

## *Bacillus pasteurii* Urease Gene의 생물방제균 *Bacillus subtilis* YBL-7내에서의 발현

김용수 · 김상달\*

영남대학교 응용미생물학과

### Genetic Transfer of *Bacillus pasteurii* Urease Gene into Antagonistic *Bacillus subtilis* YBL-7 against Root Rotting Fungi *Fusarium solani*

Kim, Yong-Su and Sang-Dal Kim\*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

**Abstract**— To investigate the possibility of genetic development for a multi-purpose strain of *Bacillus subtilis* YBL-7 against *Fusarium solani* causing root rot of many important crops, the plasmid pGU66 inserting urease gene of *Bacillus pasteurii* had been introduced into *Bacillus subtilis* YBL-7 by PEG-induced protoplast (PIP) transformation system. Protoplasts of *B. subtilis* YBL-7 were prepared by treating the cells with lysozyme (200 µg/ml) in hypertonic buffer (SMMP). The highest transformation frequency was achieved when cells of the strain with lysozyme at 42°C for 90 minutes. Optimal transformation was obtained using polyethylene glycol (MW 4000) at final concentration of 30% (V/V). The transformation frequency was increased proportionally to 1.2 µg of plasmid DNA. At best condition, the transformation frequency (transformants/regenerants/µg of DNA) for pGU66 was approximately  $4 \times 10^{-3}$ . Also, the urease gene was strongly expressed in the transformants of *B. subtilis* YBL-7 and maintained steadily. The antifungal ability of transformant was very similar to that of *B. subtilis* YBL-7.

미생물을 이용하여 식물병원균을 방제하고자 하는 생물학적 방제법의 필요성이 최근 크게 요구되고 있으며 이에 관한 몇몇 연구들이 보고되어 있다(1-6). 본인 등도 식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 강력히 길항할 수 있는 생물방제균 *Bacillus subtilis* YBL-7 균주를 저병해 인삼 경작지의 근권토양에서 분리 선발한 바 있고 그 길항기작이 저분자의 항생물질인 것으로 추정하였다(7). 그러나 보다 더 그 길항력이 강화되고 다기능화된 강력한 생물방제균을 얻기 위해서는 특히 타 길항기작인 가수분해효소(8-11)나 siderophore(12-15)의 생산능력 등을 추가하는 등의 외부유전형질을 도입시키는 유전공학적 육종방법이 필수적이라고 사료된다.

*Bacillus*는 포자형성능과 단백질분해능 등 다양한 산업적 이점에도 불구하고 외부 유전자를 용이하게 받아들이지 않는다는 점이 염려되긴 하나(16), 분리된 근부길항균 *Bacillus subtilis* YBL-7을 숙주로 해서 외부의 유용 유전형질을 도입 발현시키는 형질전환 방법을 확립, 최적화 한다면, 보다 효과적이고 강력한 다기능의 생물방제균으로 개발할 수 있으리라고 생각된다.

본 연구에서 우선 도입하고자한 외부 유전자로는 본인 등이 이미 *Bacillus-E. coli* shuttle vector인 pGR 71의 *Hind*III site에 삽입하여 *E. coli*내에서 발현시킨 *B. pasteurii*의 urease gene을 함유한 pGU66(16)이었으며, 이를 이용하여 생물방제균 *Bacillus subtilis* YBL-7에 외부의 유용 효소생산형질을 도입 발현시키고자 하였고, 아울러 다기능적이고 강력한 생물방제균으로의 유전공학적 육종방법을 개발하는데 필요한 몇가지 형질전환의 최적조건을 조사하였다.

**Key words:** *Bacillus subtilis* YBL-7, *Fusarium solani*, urease gene, pGU66, PEG-induced protoplast (PIP) transformation

\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 숙주균주 및 urease 유전자

본 연구에 사용한 균주는 근부균 *F. solani*의 생육을 길항하는 생물방제균으로서 저병해 인삼경작지로부터 분리 선발되어 동정된 *B. subtilis* YBL-7(7)을 숙주 균주로 사용하였고, 도입하고자 한 외래 urease 유전자는 김 등이(16) *B. pasteurii*의 urease 유전자를 *Bacillus-E. coli* shuttle vector인 pGR71(Km<sup>r</sup>, Neo<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>)의 *Hind*III site에 삽입하여 *E. coli*내에서 클로닝시킨 pGR66(Fig. 1)을 CsCl density gradient ultracentrifugation으로 정제하여 형질전환에 사용하였다.

### 배지 및 배양조건

기본생육배지로는 Nutrient broth(NA)를 사용하였고, 형질전환시에는 Penassay broth에 *B. subtilis* YBL-7 종배양액을 1%되게 접종하여 30°C에서 160 rpm으로 진탕배양하였다. 또한 protoplast regeneration medium은 mannitol regeneration agar(17)를 사용하였다. 억제능 측정을 위한 억제물질 생산용 medium은 Mckeen's medium(18)을 사용하였으며 식물근부균 *F. solani*의 배양에는 potato dextrose broth(PDB)를 사용하여 30°C에서 160 rpm으로 진탕 배양하였다.

### 원형질체 제조 및 재생

*B. subtilis* YBL-7의 원형질체(protoplast) 제조는 50 ml의 Penassay broth에 종배양액을 1%되게(OD<sub>575</sub>: 0.02) 접종하여 37°C에서 진탕배양하여 균을 회수하고 5 ml의 SMMP(19)로 현탁시킨 후 lysozyme(최종농도 200 µg/ml)을 첨가하여 제조하였으며, 원형질체 재생은 mannitol regeneration agar medium에서 5일간 배양하여 재생시켰다.

### 형질전환

*B. subtilis* YBL-7의 PEG-induced protoplast (PIP) transformation은 Chang과 Cohen의 방법(19)을 따라 행하였다.

