

Urease gene의 전이에 의한 길항세균 *Bacillus* sp. SH14의 길항능력 증가

최종규 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Improvement in Antagonistic Ability of Antagonistic Bacterium *Bacillus* sp. SH14 by Transfer of the Urease Gene. Choi, Jong-Kyu and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea - It were reported that antifungal mechanism of *Enterobacter cloacae* is a volatile ammonia that produced by the strain in soil, and the production of ammonia is related to the bacterial urease activity. A powerful bacterium SH14 against soil-borne pathogen *Fusarium solani*, which cause root rot of many important crops, was selected from a ginseng pathogen suppressive soil. The strain SH14 was identified as *Bacillus subtilis* by cultural, biochemical, morphological method, and API® test. From several *in vitro* tests, the antifungal substance that is produced from *B. subtilis* SH14 was revealed as heat-stable and low-molecular weight antibiotic substance. In order to construct the multifunctional biocontrol agent, the urease gene of *Bacillus pasteurii* which can produce pathogenes-suppressive ammonia transferred into antifungal bacterium. First, a partial *BamH* I digestion fragment of plasmid pBU11 containing the alkalophilic *B. pasteurii* 11859 urease gene was inserted into the *BamH* I site of pEB203 and expressed in *Escherichia coli* JM109. The recombinant plasmid was designated as pGU366. The plasmid pGU366 containing urease gene was introduced into the *B. subtilis* SH14 with PEG-induced protoplast transformation (PIP) method. The urease gene was very stably expressed in the transformant of *B. subtilis* SH14. Also, the optimal conditions for transformation were established and the highest transformation frequency was obtained by treatment of lysozyme for 90 min, and then addition of 1.5 µg/ml DNA and 40% PEG4000. From the *in vitro* antifungal test against *F. solani*, antifungal activity of *B. subtilis* SH14(pGU366) containing urease gene was much higher than that of the host strain. Genetical development of *B. subtilis* SH14 by transfer of urease gene can be responsible for enhanced biocontrol efficacy with its antibiotic action.

Key words: antifungal, urease gene, *Bacillus subtilis* SH14(pGU 366) *Bacillus pasteurii*, *Fusarium solani*, pEB 203

최근 새로운 생물방제균으로 주목받고 있는 *Enterobacter cloacae*의 길항작용이 휘발성 ammonia에 의한 것이라는 보고[3, 8, 11, 27]와, 이 균이 토양내에서 생산하는 ammonia가 식물병원균인 *Pythium*, *Fusarium*, *Phymatotrichum*, *Phytophthora* 등의 생육을 억제한다는 보고 [7, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25] 등으로 미루어 볼 때 ammonia 생산도 생물방제균의 중요한 길항기작으로 급부상되고 있다. 이러한 사실이 최근 밝혀진 후 길항미생물이 토양환경의 pH를 조절함으로써 식물병원성 진균의 생육을 억제하는 환경조절적(environmental control) 작용의 이론도 확립되었다[8, 11]. Urea는 포유동물의 질소성 분비 산물로서 지구상에서 풍부하게 존재하는 성분이고 토양내에서의 ammonia의 생산은 미생물성 urease에 의해서 요소(urea)의 분해로부터 쉽게 얻을 수 있다. Urease는 100여 종의 세균에서 생산되며, urea를 가수분

해하여 ammonia 분자와 carbonic acid를 생산하게 되며, 시간이 경과함에 따라 계속해서 ammonia는 물과 반응하여 ammonium hydroxide를 형성하게 되고, 그것은 결국 pH의 급격한 상승 결과를 낳게 된다. 따라서 ammonia 생성과 그로인한 pH의 상승은 식물병원균의 생육을 억제하게 되는 이유라고 생각되어진 것이다[9].

이러한 보고들을 근거로 하여 본 연구에서는 저병해 인삼경작지로부터 인삼근부병을 강하게 억제하는 한 균주의 항생물질 생산성 길항미생물을 선발하여 동정하고, 선발된 이 길항균주 *Bacillus subtilis* SH14에 urease 생산력이 가장 강한 균으로 알려진 *Bacillus pasteurii*의 urease 유전자를 subcloning하여 형질전환함으로써 ammonia 생성유전자를 생물방제균주에 추가하여 방제효과가 보다 높은 다기능적 생물방제균으로의 유전공학적 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

길항세균의 분리

*Corresponding author
Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@yucc.yeungnam.ac.kr

경북 영주시 소재 저병해 인삼경작지 토양으로부터 채취한 토양시료를 nutrient agar(NA) 평판배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양하여 얻어진 세균집락을 분리하였고, 길항세균의 선발은 대표적인 식물근부균 *Fusarium solani*를 대상으로 먼저 potato dextrose/nutrient (PDN) agar 평판배지[28]를 이용하여 pairing culture method(대치배양법)으로 조사하였으며, 여기서 가장 강한 길항력을 나타내는 균을 선발하였다.

