

새송이버섯 수확 후 배지로부터 surfactin 생성 *Bacillus amyloliquefaciens* YJ07의 분리 및 특성

신평균¹, 유영복¹, 조용운², 조수정^{2*}
농촌진흥청 인삼특작부 버섯과¹, 경남과학기술대학교 제약공학과²

Isolation and Characterization of Surfactin-producing *Bacillus amyloliquefaciens* YJ07 from Spent Mushroom (*Pleurotus eryngii*) Substrates

Pyung Gyun Shin¹, Young Bok Yoo¹, Yong Un Cho² and Soo Jeong Cho^{2*}

¹Division of Mushroom Research, International Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, 150 Chilamdong, Jinju 660-758, Korea

(Received November 27, 2011, Revised December 8, 2011, Accepted December 11, 2011)

ABSTRACT : Spent mushroom substrates (SMS) is a by-product remaining after a crop of mushrooms. About four surfactin-producing strains were isolated from SMS (*Pleurotus eryngii*). Among of them, one isolate, which designated to YJ07, potentially showed the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* producing mycotoxin on PDA medium. The biochemical characteristics of the strain YJ07 was similar with *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* by *Bacillus* ID kit and VITEK 2 system. Comparative 16S rDNA gene sequence analysis of the strain YJ07 also showed that the strain YJ07 was most closely related to *Bacillus amyloliquefaciens* with sequence similarity of 99.5%. On the basis of their biochemical characteristics and phylogenetic distinctiveness, the strain YJ07 was classified within the genus *Bacillus* as *Bacillus amyloliquefaciens* YJ07. The antifungal compound from *B. amyloliquefaciens* YJ07 was similar to lipopeptide surfactin from *Bacillus subtilis* by TLC and HPLC analysis.

KEYWORDS : Spent mushroom substrates, Antifungal activity, Surfactin, *Bacillus amyloliquefaciens* YJ07

서론

버섯 수확 후 배지(spent mushroom substrates; SMS)는 버섯을 수확한 후 남겨진 부산물로서 버섯 종류와 재배방식에 따라 다양하게 배출되고 있으며, Kim(2006)과 Semple(2001) 등의 보고에 의하면 버섯 1 kg을 생산할 때 5 kg 정도 발생된다(Williams 등, 2001). 버섯 재배 농가에서 배출되는 버섯 수확 후 배지는 수분(50~60%)과 유기물 함량이 높기 때문에 쉽게 부패되는 특징이 있어서(Kwak 등, 2008) 대부분 유기질 퇴비, 토양개량제, 지렁이 생산용 배지 등으로 이용되고 있다. 그러나 최근에는 곡물가격 상승으로 사료비가 증가하면서 버섯 수확 후 배지를 사료로 사용하려는 축산농가가 증가하고 있다. 버섯 배지 원료인 미강, 밀기울, 콘코브, 면실피, 비트펄프 등은 가축사료 원료이며 버섯 재배과정에서 배지 영양분의 약 20% 정도는 버섯에 의해 이용되고 나머지 80% 정도는 버섯 수확 후 배지에 남아있을 뿐만 아니라 버섯 수확 후 배지에는 버섯균이 분비한 각종 생리활성물질

과 버섯 균사체 등이 남아있기 때문에 버섯 수확 후 배지는 사료원료로서 영양적 가치가 있다(Bae 등, 2006).

버섯 수확 후 배지 중에서도 새송이버섯 수확 후 배지는 새송이버섯 재배기술의 발달과 생산설비의 자동화로 연중 생산되고 있어서 수확 후 배지의 안정적 수급이 가능하기 때문에 사료화에 적합하다고 생각되며 우리나라와 같이 사료원료 대부분을 수입에 의존하고 있는 경우 유기물 함량이 높은 버섯 수확 후 배지의 사료화는 축산농가의 경영비 절감에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 버섯 수확 후 배지와 같이 부패가 용이한 부산물을 사료화하기 위해서는 발효와 같은 가공이 필요하며 무엇보다도 발효사료 제조에 적합한 생균제 균주의 개발이 중요하다. 발효에는 퇴적, 혐기, 호기 발효 등의 방법이 있는데 Kwak(2008) 등은 버섯 수확 후 배지를 혐기발효시킬 경우 3주가 경과한 후에도 곰팡이 오염이 일어나지 않았다고 보고하였다.