### 형질전환체로부터 플라스미드 분리 및 확인

Urease 유전자를 함유 한 pGU66에 의해 형질전

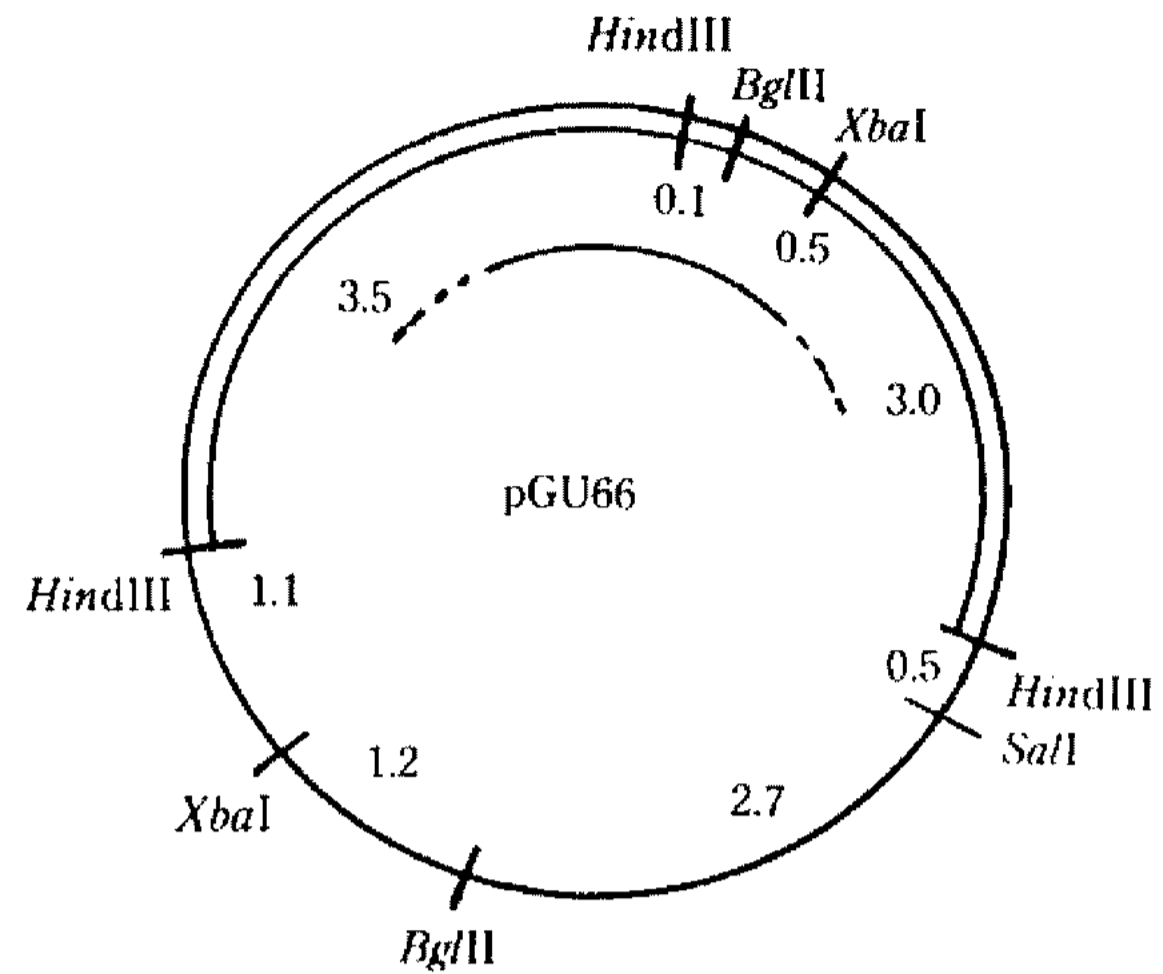


Fig. 1. Physical restriction map of plasmid pGU66 carrying urease gene.

Single line: vector (pGR71) of 5.5 Mdal, and double line: the inserted fragment of 7.1 Mdal.

환된 형질전환체로부터 플라스미드의 분리는 Birnbiom 등의 방법(20)을 따랐으며 0.8% horizontal agarose gel상에서 60 V로 약 3시간 전기영동하여 ethidium bromide로 15분간 염색 후 UV투사등(TR-302, 302 nm)으로 관찰하였다.

### 형질전환체의 Urease 활성측정

Urease 유전자가 삽입된 pGU66으로 형질전환된 형질전환체내에서 발현되는 urease 활성은 Nesslerization method(21)와 urea R broth(16)을 사용하여 조사하였다.

### 식물근부균 *F. solani*에 대한 억제능 측정

생물방제균 *B. subtilis* YBL-7과 pGU66으로 형질전환된 형질전환체의 억제능을 비교하기 위해서 Mckeen's medium에 *B. subtilis* YBL-7과 형질전환체를 일정하게 접종하여 30°C에서 84시간 진탕배양한 다음 그 원침상등액을 Amicon(centriprep 10)으로 분리하여 얻은 저분자 물질을, 미리 약  $1.0 \times 10^7$ /ml의 *F. solani* chlamydospore로 3일간 전배양된 2.46% PDB에 첨가시켜 30°C에서 4일간 배양하면서 여과(Toyo filter paper No. 2), 건조하여 그 균체량을 비교 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 형질전환체의 Urease 생산