길항세균의 억제기작 조사

선발된 길항세균의 항진균성 길항기작이 항생물질과 같은 저분자물질에 의한 것인지를 확인하기 위하여 길항세균의 배양액을 원심분리해서 그 상등액을 80°C에서 60분간 가열처리 한 후 Amicon centrprep 10(MW 10,000)의 저분자 분획을 potato dextrose broth에 첨가한후 *F. solani*의 포자체를 첨가하여 5일간 배양시킨 후 Whatman filterpaper NO. 2로 여과, 90°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 그 균체중량을 측정, 비교하였고, 또한 선발된 길항균주가 외막가수분해 효소인 chitinase를 생산하는지 알아보기 위해서 탄소원으로 colloid chitin이 함유된 chitin minimal medium(CMM) 즉 1% colloidal chitin, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.03% KH₂PO₄, 0.07% K₂HPO₄, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 1.2% agar에 길항균주를 접종하여 28°C에서 15일간 배양하면서 colony 주위에 clear halo zone의 생성유무를 관찰하였다.

길항세균의 분류학적 동정

최종선발된 길항균주의 분류학적 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology[15] 및 Manual of methods for general bacteriology[6]의 방법에 따라 형태, 배양학적 특성 및 생리, 생화학, 영양학적 특성을 조사하였으며, 아울러 API® test를 통하여 동정하였다.

Urease gene의 subcloning

Urease gene은 Kim 등이 cloning한 바 있는 10.7 Kb 크기의 *B. pasteurii* urease gene library pBU11[12]를 사용하였으며, vector plasmid는 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pGB215-110, pGR71과 pEB203[20]를 이용하였다. Marker 항생제는 plasmid pGR71의 경우 kanamycin(Km)과 chloramphenicol(Cm)를 50 µg/ml와 20 µg/ml, pGB215-110의 경우 ampicillin(Ap)과 Km을 50 µg/ml와 5 µg/ml, pEB203의 경우는 Ap와 Km을 50 µg/ml와 10 µg/ml를 각각 최종농도로 첨가하였다.

Alkali lysis방법[4]에 따라 pBU11[12]을 분리하였고, 단일의 urease gene단편을 얻기 위해서 *Bam*HI로 partial digestion하고[29], 이것을 0.6% low melting agarose gel 상에서 60 V로 전기영동을 실시한 후 중간

의 *Bam*HI site가 절단되지 않은 urease gene fragment의 단일 band가 위치한 부분의 gel을 절단해낸 후 β-agarase를 이용하여 DNA 단편을 elution하였으며 ethanol 침전법으로 분리하였다.

Ligation을 위해 vector plasmid를 제한효소로 절단 후 calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)로 탈인산화하고, ligation kit ver.II®(TaKaRa)를 이용하여 urease gene fragment 15 µl와 탈인산화된 pEB203 5 µl(약 50 ng)를 섞은 후 ligation kit sol.II 20 µl를 첨가하여 16°C에서 30분간 처리하였으며, urease gene library가 함유된 이 recombinant plasmid를 pGU366로 명명하였으며 이것을 형질전환에 이용하였다. 이때 plasmid DNA 농도의 측정은 OD₂₆₀의 1.0을 ml당 50 µg의 DNA량으로 하여 환산하였다[23].

Urease gene에 의한 *E. coli*의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 Mandel과 Higa의 CaCl₂ 방법[17]을 따라 행하였다. Urease-positive 형질전환체의 선별은 항생제 Ap 내성 colony를 일차선발하고, 최종적으로 Ap 함유 Christensen urea agar(CUA) 평판배지[14]상에 tooth pick replica법으로 spot하여 붉은색으로의 변색여부로 urease-positive colony를 선발하였다.

길항균주 *Bacillus subtilis* SH14의 형질전환

Bacillus subtilis SH14의 형질전환은 Chang과 Cohen의 방법[5]에 의거해서 PEG-induced protoplast(PIP) 형질전환법을 이용하였고, protoplast regeneration medium은 mannitol regeneration agar[13]를 사용하였다.

항생제는 Ap를 사용하였고, 최종농도가 50 µg/ml되도록 첨가하였으며, transformant는 재생배지에서 일차선발한 후, 항생제 Ap 함유 CUA 평판배지[14]에 tooth pick replica법으로 spot하여 붉은색으로의 변색여부로써 최종선발하였다.

형질전환체의 urease 생산성 측정

Recombinant plasmid로 형질전환시킨 생물방제균 *B. subtilis* SH14의 형질전환체가 암모니아 생성 유전자, 즉 urease gene을 정상적으로 발현시키려는가를 조사하기 위해 urea R broth(Ap 50 µg/ml)에서 4일간 30°C에서 배양하면서 생성되는 적색도를 흡광도 550 nm에서 측정하였다[12].

Urease gene에 의한 길항력 증강

Urease gene이 도입된 형질전환체 *B. subtilis* SH14(pGU366)의 식물근부균 *F. solani*의 생육억제능을 조사하기 위해서 0.5% urea와 Ap가 함유된 PDNA 평판배지에서 대치배양법으로 조사하였다.

한편 *B. subtilis* SH14(pGU366)의 배양물을 0.5% urea와 Ap 함유 potato dextrose broth에 첨가한 후 식물병원균의 전 배양 균사체를 균등하게 접종하여 28°C, 160 rpm으로 7일간 배양하였으며 filter paper로 여과 건조하여 그 건조 균체량을 측정 비교하였다.