버섯 재배 농가에서 배출되는 버섯 수확 후 배지는 수분함량(50~60%)이 높고 유기물 함량이 높은 곡물이 주원료이기 때문에 가축에게 유해한 aflatoxin이나 ochratoxin과 같은 곰팡이독소가 생성될 확률이 높으므로(Kabak 등, 2006; Kabak

*Corresponding author <sjcho@gntech.ac.kr>

등, 2009) 곰팡이독소 생성을 억제할 수 있는 균주를 발효사료 첨가용 생균제로 사용해야 발효사료의 안전성과 보존성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 현재 축우사료 첨가용 생균제로 개발된 미생물 중에서 *Bacillus* 속은 surfactin (Regine 등, 1985; Regine 등, 1994), fengycin (Vanittanakam 등, 1986), iturin (Regine 등, 1985; Regine 등, 1994)과 같은 항균물질을 생성할 수 있기 때문에 곰팡이독소 생성 억제효과를 기대할 수 있으며 액체배양시 다른 균주에 비하여 생육속도가 빠르고 포자를 형성하여 다양한 환경에서도 생육할 수 있으므로 버섯 수확 후 배지 발효사료 첨가용 생균제로 적합한 생물자원이다. 특히, surfactin은 *Bacillus* 속이 생성하는 cyclic lipopeptide 구조를 가진 항생물질로 알려져 있으며 세균, 바이러스, 곰팡이, mycoplasma 등에 관한 항균력과 용혈작용이 우수하여 산업적으로 많이 이용되고 있는 유용물질이다 (Schallmey 등, 2004).

본 연구에서는 수분과 유기물 함량이 높은 새송이버섯 수확 후 배지의 발효에 적합한 생균제 개발을 목적으로 버섯 수확 후 배지에 우점하는 surfactin 생성 균주를 선별하기 위하여 퇴적되어 있는 수확 후 배지로부터 균주를 분리·동정하고 곰팡이 독소를 생성하는 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus ochraceus*에 대한 분리균의 항균활성과 분리균이 생성하는 항균물질의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Surfactin 생성 균주의 분리

새송이버섯 수확 후 배지에 우점하는 균주를 분리하기 위하여 도준농산(경남 진주시 소재 새송이버섯 재배농가)으로부터 탈병 후 퇴적되어 있는 버섯 수확 후 배지를 수집하였다. 새송이버섯 수확 후 배지에 우점하는 균주는 수집한 배지 1 g을 멸균수에 현탁하여 10^3 으로 희석한 후 현탁액을 trypticase soy agar (TSA) 배지에 도말한 다음 30°C에서 36시간 동안 배양하여 분리하였다. Surfactin 생성 균주는 분리균을 0.5% sheep blood가 첨가된 trypticase soy agar (TSA) 배지에서 36시간 동안 배양하면서 콜로니 주위의 투명화를 확인하여 선별하였다 (Nakano 등, 1988).

Surfactin 생성 균주의 항균활성

선별된 균주의 항균활성은 paper diffusion 법 (Perez 등, 1990)을 이용하여 측정하였으며 곰팡이독소를 생성하는 *A. flavus*와 *A. ochraceus*는 농촌진흥청 한국농업미생물 보존센터 (Korean Agricultural Culture Collection)에서 분양받아 사용하였다. 곰팡이독소를 생성하는 *A. flavus*와 *A. ochraceus*는 멸균된 cork-borer를 사용하여 potato

dextrose agar (PDA) 배지 중앙에 접종한 후 30°C에서 2일 동안 배양한 다음 사용하였다. 분리균은 trypticase soy broth (TSB) 배지에 접종하여 30°C에서 2×10^6 CFU/ml까지 배양한 후 paper disc (8 mm, Advantec, Japan)에 20 μ l 씩 흡수시켜 실온에서 1시간 동안 확산시킨 다음 곰팡이가 배양된 배지 표면에 고정시켰다. 항균활성은 30°C에서 2일 동안 배양하면서 paper disc 주위의 투명화 크기를 측정하여 확인하였다.

