

## Bacillus subtilis KL-57로부터 생산되는 생체계면활성제 합성 유전자 클로닝

강상모\* · 이병옥 · 이철수

건국대학교 공과대학 미생물공학과

### Cloning of Biosurfactant-Producing Gene from *Bacillus subtilis* KL-57

Kang, Sang-Mo\*, Byung-Ok Lee and Chul-Su Lee

Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

**Abstract** — A bacterium KL-57 which exhibited biosurfactant activity was isolated. This bacterium was identified as *Bacillus subtilis*. The biosurfactant-producing gene of *B. subtilis* KL-57 was cloned into *B. subtilis* MI113 by using plasmid pTB523. The plasmid DNA from the clone was found to carry a 18 kb *PstI* insert. The biosurfactant-producing gene was cleaved into 4 fragments by *SmaI*, 3 fragments by *PvuII* or *EcoRI*, 4 fragments by *PvuII* and *EcoRI* double digestion, 5 fragments by *AccI*, and 2 fragments by *KpnI*, *HindIII* or *BamHI*. By subcloning the 18 kb *PstI* insert, a 2.3 kb *EcoRI* fragment conferred the biosurfactant producing activity on *B. subtilis* cells. The 2.3 kb had one *HindIII* cleave site. But Two fragments, which corresponds *HindIII/EcoRI* termini, exhibited no biosurfactant activity.

환경보존에 대한 관심이 높아짐에 따라 생분해도가 우수하며 독성이 적은 생물 유래의 생체계면활성제(biosurfactant)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 계면활성제는 분자내에 친수성과 소수성 부위를 갖는 amphiphilic compound로서, 물리적으로 상이한 부위에 의하여 그 활성을 가지게 된다.

표면장력은 액체, 기체 같은 성격이 다른 두 상(phase)이 서로 인접하여 있을 경우 액체의 계면이 수축하려는 힘을 말한다. 이때, 그 상이 물인 경우 계면활성제는 물분자의 결합을 약화시키며, 계면활성제의 농도가 증가함에 따라 외측에 친수성부위 내측에는 소수성 부위를 가진 micelles이라는 구조를 형성하게 된다. 이러한 micelles 구조에 따라 물의 표면장력은 급격히 감소하고 일정한 표면장력에 이르면 더 이상 표면장력이 감소하지 않게 된다.

계면활성제는 오래 전부터 사용되어 왔으며 현재는 세제의 기능 뿐만이 아닌 공업분야의 전반에 걸쳐 폭넓게 사용되고 있다. 그 대표적인 물성으로는 유화(emulsification), 분산(dispersion), 침습(penetration), 습윤(wetting), 용해(solubilization), 기포 형성(forming), 기포 방지(deforming), 부식 방지(corrosion

inhibition) 등이 있다. 그러나 물질 자체의 특성과 난분해성으로 인하여 대표적인 환경 오염원이 되면서, 생물 유래의 계면활성제의 개발이 절실히 요구되게 되었다.

Biosurfactant는 종래의 합성계면활성제와는 달리 생체내에서 생산되는 물질이므로 생분해도가 우수하며 독성이 적고, 분자구조의 다양함에 의하여 여러 가지 물성을 나타내므로 특이적인 목적에 활용될 수 있다는 일반적인 장점을 가지고 있다(1). 각각의 미생물이 생산하는 biosurfactant의 종류와 물성은 극히 다양하며, 여러 목적에의 폭 넓은 응용이 기대된다.

*Bacillus*에서 생산되는 biosurfactant는 lipopeptide형으로서(2), 단순 peptide 형태인 gramicidin S(3)와 tyrocidine(4), 7개의 amino acid cyclic peptide에  $\beta$ -hydroxy fatty acid가 ester 결합을 하고 있는 surfactin(5-7), 7개의  $\alpha$ -amino acid와 한개의  $\beta$ -amino acid 잔기를 갖는 iturin(7)으로 대별할 수 있다. 이중 surfactin은 혈전 용해제로 알려져 있다. Surfactin의 hydrophilic 부분은 peptide로서, 상당히 높은 표면 활성을 갖는다(5). Surfactin은 0.005%의 낮은 농도에서 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>의 표면장력을 71.6 dyn/cm에서 27.9 dyn/cm로까지 저하시킬 수 있는 높은 표면 활성을 가지며, 이는 합성 계면활성제 중 우수한 능력을 갖고 있는 SLS(sodium lauryl sulfate)에 필적할 만한 정