결과 및 고찰

길항세균의 선발 및 항진균성 억제기작

식물근부균의 생육을 억제하는 길항균주를 분리하기 위하여 저병해 인삼경작지 토양으로부터 130여 균주를 분리하였다. 길항균주의 선발을 위해서 PDNA 평판배지에서 *F. solani*를 대상으로 생육억제거리 측정법으로 조사하여 colony 증식 선단간의 거리가 0.8 cm 이상의 균주 10종을 Table 1에서 보는 것과 같이 선발하여 그 중에서 가장 강한 길항력을 나타내는 SH14 균주를 선발하였다.

식물병원성 진균인 *F. solani*에 대한 길항기작과 길항 물질을 조사해 본 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 열처리된 저분자물질(분자량 10,000이하)을 대상으로 할 때 균체중량법의 경우는 그 진균 생육억제력이 88.1%였으며, 억제거리측정법에서는 93.2%의 억제력을 나타내었다. 또한 식물근부균 *F. solani*에 대한 억제기작이 흑색 *F. solani* 외막의 주성분인 chitin의 가수분해효소인 chitinase에 의한 기작인지를 알아보기 위해서 CMM 평판배지에 길항균을 배양하며 관찰한 결과 colony주위에 clear halo zone이 전혀 형성되지 않았으며, 길항균 배양액 전체 억제력의 대부분에 해당되는 억제력이 저분자 열처리 분획에서 나타났다. 이 결과로 미루어보아 선발된 SH14의 식물근부균 *F. solani*에 대한 억제기작은 저분자 물질인 항생물질에 의한 것으로 생각되었다.

Table 1. Antifungal activity of the selected strains against *F. solani*

Strains	Antifungal activity
	Inhibition distance (mm) ^a
SH14	13.2
SH27	12.0
SH11	10.7
SH08	9.7
SH14	9.6
SH33	9.0
SH19	8.8
SH27	8.5
SH08	8.1
SH33	8.2
Control	0.0

The bacteria were grown in nutrient agar (NA) medium at 30°C for 84 hr. ^aDistance between the edges of the bacterial colony and fungal mycelium on PDNA plate after incubation at 28°C for 5 days.

Table 2. Antifungal activity of *B. subtilis* SH14 against *F. solani*

Prepn.	Fungal dry weight ^a		Fungal colony size ^b	
	Inhibition (%) ^c	Relative ratio (%)	Inhibition (%) ^d	Relative ratio (%)
Culture filtrate ^{a)}	53.2	100	51.8	100
Heat-treated low MW substance ^{b)}	46.9	88.1	48.3	93.2

^{a)}*B. subtilis* SH14 was grown in NB medium at 30°C for 84 hr.

^{b)}The culture filtrate of *B. subtilis* SH14 was treated at 80°C for 60 min, and centrifuged with Amicon centriprep[®] 10 (MW 10,000).

^{c)}Dry weight of *F. solani* with the heat treated low MW substance of *B. subtilis* SH14 on PDB after 5 days incubation at 28°C.

^{d)}Colony circle diameter of *F. solani* with the heat treated low MW substance of *B. subtilis* SH14 on PDA plates after 5 days of incubation at 28°C.

^{e)}Completely inhibition ratio (100%) – dry weight of *F. solani* cultured with solution relative to those cultured with water.

^{f)}Completely inhibition ratio (100%) – colony circle diameter of *F. solani* cultured with solution relative to those cultured with water.

길항세균의 분류학적 동정

최종선발된 길항균주 SH14의 분류학적 동정을 위해

Table 3. The identification characteristics of the isolated antifungal strain SH14

Characteristics	Isolate SH14	<i>Bacillus subtilis</i>
Gram stain	+	+
Cell form	Rod	Rod
Endospores produced	+	+
Motile	+	+
Anaerobic growth	-	-
Voges-Proskauer test	+	+
Catalase test	+	+
Oxidase test	+	+
Acid from D-glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
D-Mannitol	+	+
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+
Utilization of Citrate	+	+
Nitrate reduced to nitrite	-	-
Degradation of tyrosin	-	-
Deamination of phenylalanine	-	-
Formation of Indole	+	+
Growth at NaCl 2%	+	+
5%	+	+
7%	-	ND
10%	-	ND
API [®] (50CHB)	<i>B. subtilis</i>	

+: Positive, -: Negative, ND: No data available.

행한 배양학적, 형태학적 특성, 생리 및 생화학적 특성을 Table 3에 나타내었다. 아울러 API® test kit를 이용한 동정을 함께 병행하였다. 이를 Bergey's manual of systematic bacteriology[15] 및 Manual of methods for general bacteriology[6]과 API® test 결과를 토대로 검토해 본 바 SH14는 *Bacillus subtilis*이거나 그 근연종일 것으로 추정되었다.

Vector plasmid의 선정

E. coli-Bacillus shuttle vector인 pGB215-110, pGR71, 그리고 pEB203를 대상으로 PEG-induced protoplast (PIP) 형질전환법에 의해 선발된 길항균주 SH14에 도입하여 형질전환율을 조사해 본 결과 Table 4와 같이 pla-

Table 4. Transformation frequency of *B. subtilis* SH14 with the PEG-induced protoplast transformation

Plasmid	Size (Kb)	Transformation frequency /µg of plasmid DNA
pGB215-110	10.6	3.4×10^4
pGR71	8.4	7.5×10^3
pEB203	6.4	8.9×10^4

smid pEB203이 가장 우수한 형질전환율을 나타내었다. 따라서 urease 유전자 전이를 위한 vector plasmid를 pEG203을 사용하기로 하였다.