Surfactin 생성 균주의 동정

최종 선별된 균주는 30°C에서 36시간 동안 배양한 다음 1% phosphotungstic acid로 negative stain한 후 투과전자현미경 (JEM 1010, Germany)으로 형태적 특징을 확인하였으며 Gram 양성/음성은 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 분리균의 생리적·생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit (Microgen™, UK)와 VITEK 2 system (bioMérieux, USA)을 사용하여 조사하였다.

최종 선별된 분리균의 16S rDNA 염기서열은 DNAzol (Invitrogen, USA)을 사용하여 분리한 genomic DNA를 주형가닥으로 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후 증폭된 PCR 산물 중 1.5 kb에 해당하는 단편만을 PCR purification kit (Qiagen, USA)를 사용하여 정제한 다음 MacroGen (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 중합효소연쇄반응은 universal primer 27F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3')를 사용하여 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 30 cycle을 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 10분 동안 수행하였다. 분석된 16S rDNA 염기서열의 상동성은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 GeneBank database에 등록된 균주들의 16S rDNA 염기서열과 비교·분석하여 확인하였으며 그 결과를 근거로 DNAMAN analysis system (Lynnon Biosoft, Canada)에 의해 계통도를 작성하였다.

분리균이 생성하는 항균물질의 분리

최종 선별된 분리균이 생성하는 항균물질은 Nakano (Nakano 등, 1988) 등의 방법에 따라 분리하였다. 분리균을 No. 3 배지 (polypeptone 10 g, glucose 10 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, pH 6.8)에서 30°C로 4일 동안 배양한 다음 배양액을 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 6N HCl를 가하여 pH를 2.0으로 조절한 후 6,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 침전물만을 취한 다음 침전물을 메탄올에 추출하여 본 실험에 사용하였다. 메탄올에 추출된 산 침전물은 thin layer chromatography (TLC; silicagel 60F₂₅₄,

Table 1. Antifungal activity of isolates from spent mushroom substrates against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceous*

Test strains ^a	Isolates ^b			
	YJ02	YJ04	YJ07	YJ11
<i>Asp. flavus</i>	- ^c	+	++	+
<i>Asp. ochraceous</i>	+	+	+	+

^aCultured on PDA medium at 30°C for 2 days.

^bCultured on TSB medium at 50°C for 24 hours.

^cInhibitory zone diameter >20mm, ++: 10–20 mm, +: <10 mm, -.

Merck, Germany)에서 chloroform/methanol(6/4)의 용매 조건으로 전개한 후 10% H₂SO₄로 발색하여 확인하였으며 high performance liquid chromatography(HPLC; Agilent 1100 series, USA)를 이용하여 펩타이드성 항균물질을 분리하였다. HPLC 분석에 사용된 column은 C18 reverse column이며 용매는 3.8 mM trifluoroacetic acid/water(1/3=v/v), flow rate는 1 ml/min이고 215 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference 물질로 사용한 surfactin은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)로부터 구매하여 사용하였다.