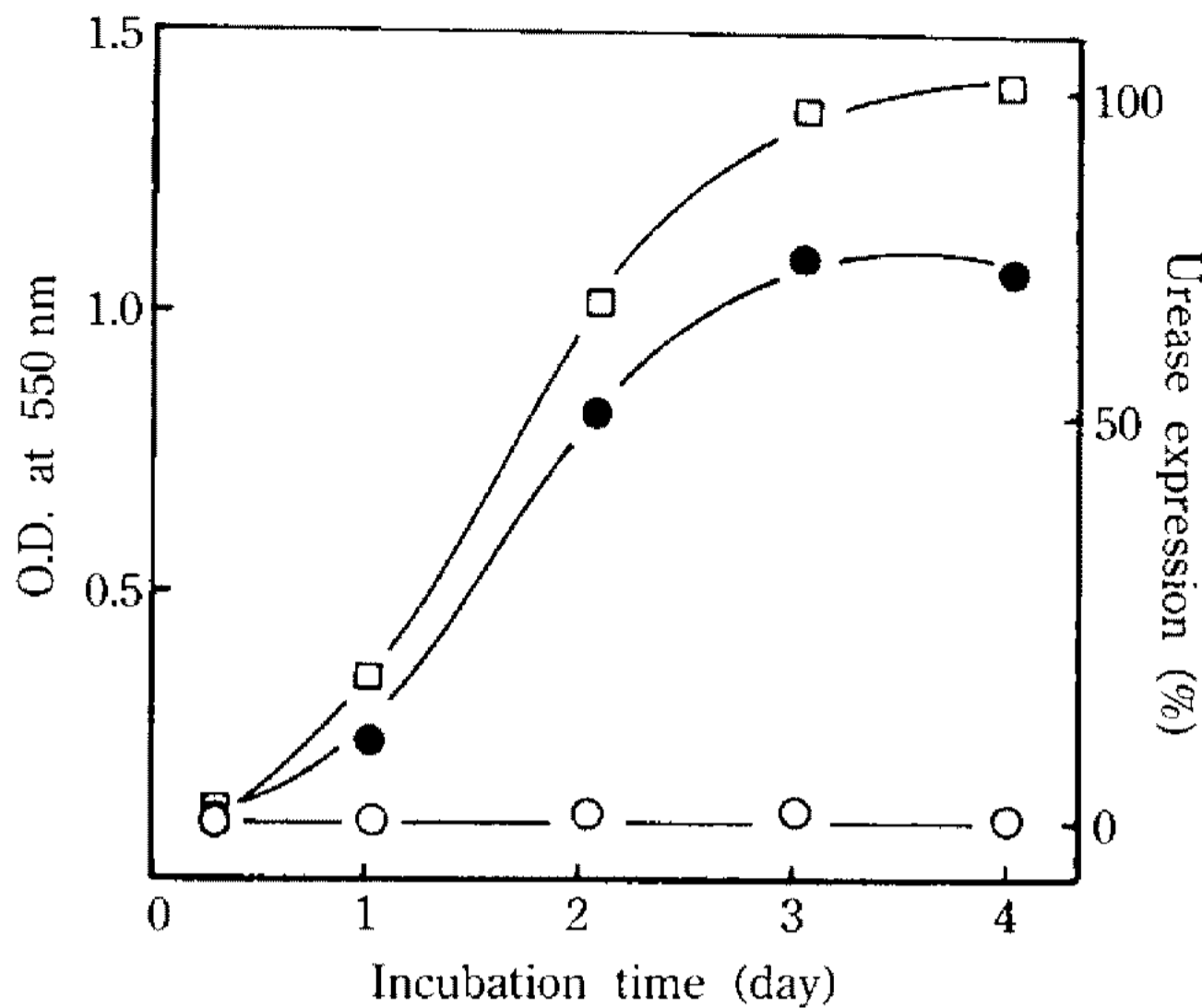


Fig. 2. The ability of urease-expression in the transformant of *B. subtilis* YBL-7 with pGU66.

Exponentially growing cells of *B. subtilis* YBL-7 transformant and *E. coli* HB101 carrying pGU66 were inoculated into the urea R broth containing 2% urea and incubated at 37°C for 4 days. The urease-expression was estimated by spectrophotometric assay at 550 nm. Symbol: (○-○); *B. subtilis* YBL-7, (●-●); Transformant by pGU66 and (□-□); *E. coli* HB101 carrying pGU66.

Urease 유전자를 내재하는 pGU66으로 형질전환시킨 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7의 형질전환체가 urease 유전자를 정상적으로 발현시키는가를 조사하기 위해 chloramphenicol의 최종농도를 20 µg/ml 되게 첨가시킨 urea R broth에서 4일간 배양하면서 생성되는 적색도를 흡광도 550 nm에서 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 이 결과에서 보는 것과 같이 urease 유전자를 함유한 pGU66에 의해 형질전환된 *B. subtilis* YBL-7에서도 urease가 정상적으로 발현되었다. 그리고 *E. coli*(pGU66)의 urease 생성력과 비교하여 보았을 때 약 75%의 발현력을 나타냈으며 8시간 이후 증가하여 3일 후 다소 감소하였는데 이는 37°C의 배양온도가 *B. subtilis* YBL-7에는 비교적 높은 온도이었기 때문인 것으로 생각되어진다.

#### Lysozyme 처리시간의 영향

원형질체의 재생율이 세포벽의 제거 정도에 따라 크게 영향을 받으므로 PEG-induced protoplast transformation이 원형질체형성 정도와 관계있다는 보고(22)에 따라 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7의 형질전환에서도 원형질체형성 및 재생율과 그에 따른 형질

