

## 다기능 PGPR균주 *Bacillus licheniformis* K11이 생산하는 항진균성 Siderophore의 정제와 특성

우상민 · 우재욱 · 김상달\*  
영남대학교 응용미생물학과

**Purification and Characterization of the Siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a Multi-functional Plant Growth Promoting Rhizobacterium.** Woo, Sang-Min, Jae Uk Woo, and Sang-Dal Kim\*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 721-749, Korea - Previously, we isolated plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Bacillus licheniformis* K11 which could produce auxin, cellulase and siderophore. The siderophore of *B. licheniformis* K11 (siderophore<sub>K11</sub>) was determined to be a catechol type siderophore which is produced generally by *Bacillus* spp. *B. licheniformis* K11 could produce the siderophore most highly after 96 h of incubation under nutrient broth at 20°C with initial pH 9.0. For the production of the siderophore<sub>K11</sub>, trehalose and NH<sub>4</sub>Cl were the best carbon and nitrogen sources in Davis minimal medium, respectively. The siderophore<sub>K11</sub> was produced in M9 medium (pH 9.0) after 4 days at 20°C, and purified from culture broth of *B. licheniformis* K11 by using Amberlite XAD-2, Sephadex LH-20 column chromatography, and reversed-phase HPLC. The siderophore<sub>K11</sub> had the biocontrol activity against spore germination of *P. capsici* and *F. oxysporum* on potato dextrose agar (PDA). The results indicate that the siderophore<sub>K11</sub> is an antifungal mechanism of *B. licheniformis* K11 against phytopathogenic fungi.

**Key words:** PGPR (plant growth promoting rhizobacterium), siderophore, catechol type, *Bacillus licheniformis* K11

### 서 론

길항미생물을 이용하여 식물의 질병을 방제하는 생물학적 방제는 친환경 농업의 가장 중요하고 중심에 있는 기술로, 그 연구는 1980년대부터 인삼 뿌리썩음병 방제연구를 시작으로 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔고, 일부 농업현장에서 점차 이용되기 시작하고 있다. 유용 토착미생물을 분리, 선별하여 미생물제제로 활용하는 환경친화적인 미생물 농업은 최근 국민들의 소득향상으로 인한 친환경 농산물의 소비가 급증하고 있어 농가에서 사용이 증가하고 있는 추세이다. 미생물제제에 의한 생물방제 기작으로 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 용균작용[10, 24, 31]과 *Bacillus* sp.[17, 22], *Penicillium* sp.[4], *Pseudomonas* sp.[1, 18], *Streptomyces* sp.[9, 30] 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용, 식물병원균에 기생하면서 식물에 대한 진균의 병원성을 억제하는 기생작용[21], 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용[13, 26, 27, 29], 마지막으로 미생물이 식물의 면역기능을 활성화하여 병에 대한 저항성을 유도하는 유도저항성

작용[20] 등을 들 수 있다. 최근에는 식물성장촉진능과 식물병원성 진균의 방제능을 동시에 가지는 PGPR(plant growth promoting rhizobacterium)균주에 대한 연구의 필요성이 대두되어 그 연구가 활발히 진행되고 있다[13, 14].

Siderophore는 철이온( $Fe^{3+}$ )과 친화성이 높은 가용성이며 저분자(1.0 kDa 미만)인 2차 대사산물로 많은 미생물들이 이 물질을 생산한 후 철수송계(high-affinity iron-transport system)를 이용해 토양환경 내 철이온( $Fe^{3+}$ )을 흡수하여 생육에 이용한다[28]. 그리하여 많은 미생물들이 철이온( $Fe^{3+}$ )의 경쟁에서 우위를 선점하기위해 경쟁적으로 siderophore를 생산한다. 이런 siderophore에는 catechol type과 hydroxamate type으로 크게 2종류로 분류된다. Catechol type의 siderophore에는 enterobactin, parabactin, agrobactin, anguibactin, vibriovactin, azotochelin 등이 있으며, hydroxamate type에는 ferrichrome, ferrioxamine, coprogen, nocardamine 등이 있다. 최근에는 citrate-hydroxamate type의 arthrobactin, aerobactin, schizokinen과 quinoline type의 pseudobactin, pyoverdin 등이 보고되었다[8, 11, 28]. 미생물에 의한 siderophore의 생산은 철이온( $Fe^{3+}$ )의 경쟁으로 인해 타 미생물의 생육이 억제되기도 하며, siderophore를 생산하는 미생물을 이용해 생물방제에 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[13, 15, 16, 18, 19, 23, 25].

