

Bacillus subtilis IJ-31에서 Hydrocinnamic Acid 생산을 위한 최적배양조건

주길재¹ · 김영목¹ · 이오석¹ · 김정웅² · 김원찬² · 송경식² · 윤성준³ · 김진호³ · 이인구^{2,*}

¹경북대학교 농업과학기술연구소, ²경북대학교 농화학과, ³상주대학교 식물자원학과

Optimization of Culture Condition for the Hydrocinnamic Acid Production from *Bacillus subtilis* IJ-31

Gil-Jae Joo¹, Young-Mog Kim¹, Oh-Seuk Lee¹, Joung-Woong Kim², Won-Chan Kim²,
Kyung-Sik Song², Sung-Joon-Yoon³, Jin-Ho Kim³ and In-Koo Rhee^{2,*}

¹Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Department of Plant Resources, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

Received June 2, 2005; Accepted August 8, 2005

The metabolites released from cultures of rhizosphere bacteria can inhibit plant growth. *Bacillus subtilis* IJ-31 inhibited plant growth by the production of hydrocinnamic acid (HCA). The production of HCA by plant-growth inhibiting rhizobacterium *B. subtilis* IJ-31 was optimized. 90.5 µg/ml of HCA was obtained under the condition of 1% rice bran as carbon source, 0.5% tryptone as nitrogen source, 0.1% ZnCl₂ as metal source at 37°C for 60 h (pH 7.0). The optimal condition for the HCA production by *B. subtilis* IJ-31 in the jar fermenter was established using response surface methodology (RSM) of statistical analysis system(SAS) program. The production of HCA by *B. subtilis* IJ-31 in the jar fermenter culture reached 102.99 µg/ml when 2.24% soil extracts was added and agitation speed was 290 rpm under the same condition. And the experimental value of HCA production is 102.5 µg/ml in the same culture condition. The production of HCA by *B. subtilis* IJ-31 is higher as 12% than that from the flask culture.

Key words: plant-growth inhibiting rhizobacterium, optimization of production, hydrocinnamic acid, *Bacillus subtilis*

서 론

토양에 서식하는 수많은 미생물들은 식물의 성장에 직·간접적으로 영향을 주는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이들 미생물들 중에는 작물의 생육을 억제시키는 유해근권미생물(DRB, deleterious rhizobacteria)과 작물생육을 촉진시키는 근권생균(PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria)로 구분되며,^{3,4)} 이러한 PGPR 및 DRB는 뿌리삼출액에 의한 주화성, 무기원소와 수분의 흡수개선, 식물호르몬의 변화, 전체 뿌리시스템의 개선과 뿌리의 막 전위 감소 등에 관여하여 작물의 생육을 촉진하거나 억제시키는 것으로 알려져 있다.^{3,5-8)} DRB에 의한 식물생육억제는 DRB의 배양액으로부터 방출되는 휘발성 대사산물인 phytotoxin에 의해 일어날 수도 있으며,⁹⁾ Bakker와 Schippers (1987)는 근권미생물이 생산하는 cyanide가 감자 연작 토양에

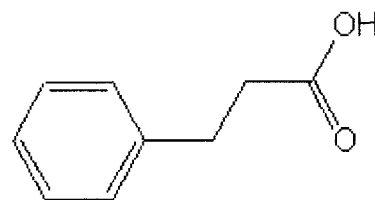


Fig. 1. Structure of hydrocinnamic acid (HCA).