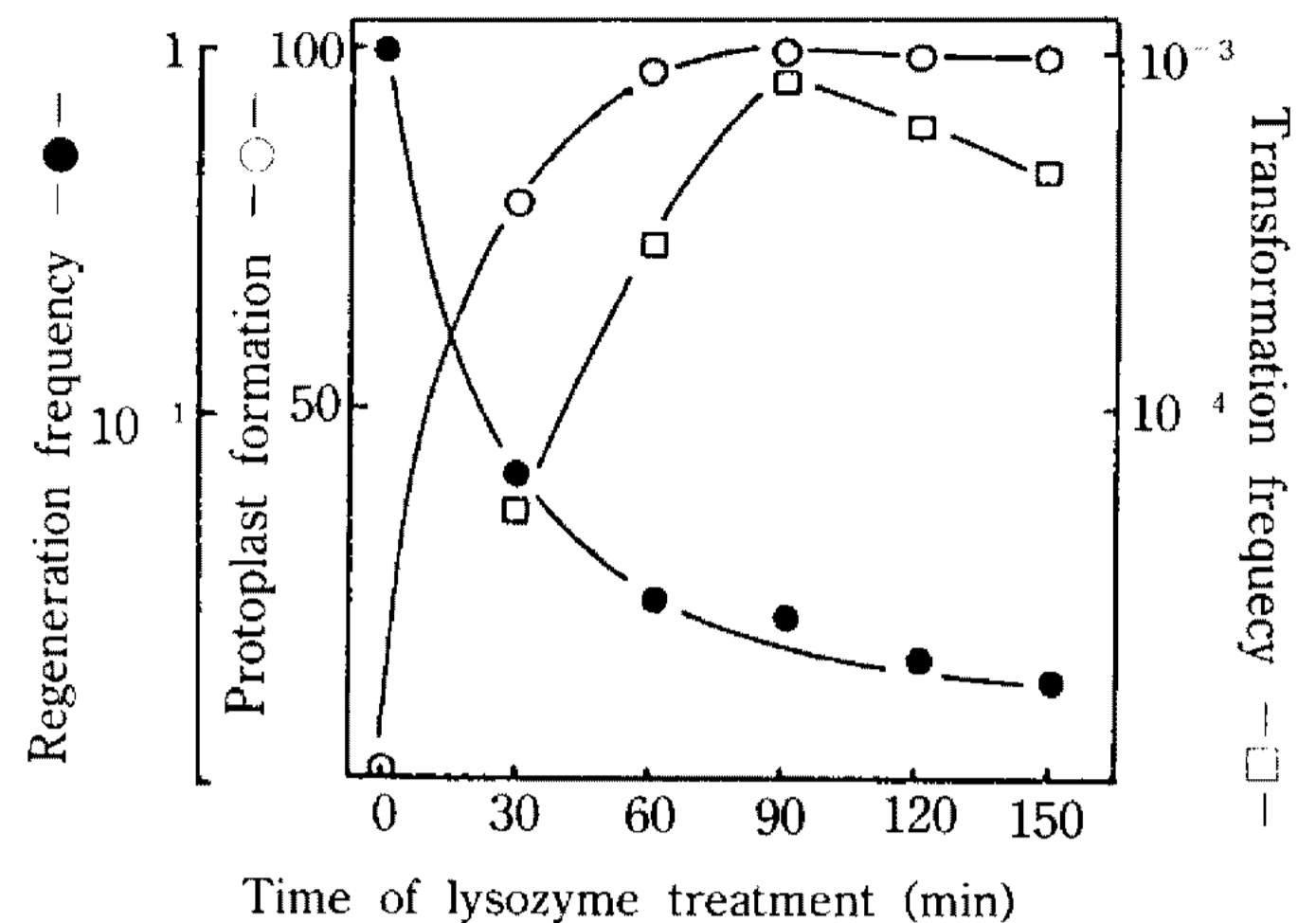
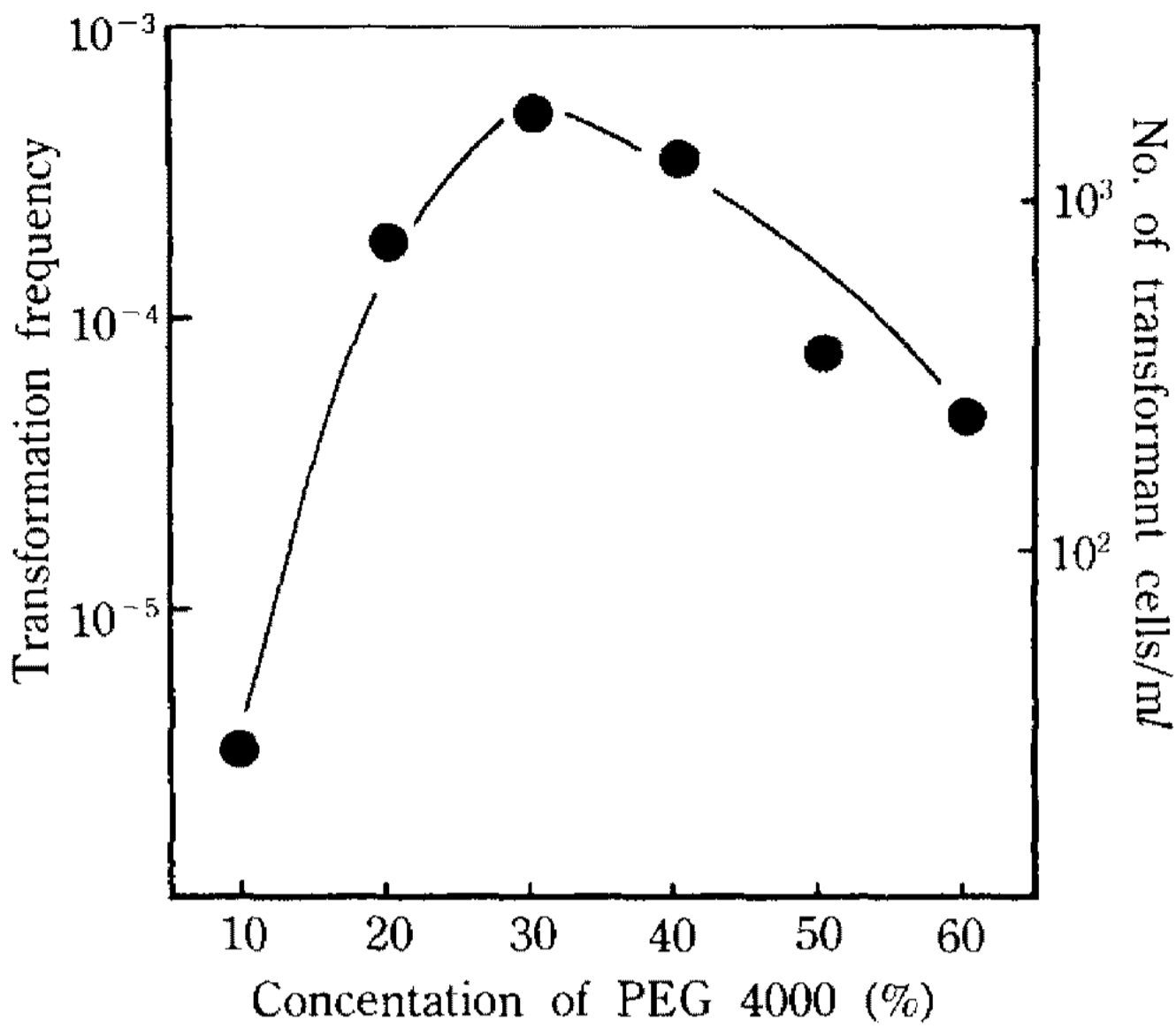


Fig. 3. Kinetics of protoplast formation and regeneration of *B. subtilis* and its transformation with pGU66.