**Key words:** Biosurfactant, *Bacillus subtilis*, surfactin, gene cloning

\*Corresponding author

도이다(6). 또한 항진균활성, 항종양활성, 항혈액응고활성 등의 특징을 갖고 있어 산업 및 의학분야에서의 광범위한 응용이 기대되고 있다(8, 9). 그러나 이러한 두드러진 특징을 갖고 있음에도 불구하고, 그 생합성 경로나, fatty acid와 peptide의 결합 등에 관해서는 자세히 연구되어 있지 않으며, 그 생산성 또한 낮다(9). 그리고, *Bacillus*는 *E. coli*에 비하여 외부 유전자를 용이하게 잘 받아들이지 않으며, vector에 삽입된 DNA 종류에 따라서는 세포내에서 plasmid의 재조합 빈도가 높다. 이런 특징 등으로 인하여 surfactin의 유전자 cloning에 관한 연구도 극소수에 불과하다(10-12). 현재까지 밝혀진 몇몇 surfactin producing gene의 경우도, 그 생합성 경로에서 비슷한 기능을 수행한다는 잠정적 결론을 내고 있다(9, 12-14).

현재, surfactin과 iturin을 포함하는 *Bacillus* 유래의 lipopeptides는 biosurfactant로서 뿐만 아니라 항균활성과 식물방제의 측면에서 상당한 연구가 진행되고 있다(7, 8, 15). 그러나 마찬가지로 그 효과의 기작에 대해서는 명확히 밝혀진 바가 없으며, 식물의 종이나 병의 종류, 재배조건 등에 따라 많은 영향을 받는 등 연구되어야 할 문제들이 많이 남아 있지만(15), 근년내 합성기구 및 식물방제효과의 기구 등의 해명에 상당한 진보가 있을 것으로 기대된다.

전술한 바와 같이 *Bacillus* sp. 유래의 lipopeptide 형 biosurfactant의 용도는 다양하며 아직 많은 연구가 수행되지는 않았으나, 그 잠재적 이용가능성은 무한하다할 수 있겠다. 따라서 본 연구는 *Bacillus* 유래의 새로운 lipopeptide 유전자의 탐색과 더불어 Srf<sup>-</sup>인 *Bacillus subtilis* 내에서의 발현을 보고자 하는 목적과, 합성기구의 해명에 대한 기초자료로 삼기 위하여 수행하였다.

## 재료 및 방법

### Biosurfactant 생산균주의 분리 및 동정

본 연구에서 사용된 균주는 전국 각지의 토양으로부터 분리한 200여 균주로부터 선별하였다. 분리용 평판배지상에서 37°C, 24시간 배양한 후, biosurfac-

tant 활성이 우수한 균주 1주를 최종 선별하여 실험에 사용하였다. 분리용 배지로는 oil-L agar plate(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.3 with NaOH, 1.5% agar, spread with oil)를 사용하였다. L agar plate에 40 μl의 oil을 도포하고 37°C에서 1일간 배양한 다음 colony 주위에 emulsified halo가 나타나는 균을 biosurfactant 생산균주로 선별하였다. 최종 선별된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(16)와 微生物の 分離と 同定(下)(17)에 준하여 동정하였다.

### 사용균주 및 plasmid

Biosurfactant 생산 유전자의 공여균주로는 분리된 biosurfactant 생산균인 *Bacillus subtilis*로 동정된 균주를 사용하였고, Table 1과 같이 surfactant를 생산하지 못하는 *B. subtilis* MI113을 숙주세포로, 재현성 확인을 위하여 *B. subtilis* MI112(18), biosurfactant 생산 유전자의 amplification을 위하여 *E. coli* JM103(21)을 사용하였다. 그리고 vector plasmid로는 pTB523(19), pUC19(20)를 각각 *B. subtilis*와 *E. coli*의 vector로서 사용하였다. pTB523은 copy 수가 약 8개 정도로 적으므로 pTB523을 다량 얻기 위하여 pUC19의 다 copy 성질을 이용 *E. coli*에서 pTB523과 pUC19의 shuttle vector를 만들어 사용하였다.

### 배지 및 배양

*B. subtilis*의 균체증식을 위한 배지는 L 배지(pH 7.2)를 사용하였으며, 37°C에서 24시간 진탕배양하였고, 형질전환체의 배양배지도 L 배지를 사용하였다. Biosurfactant 생산 유전자 선별을 위해서는 L 평판 배지를 사용하였다. 그리고 항생물질은 tetracycline 25 μg/ml의 최종 농도로 첨가하였다.

### 효소 및 시약

Lysozyme, agarose, RNase 등은 Sigma Co., T<sub>4</sub> DNA ligase와 각종 제한효소들은 Toyobo 또는 Promega 제품을 사용하였고, 기타 일반 시약류는 시판 특급이상의 분석용을 사용하였다.