결과 및 고찰

새송이버섯 수확 후 배지로부터 surfactin 생성 균주의 분리

버섯 수확 후 배지에 우점하는 균주를 분리하기 위하여 퇴적되어 있는 버섯 수확 후 배지로부터 시료를 수집한 다음 멸균수에 희석하여 TSA 배지에 도말하였으며 12개 균주가 순수분리되었다. Surfactin 생성 균주는 순수분리된 균주 중 0.5% sheep blood가 첨가된 TSA 배지에서 콜로니 주변에 형성된 투명환을 확인하여 선발하였다. Surfactin은 *Bacillus* 속이 생성하는 대표적인 항생물질로써 세균, 곰팡이, 바이러스, mycoplasma 등에 대해 강한 항균활성을 나타내므로 버섯 수확 후 배지를 저장하거나 발효하는 과정 중에 발생되는 곰팡이 오염과 곰팡이 독소 생성을 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 *Bacillus* 속은 포자를 생성하여 다양한 환경에서도 생육할 수 있고 여러 가지 효소를 분비할 수 있기 때문에 버섯 수확 후 배지 발효사료 첨가용 생균제로 적합한 미생물이다(Yang 등., 2001; Jung 등, 2003).

분리균 YJ07의 항균활성

Surfactin 생성 균주의 *A. flavus*와 *A. ochraceous*에 대한 항균활성은 PDA 배지에서 paper diffusion 법에 따라 확인하였으며 항균활성이 강한 YJ07 균주를 선발하여 본 실험에 사용하였다(Table 1). 버섯 수확 후 배지는 수분과 유기물 함량이 높기 때문에 가축에게 유해한 aflatoxin이나 ochratoxin을 생성하는 곰팡이에 오염될 가능성이 높다. 따라서 버섯 수확

후 배지 발효사료의 안전성과 보존성을 향상시키기 위해서는 분리균과 같이 aflatoxin과 ochratoxin의 생성을 억제할 수 있는 생균제 균주의 개발이 필요하다. 분리균 YJ07은 곰팡이에 대한 항균활성이 있는 surfactin을 분비할 수 있으므로 수분과 유기물 함량이 높은 버섯 수확 후 배지 발효사료에 적합한 생균제 균주로 사용될 수 있을 것이다.

분리균 YJ07의 동정

분리균 YJ07의 형태적 특성은 분리균을 1% phosphotungstic acid로 negative stain한 후 투과전자현미경으로 관찰하여 확인하였으며 분리균 YJ07은 크기가 1.3~1.8×0.9 μm인 간균으로(Fig. 1) Gram 양성이었다.

분리균 YJ07의 생리적·생화학적 특성은 *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system를 이용하여 분석하였으며 *Bacillus* ID kit로 분석한 결과 분리균은 *B. subtilis* group과 97.8%의 probability를 나타내었으며 VITEK 2 system에 의한 분석결과에서도 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*와 유사한 생화학적 특성을 나타내었다. *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system에 의한 분리균 YJ07의 생화학적인 특성을 종합하면

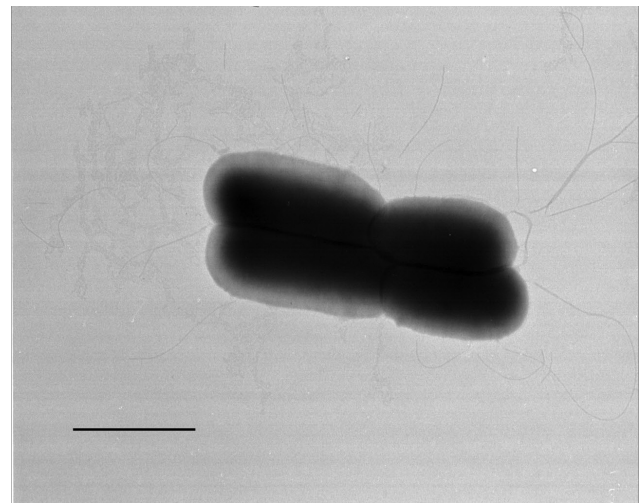


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the isolate YJ07. Exponentially growing culture was observed by negative stain with 1% phosphotungstic acid. Scale bar, 1.4 μm.