Middle log phase cells of *B. subtilis* YBL-7 were inoculated in SMMP containing lysozyme (final conc. of 200 µg/ml) at 42°C for 30, 60, 90, 120 and 150 min. Each sample was exposed to pGU66 (0.5 µg) followed by the addition of 40% PEG solution.

Symbols: (○-○); protoplast formation (%) =  $[1 - (\text{osmotically stable cells} / \text{input bacteria})] \times 100$ , (●-●); regeneration frequency = regenerants / (input bacteria - osmotically stable cells) and (□-□); Transformation frequency = transformants / protoplasts.

전환율에 미치는 상호관계를 알아보기로 하였다. 50 ml의 Penassay broth에 1%되게 종배양액을 접종하여 중기대수기(OD<sub>575</sub>: 0.6)가 될 때까지 배양한 균체를 200 µg/ml의 lysozyme을 함유한 SMMP에서 42°C, 80 rpm으로 시간별로 처리한 다음 각 처리구의 원형질체 형성 및 재생율과 형질전환율을 조사해 본 결과 Fig. 3에서 보는 것과 같이 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7의 원형질체 형성은 60분 이후 거의 완전한 원형질체를 형성하였고 재생율은 lysozyme 처리 후 계속 감소하여 10<sup>-2</sup> 범위의 재생율을 나타냈는데, 이 결과는 2 mg/ml의 lysozyme을 처리하여 2시간 후 10~25%의 생존세포를 얻었다는 Chang 등의 보고(19)와 재조합 플라스미드를 사용한 *B. subtilis* 원형질체의 형질전환 실험(17)의 12.8%보다는 낮은 빈도이었지만 250 µg/ml의 lysozyme을 사용하여 45분 처리 후 0.4~0.5%의 재생율 나타냈다는 Akamatsu의 보고(23)와 *Bacillus* species의 원형질체가 1.0×10<sup>-4</sup>~6.2×10<sup>-3</sup> 범위에서 재생되었다는 결과(22)보다 높은 재생율을 나타내었다. 또한 각 lysozyme 처리 시간에 대한 형질전환율은 완전한 원형질체형성이