Table 1. Strains and vector plasmids used

Strain/plasmid	Genotype and characteristic	Source
<i>B. subtilis</i> MI113	<i>arg</i> <sup>-</sup> 15, <i>trpC2</i> , <i>hsrM</i> <i>hsmM</i>	Imanaka et al <sup>18)</sup>
<i>B. subtilis</i> MI112	<i>arg</i> <sup>-</sup> 15, <i>trpC2</i> , <i>hsrM</i> <i>hsmM</i> , <i>rec</i> <sup>-</sup>	Imanaka et al <sup>18)</sup>
<i>E. coli</i> JM103	<i>thiΔ</i> ( <i>lac-proAB</i> ), <i>strA</i> , <i>supE</i> , <i>endA</i> , <i>sbcB</i> , <i>hsdR</i> <sup>-</sup>	Sambrook et al <sup>21)</sup>
pTB523	Tc <sup>r</sup>	Imanaka et al <sup>19)</sup>
pUC19	Ap <sup>r</sup>	Messing et al <sup>20)</sup>

## DNA 분리

Chromosomal DNA는 CsCl-EtBr equilibrium density gradient ultracentrifugation 법(22)에 의하여 분리 사용하였다.

Plasmid는 필요에 따라 PEG 침전법(23) 또는 rapid alkaline lysis 법(24, 25) 등을 이용하여 분리, 정제하여 사용하였다.

## *Bacillus subtilis*의 형질전환

형질전환 방법은 Anagnostopoulos와 Spizizen<sup>o</sup> 확립한 방법(26, 27)에 준하여 행하였으며, subcloning을 위해서는 autolysis를 촉발하는 2가 양이온을 사용한 방법(28, 29)에 준하였다. 그 방법은 다음과 같다. 전배양한 *B. subtilis* MI113을 L 배지에 1%가 되도록 접종하고 OD<sub>660 nm</sub>에서 0.7~0.8<sup>o</sup> 될 때까지 진탕배양하였다. 1 ml의 배양액을 Eppendorf tube에 옮긴 후, 10,000×g에서 2분간 원심분리하여 세포를 모은 다음, glass tube(15ΦP×105 mm)에 든 3 ml의 410 mM KCl solution에 혼탁시켰다. 30°C에서 30분간 정치하여 반응시킨 후 200 μl의 혼탁액을 취하여 DNA sol'n과 섞어 준 다음 30°C에서 10분간 반응한 후, 200 μl의 70% PEG 6000을 가하였다. 30°C에서 5분간 반응한 다음 45°C에서 90초간 열처리하였다. 30°C로 cooling 한 후, LC medium(L medium supplemented with 100 mM CaCl<sub>2</sub>)으로 PEG를 회석하여 원심분리(10,000×g, 2분)로 균체만을 회수하였다. 균체를 0.5 μl의 L 배지에 혼탁시켜 2시간 동안 배양한 후, L-oil 한천 배지에 도말하여 배양하고 형질전환체를 얻었다.

형질전환체의 혼탁액을 tetracycline을 첨가하고 표면에 원유를 바른 L 평판배지에 도말하고, 37°C에서 16시간 배양하여 biosurfactant 활성이 있는 것을 선별하였다.

## Gel electrophoresis

Gel electrophoresis는 TBE buffer(0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA, pH 8.0)를 사용하여 Maniatis 등이 사용한 방법(24)에 따라 mini gel system(Mupid Co.)에서 실시하였으며, agarose gel 상의 DNA 절편은 electroelution 방법과 ISCO 사의 electroelutor를 사용하여 추출, 회수하였다.

## Biosurfactant 활성 test

형질전환체를 50 ml L 배지(tetracycline 첨가)에서 37°C, 24시간 진탕배양한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 biosurfactant 활성측정

을 위한 시험액으로 사용하였다(30, 31). Biosurfactant 활성측정은 한국 공업규격에 명시되어 있는 비표면장력계산법을 이용하였다. 비표면장력계에 일정량(6 ml)의 시료액을 넣고, 하부의 모세관에서 이 액이 적하되는 방울수를 측정한 후, 종류수의 방울수와 비교하여 상대적인 표면장력을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리된 biosurfactant 생산균주의 동정

최종 선별된 균주 KL-57의 영양세포는 Gram 양성의 간균으로서 포자를 형성하며 운동성을 나타냈다. 또한, catalase와 V-P test 양성인 반면 urease, nitrate reduction, indole 형성능 등에는 음성을 보였으며, starch, casein, gelatin을 가수분해하는 중온균이었다 (Table 2).

이상의 결과를 종합해 볼 때 KL-57 균주는 *B. subtilis*의 형태적, 생화학적 특징과 같으므로 *B. subtilis* KL-57로 명명하였다.