따라서 본 연구에서는 식물성장 촉진물질인 auxin과 식물

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

병원성 진균의 생육을 억제하는 siderophore 그리고 세포벽이 cellulose로 구성된 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 cellulase를 동시에 생산하는 plant growth promoting rhizobacterium(PGPR)균주로 선발된 *Bacillus licheniformis* K11[14]에 의해 생산되는 siderophore를 정제하고, 정제된 siderophore에 의한 여러 가지 식물병원성 진균의 생육을 억제할 수 있는 항진균 특성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 siderophore type 확인

본 연구에 사용된 균주는 식물성장 촉진 호르몬인 auxin과 식물병원성 진균의 생육을 억제하는 siderophore 그리고 cellulase를 생산하는 *B. licheniformis* K11 균주이다[14]. *B. licheniformis* K11이 생산하는 siderophore의 type의 확인은 Arnow assay[2]와 Csaky assay[7]로 catechol type과 hydroxamate type을 확인하였다. Arnow assay 방법[2]은 *B. licheniformis* K11의 균체를 제거한 배양상등액 1 ml에 0.5 N HCl 1 ml, nitrite-molybdate reagent 1 ml를 첨가 후 1 M NaOH 1 ml를 첨가하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Csaky assay방법[7] 역시 균체를 제거한 배양상등액 1 ml에 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml를 첨가하여 130°C에서 6 h 동안 가수분해하였으며, 여기에 3 ml sodium acetate solution, 1 ml의 sulfanilic acid solution, 0.5 ml iodine solution를 각각 첨가하여 3~5분 후 1 ml sodium arsenite solution, 1 ml  $\alpha$ -naphthylamine solution을 첨가하고 마지막으로 10 ml의 증류수를 첨가하여 2(1~30분 반응 후 526 nm에서 흡광도를 측정하였다. Arnow assay와 Csaky assay 측정 시 표준시약은 Sigma-Aldrich Co., U.S.A. 사의 2,3-dihydroxybenzoic acid와 hydroxylamine-HCl를 각각 사용하였다.

### Siderophore의 생산을 위한 *B. licheniformis* K11 배양 조건 확인

*B. licheniformis* K11을 5 ml nutrient broth에 접종하고 30°C에서 24 h 배양한 전배양액을 100 ml nutrient broth에 0.1%(v/v) 농도로 접종하여 10~50°C까지 10°C 간격으로 4일간 배양하였고, 배양시간은 24 h 간격으로 5일 동안 배양하였다. 그리고 배지의 pH를 3.0~11.0의 범위로 적정된 nutrient broth에서 4일간 배양 후 균 생육과 siderophore의 생산을 확인하였다. 균 생육은 spectrophotometer로 600 nm에서 측정하였으며, siderophore의 생산은 Arnow assay[2]를 통해 확인하였다. Siderophore의 정량을 위한 표준시약은 2,3-dihydroxybenzoic acid를 사용하였다. 그리고 탄소원과 질소원에 따른 *B. licheniformis* K11의 균 생육과 siderophore의 생산을 조사하기 위해서 Davis minimal medium(0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1%

glucose)중 glucose와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 대신 10가지 탄소원과 16가지의 질소원을 각각 0.1%로 첨가한 Davis minimal medium 100 ml에 전배양한 *B. licheniformis* K11을 0.1%로 접종한 후, 30°C에서 4일간 진탕배양 후 위와 동일한 방법으로 균 생육도와 siderophore 생산을 측정하였다.