Urease gene library의 subcloning

Kim 등이 이미 cloning한 바 있고[12], urease 발현에 최소한 4.3 Kb가 필요하다고 보고된 pBU11[29]을 저농도 *Bam*H I으로 부분절단하고 0.6% low melting agarose gel 상에서 전기영동을 하여 중간부분의 *Bam*HI site가 절단되지 않은 urease gene fragment 부분만을 얻은후, *E. coli-Bacillus* shuttle vector인 pEB203[20]의 *Bam*HI site에 삽입하여 *E. coli* JM109를 형질전환함으로써 Fig. 1에서 보는 바와 같은 recombinant plasmid를 제작하여 pGU366으로 명명하였다.

재조합 plasmid pGU366으로 *E. coli* JM109를 형질전환하여 LB 평판배지(Ap 50 µg/ml)에서 항생제 내성 colony를 우선 선발한 후 다시 모든 Ap 내성 균주를 urea 함유 CUA 평판배지(Ap 50 µg/ml)에 tooth-pick replica하여 12개의 붉은색으로 변색된 urease-positive colony를 획득하였다. 이때 바로 CUA 평판배지를 이용하지 못한 이유는 배지에 함유된 urea가 형질전환에 나쁜영향을 미쳤기 때문이었다. Birnboim 등의 Alkali lysis 방법[4]에 따라 형질전환된 *E. coli* JM109(pGU366)으로부터 recombinant plasmid를 small scale로 얻었으며, 0.8% agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였다. 재조합 plasmid의 size는 약 17 Kb정도이며, *Bam*HI으로 절단해 본 결과 pBU11의 urease gene fragment의 band와 vector plasmid pEB203의 band를 확인할 수 있었다(data 미제시).

Urease gene 함유 pGU366를 이용한 길항균주의 형질전환

길항균주 *B. subtilis* SH14에 또 다른 길항기작으로 암모니아 생성능을 부가하기 위해서 PIP 방법으로 *B. subtilis* SH14에 pGU366를 형질전환하였다. Transformant의 선발은 일차로 항생제 내성 colony를 Ap 함유 LB 평판배지에서 선발한 후, Ap 함유 CUA 평판배지에 tooth-pick replica법으로 spot하여 붉은색으로 발색되는 urease-positive colony를 선발하였다. *B. subtilis* SH14 (pGU366)으로부터 plasmid의 분리는 alkali lysis법[4]에 따라 행하였으며, 이때 lysozyme 처리는 37°C에서 20분간 행하였다. 길항균주 *B. subtilis* SH14를 형질전환시킨 pGU366은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.8% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 확인하였다.

Recombinant plasmid pGU366에 insertion된 urease gene fragment가 실제로 urease 유전자를 정상적으로 발현하는가를 알아보기 위해서 transformant *E.*

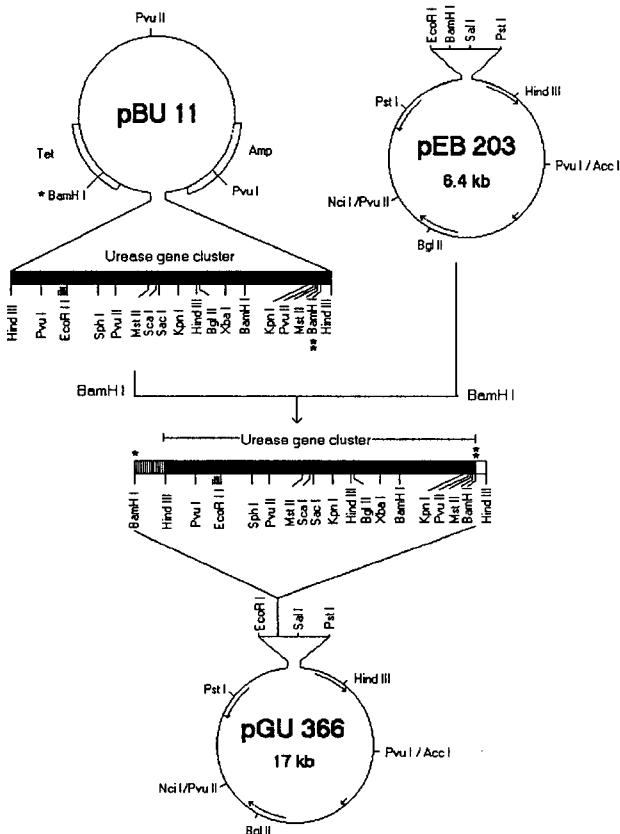


Fig. 1. Construction scheme of the recombinant plasmid pGU366 containing the urease gene of *B. pasteurii*. ★-★★: Inserted sites.