Table 2. Physiological and Biochemical characteristics of strain YJ07

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Arabinose	-	Cyclodextrin	-
Sucrose	+	D-galactose	+
Adonitol	-	Glycogen	-
Methyl-D-glucoside	+	Myo-inositol	-
Indole	-	Methyl-A-D-glucopyranoside acidification	+
Citrate	-	Ellman	-
Cellobiose	+	Methyl-D-xyloside	+
Salicin	+	α -mannosidase	-
Trehalose	+	Maltotriose	-
ONPG	+	Glycine arylamidase	-
VP	-	D-mannitol	+
Inositol	-	D-mannose	-
Raffinose	+	D-melezitose	-
Sorbitol	+	N-acetyl-d-glucosamine	-
Xylose	+	Palatinose	(-)
Methyl-D-mannoside	-	L-rhamnose	-
Melizitose	-	β -glucosidase	+
Arginine	+	β -mannosidase	-
Nitrate	+	Phosphoryl choline	-
β -xylosidase	+	Pyruvate	(+)
L-lysine-arylamidase	-	α -glucosidase	-
L-aspartatearyl amidase	-	D-tagatose	-
Leucine-arylamidase	+	D-trehalose	+
Phenylalanine arylamidase	+	Inulin	-
L-proline arylamidase	+	D-glucose	+
β -galactosidase	-	D-ribose	-
L-pyrrolydonyl-arylamidase	+	Putrescine assimilation	-
α -galactosidase	-	Kanamycin resistance	-
Alanine arylamidase	(-)	Oleandomycin resistance	-
Tyrosine arylamidase	+	Esculin hydrolysis	+
β -N-acetyl-glucosaminidase	-	Tetrazolium red	-
Ala-phe-pro arylamidase	+	Polymixin B resistance	-

+, positive reaction; -, negative reaction; (+), (-), weak.

Table 2와 같이 sucrose, methyl-D-glucoside, cellobiose, salicin, trehalose, ONPG, raffinose, sorbitol, xylose, arginine, nitrate, β -xylosidase, leucine-arylamidase, phenylalanine arylamidase, L-proline arylamidase, L-pyrrolydonyl-arylamidase, tyrosine arylamidase, ala-phe-pro arylamidase, D-galactose, methyl-A-D-glucopyranoside acidification, methyl-D-xyloside, D-mannitol, β -glucosidase, D-trehalose, D-glucose, esculin

hydrolysis 등에 대해서는 양성반응을 보였으며 kanamycin, oleandomycin, polymixin B 등의 항생제에 대해서는 감수성을 나타내었다.

분리균 YJ07의 계통학적 유연관계를 조사하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 분리균 YJ07은 *B. amyloliquefaciens*와 99.5%의 상동성을 나타내었으며 분리균 YJ07의 16S rDNA 염기서열에 근거한 계통도는 분리균 YJ07의 16S rDNA 염기서열과 GeneBank에 등록된 균주들

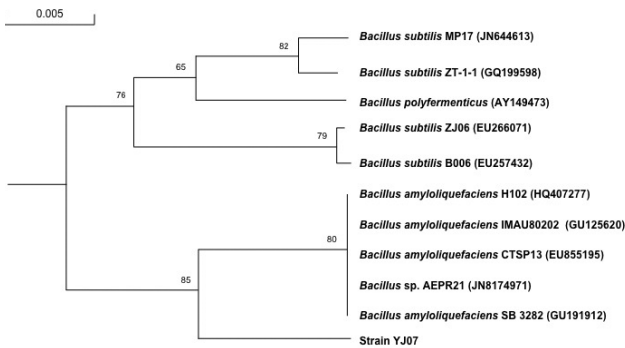


Fig 2. Phylogenetic relationships of the isolate YJ07 and other closely related bacteria based on the partial 16S rDNA gene sequence. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values(expressed as percentages of 10,000 replications) are shown at major branching points. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position.

의 16S rDNA 염기서열을 비교하여 Fig. 2에 나타내었다.