### *B. licheniformis* K11이 생산하는 siderophore의 정제

*B. licheniformis* K11이 생산하는 siderophore를 정제하기 위해서 M9 minimal medium(5X M9 salts(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6.4%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15%, NaCl 0.25%, NH<sub>4</sub>Cl 0.5%) 200 ml, 1M MgSO<sub>4</sub> 2 ml, 20% glucose 20 ml, 1M CaCl<sub>2</sub> 0.1 ml, total 1 L)를 pH 9.0으로 조정하여 20°C에서 4일 동안 배양 후 4°C, 6000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 균체를 제거하였다. 상등액에 6 N HCl을 첨가하여 pH를 2.5로 조정한 후 4°C 냉장고에 24 h 정치하여 침전시켰다. 그리고 정치시켜둔 상등액을 원심분리하여 침전물을 제거하고, 상등액만 회수하여 XAD-2 column에 흡착시키고 column의 5배의 0.1 N HCl로 씻었다. 그 후 100% MeOH를 이용해 siderophore를 녹여냈다. 녹여낸 MeOH는 감압농축하여 MeOH를 제거하고 소량의 MeOH를 넣어 siderophore를 추출하였다. 추출한 siderophore는 sephadex LH-20 column chromatography에서 2회 분리하였으며, 활성부위를 HPLC(C<sub>18</sub> reversed-phase column, elution with methanol-0.1% phosphoric acid 1:1, flow rate: 2 ml/min)를 통해 확인하였다[30].

### Siderophore<sub>K11</sub>의 식물병원성진균에 대한 방제력 확인

Siderophore<sub>K11</sub>의 활성 확인은 *Phytophthora capsici*의 포자(zoospores)와 *Fusarium oxysporum*의 포자(conidia)를 대상으로 발아 억제를 관찰 확인하였다. *P. capsici*의 zoospores는 윤 등의 방법[31]으로 포자를 회수하였다. *F. oxysporum*의 conidia의 회수는 potato dextrose broth(PDB)에 *F. oxysporum*을 접종하여 7일간 배양 후 기균사를 멸균거즈와 filter paper No. 1로 제거하여, 걸러진 액에서 포자를 회수하였다. 회수된 포자를 혈구계산기(Haemocytometer)로 확인 후 500 spore를 각각의 PDA에 도말하였으며, 여지 disc 위에 200  $\mu$ L(1 mg/ml)의 정제된 siderophore<sub>K11</sub>를 접종하여 항온항습기에서 배양하면서 포자의 발아 억제를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### *B. licheniformis* K11이 생산하는 catechol type의 siderophore 확인

*B. licheniformis* K11의 siderophore 생산을 CAS(chrome azurol S) agar상에서 orange halo zone으로 확인하였으며[14], siderophore type의 확인을 위하여 *B. licheniformis* K11의 배양상등액으로 catechol type을 확인하는 Arnow assay[2]와 hydroxamate type을 확인하는 Csaky assay[7]를

**Table 1. Characterization of the siderophore produced by *B. licheniformis* K11.**

Strain	eAS liquid assay <sup>1</sup>	Arnow assay <sup>2</sup>	Csaky assay <sup>3</sup>
<i>B. licheniformis</i> K11	0.219 ± 0.012 <sup>4</sup>	6.5 ± 0.7	0

Strain was grown at 30°C for 96 h in Nutrient medium.

<sup>1</sup> Siderophore production was determined by measuring the decrease in absorbance at 630 nm by the method of Payne [28].

<sup>2</sup> The presence of catechol type siderophore was detected at 510 nm by the method of Arnow [2]. The value is the concentration of 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents (µg/L).

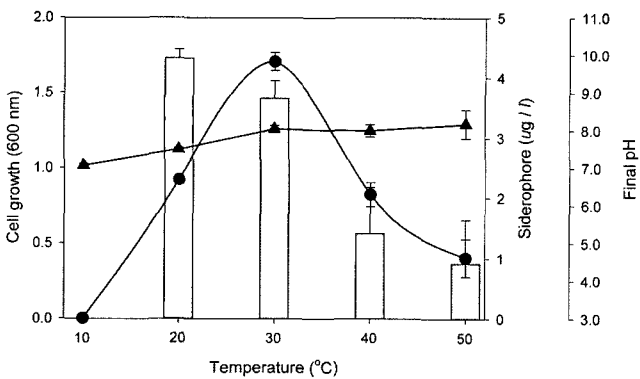
<sup>3</sup> The presence of hydroxamate type siderophore was detected at 543 nm by the method of Csaky [7]. The value is the concentration of hydroxylamine-HCl equivalents (µg/L).

<sup>4</sup> STD : Standard deviation.