재배한 감자의 생육을 억제시키는 원인이 된다고 하였다. 한편 본 연구팀에서는 *Bacillus subtilis* IJ-31로부터 식물생장저해물질로 indole-3-acetic acid(IAA)와 indole-3-propionic acid(IPA)¹¹⁾ 및 hydrocinnamic acid(HCA)¹²⁾를 분리, 동정하여 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 *Bacillus subtilis* IJ-31이 생산하는 작물생육억제물질인 HCA의 최적생산조건 및 대량배양조건을 확립하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양. *Bacillus subtilis* IJ-31¹¹⁻¹²⁾은 작물생육억제물질

*Corresponding author

Phone: +82-53-950-5718; Fax: +82-53-953-6972

E-mail: ikrhee@knu.ac.kr

인 HCA를 생산하는 미생물로서 tryptic soy broth(TSB; Merck Co., Germany)배지에 37°C에서 2일간 진탕배양한 후 배양액과 살균된 20% glycerol을 1:1 동량 혼합하고 잘 섞은 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

HCA의 HPLC 분석조건. *B. subtilis* IJ-31이 생산하는 HCA를 분석하기 위한 HPLC 분석조건으로 기기는 HPLC 600 controller(Waters, Milford, MA, USA), column은 Eclipse XDB-C18(4.6×150 mm), mobile phase는 (A) 1% HOAc(물 용해), (B) 1% HOAc(MeOH 용해), linear gradient(initial 0% final 100% MeOH×60 min), 유속은 0.8 ml/min, 검출기는 UV 254 nm(996 photodiode array detector)를 사용하였다. HCA의 표준품은 4-hydroxycinnamic acid(F.W. 164.16, Aldrich Chemical Co. Inc., USA)를 사용하였다.

HCA의 최적 생산을 위한 탄소원의 영향. *B. subtilis* IJ-31의 HCA 생산을 위한 탄소원의 영향을 조사하기 위해 최소배지(yeast extract 0.3%, Na₂HPO₄ 0.5%, MgCl₂ 0.1%, soil extract 1%(v/v), pH 7.0)에 glucose를 포함하여 fructose, 전분, 당밀, 흑설탕, oatmeal, 쌀겨, 깨묵, 왕겨, 비지 등 10종의 탄소원을 1.0%씩 각각 첨가하여 37°C, 72시간 동안 rotary shaker(180 rpm)에서 균을 배양한 후 원심분리(7,000×g, 4°C, 20 min)하여 얻은 배양 상정액을 0.22 μm membrane filter로 무균여과하고 상기와 같은 HPLC 분석법에 따라 HCA의 생산량을 조사하였다.

질소원의 영향. 최소배지에서 상기 최적 탄소원을 넣어 준 후 yeast extract, peptone, tryptone, corn steep liquor, CO(NH₂)₂, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, 및 KNO₃ 등 각종 질소원을 0.5%씩 첨가하여 37°C에서 3일간 균을 배양한 후 탄소원의 경우와 동일한 방법으로 HCA의 생산량을 조사하였다.

무기염의 영향. 최소배지에서 무기염을 제외시키고 앞에서 결정한 탄소원과 질소원을 최적농도로 첨가한 후 BaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, HgCl₂, CuSO₄, FeCl₃, CaCl₂ 등 8종의 무기염을 0.1% 농도로 넣고 상기와 같은 방법과 동일하게 HCA의 생산에 미치는 무기염의 종류 및 농도의 영향을 조사하였다.

배양 온도 및 초기 pH의 영향. HCA의 생산에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도(30, 32, 35, 37, 40, 45°C)를 달리하여 배양한 다음 배양 상정액으로부터 무균 여과

액을 조제하여 HCA의 생산량을 조사하였다.

B. subtilis IJ-31이 HCA 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 상기 최적배지를 1 N NaOH와 1 N HCl로 pH 5-8로 0.5 단위로 조정하고 배양한 후 각각의 배양 상정액으로부터 회수한 무균여과액에 존재하는 HCA의 함량을 HPLC로 조사하였다.

배양 시간의 영향. 배양시간에 따른 균 생육도를 조사하기 위하여 상기 최적배지를 최적 pH로 조정된 후 종균을 1% 접종하고 최적온도에서 진탕 배양하면서 3시간 간격으로 배양액을 회수하고 원심분리(7,000×g, 4°C, 20 min)하여 얻은 배양 상정액을 0.22 μm membrane filter로 무균여과한 다음 HCA의 함량을 HPLC로 조사하였다.