Table 2. Morphological and biochemical properties

Characteristic	KL-57	<i>B. subtilis</i>
Morphological characteristics		
Gram staining	+	+
Shape of cell	Rod	Rod
Spore formation	+	+
Motility	Motility	Motility
Biochemical characteristics		
Catalase	+	+
Unaerobic growth	-	-
V-P test	+	+
Urease	-	-
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of casein	+	+
starch	+	+
gelatin	+	+
Utilization of citrate	+	+
Growth in NaCl 2%	+	+
5%	+	+
7%	+	+
Growth at 30°C	+	+
40°C	+	+
55°C	-	ND
Indole formation	-	-
Reduction of nitrate	-	-

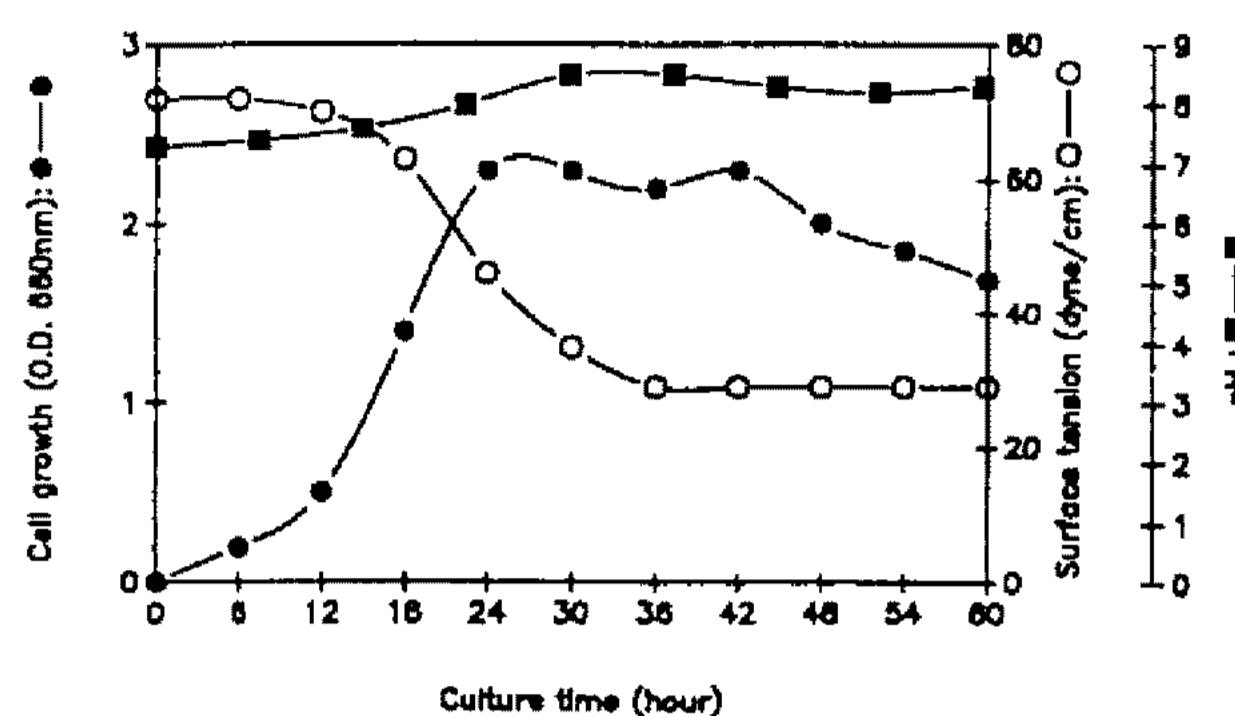


Fig. 1. Time course of growth, pH and surface tension.

### Biosurfactant의 생산

분리 동정된 균주 *B. subtilis* KL-57의 생육과 biosurfactant 생산과의 관계를 검토하기 위하여 L 배지에서 균주의 증식, pH, 표면장력을 측정하여 Fig. 1에 나타냈다. Biosurfactant의 활성은 균체의 증식이  $OD_{660\text{nm}}=0.5$ 에 이르렀을 때 나타나기 시작하여 대수증식기가 끝난 후 최대의 활성을 나타냈다. 이 결과는 *Bacillus* sp.에서 대수증식기가 끝난 후 정지기에 들어가 최대의 생산을 보인다는 Carins의 보고(1)와 일치한다.

### Biosurfactant 합성 유전자의 cloning

Biosurfactant를 생산해 내는 *B. subtilis*의 chromosomal DNA를 분리하여 *Pst*I 제한효소로 절단하여 분리회수한 2~20 kb의 DNA 단편과 *Pst*I으로 절단한 pTB523 DNA를 ligation 시킨 다음, *B. subtilis* MI113을 형질전환시켜, 약  $1 \times 10^5$ 개의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체로부터 뚜렷한 biosurfactant 활성을 나타내는 1개의 colony를 분리할 수 있었다. Fig. 2는 이때의 실험과정을 나타낸 것이다. Fig. 3에서는 *B. subtilis* KL-57의 biosurfactant 생산 활성과 cloning된 biosurfactant 생산 유전자를 갖는 균주 *B. subtilis* MI113이 활성을 나타내는 것을 보이고 있다.