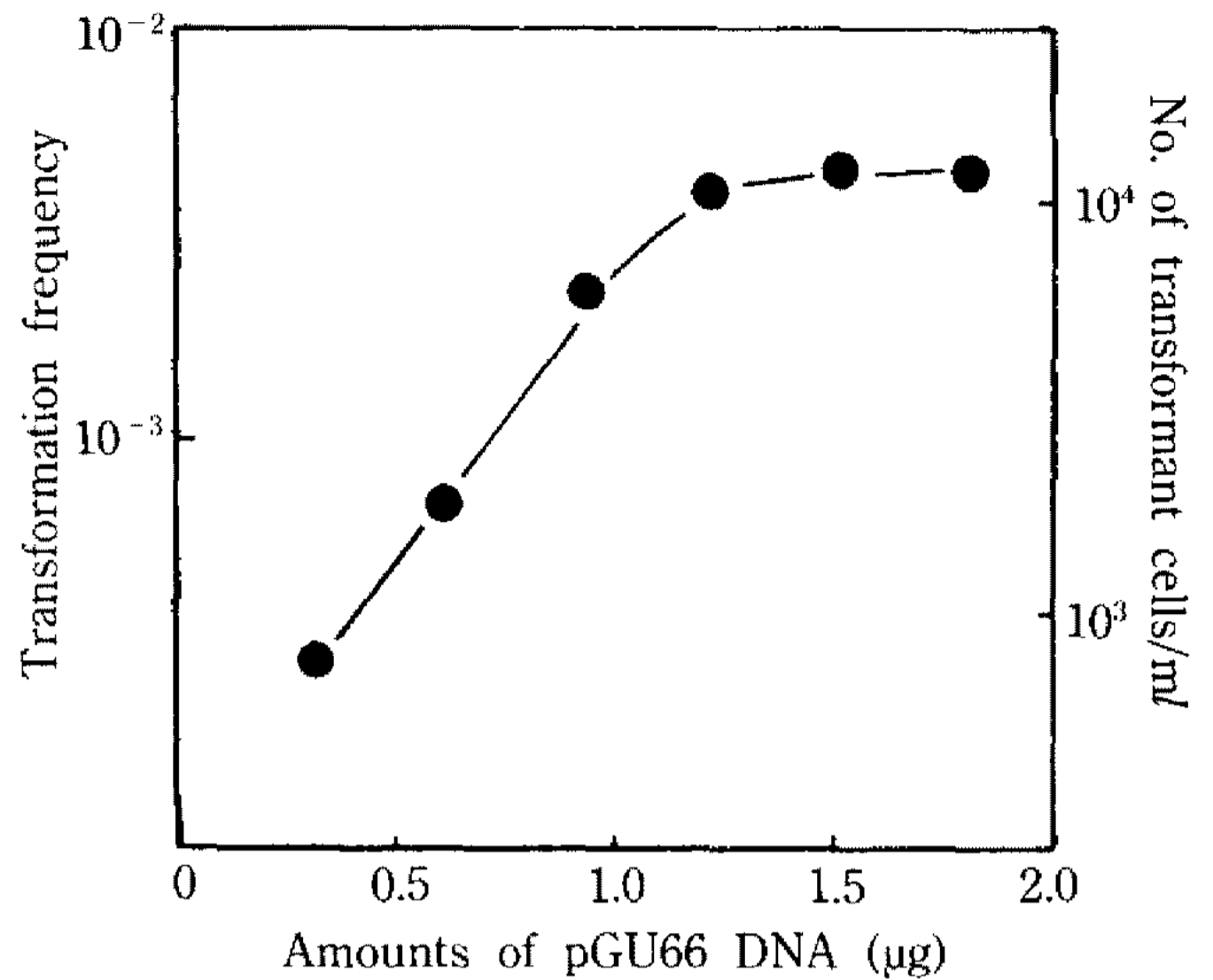


**Fig. 4. Effect of PEG concentration on the transformation of *B. subtilis* YBL-7 with pGU66 DNA.** The pGU66 DNA (500 ng) was added to protoplasts of *B. subtilis* YBL-7 ( $6.42 \times 10^6/ml$ ) at various PEG 4000 concentrations (V/V).

형질전환 효율에 필수적이라는 보고(22)와 자극성이 적은 lysozyme 처리과정에서 처리시간을 연장한 경우보다는 재생율은 높으나 PEG-induced fusion의 빈도가 낮다는 결과(23)와 비슷하게 *B. subtilis* YBL-7의 원형질체 형질전환율도 30분 이후 증가하다 90분에서 그 최고치를 나타내었으며 이후 처리시간의 연장은 오히려 감소하였다. 이로 미루어 보아 본 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7의 PEG-induced protoplast(PIP) transformation에서 lysozyme 처리시간은 90분에서 최적의 효율을 나타내었다. 이때 재생빈도 (regeneration frequency)는 약 2.3%이었으며, pGU66에 의한 형질전환빈도(transformation frequency)는  $8.31 \times 10^{-4}$ (transformants/regenerants)로 나타났다.

**PEG 농도의 영향**

일반적으로 PIP transformation에 이용되는 polyethylene glycol(PEG)가 PIP transformation을 유도하는 확실한 기작은 밝혀져 있지 않으나 PEG가 DNA의 세포막 투과를 유도하거나 DNA 분자의 형태적 변화를 유도한다는 보고(24, 25)가 있으므로 본 실험에서도 *B. subtilis* YBL-7의 PIP transformation 과정 중에 PEG(M.W. 4,000)의 농도가 어떠한 영향을 미치는가를 조사해보았다. 그 결과 Fig. 4에서 보는

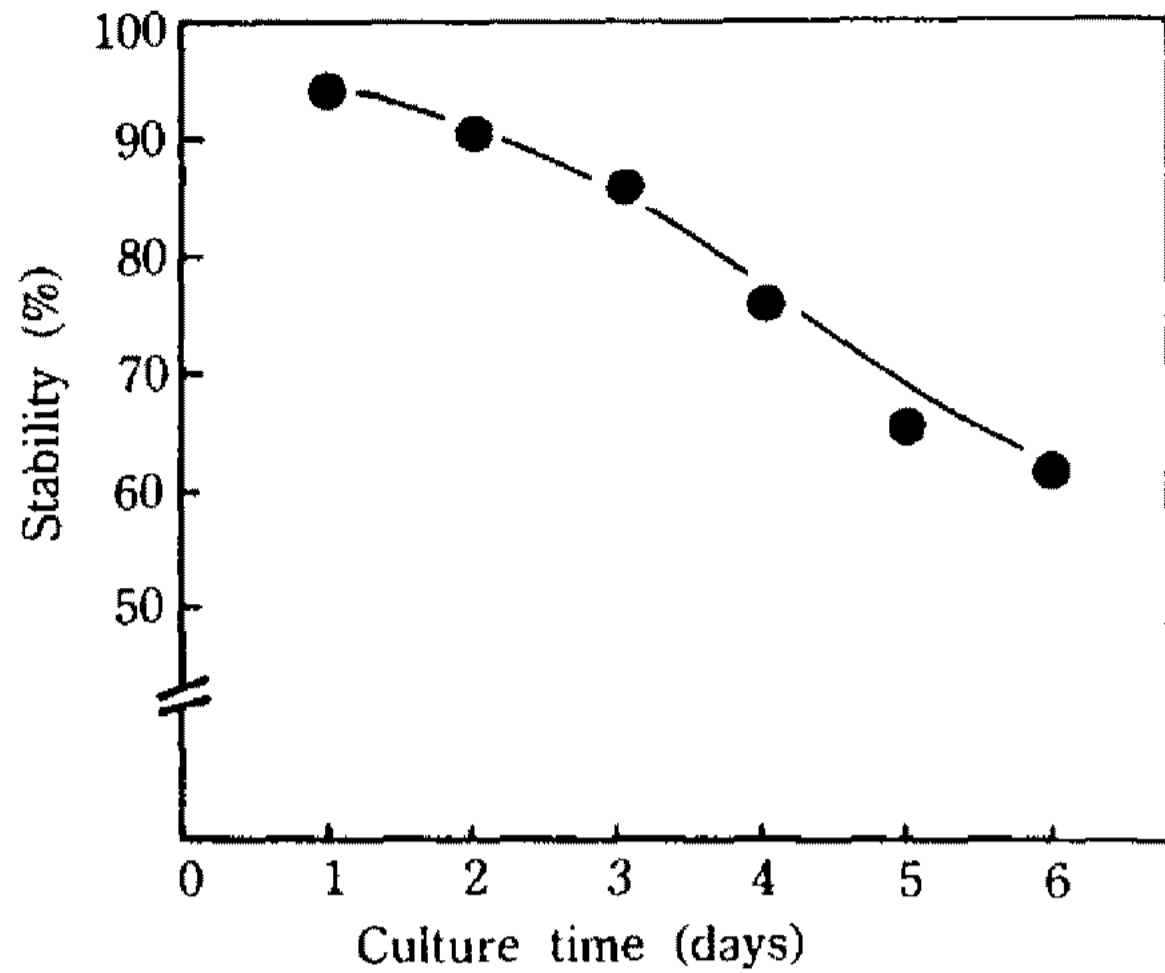


**Fig. 5. PIP transformation frequency of *B. subtilis* YBL-7 protoplasts with pGU66 concentration.** The protoplasts were treated by varying concentrations of pGU66 DNA. The number of regenerants per ml in the transformation mixture was  $2.6 \times 10^6$ .