단백질 및 균체량 측정. 균체량의 측정은 배양액 1 ml를 원심분리하여 집균하고 증류수로 2회 세척한 다음 증류수로 현탁하여 0.5 ml로 만든다. 이 균체 현탁액 0.5 ml와 2 N-NaOH 0.5 ml를 넣고 100°C에서 30분간 가열하여 균체 단백질을 추출한다. 이 추출액을 원심분리한 후 소의 혈청 알부민을 표준 단백질로 하여 Bradford법¹³⁾에 따라 상정액의 단백질 함량을 측정하여 배양액 m/당 단백질의 함량을 상대적인 균체량으로 나타내었다.

대량생산을 위한 반응표면 중심합성 프로그램 응용. Jar fermenter 배양에서 HCA 생산 최적화를 확립하기 위하여 SAS(statistical analysis system)의 RSM(response surface methodology, 반응표면 분석법, Mayer, 1976) 프로그램을 사용하였다. 반응표면 분석법의 최적반응(optimum response)은 효소 생산에 큰 영향을 미치게 하는 요인변수(독립변수)를 설정한 후 실험수준마다 반응변수의 값(효소활성)을 얻으면, 이 값들이 곧 반응표면을 형성하게 되고 반응표면은 이차식(근사식)을 유도하여 적합하면 독립변수의 최적조건(optimum conditions)을 찾을 수 있을 것이다. 200 l 용량 jar fermenter에 100 l 배지를 넣고 RSM에 따라 3가지 변수 요인으로 X₁, 토양추출물 0%, 1%, 2%; X₂, tryptone 0.5%, 1%, 1.5%; X₃, 교반속도 100, 200, 300 rpm으로 하고 시험계획에 따라 HCA를 생산한 후 최적 배양조건을 확립하였다. 본 실험에서 이용한 중심합성 계획은 Table 1에서 보는 바와 같이 표준화된 값을 사용하였고, 그 값은 측정 단위

Table 1. Hydroxycinnamic acid production by *Bacillus subtilis* IJ-31 under different conditions based on central composite designed for response surface analysis

Exp. No. ¹⁾	Soil extract (%)	Agitation speed (rpm)	Tryptone (%)	HCA production (μg/ml broth)
1	1 (-1)	100 (-1)	0.5 (-1)	91.2
2	1 (-1)	100 (-1)	1.5 (1)	96.3
3	1 (-1)	300 (1)	0.5 (-1)	93.8
4	1 (-1)	300 (1)	1.5 (1)	96.3
5	3 (1)	100 (-1)	0.5 (-1)	94.8
6	3 (1)	100 (-1)	1.5 (1)	96.6
7	3 (1)	300 (1)	0.5 (-1)	102.4
8	3 (1)	300 (1)	1.5 (1)	97.8
9	2 (0)	200 (0)	1.0 (0)	102.1
10	2 (0)	200 (0)	1.0 (0)	100.2

¹⁾The number indicates different experimental conditions by central composite design. The basic medium is composed of 1% rice bran and 0.1% ZnCl₂ per 100 l at pH 7.0. The cells were cultivated in 200 l jar fermenter at 37°C for 72 h.

가 다른 변수들과 동등한 비교가 가능하도록 해주었다. pH는 HCA 생산에 큰 영향을 주지 않았기 때문에 자동 pH 조절장치로 pH 7.0으로 고정하여 요인 변수에 포함시키지 않았다. 요인 변수로 먼저 토양추출물의 농도로 상기 jar fermenter 배양에서 토양추출물의 농도를 증가시키므로써 HCA 생산이 증가할 것으로 예상하고 1, 2, 3% 단위로 3구간 설정하였으며, 교반속도를 변수로 설정하였다. 이는 작물생육억제미생물 *B. subtilis* IJ-31 균주가 호기성이며 플라스크 배양에도 플라스크 내벽에 저항장치(baffle plate)가 달린 플라스크에서 HCA의 생산이 우수하였기에 요인 실험에 포함하였고 예비실험을 통하여 확인 하였다. 질소원인 tryptone의 함량은 0.5, 1, 1.5%로 3구간 설정하였다.