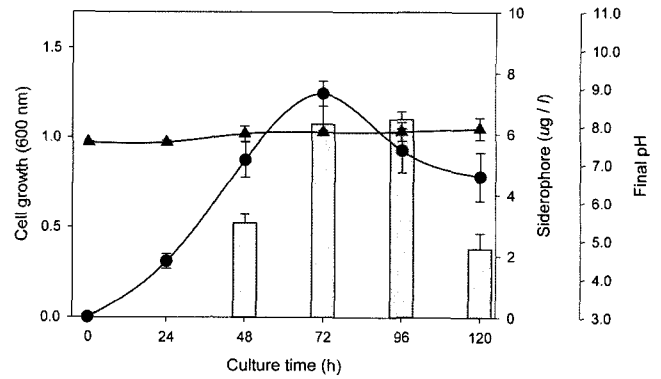
실시하였다. 그 결과 *B. licheniformis* K11이 생산하는 siderophore는 catechol type의 siderophore를 생산하는 것으로 확인하였다(Table 1). 이는 지금까지 알려진 *Bacillus* sp. 들이 생산한다고 보고[12, 13]된 catechol type의 siderophore들과 유사한 것으로 생각된다.

**배양온도, 배양시간 및 pH에 따른 siderophore의 생산 확인**

*B. licheniformis* K11의 배양온도가 siderophore의 생산에 미치는 영향을 확인한 결과, 균의 생육은 30°C에서 가장 높았지만, siderophore의 생산은 20°C에서 가장 높았다(Fig. 1). 그리고 배양 시간에 따른 siderophore의 생산은 96 h 배양 시 가장 높았으며, 균 생육은 72 h 배양 시 최대를 나타내었다(Fig. 2). 그리고 *B. licheniformis* K11의 pH에 따른 siderophore의 생산을 확인하기 위해 pH 3.0~pH 11.0까지 조정된 nutrient broth에 30°C에서 4일간 배양 후 생육과 siderophore 그리고 항진균성 항생물질의 생산을 조사한 결과, pH 5.0~8.0의 넓은 범위에서 균의 생장을 확인하였으며, siderophore는 pH 9.0에서 가장 많이 생산하였다(Fig. 3). 이



**Fig. 1. Effect of temperature on cell growth and production of the siderophore from *B. licheniformis* K11. ● : Cell growth, ■: Siderophore, ▲: Final pH.**

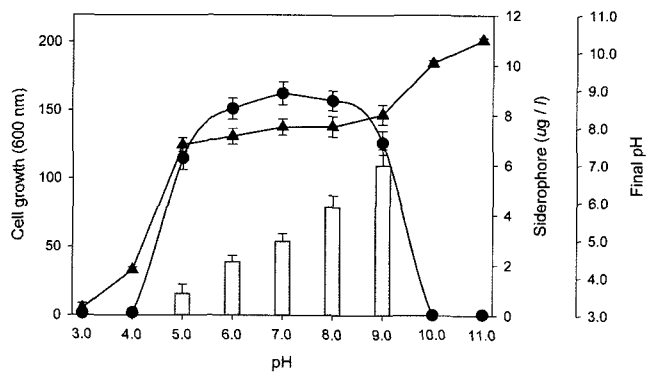


**Fig. 2. Effect of culture time on cell growth and production of the siderophore from *B. licheniformis* K11. ● : Cell growth, ■: Siderophore, ▲: Final pH.**

는 정 등[14]이 보고한 *B. subtilis* AH18의 siderophore의 최대 생산조건인 30°C의 배양온도와 pH 6.0에서 siderophore를 가장 많이 생산한다는 보고와 상이한 결과이다. 그리고 pH 3.0~4.0과 pH 10.0~11.0와 같은 강산성과 강염기의 나쁜 환경조건에서는 균의 생장과 siderophore의 생산이 나타나지 않았다. 또한 균이 배양되는 동안에 배양 상등액의 pH를 약염기(pH 8.0 정도)로 끌어 올렸다(Fig. 3). 이는 *B. licheniformis* K11이 화학비료를 장기간 사용해서 산성화된 우리나라 토양의 환경조건에서 식물병원성 진균을 방제할 수 있는 생육조건을 나타낼 수 있다는 가능성과, 동시에 산성화된 토양의 중화에도 좋은 영향을 줄 것으로 사료된다.