것과 같이 최종농도가 30%되게 첨가하였을 때 최고의 형질전환빈도를 나타내었다. 이 결과는 *Streptomyces* (26), *Streptococcus lactis*(25)와 *Acholeplasma laidlawii*(27)의 PIP transformation에서의 각 최적 PEG 농도인 20%, 22.5%, 36%와는 약간의 차이가 있으나 *Bacillus* sp.의 형질전환시 최적 PEG 농도가 30%이라는 보고(26)와는 일치하는 결과이었다. 이로 미루어 보아 *B. subtilis* YBL-7의 PIP transformation에서 최적 PEG의 농도는 타 균종보다는 약간 높은 농도를 요구하였으나 *Bacillus* 균속의 PEG 요구 농도와는 동일한 농도에서 최적의 형질전환율을 얻었다.

**플라스미드 DNA 농도의 영향**

플라스미드 DNA 농도가 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7 원형질체의 형질전환에 미치는 영향을 조사하기 위해 정제된 pGU66을 각 농도별로 첨가시켜 형질전환하여 보았다. 그 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 1.2 µg 이하의 농도에서는 플라스미드 DNA 첨가량과 비례하여 형질전환율이 증가하였으나, 그 이상으로 플라스미드 DNA를 첨가했을 때는 증가율이 현저히 감소하였다. 이 결과는 플라스미드 pTP4 DNA를 사용한 *Bacillus* 원형질체의 형질전환 연구(22)에서의 500 ng의 플라스미드 DNA를 첨가할 때까지 형질전환빈도가 증가하다가 그 이상의 농도에서는 증가하지 않았다는 결과와는 약간의 차이가 있



**Fig. 6. Stability of pGU66 plasmid.**  
*B. subtilis* YBL-7 carrying pGU66 was subculture on NA plates with and without chloramphenicol (20 µg/ml).

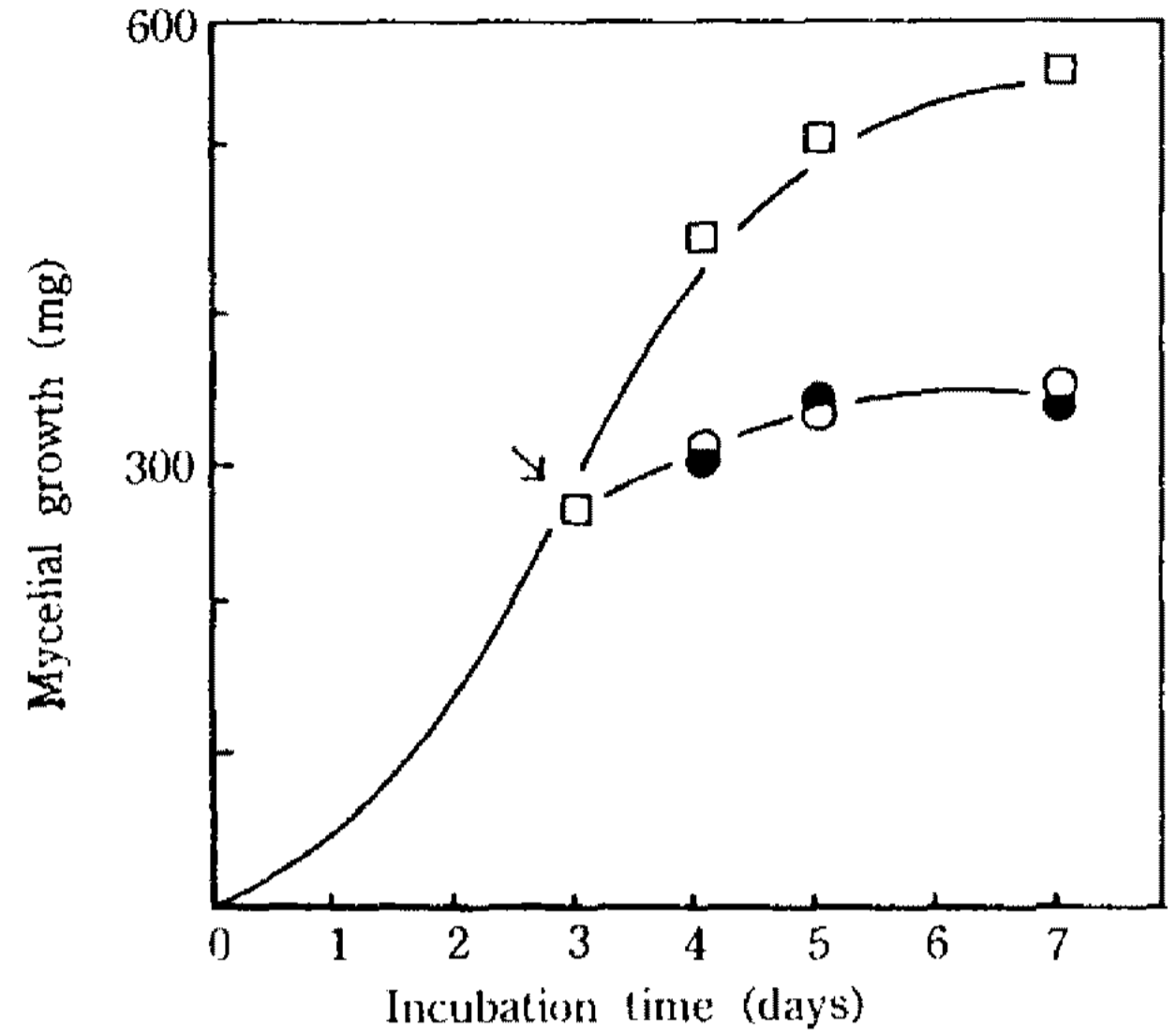
으나 1 µg 이하의 농도에서 플라스미드 DNA 첨가량과 비례적으로 형질전환율이 증가하였다는 보고(19, 28, 29)와 1.0 µg 이상의 농도에서는 형질전환빈도가 그 이하의 농도에 비해 증가율이 감소하였다는 Vorobjeva 등(29)의 실험결과와는 아주 유사한 결과이었다.