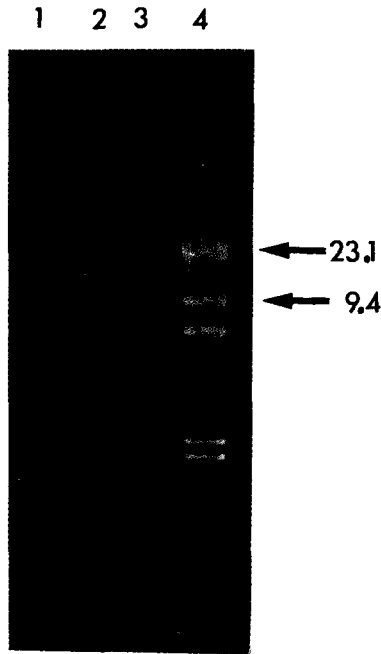


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA pGU366 isolated from the transformant of *B. subtilis* SH14. Lane 1: Purified pGU366 from *E. coli* JM109(pGU366) Lane 2: pGU366 from *B. subtilis* SH14(pGU366) Lane 3: *B. subtilis* SH14 Lane 4: λ-DNA digested with *Hind*III

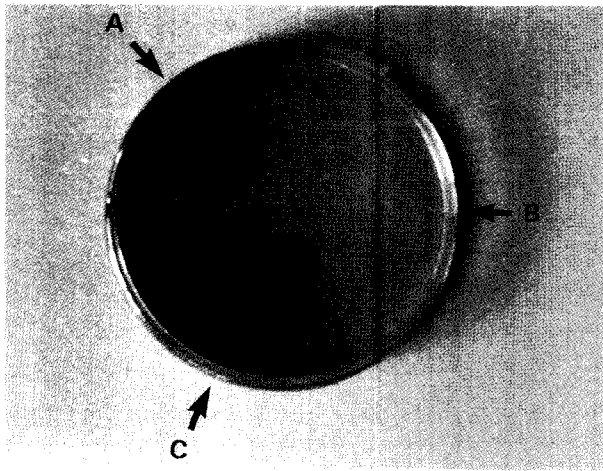


Fig. 3. Detection of urease gene expression of *B. subtilis* SH14 (pGU366) on the Christensen's urea agar containing ampicillin

Strains	Color
A: <i>B. subtilis</i> SH14 (pGU366)	Red (urease positive)
B: <i>B. subtilis</i> SH14	Yellow (urease negative)
C: <i>E. coli</i> JM109 (pGU366)	Red (urease positive)

coli JM109(pGU366)로부터 정제한 pGU366를 *B. subtilis* SH14에 retransformation하여 Ap 함유 Christensen's urea agar 상에서 관찰한 결과 Fig. 3에서와 같이

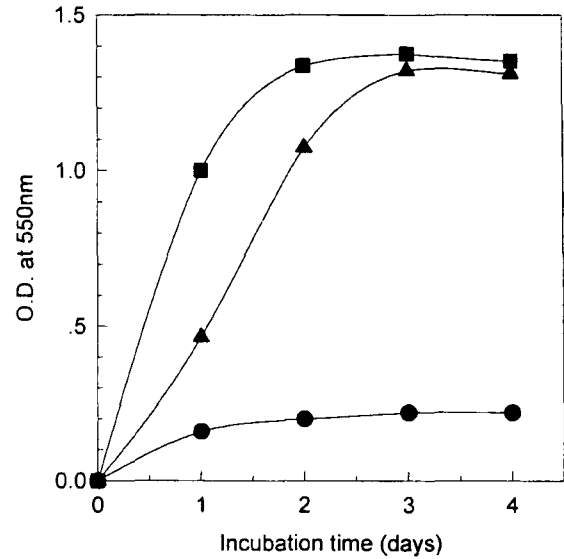


Fig. 4. The ability of urease-expression in the transformant of *B. subtilis* SH14 with pGU366.

Exponentially growing cells of *B. subtilis* SH14 transformant and *E. coli* JM109 carrying pGU366 were inoculated into the urea R broth containing 2% urea and incubated at 30°C for 4 days. The urease-expression was estimated by spectrophotometer assay at 550 nm. ●, *B. subtilis* SH14; ■, *E. coli* JM109 (pGU366); ▲, Transformant by pGU366, *B. subtilis* SH14(pGU366).

붉은색으로의 변색으로 정상발현을 확인할 수 있었다.

B. subtilis SH14(pGU366)에서 도입된 urease 유전자를 액체배지에서 정상적으로 발현시키는가를 조사하기 위해 urea R broth(Ap 50 µg/ml)에서 30°C에서 4일간 배양하면서 생성되는 적색도를 흡광도 550 nm에서 측정하여 조사해 본 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 urease 유전자를 함유한 pGU366으로 형질전환된 *B. subtilis* SH14(pGU366)에서도 urease가 정상적으로 발현됨을 알 수 있었는데, *E. coli* JM109(pGU366)와는 달리 발현에 있어 다소의 시간이 걸렸으나 2일이 경과된 후로는 *E. coli*와 거의 유사한 발현력을 나타내었다.

도입된 recombinant plasmid pGU366의 안정성

B. subtilis SH14내에서 pGU366의 안정성을 조사하기 위해서 항생제가 첨가되지 않은 nutrient broth에서 계대배양시키면서 2일 간격으로 50 µg/ml의 Ap를 함유한 선택배지와 함유하지 않은 비선택배지에서 일정비율로 희석, 도말배양하여 비선택배지에서 나타난 colony를 백분율로 조사한 결과 Fig. 5에서와 같이 10일이 경과후에도 65%이상의 안정성을 나타내어 *B. subtilis* SH14에 도입된 pGU366은 비교적 안정하다고 추정할 수 있다.