**탄소원 및 질소원에 따른 siderophore의 생산 확인**

여러 종류의 탄소원과 질소원을 각각 첨가하여 *B. licheniformis* K11균주의 생육과 siderophore의 생산을 조사하였다. 그 결과 탄소원으로 trehalose, galactose, dextran 순으로 siderophore의 생산이 높았으며, trehalose를 첨가 시 균 생육과 siderophore의 생산이 최대로 나타났다(Table 2). 질소원으로는 무기질소인 NH<sub>4</sub>Cl 첨가 시 siderophore의 생



**Fig. 3. Effect of pH on cell growth and production of the siderophore from *B. licheniformis* K11. ● : Cell growth, ■: Siderophore, ▲: Final pH.**

**Table 2. Effect of carbon sources on the production of the siderophore from *B. licheniformis* K11.**

Carbon Sources <sup>1</sup>	Cell Growth (600 nm)	Siderophore ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>2</sup>	Specific productivity <sup>3</sup>	Final pH
Control <sup>4</sup>	0.124 $\pm$ 0.010	2.54 $\pm$ 0.32	100.00	7.509 $\pm$ 0.037
Trehalose	0.694 $\pm$ 0.013	7.08 $\pm$ 0.48	49.80	7.388 $\pm$ 0.017
D(+)-Galactose	0.347 $\pm$ 0.018	4.44 $\pm$ 0.32	62.47	7.444 $\pm$ 0.010
Dextran	0.196 $\pm$ 0.008	4.23 $\pm$ 0.48	105.36	7.486 $\pm$ 0.012
D(-)-Fructose	0.222 $\pm$ 0.019	4.12 $\pm$ 0.32	90.60	7.424 $\pm$ 0.038
Mannitol	0.167 $\pm$ 0.026	2.97 $\pm$ 0.18	86.82	7.412 $\pm$ 0.024
Lactose	0.274 $\pm$ 0.020	2.96 $\pm$ 0.18	52.74	7.374 $\pm$ 0.044
Mannose	0.092 $\pm$ 0.013	2.54 $\pm$ 0.55	134.78	7.427 $\pm$ 0.026
Sucrose	0.185 $\pm$ 0.013	2.32 $\pm$ 0.18	61.22	7.397 $\pm$ 0.009
Starch corn	0.478 $\pm$ 0.012	2.11 $\pm$ 0.18	21.55	7.342 $\pm$ 0.038
D(+)-Maltose	0.360 $\pm$ 0.019	2.11 $\pm$ 0.17	28.61	7.435 $\pm$ 0.019

<sup>1</sup>Carbon sources (0.1%) were added to the basal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

<sup>2</sup>The value is the concentration of 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents ( $\mu\text{g/L}$ ).

<sup>3</sup>Specific productivity = siderophore ( $\mu\text{g/ml}$ ) / cell growth (600 nm). Control settled on standard.

<sup>4</sup>Davis minimal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% glucose).

**Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of the siderophore from *B. licheniformis* K11.**

Carbon Sources	Cell Growth (600 nm)	Siderophore ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>2</sup>	Specific productivity <sup>3</sup>	Final pH
Control <sup>4</sup>	0.199 $\pm$ 0.004	1.91 $\pm$ 0.52	100.00	7.386 $\pm$ 0.063
NH <sub>4</sub> Cl	0.222 $\pm$ 0.010	3.99 $\pm$ 0.90	187.26	7.374 $\pm$ 0.068
Tryptone	0.492 $\pm$ 0.006	3.41 $\pm$ 0.76	72.21	7.568 $\pm$ 0.049
KNO <sub>3</sub>	0.356 $\pm$ 0.010	3.33 $\pm$ 1.44	97.46	7.440 $\pm$ 0.072
Urea	0.195 $\pm$ 0.008	3.00 $\pm$ 0.66	160.29	7.789 $\pm$ 0.010
Yeast extract	0.428 $\pm$ 0.025	3.00 $\pm$ 0.68	7.30	7.421 $\pm$ 0.089
Proteose peptone No. 3	0.254 $\pm$ 0.006	2.66 $\pm$ 0.38	109.11	7.526 $\pm$ 0.007
Bacto peptone	0.364 $\pm$ 0.013	2.66 $\pm$ 0.76	76.14	7.480 $\pm$ 0.016
Alanine	0.243 $\pm$ 0.021	2.41 $\pm$ 0.52	103.33	7.510 $\pm$ 0.017
Beef extract	0.635 $\pm$ 0.008	2.41 $\pm$ 0.54	39.54	7.620 $\pm$ 0.029
Malt extract	0.356 $\pm$ 0.006	2.33 $\pm$ 0.38	68.19	7.421 $\pm$ 0.014
L-Asparagine	0.233 $\pm$ 0.010	2.08 $\pm$ 0.29	93.01	7.741 $\pm$ 0.007
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.285 $\pm$ 0.012	1.91 $\pm$ 0.52	69.83	7.449 $\pm$ 0.037
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.175 $\pm$ 0.022	1.41 $\pm$ 0.14	83.95	7.270 $\pm$ 0.046
NaNO <sub>2</sub>	0.330 $\pm$ 0.010	1.08 $\pm$ 0.14	34.10	7.301 $\pm$ 0.020
NaNO <sub>3</sub>	0.389 $\pm$ 0.031	1.00 $\pm$ 0.25	26.78	7.515 $\pm$ 0.016
glutamic acid	0.259 $\pm$ 0.009	0.83 $\pm$ 0.29	33.39	7.702 $\pm$ 0.053