한편, biosurfactant 활성을 나타낸 형질전환체로부터 분리한 plasmid를 *Pst*I으로 절단하여 18 kb의 외래 DNA를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이 recombinant plasmid를 pBS101이라 명명하였다.

### Biosurfactant 합성 유전자의 제한효소 site 분석

Insert DNA의 cleavage site의 분석을 위하여 각 제한효소로 절단 분석하여 본 결과 9.2, 5.2, 2.2, 1.4 kb로 나누는 3개의 *Sma*I site를 가지고 있으며, 6.6, 8.9, 2.5 kb로 나누는 2개의 *Eco*RI site와 8.3, 6.0, 3.54 kb로 나누는 2개의 *Pvu*II site를 갖고 있었으며, 16.6과 1.4 kb로 나누는 1개의 *Hind*III site, 10.6과 7.4

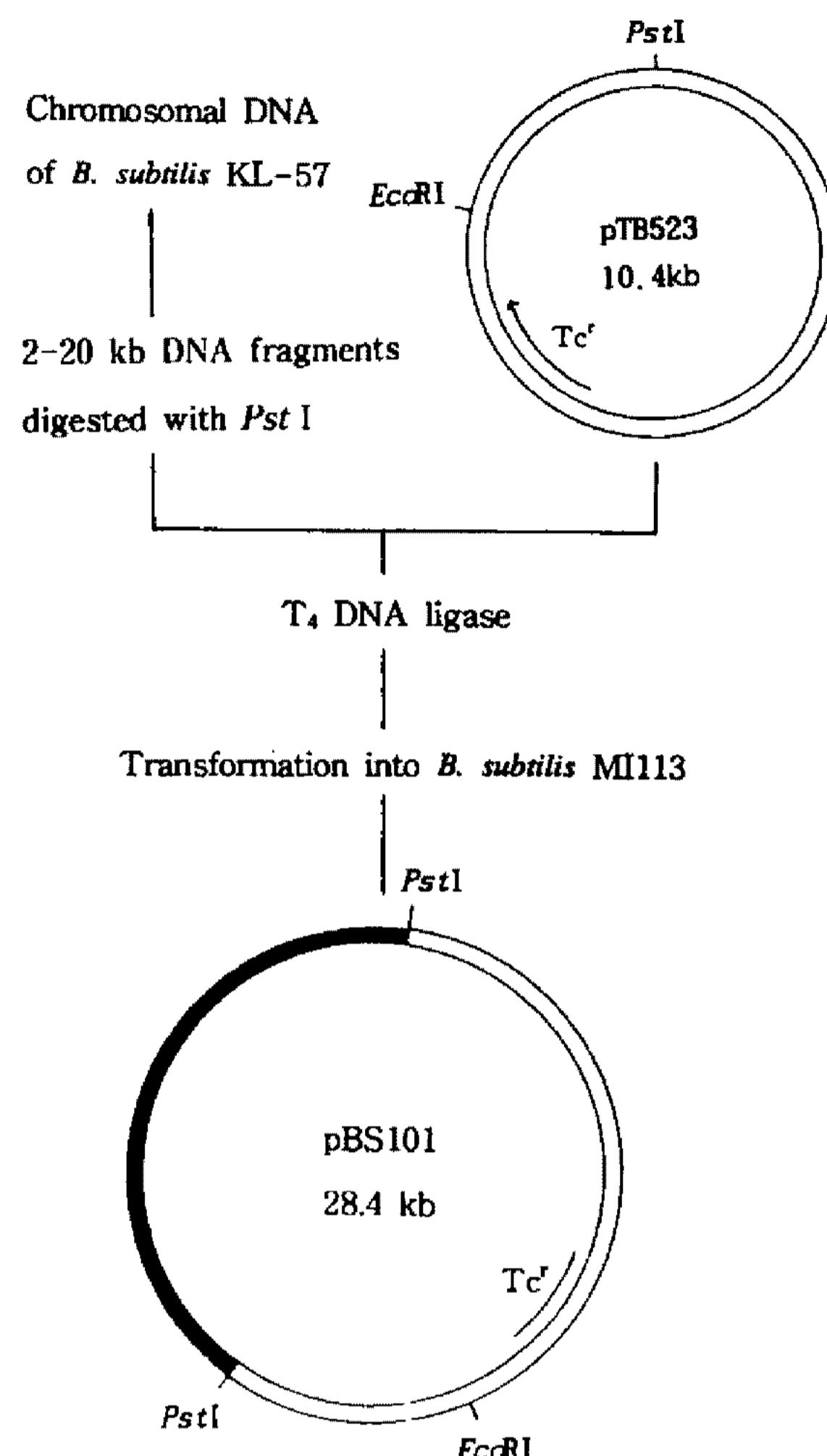


Fig. 2. Schematic diagram of the cloning strategy.

