 cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **23**, 31-36.
3. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microiol.* **41**, 109-117.
4. Glick, B. R., C. L. Patten, G. Patten and D. M. Penrose. 1999. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria.* Imperial College Press. Canada.
5. Han, K. H., C. U. Lee and S. D. Kim. 1999. Antagonistic role of chitinase and antibiotic produces by *Promicromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* **27**, 349-353.
6. Jung, H. K., J. C. Ryoo and S. D. Kim. 2005. A muti-microbial biofungicide for the biological control against several important plant pathogenic fungi. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 40-47.
7. Jung, H. K., J. R. Kim, S. M. Woo and S. D. Kim. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-Producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 94-100.
8. Jung, H. K., J. R. Kim, S. M. Woo and S. D. Kim 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 23-28.
9. Kang, S. J., J. H. Kim and G. J. Joo. 2005. Isolation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* and physicochemical properties of compost mixed with microbial formulation. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **23**, 342-350.
10. Katz, E. and A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41**, 449-474.
11. Kim, S. S, S. W. Kwom, S. Y. Lee, S. J. Kim, B. S. Koo, H. Y. Weon, B. Y. Kim, Y. S. Yeo, Y. H. Lim and S. H. Yoon. 2006. Taxonomy of a soil bacteria YNB54 strain which shows specific antagonistic activities against plant pathogenic *Phytophthora* spp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **34**,

101-108.

12. Kloepper, J. W. and C. M. Ryu. 2006. *Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance*, p. 34-52. In B. Schulz, C. Boyle, and T. N. Sieber (eds.), Microbial Root Endophytes. Spring-verlag, Berlin Heidelberg.
13. Kloepper, J. W., C. M. Ryu and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* **94**, 1259-1266.
14. Kumar, R., J. S. Dahiya, D. Singh and P. Nigam. 2000. Production of endo-1,4-β-glucanase by a biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimu. Bioresour. Technol.* **75**, 95-97.
15. Lee, E. T. and S. D. Kim. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting *Phytophthora capsici. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 334-340.
16. Lee, I. K., C. J. Kim, S. D. Kim and I. D. Yoo. 1990. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper form *Streptomyces parvullus. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 142-147.
17. Lee, J. M., E. S. Do, S. B. Baik and S. C. Chun. 2003. Effect of organic amendments on efficacy of biological control of seedling damping-off of cucumber with several microbial products. *Kor. J. Mycology* **31**, 44-49.
18. Lee, S. Y., S. B. Lee, Y. K. Kim and H. G. Kim. 2004. Effect of agrochemicals on mycelial growth and spore germination of a hyperparasite, *Ampelomyces quisqualis* 94013 for controlling cucumber powdery mildew. *Kor. J. Pesti. Sci.* **8**, 71-78.
19. Lim, J. H., H. K. Jung and S. D. Kim. 2007. An antifungal agent produced by *Bacillus thuringiensis* BK4, an antagonistic bacterium against *Fusarium* wilt disease of tomato. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 18-22.
20. Lim, S. T., Y. Y. Park, S. J. Cho and H. D. Yun. 1997. Phytopathgenicity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and production of CMCase isozymes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 468-476.
21. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
22. Neilands, J. B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* **1**, 9-14.
23. Ping, L. and W. Boland. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis. Trends Pla. Sic.* **9**, 263-266.
24. Woo, S. M., H. K. Jung and S. D. Kim. 2006. Cloning and characterization of a cellulase gene from a plant growth promoting rhizobacterium, *Bacillus subtilis* AH18 against phytophthora blight disease in red-pepper. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 311-317.
25. Yun, G. H., E. T. Lee and S. D. Kim. 2001. Identification and antifungal antagonism of *Chryseomonas luteola* 5042 against *Phytophthora capsici. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 186-193.