<sup>1</sup>Nitrogen sources (0.1%) were added to the basal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% glucose, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

<sup>2</sup>The value is the concentration of 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents ( $\mu\text{g/L}$ ).

<sup>3</sup>Specific productivity = siderophore ( $\mu\text{g/ml}$ ) / cell growth (600 nm). Control settled on standard.

<sup>4</sup>Davis minimal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% glucose).

산이 가장 많았지만, 균 생육은 유기질소인 beef extract 첨가시 가장 높았고, NH<sub>4</sub>Cl, tryptone, KNO<sub>3</sub> 순으로 siderophore의 생산이 높았다(Table 3).

#### Siderophore<sub>K11</sub>의 정제 및 항진균성 활성

*B. licheniformis* K11이 생산하는 catechol type의 siderophore를 정제순서에 준하여(Fig. 4) 정제한 결과 단일 물질인 siderophore<sub>K11</sub>를 정제할 수 있었으며, 이를 HPLC

상에서 확인하였다(Fig. 5). 정제된 siderophore<sub>K11</sub>을 *P. capsici*의 유주자(zoospores)와 *F. oxysporum*의 분생포자(conidia)가 도말된 PDA에 여지 disc를 이용해 포자의 발아 억제능을 확인할 수 있었다(Fig. 6). Catechol type의 siderophore는 주로 *Bacillus* sp.에서 생산하는 것으로 보고 되어있으며, 이들은 주로 2,3-dihydroxybenzoate에 다양한 아미노산들이 결합된 구조들이 있으며, 이중에서 2,3-dihydroxybenzoylglycine과 2,3-dihydroxybenzoic acid(itoc

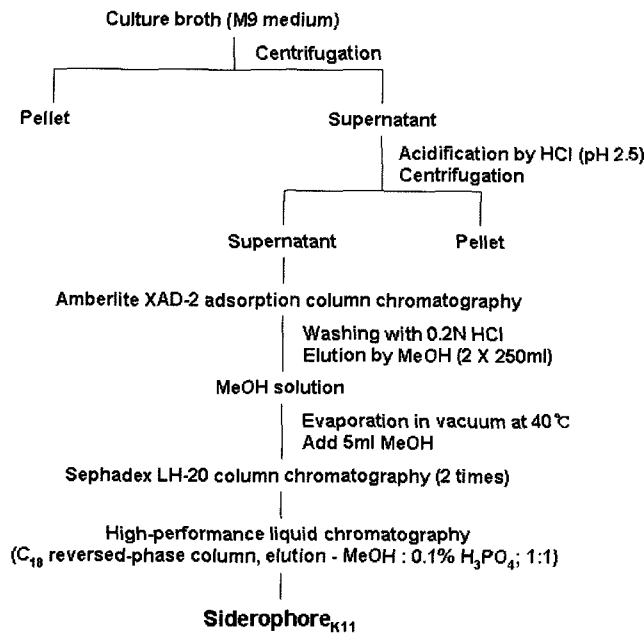


Fig. 4. Isolation and purification procedure of the siderophore produced by *B. licheniformis* K11.

acid) 그리고 2,3,-dihydroxybenzoyl glycl threonine들이 알려져 있다[3, 5, 6, 12]. 따라서 *B. licheniformis* K11이 생산하는 siderophore 역시 2, 3-dihydroxybenzoate의 유도체로 추정되어지며 차후 정확한 구조분석을 통해 GC/MS와 NMR을 통해 siderophore<sub>K11</sub>의 분자구조를 확인 할 것이다.