분리균 YJ07의 생리적·생화학적 특성은 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*와 유사하였으며 16SrDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 유연관계에서도 *B. amyloliquefaciens*와 높은 상동성을 나타내므로, 이 결과들을 종합하여 분리균 YJ07은 *B. amyloliquefaciens* YJ07로 동정되었다. Shivaji(2006) 등의 보고에 의하면 *Bacillus* 속은 포자를 형성하여 다양한 환경에서 생존할 수 있기 때문에 환경에 따라 종 다양성이 큰 세균으로 16S rDNA 염기서열에서 100%의 상동성을 나타내더라도 서로 다른 종으로 분류될 수 있다.

분리균 YJ07이 생성하는 항균물질

분리균 YJ07이 생성하는 항균물질은 분리균을 No. 3 배지에서 액체 배양한 다음 산 침전한 후 메탄올에 추출하여 얻었으며 항균물질의 TLC 분석은 Sigma-Aldrich에서 구입한 surfactin을 reference 물질로 사용하여 수행하였다. 분리균 YJ07이 생성하는 항균물질은 TLC 상에서 chloroform/methanol(6/4)를 전개용매로 사용하여 10% H₂SO₄으로 발색하였을 때 분홍색을 띠었다. 10% H₂SO₄에서 분홍색으로 발색되는 분리균 YJ07에서 분리한 항균물질의 Rf치는 0.70이었으며 reference 물질인 surfactin의 Rf치는 0.68이었다. 분리균 YJ07에서 분리한 항균물질의 Rf치와 reference 물질인 surfactin의 Rf치가 유사하다는 것을 확인한 후 TLC에서의 결과를 근거로 C18 reverse column를 이용하여 HPLC 분석(Fig. 3)을 수행하였다. HPLC 분석 결과 surfactin은 10.120분, 12.472분, 16.892분, 19.584분에서 peak가 나타났으며 분리균 YJ07에서 분리한 항균물질은 11.323분, 14.129분, 19.358분, 21.342분, 26.352분,

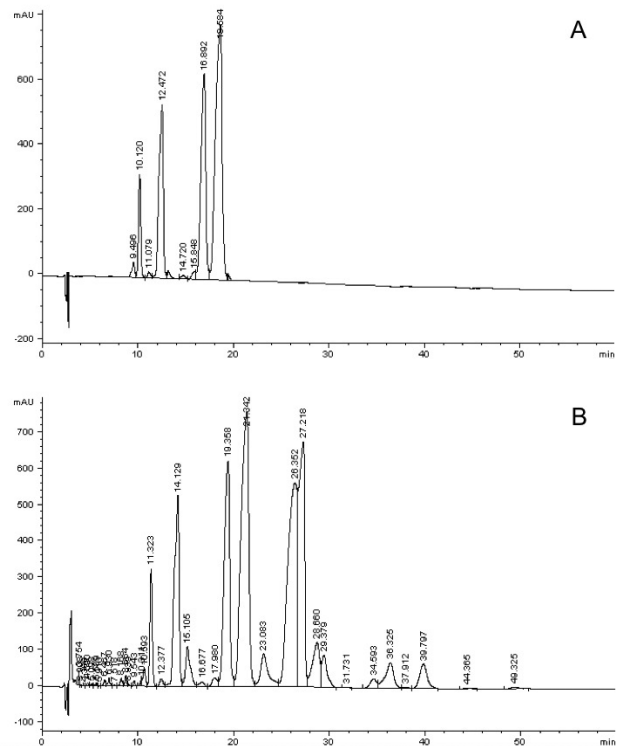


Fig. 3. HPLC chromatogram of surfactin standard purchased from Sigma(A) and compound obtained in this work(B). Eluent solvent: 3.8 mM trifluoroacetic acid/acetonitrile=1/3, Flow rate:1 ml/min., Absorbance: 215 nm.