HCA에 의한 상추의 생육도 조사. HCA에 의한 상추의 생육도를 조사하기 위해 Petri dish(ϕ 150×25 mm)에 여과지를 깔고 멸균증류수 또는 시판 표준 HCA 용액 또는 *B. subtilis* IJ-31 배양액(유기용매 EtOAc 분획 부분을 농축하여 HCA 함유량으로 계산)을 각각 6 ml은 후 상추씨 400개를 넣어 24°C, 24시간 광조건 하에서 발아 재배하였다. HCA 용액 및 *B. subtilis* IJ-31 배양액 유기용매 분획분(E_2)은 1, 10, 50, 100 ppm의 농도로 sample을 준비하였다. 대조구는 멸균증류수 6 ml 넣은 Petri dish로 하였고 4일간 배양후 근장과 초장을 측정하여 생육도를 조사하였다.

결과 및 고찰

플라스크 배양에서의 최적 Hydrocinnamic acid 생산조건. *B. subtilis* IJ-31에 의한 HCA 최적 배지조건을 검토하기 위하여 최소배지에 포도당 및 과당 등을 첨가하여 배양한 후 HCA 생산량을 조사한 결과, 전분, 비지, 쌀겨에서 비교적 높은 생산량을 나타내 보였으나 쌀겨를 첨가한 경우에서 70.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 HCA를 가장 많이 생산하였다. 최소배지에 탄소원으로 1% 쌀겨를 넣어준 후 각 질소원을 0.5%가 되게 첨가하여 배양한 후 HCA 생산량을 조사한 결과, 0.5% tryptone을 첨가한 경우 HCA 생산량(83.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 가장 많이 생산되었다. *B. subtilis* IJ-31의 HCA 생산에 미치는 금속염의 효과를 조사한 결과, MnCl_2 와 ZnCl_2 를 가한 경우 각각 90.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 90.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 HCA 생산성이 높았다. *B. subtilis* IJ-31을 각 온도에서 72시간

배양한 후 HCA 생산량을 조사한 결과, 37°C에서 배양하였을 때 가장 많은 HCA(90.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 생산하였다. *B. subtilis* IJ-31의 HCA 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사한 결과, pH 7.0 이나 pH 7.5에서 HCA 생산량이 가장 높았다. 배양시간에 따라 *B. subtilis* IJ-31에 의한 HCA 생산을 조사한 결과, 균체 성장은 30시간 내에 최고에 달했으나 HCA는 60시간 배양에서 생산량이 최고치에 도달하여 90시간까지 그 생산량을 유지 하였다.

이상의 결과를 정리하면 작물생육억제 미생물 *B. subtilis* IJ-31이 생산하는 HCA의 최적생산조건은 탄소원으로는 1%의 미강(쌀겨), 질소원으로는 0.5% tryptone, 무기염으로는 0.1% ZnCl_2 , 배양 온도는 37°C, 배양시간은 60시간, pH는 7.0에서 1%의 토양추출물을 첨가하여 배양할 경우 약 90.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HCA를 생산하여 최적생산조건으로 조사되었다.