요 약

식물성장촉진 호르몬인 auxin, 식물병원성 진균의 생육을

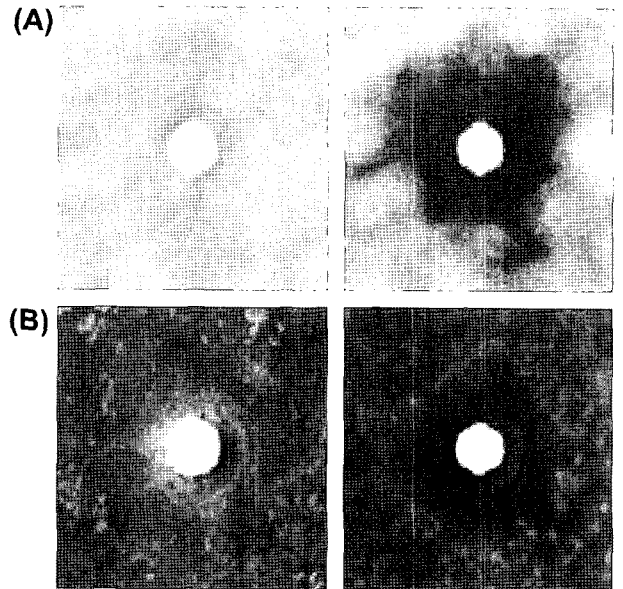


Fig. 6. Antifungal activity of purified siderophore<sub>K11</sub> against the zoospore germination of *P. capsici* (A) and conidia germination of *F. oxysporum* (B) on PDA. Left: Control (MeOH), Right: Purified the siderophore<sub>K11</sub> with MeOH.

억제하는 siderophore, 그리고 세포벽이 cellulose로 구성된 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 cellulase를 동시에 생산하는 PGPR균주이자 생물방제균주로 선발된 *Bacillus licheniformis* K11이 생산하는 항진균성 siderophore의 특성을 확인한 결과 catechol type의 siderophore로 확인하였다. 또한 *B. licheniformis* K11의 siderophore 생산조건을 조사한 결과 nutrient broth(pH 9.0)를 20°C에서 96 h 배양시 가장 많이 생산하였다. 그리고 탄소원과 질소원으로는 각각

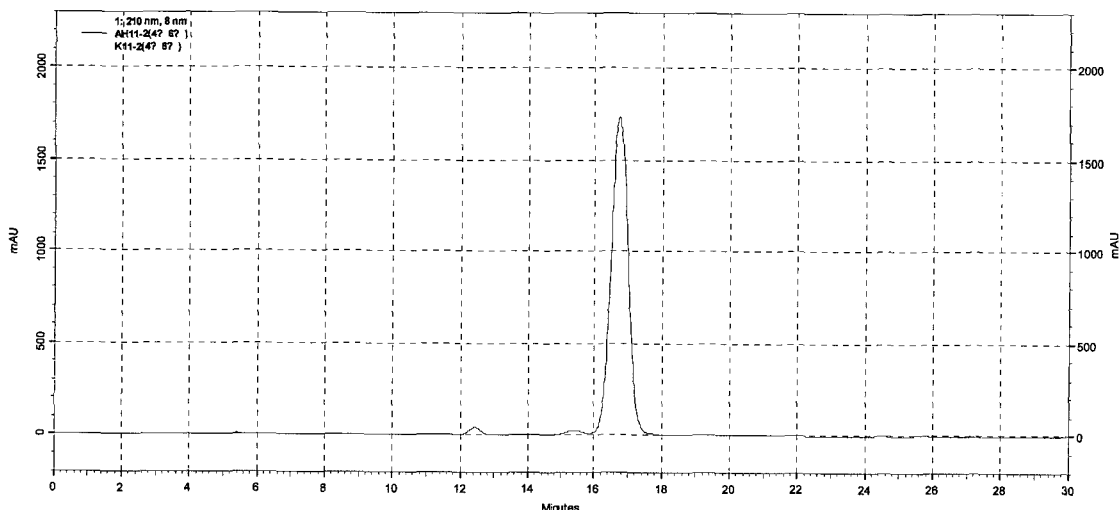


Fig. 5. HPLC pattern of siderophore<sub>K11</sub> purified from *B. licheniformis* K11. Antifungal siderophore<sub>K11</sub> produced by *B. licheniformis* K11 were analyzed by HPLC (SHIMADZU Co., LC-10A, Japan), and using a C<sub>18</sub> reversed-phase column (250 × 4.6 mm). Sample (20 μL) were eluted with methanol : 0.1% phosphoric acid (1 : 1, v/v). The flow rate was 2 ml/min. The siderophore<sub>K11</sub> was detected by UV-absorption at 210 nm.