27.218분에서 peak가 나타났다. 따라서 HPLC 분석에서 나타난 peak의 retention time을 비교해보면 19.584분의 surfactin peak와 19.358분의 분리균 YJ07에서 분리한 항균물질이 유사한 것으로 추정되며 분리균에서 분리한 항균물질이 surfactin임을 확인하기 위해서는 MALDI-TOF mass 등의 분석이 필요할 것으로 사료된다.

적요

버섯 생산 후 발생하는 부산물인 새송이버섯 수확 후 배지로부터 surfactin을 생성하는 4종의 균주를 분리하였으며 이 중 곰팡이 독소를 생성하는 *A. flavus*와 *A. ochraceous*에 대한 항균활성이 우수한 균주를 최종 선발하여 YJ07로 명명하였다. *Bacillus* ID kit와 VITEK 2 system를 이용하여 분리균 YJ07의 생리적·생화학적 특성을 조사한 결과 분리균은 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*와 유사한 생리적·생화학적 특성을 나타내었으며 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 유연관계에서도 *B. amyloliquefaciens*와

99.5%의 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 종합하여 분리균 YJ07은 *B. amyloliquefaciens* YJ07로 동정되었으며 분리균 YJ07이 생성하는 항균물질은 TLC와 HPLC 분석에서 reference 물질로 사용한 surfactin과 유사한 특성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2011년 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : PJ007474)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bae, J. S., Kim, Y. I., Jung, S. H., Oh, Y. G. and Kwak, W. S. 2006. Evaluation on feed-nutritional value of spent mushroom(*Pleurotus osteratus*, *Pleurotus eryngii*, *Flammulina velutipes*) substrates as a roughage source for ruminants. *J. Anim. Sci. & Technol. Kor.* 48 : 237-246.
- Jung, W. H., Yang, S. Y., Song, M. D., Ha, J. K. and Kim, C. W. 2003. Isolation of *Bacillus* sp. producing xylanase and cellulase and optimization of medium conditions of its production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 383-388.
- Kabak B, Dobson, AD. and Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46 : 593-619.
- Kabak B. and Dobson, AD. 2009. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *J. Food Prot.* 72 : 2006-2016.
- Kim, Y. I., Bae, J. S., Jung, S. H., Ahn, M. H. and Kwak, W. S. 2007. Yield and physicochemical characteristics of spent mushroom(*Pleurotus eryngii*, *Pleurotus osteratus* and *Ammulina velutipes*) substrates according to mushroom species and cultivation types. *J. Anim. Sci. & Technol. Kor.* 49 : 79-88.
- Kwak, W. S., Jung, S. H. and Kim, Y. I. 2008. Broiler litter supplementation improves storage and feed-nutritional value of sawdust-based spent mushroom substrate. *Bioresource Tech.* 99 : 2947-2955.
- Nakano, M. M., Marahiel, M. A. and Zuber, P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170 : 5662-5668.
- Perez, C., Pauli, M. and Bazerque, P. 1990. An antibiotics assay by agar well diffusion method. *Acta Biol. Med. Exp.* 15 : 113-115.
- Regine, M. D., Ptak, M., Peypoux, F. and Michel, G. 1985. Pore-forming properties of surfactin A; a lipopeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta* 815 : 405-409.
- Regine, M. D. and Peypoux, F. 1994. Surfactins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87 : 151-174.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50 : 1-17.
- Semple, K. T., Reid, B. J. and Fermor, T. R. 2001. Impact to composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Poll.* 112 : 269-283.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S., Dutt, C. B., Wainwright, M., Narlikar, J. V. and Bhargava, P. M. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 : 1456-1473.
- Vanittanakam, N. and Loeffler, W. 1986. Fengycin—a novel antifungal lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J. Antibio. Tokyo* 39 : 888-901.
- Williams, B. C., McMullan, J. T. and McCahey, S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Biores. Technol.* 79 : 227-230.
- Yang, S. Y., Song, M. D., Kim, O. H. and Kim, C. W. 2001. Isolation of *Bacillus* sp. producing multi-enzyme and optimization of medium conditions for its production using feedstuffs for probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 : 110-114.