RSM에 의한 HCA의 대량생산 최적화. 반응표면중심합성(RSM)의 실험계획에 따라 HCA 생산 최적화 요인실험을 행한 결과, HCA 생산량의 변화는 Table 1과 같이 나타났기에 HCA 생산량을 반응표면 분석법에 적용시켜 분석하였다. Table 2에서와 같이 회귀계수를 산출하였고 따라서 *B. subtilis* IJ-31의 HCA 생산은 토양추출물, 교반속도, tryptone의 농도 등 세 가지 조건 중에서 토양추출물의 함량에 가장 큰 영향을 받는 것으로 나타났으며, 반응표면 2차 회귀 모형식을 구하였다. HCA생산량의 변화에 대한 회귀식의 결정계수(R^2)는 0.9688이었다. 즉, 결정계수는 가정된 모형이 자료에 얼마나 잘 맞는지를 수량화한 통계량으로 1에 근접할수록 반응모형이 자료에 적합함을 확인하는 수치이다. 따라서 Table 3에서와 같이 토양추출물 2.24%, 교반속도 290 rpm, tryptone 0.83%를 첨가하고 배양 온도는 37°C, 배양시간은 60시간, pH는 7.0에서 102.99 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HCA를 생산하는 최적생산조건으로 예측되었다. 따라서 실제 상기 RSM 최적 조건에서 실험한 결과 HCA는 102.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 생산하였다. 이러한 결과는 플라스크에서 HCA는 90.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 생산되었으나 jar fermenter배양에서는 플라스크 배양에 비하여 12%가량 HCA 생산량이 증가된 결과를 보여주고 있다.

***B. subtilis* IJ-31 배양액 및 HCA에 의한 상추의 뿌리 및 지상부 생육억제.** *B. subtilis* IJ-31은 또한 전보(Lee 등, 2004)에서 2% peptone, 0.25% glucose, 0.5% NaCl, 0.25% K_2HPO_4

Table 2. Polynomial equations calculated by RSM program for HCA production

Response	Polynomial equations ¹⁾	R ²	Significance
HCA production	$Y=67.000000+10.900000X_1+0.021250X_2+22.800000X_3-0.022500X_1X_2-2.600000X_1X_3+0.007750X_2X_3-5.000000X_3^2$	0.9688	0.1050

¹⁾ X_1 : Soil extract (%), X_2 : agitation speed (rpm), X_3 : tryptone (%).

Table 3. Estimated level of optimum preparation conditions for HCA production

Item	Soil extract (%)	Agitation speed (rpm)	Tryptone (%)	HCA production ($\mu\text{g}/\text{ml}$ broth)
Predicted value	2.24	291.12	0.83	102.99
Experimental value	2.24	290.00	0.83	102.50

The basic medium is composed of 1% rice bran and 0.1% ZnCl_2 per 100 l at pH 7.0. The cells were cultivated in 200 l jar fermenter at 37°C for 72 h.

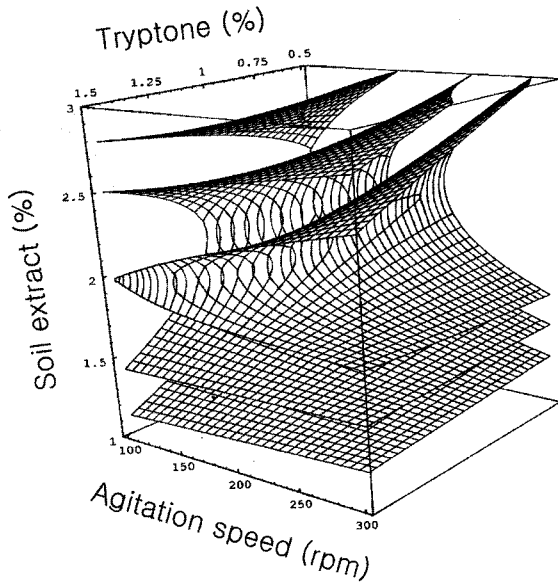


Fig. 2. Response surface for HCA production in 200l jar fermenter. X_1 : Soil extract (%), X_2 : agitation speed (rpm), X_3 : tryptone (%).

(pH 7.0)로 구성된 배지에서 공기주입량 10 vvm, 교반속도 30 rpm, 배양온도 30°C, 배양시간 72시간의 조건에서 배양한 액내에 IPA를 47.55 mg/l, IAA를 34.86 mg/l 생산하였다. 따라서 *B. subtilis* IJ-31의 배양액 내에는 IPA, IAA, HCA 등이 존재하며, 미생물 배양액 및 HCA가 실제 상추의 뿌리 및 지상부 생육도에 미치는 영향을 조사하였다.