형질전환의 최적조건

B. subtilis SH14에 pGU366을 최적으로 형질전환시킬

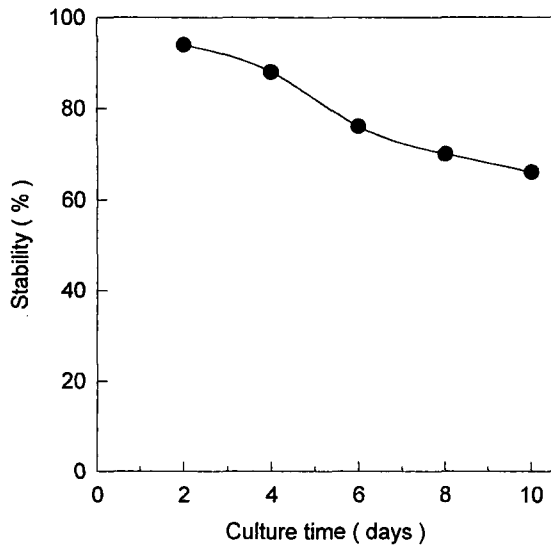


Fig. 5. Stability of plasmid pGU366 in *B. subtilis* SH14 (pGU366).

B. subtilis SH14 carrying pGU366 was subculture on NB without kanamycin. The subculture was plated on NA plate with and without Ap (50 µg/ml) per two days.

Table 5. Optimal conditions on the transformation of *B. subtilis* SH14 with pGU366

Conditions	Optima
Time of lysozyme treat	90min
PEG concentration	40%
Amount of pGU366	1.5 µg

수 있는 최적조건을 조사하기 위해 protoplast 제조시 사용되는 lysozyme의 처리조건을 조사하였다. 최적 lysozyme 처리 시간을 알기 위해 *B. subtilis* SH14의 중기 대수기가 될 때까지 배양한 균체를 200 µg/ml의 lysozyme를 함유한 SMMP에 42°C에서 80 rpm으로 150분까지 30분 간격으로 처리한 다음 그 형질전환율을 조사한 결과 90분에서 가장 높은 형질전환율을 나타내었다 (Table 5). 이는 각 lysozyme 처리시간에 대한 형질전환율은 완전한 원형질체 형성이 형질전환 효율에 필수적이라는 Akamatsu의 보고[2]와 자극성이 적은 lysozyme 처리과정으로 처리시간을 연장한 경우보다는 재생율은 높으나 PEG-induce fusion의 빈도가 낮다는 Akamatsu의 결과[1]와 비슷하게 *B. subtilis* SH14의 원형질체 형질전환율도 30분 이후 증가하다가 90분에서 최고치를 나타냈으며 이후 처리시간의 연장은 오히려 감소하는 것을 보여 주었다.

형질전환과정에서 PEG (MW4000)의 농도가 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 최종농도가 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60%되게 첨가한 후 형질전환율을 조사한 결과 40%되게 첨가하였을 때 최고의 형질전환율을 나타내

Table 6. *In vitro* antifungal activity of *B. subtilis* SH14 containing urease gene (pGU366) against *F. solani*

Days	Antifungal activity ^a		
	<i>B. subtilis</i> SH14	<i>B. subtilis</i> SH14(pGU366)	None
1	5.8 (mm)	3 (mm)	6 (mm)
2	17	12	19
3	21	16	23
4	24	18	27
5	24	19	30

^aAn agar disk (8 mm in diameter) of *F. solani* inoculum placed at a 3 cm distant from the edges of the bacterial colonies on potato dextrose-nutrient agar (PDNA) medium containing 0.5% urea. The plates were incubated at 30°C and the antifungal activity was determined by measuring the diameter (mm) of fungal mycelium.

어 (Table 5) *Bacillus* sp.의 형질전환시 최적 PEG 농도가 30%이라는 Hopwood의 보고[10]와는 상이한 결과로 *B. subtilis* SH14의 형질전환에 필요한 PEG의 농도는 다소 높은 농도를 요구하였다.

Plasmid DNA의 농도가 미치는 영향을 조사하기 위해 정제된 pGU366을 3.5 µg까지 각 농도별로 7단계로 첨가하여 형질전환시켜 본 결과 1.5 µg 이하의 농도에서는 형질전환율이 plasmid 첨가량과 비례하여 증가하였으나 그 이상을 첨가하였을 때는 형질전환율은 일정하였다 (Table 5). 이것은 1 µg 이하의 농도에서 plasmid DNA 첨가량과 비례적으로 형질전환율이 증가하였다는 Chang 등의 보고와 1.0 µg 이상의 농도에서는 형질전환 빈도가 그 이하의 농도에 비해 증가율이 감소하였다는 Vorobjeva 등의 보고와 상이한 결과로서 비교적 많은 양의 plasmid가 요구된다는 것을 알 수 있었다[5, 26].