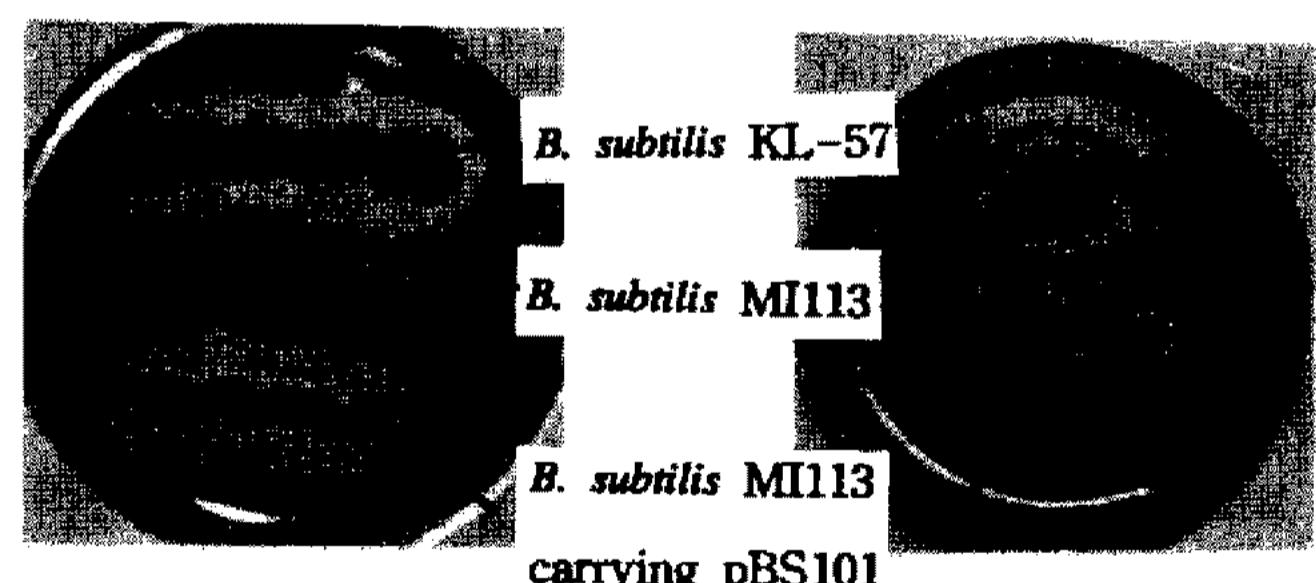
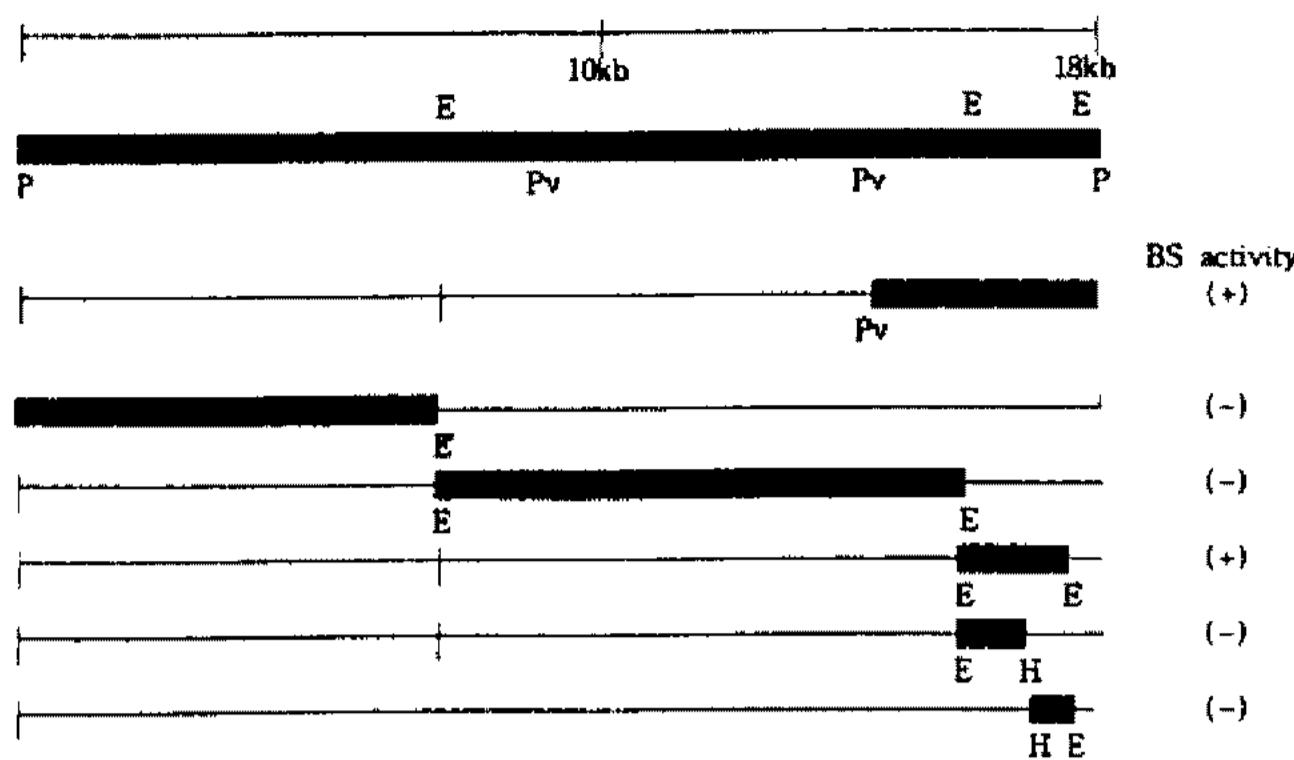