trehalose와 NH<sub>4</sub>Cl 첨가시 siderophore를 가장 많이 생산하였다. 그리고 siderophore<sub>K11</sub>의 정제는 Amberlite XAD-2과 sephadex LH-20 column chromatography를 통해 수행하였으며, HPLC를 통해 단일 물질임을 확인하였다. 정제된 Siderophore<sub>K11</sub>은 2, 3-dihydroxybenzoate의 유도체로 추정하며, *P. capsici*의 zoospores와 *F. oxysporum*의 conidia의 발아를 강하게 억제하였다.

### 감사의 글

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

### REFERENCES

1. Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuta, and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **28**: 575-576.
2. Arnow, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**: 531-537.
3. Bergeron, R. J. and J. S. McManis. 1991. *Synthesis of catecholamide and hydroxamate siderophore*. In CRC Handbook of Microbial Iron Chelates, (ed) G. Winkelmann, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 271-307.
4. Brian, P. W., J. M. Wright, J. Stubbs, and A. M. Way. 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plant. *Nature*, **167**: 347-349.
5. Corbin, J. L. and W. A. Bulen. 1969. The isolation and identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid and 2-N, 6-N-di-(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysine formed by iron-deficient *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*. **8**: 757-762.
6. Crosa, J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 517-530.
7. Csaky, T. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine. *Acta Chem. Scand.* **2**: 450-454.
8. Glick, B. R., C. L. Patten, G. Holguin, and D. M. Penrose. 1999. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press, Canada.
9. Gregory, K. F., O. N. Allen, A. J. Riker, and W. H. Peterson. 1952. Antibiotics as agents for the control of certain damping-off fungi. *Am. J. Botany*. **9**: 405-415.
10. 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. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 349-353.
11. Hider, R. C. 1984. Siderophore mediated absorption of iron. *Structure & Bonding*. **58**: 25-87.
12. Ito, T. and J. B. Neilands. 1958. Products of "low-iron fermentation" with *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and synthesis of 2,3-dihydroxybenzoylglycine. *J. Am. Chem. Soc.* **80**: 4645-4647.
13. 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.
14. Jung, H. K., J. R. Kim, S. M. Woo, and S. D. Kim. 2006. 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.
15. Jung, H. K. and S. D. Kim. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 312-316.
16. Katiyar, V. and G. Reeta. 2004. Improved plant growth from seed bacterization using siderophore overproducing cold resistant mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 653-657.
17. Kim, K. Y. and S. D. Kim. 1997. Biological control of *Pyricularia aryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 396-402.
18. 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.
19. Lee, J. M., H. S. Lim, T. H. Chang, and S. D. Kim. 1999. Isolation of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 427-432.
20. Lee, M. W. 1997. Root colonization by beneficial *Pseudomonas* spp. and bioassay of suppression of fusarium wilt of radish. *The Kor. J. Mycol.* **25**: 10-20.
21. 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.
22. Leoffler, W. J., S. M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T. F. Hsieh, and T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* **115**: 204-213.
23. Lim, H. S., J. M. Lee, and S. D. Kim. 2002. A plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20: Mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increased biocontrol efficacy. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 249-257.
24. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1995. The role and characterization of  $\beta$ -1,3-Glucanase in biocontrol of *Fusarium solani* by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Microbiol.* **33**: 295-304.
25. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1997. Role of siderophore in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of Bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. *J. Microbiol.*

- Biotechnol.* **7**: 13-20.
26. Neilands, J. B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* **1**: 9-14.
27. Paulitz, T. C. and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* **81**: 930-935.
28. Payne, S. M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophore. *Methods enzymology.* **235**: 329-344.
29. Scher, F. M. and R. Baker. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* **72**: 1567-1573.
30. Takeuchi, S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sasaki, and H. Yonehara. 1958. Blastidicin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**: 1-5.
31. 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. Microbial. Biotechnol.* **29**: 186-193.

(Received Apr. 2, 2007/Accepted May 10, 2007)