형질전환체의 urease에 의한 길항력 증강조사

Urease gene이 도입된 *B. subtilis* SH14(pGU366)의 식물근부균 *F. solani*의 생육억제능을 조사하기 위해서 0.5% urea가 함유된 PDNA 평판배지에서 개체균간의 증식선단까지의 거리를 측정 한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* SH14(pGU366)가 숙주균주인 *B. subtilis* SH14보다 우수한 길항력을 나타내었으며, 숙주균주와는 달리 식물근부균 *F. solani*를 전체적으로 저해하는 것으로 나타났다. 또한 0.5% urea가 함유된 PDNB 액체배지에 *F. solani*와 *B. subtilis* SH14(pGU366)를, *F. solani*와 *B. subtilis* SH14을 혼합배양하여 균체중량법으로 측정 한 결과 Fig. 6과 Table 7에서 보는 바와 같이 각각 38.0%, 44.0% 정도의 억제력을 보였다.

이러한 결과로 미루어 외부의 urease gene를 도입함으로써 항진균성 항생물질 생산성 생물방제균 *B. subtilis* SH14에 ammonia 생성능을 별도로 부가함으로써 식물

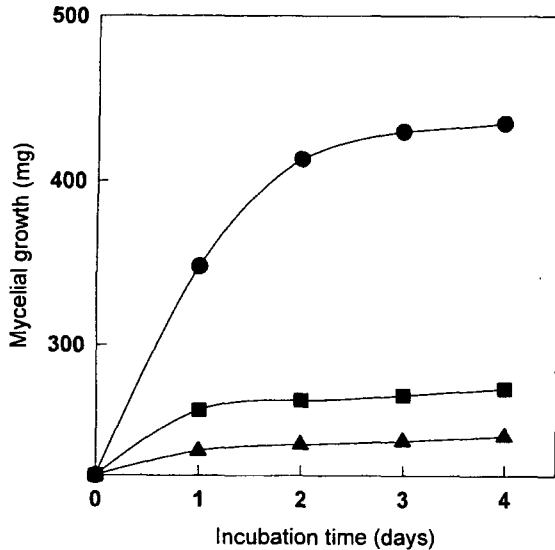


Fig. 6. Antifungal activities of *B. subtilis* SH14 and its transformant on the mycelial growth of *F. solani*

Three days old *F. solani* culture were treated with culture of *B. subtilis* SH14 and *B. subtilis* SH14 (pGU366) grown in NB with 0.5% urea at 30°C for 3 days. ■—, *F. solani* with of *B. subtilis* SH14; ▲—, *F. solani* with of *B. subtilis* SH14 (pGU366); ●—, *F. solani* only.

Table 7. Antigungal activity of transformant *B. subtilis* SH 14 (pGU366)

Strains	Antifungal activity	
	Fungal dry weight	Inhibition ratio ^a
None	435 (mg)	0 (%)
<i>B. subtilis</i> SH14	270	38.0
<i>B. subtilis</i> SH14(pGU366)	244	44.0

Three days old *F. solani* culture were treated with culture of *B. subtilis* SH14 and *B. subtilis* SH14 (pGU366) grown in NB with 0.5% urea at 30°C for 3 days. After 5 days of incubation, the antifungal activity was determined. ^aCompleted inhibition ratio(100%)—dry weight of *F. solani* cultured with solution relative to those cultured with water.

근부균 *F. solani*에 대한 길항력이 훨씬 증가하게되어 다 기능적인 생물방제균의 육종방법이 가능할 수 있다고 생각되어진다.

요 약

최근 생물방제균으로 주목받고 있는 *Enterobacter cloacae*의 방제기작이 이 균에 의해 토양내에서 생산된 휘발성 ammonia이며 ammonia의 생산에는 urease가 관계한다는 보고를 근거로하여, 항생물질 생산성 균주로 선발된 우수한 길항균주에 암모니아 생성능, 즉 urease 유전자를 유전적으로 부가함으로써 항진균성 길항물질 생산과 암모니아 생산이 동시에 이루어 질 수 있는 새로운 다

기능의 생물방제균을 유전적으로 육종하고자 하였다.

저병해 인삼경작지로부터 식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 강하게 억제하는 길항세균 한 균주 SH14 균주를 분리, 선발하였으며, 분리된 균주를 동정한 결과 *Bacillus subtilis*이거나 그 근연종으로 추정되었다. 억제기작 실험을 통해 길항균주 *B. subtilis* SH14에 의해 생산되는 항진균성 길항물질은 외막가수분해효소와 같은 고분자 물질이 아니라 열에 안정한 저분자의 항생물질임을 알 수 있었다.

한편 ammonia 생산을 위한 urease의 유전자는 urease 생산력이 강력한 호알칼리성 *Bacillus pasteurii*의 urease 생산유전자를 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pEB203에 subcloning하였고, 이어서 pGU 366으로 명명된 이 recombinant plasmid를 선발된 항진균성 길항균주 *B. subtilis* SH14에 PEG-induced protoplast transformation 방법으로 도입, 발현시켰으며, 최적조건을 조사하여 90분간의 lysozyme 처리과정 후 1.5 µg/ml의 DNA와 40% PEG4000의 첨가로 약 6.5×10^4 의 형질전환율을 얻을 수 있었다. 아울러 암모니아 생성능이 부가된 생물방제균 *B. subtilis* SH14(pGU366)에 의해 식물근부균 *F. solani*에 대한 생육억제력이 증가되는지 여부를 억제거리 측정법과 균체중량법을 통해 확인한 결과 urease 유전자가 도입된 형질전환체 *B. subtilis* SH14(pGU366)의 근부균 생육억제능이 각각 36.7%, 44.0%정도로 숙주균주인 *B. subtilis* SH14에 비해 근부균 생육억제능을 보다 강하게 나타내었음을 알 수 있었다.