Fig. 3. Production of biosurfactant of *B. subtilis* MI113 carrying biosurfactant-producing gene.

kb로 나누는 1개의 *Bam*HI site와 12와 6 kb로 나누는 1개의 *Kpn*I을 갖고 있었다. *Acc*I의 site는 4개로서 2.5, 3.23, 5.23, 5.69, 1.38 kb가 관찰되었다.

### Biosurfactant 합성 유전자의 subcloning

결정된 biosurfactant 유전자의 제한효소 site를 토대로 subcloning을 행하였다. *Pvu*II와 *Eco*RI의 각 fragment를 pTB523과 pUC19의 shuttle vector에 liga-



**Fig. 4. Restriction map of the 18 kb DNA fragment carrying biosurfactant-producing gene.**

Abbreviations of restriction enzymes: E, EcoRI; Pv, Pvull; H, HindIII; P, PstI. BS is biosurfactant.

**Table 3. Biosurfactant activity of bacterial strain**

Strains	Final pH	Surface tension
<i>B. subtilis</i> KL-57	8.45	29 (dyne/cm)
<i>B. subtilis</i> MI113	8.7	69
<i>B. subtilis</i> MI113 carrying pBS101	8.38	32

tioning 하여 transformation 하여 본 결과 *EcoRI*의 2.3 kb에서 뚜렷한 biosurfactant 활성을 나타내었다. 이 2.3 kb의 *EcoRI* fragment는 1개의 *HindIII* cleave site를 갖고 있었으며 *EcoRI/HindIII* 말단의 두개의 fragment는 공히 활성을 보이지 않았다(Fig. 4).

#### 재조합균의 biosurfactant 활성 측정

*Bacillus subtilis* KL-57과 recombinant를 각각 1일간 배양하여 surface activity를 조사하여 본 결과 Table 3과 같은 결과를 얻었다.

Wild type의 균주 KL-57의 경우 Arima가 보고(6) 한 바와 같이 상당히 높은 표면활성을 가졌다. 앞으로 cloning된 유전자의 조작과 더불어 배양조건 검토 및 mutation 등의 방법을 통한 연구가 진행된다면 표면활성 및 생산수율 등이 더욱 향상될 것으로 생각된다.

앞에서 살펴 본 바와 같이 *EcoRI* 말단의 2.3 kb의 유전자는 이미 밝혀진 3개의 surfactin 생산 유전자 (*sfp*, *srfA*, *srfB*)와는 제한효소 site들이 틀리는 것으로 보아 surfactin 생산을 위한 다른 유전자로 생각된다 (9, 10, 12, 13). 한편 전술한 3가지 유전자는 염기배열의 유사성을 보이고 있으며, surfactin 생산에 유사한 기능을 하고 있다는 것이 밝혀졌다(9, 12). 본 연구의 2.3 kb의 유전자도 Srf 균주로의 역돌연변이를 유도하여 BS 균주와의 관계 등을 밝혀낼 수 있다면 sur-

factin 생합성의 기구를 해명할 수 있는 실마리가 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