B. subtilis IJ-31 배양액 및 HCA에 의한 상추 성장 저해 활성을 측정된 결과, Fig. 3과 같이 *B. subtilis* IJ-31 배양액 유기용매 분획분(E2)은 상추의 근장을 50 ppm과 100 ppm에서는 각각 65, 78% 정도 저해하였고 10 ppm 농도에서는 57% 정도 저해하였다. 초장에 대하여는 거의 활성을 나타내지 못하였다. 마찬가지로 HCA는 상추의 근장을 50 ppm과 100 ppm에서는 각각 68, 80% 정도 저해하였고 10 ppm 농도에서는 59% 정도 저해하였고, 초장에 대하여는 거의 활성을 나타내지 못하였다.

작물의 생육을 억제시키는 해로운 근권 미생물(DRB)에 의한 작물의 생육 억제 메카니즘 중 phytohormones을 생산하여 작물 생육에 영향을 줄 수 있음이 보고되어 있다.⁹⁾ HCA는 antioxidant¹⁶⁾로 잘 알려져 있으며, *B. subtilis* IJ-31이 생산하는 HCA는 대두성장저해물질¹²⁾로 보고되었다. 또한 *Pseudomonas* sp.에 의해 생산된 IAA는 사탕수수 뿌리의 생육을 억제하는 반면에, IAA가 생산 되지 않는 변이주는 뿌리 생육이 감소되지 않았다는 연구 결과가 보고되었으며,¹⁷⁾ 일반적으로 IAA는 식물 성장 촉진물질로써 알려져 있으나 외부에서 제공된 IAA는 줄기의 성장을 촉진시키지만, 뿌리의 생장은 억제한다고 알려져 있다.¹⁷⁾

따라서 *B. subtilis* IJ-31 배양액에는 IPA는 47.55 mg/l, IAA는 34.86 mg/l 함유되어 있으며¹²⁾, HCA는 102.99 mg/l 함유되어 있어 *B. subtilis* IJ-31의 배양액에 의해 상추 근장의 생육이 저해가 일어난 것으로 판단된다.

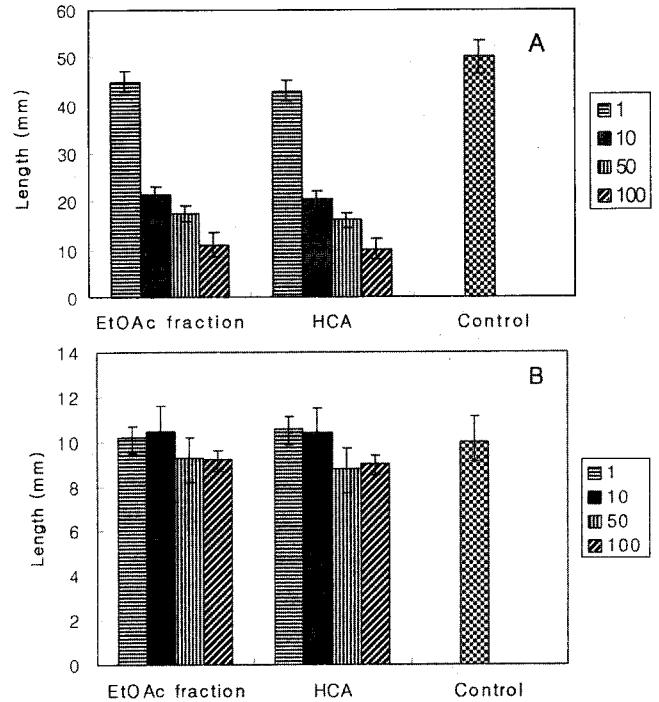


Fig. 3. Inhibitory activity of hydrocinnamic acid on the root and shoot growth of lettuce seedlings. A, inhibitory activity on the root growth; B, inhibitory activity on the shoot growth; Control, administration of sterile dH_2O instead of Con. Broth and HCA; EtOAc Fraction, ethyl acetate fraction of *B. subtilis* IJ-31 culture broth; HCA, hydrocinnamic acid; Numbers in the symbols of the left box of Fig. 3, concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of EtOAc fraction and HCA.