따라서 항진균성 항생물질 생산성 생물방제균 *B. subtilis* SH14에 외부의 urease 유전자를 도입하여 ammonia 생성능을 부가함으로써 생물방제력의 상승효과를 거둘 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 농림부에서 지원한 농림수산특정연구과제의 연구비 지원으로 이루어졌음에 감사드리고, 또한 plasmid pEB203을 분양해준 생명공학연구소 박승환박사님께도 감사드립니다.

참고문헌

1. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. 1981. Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2887-2894.
2. Akamasu, T. and J. Sekiguchi. 1982. Transformation to *Bacillus* protoplast by plasmid pTP4 DNA. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1617-1621.
3. Aldrich, J. and R. Baker. 1979. Biological control of *Fusarium roseum* f. sp. *dianthi* by *Bacillus subtilis*. *Plant*

- Dis. Repr.* **54**: 446.
4. Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* **7**: 1513–1523.
 5. Chang, S. and S. N. Cohen. 1977. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111–115.
 6. Gerhardt, P. G., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N.R. Krieg, and G. B. Philips, 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington.
 7. Gilpatrick, J. D. 1969. Role of ammonia in the control of avocado root rot with alfalfa meal soil amendments. *Phytopathol.* **59**: 973–978.
 8. Hadar, Y., G. E. Harman, A. G. Taylor, and J. M. Norton. 1983. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium spp.* *Phytopathol.* **73**: 1322–1325.
 9. Harry, L. T. Mobley. 1992. Urease, Microbial. *Encyclopedia of Microbiology* **4**: 327–335
 10. Hopwood, D. A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 237–272.
 11. Howell, C. R., R. C. Beier, and R. D. Stipanovic. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by bacterium. *Phytopathol.* **78**: 1075–1078.
 12. Kim, S. D. and J. Spizizen. 1985. Molecular cloning and expression of *Bacillus pasteurii* urease gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 297–302.
 13. Kim, S. D. and J. Spizizen. 1985. Transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by recombinant plasmid DNA. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **13**: 345–348.
 14. Kim, S. D. and R. P. Hausinger. 1994. Genetic organization of the recombinant *Bacillus pasteurii* urease genes expressed in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 108–112.
 15. Krieg, N. R. and J. C. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 16. Lovrekovich, L., H. Lovrekovich, and R. N. Goodman. 1969. The role of ammonia in the wildfire disease of tobacco caused by *Pseudomonas tabaci*. *Phytopathol.* **59**: 1713–1716.
 17. Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 109–118.
 18. Neal, D. C. and E. R. Collins. 1936. Concentration of ammonia necessary in a low-lime phase of Houston clay soil to kill the cotton root rot fungus, *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathol.* **26**: 1030–1032.
 19. Nelson, E. B., W. L. Chao, J. M. Norton, G. T. Nash, and G. E. Harman. 1986. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: Possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off. *Phytopathol.* **76**: 327–335.
 20. Park, S. H., B. T. Koo, B. S. Shin, and J. I. Kim. 1991. Construction of shuttle promoter-probe and expression vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, and expression of *B. thurigiensis* subsp. Kurstaki HD-73 crystal protein gene in the two species. *J. Microbiol. Biotech.* **1**: 37–44.
 21. Pavlica, D. A., T. S. Hora, J. J. Bradshaw, R. K. Skogerboe, and R. Baker. 1978. Volatiles from soil influencing activities of soil fungi. *Phytopathol.* **68**: 758–765.
 22. Rush, C. M. and S. D. Lyda. 1978. Effects of anhydrous ammonia on mycelium and sclerotia of *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathol.* **72**: 1085–1089.
 23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Vol. 1, 1.14. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 24. Smiley, R., R. J. Cook, and R. I. Papendick. 1970. Anhydrous ammonia as a soil fungicide against *Fusarium* and fungicidal activity in the ammonia retention zone. *Phytopathol.* **60**: 1227–1231.
 25. Tsao, P. H. and J. J. Oster. 1981. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic substances. *Phytopathol.* **71**: 53–59.
 26. Vorobjeva, I. P., I. A. Khmel, and Alföldi. 1980. Transformation of *Bacillus megaterium* protoplasts by plasmid DNA. *FEMS Microbiol. Letters* **7**: 261–263.
 27. Wilson, C. L., J. D. Franklin, and P. L. Pusey. 1987. Biological control of rhizopus rot of peach with *Enterobacter cloacae*. *Phytopathol.* **77**: 303–305.
 28. Yigal, E. and C. Ilan. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathol.* **77**: 190–195.
 29. You, J. H., B. H. Song, J. G. Kim, M. H. Lee, and S. D. Kim. 1995. Genetic organization and nucleotide sequencing of the ure gene cluster in *Bacillus pasteurii*. *Mol. cells* **5**(4): 359–369.

(Received February 10, 1998)