L-oil 평판배지에서 emulsified halo를 만드는 균주를 분리하였다. 이 균주는 *Bacillus subtilis* KL-57로 동정되었다. 이 균주의 염색체 DNA를 분리하여, pTB 523의 *PstI* site에 ligation 하고, 생체계면활성제를 생산하지 못하는 *Srf*<sup>-</sup>인 균주 *B. subtilis* MI113을 형질전환하여 *Srf*<sup>+</sup> clone을 얻었다. Insert DNA는 18 kb이며, cloning 된 biosurfactant 유전자의 제한효소 site를 분석한 결과 *SmaI* site 3개, *Pvull*와 *EcoRI* site 각각 2개, *KpnI*, *HindIII*, *BamHI* site가 1개씩 있으며, *AccI* site는 4개 존재하였다. 이를 토대로 2.3 kb의 biosurfactant 생산 유전자를 얻었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1991~1992년도 한국과학재단 목적기초 연구비(과제번호 913-0406-023-2) 지원의 일부로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Kosaric., N. and W.L. Carins. 1987. *Biosurfactant and Biotechnology*. Pp. 1-20. Marcel Dekker, Inc. New York.
2. Cooper, D.G. and J.E. Zarjic. 1980. Surface-active compound from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-253.
3. Kratzschmar, J., M. Krause, and M.A. Marahiel. 1980. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an openreading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J. Bacteriol.* **171**: 5422-5429.
4. Mittenhuber, G., R. Weckermann, and M.A. Marahiel. 1989. Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetase 1 and 2 from *Bacillus brevis*; evidence for an operon. *J. Bacteriol.* **171**: 1881-1887.
5. Kameda, Y., S. Ohira, K. Matsui, S. Kanatomo, T. Hase, and T. Atsusaka. 1974. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD2311. *Chem. Pharm. Bull.* **22**: 938-944.
6. Arima, K., A. Kakimura, and G. Tamura. 1967. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant

- produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**: 88-494.
7. Hiraoka, H., T. Ano, and M. Shoda. 1992. Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 323-326.
  8. Yukinori, T., A. Takashi, and S. Makoto. 1993. Survival of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal-antibiotic iturin producer, and its transformation in soil-system. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 107-111.
  9. Masaaki, M., I. Mikito, and I. Tadayuki. 1992. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and Nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 255-261.
  10. Nakano, M., N. Corbell, J. Besson, and P. Zuber. 1992. Isolation and characterization of *sfp*; a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molec. Gen. Genet.* **232**: 313-321.
  11. Imanaka, T., M. Kuroda, and K. Sakaguchi. 1987. Cloning and nucleotide sequence of the penicillinase antirepressor gene of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3867-3872.
  12. Nakano, M.M., M.A. Marahiel, and P. Zuber. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 5662-5668.
  13. Nakano, M.M. and P. Zuber. 1989. Cloning and characterization of *srfB*, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **171**: 5347-5353.
  14. Nakano, M.M., R. Magnuson, A. Myers, and P. Zuber. 1991. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 1770-1778.
  15. Phae, C.G., M. Shoda, and H. Kubota. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 1-7.
  16. Sneath, P.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1984. Genus *Bacillus* Cohn, Pp. 1105-1139. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins. Baltimore, USA.
  17. 長谷川武治. 1985. 微生物の分離と同定. 好氣性細菌, Pp. 99-161. 學會出版センタ-.
  18. Imanaka, T., M. Fujii, and S. Aiba. 1981. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. *J. Bacteriol.* **146**: 1091-1097.
  19. Imanaka, T., T. Himeno, and S. Aiba. 1987. Cloning and nucleotide sequence of the penicillinase anti-repressor gene of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3867-3872.
  20. Messing, J. New M13 vectors for cloning. *Method enzymol.* **101**: 20.
  21. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Pp. 4.14-4.15. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
  22. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, Pp. 76-96. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  23. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Pp. 1.40-1.41. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
  24. Holmes, D.S. and M. Quigley. 1981. A rapid method for the precipitation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193.
  25. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
  26. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen. 1961. Requirement for transformation in *Bacillus subtilis*, and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **81**: 741-746.
  27. Ano, T., A. Kobayashi, and M. Shoda. 1990. Transformation of *Bacillus subtilis* with the treatment by alkali cations. *Biotechnol. Lett.* **12**: 99-104.
  28. Hiraoka, H., T. Ano, and M. Shoda. 1991. Rapid transformation of *Bacillus subtilis* using KCl-treatment. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 241-243.
  29. Chang, S. and S.N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molec. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
  30. 한국공업표준협회. 1991. 한국공업규격 합성세제 시험법 KSM 2707, M2709-1991, Pp. 1-59. 한국공업 표준협회 발행.
  31. 강상모, 김대원, 김혜자. 1994. Biosurfactant를 생산하는 *P. aeruginosa* KK-7의 분리 및 biosurfactant의 생산. 산업미생물학회지 **22**: 92-98.

(Received August 22, 1994)