초 록

본 연구에서는 식물생장억제미생물 *B. subtilis* IJ-31이 생산하는 HCA의 최적생산조건을 검토하였다. HCA생산 최적조건으로 탄소원은 1%의 미강, 질소원은 0.5% tryptone, 무기염은 0.1% ZnCl_2 , 배양 온도는 37°C, 배양시간은 60시간, pH는 7.0에서 90.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HCA를 생산하였으므로 이를 최적생산조건으로 확립하였다. 이를 바탕으로 통계프로그램(SAS) 중 반응표면 분석법(RSM)을 이용한 jar fermentor 배양에서의 HCA 최적생산 조건을 확립하였다. 즉 토양추출물 2.24% 첨가, 교반속도 290 ppm, tryptone 0.83% 첨가, 배양온도 37°C, 배양시간 60시간, pH 7.0에서 102.99 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HCA를 생산하는 최적생산 조건으로 예측되었다. 따라서 실제 상추 RSM 최적 조건에서 실험한 결과 HCA는 102.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 생산하였다. 이러한 결과는 플라스크에서 HCA는 90.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 생산되었으나 jar fermentor 배양에서는 플라스크 배양에 비하여 12%가량 HCA 생산량이 증가된 결과를 보여주는 것이다.

Key words: 작물생육억제미생물, 생산최적화, hydrocinnamic acid, *Bacillus subtilis*

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21(과제번호 20050301-034-

430-118-01-00)에 의해 수행된 과제로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Schroth, M. N. and Hancock, J. G. (1982) Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* **216**, 1367-1381.
- Gross, D. and Parthier, B. (1994) Novel natural substances acting in plant growth regulation. *J. Plant Growth Regul.* **13**, 94-114.
- Kloepper, J. W. (1993) In *Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents*. F. B. J. Metting (ed), Soil Microbial Ecology, P. 255-274 Marcel Dekker, New York, NY.
- Schippers, A. B., Bakker, A. W. and Bakker, P. A. H. M. (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**, 339-358.
- Schroth, M. N. and Hilderbrand, D. C. (1964) Influence of plant exudates on root-infecting fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* **2**, 101-132.
- Cook, R. J. and Baker, K. F. (1983) In *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. APS Press, St. Paul, MN.
- Weller, D. M. (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**, 379-407.
- Glick, B. R. (1995) the enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**, 109-117.
- Alstrom, S. and Burns, R. G. (1989) Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biol. Fertil. Soils* **7**, 232-238.
- Bakker, A. W. and Schippers, B. (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* **19**, 451-457.
- Lee, H. J., Kim, W. C., Jeon, S. Y., Kim, J. W., Joo, G. J., Rhee, I. K. and Song, K. S. (2003) Growth inhibitors of soybean seedling from *Bacillus* sp. IJ-31. *Agri. Chem. Biotechnol.* **46**, 100-104.
- Lee, H. J., Jeon, S. Y., Kim, J. Y., Kim, S. I., Kim, W. C., Joo, G. J., Rhee, I. K. and Song, K. S. (2004) Effect of plant growth inhibition by hydrocinnamic acid from *Bacillus* sp. IJ-31 and it's homologues. Biogreen 21, workshop. K-7. Cheonan Sangrok Resort. Cheonan.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- SAS. In *User's Guide: Statistic*, Version 6. (1989) SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Myers, R. H. and Montgomery D. C. (2002) In *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments* (2nd ed.), Wiley, New York.
- Rice-Evans, C., Miller, N. and Pagana, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933-956.
- Aastroem, B. (1991) Role of bacterial cyanide production in differential reaction of plant cultivars to deleterious rhizosphere Pseudomonads. *Plant Soil* **133**, 93-100.