**도입된 Urease 유전자의 안정성**

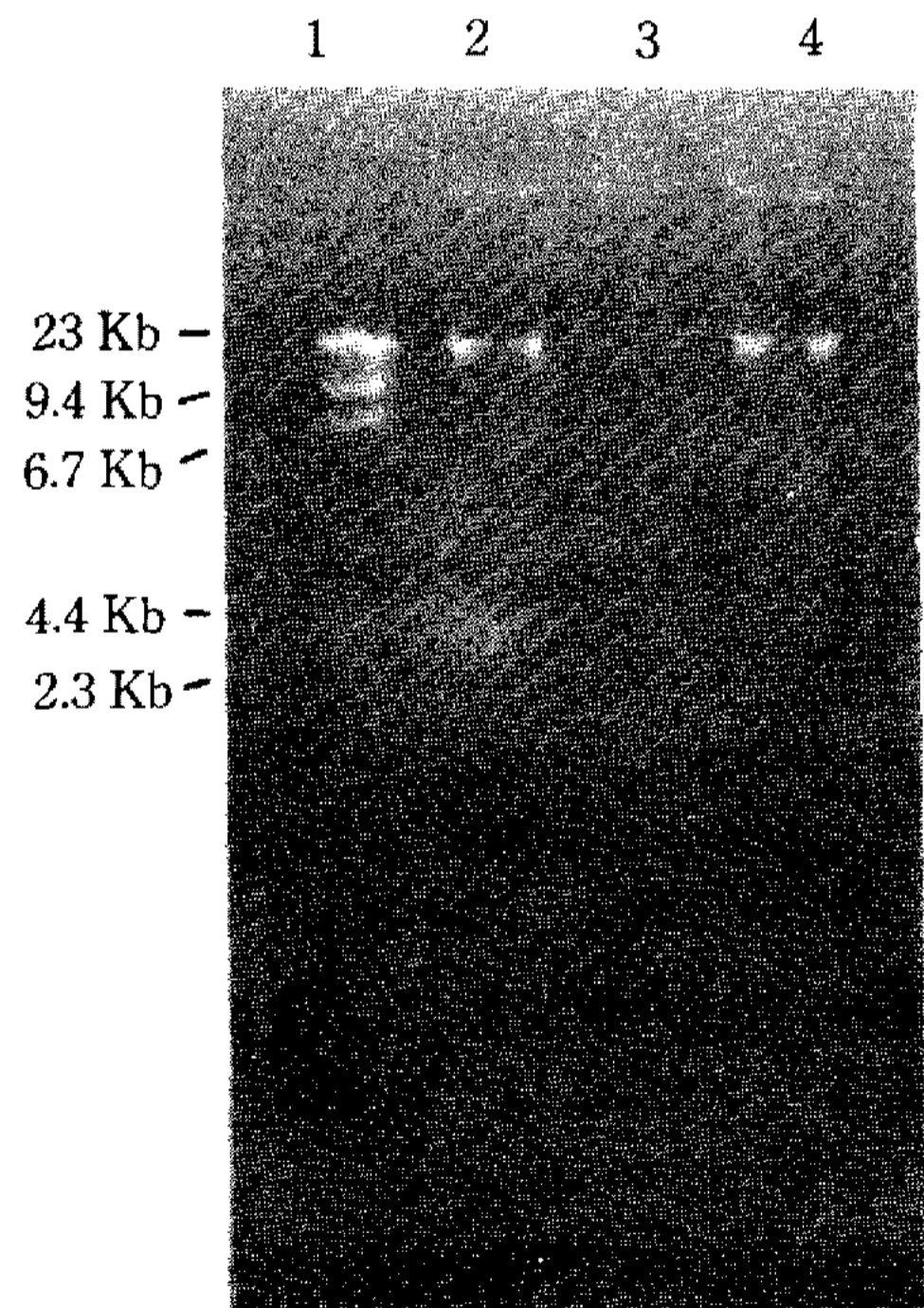
형질전환된 transformant내에서의 urease 유전자를 함유한 pGU66의 안정성을 조사하기 위해 항생제가 첨가되어 있지 않은 nutrient broth에서 생육시키면서 24시간 간격으로 20 µg/ml의 chloramphenicol을 함유한 선택배지와 비선택배지에 일정비율로 희석하여 도말배양하였다. 이때 비선택배지에서 나타난 콜로니 수를 백분율로 하여 안정성을 조사한 결과 Fig. 6에서 나타난 것과 같이 6일 경과하여도 50% 이상의 안정성을 유지하였다. 이 결과는 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7이 도입된 외부의 유전자를 비교적 안정하게 발현시킨다고 추정할 수 있다.

**형질전환체의 억제능 측정**

외부의 유전자 도입된 형질전환체와 숙주균주인 *B. subtilis* YBL-7의 식물근부균 *F. solani*에 대한 억제능을 비교해보기 위해 상기 실험방법으로 효소단백 등의 고분자물질을 제거한 저분자성 배양물질을 사용하여 그 억제력을 조사해 본 결과 Fig. 7에서 보는 것과 같이 숙주균주와 거의 동일한 억제력을 유지하



**Fig. 7. Antifungal abilities of *B. subtilis* YBL-7 and its transformant on the mycelial growth of *F. solani*.**  
 Symbol: (□-□); *F. solani*, (○-○); *F. solani* with culture of *B. subtilis* YBL-7 and (●-●); *F. solani* with culture of transformant by pGU66.



**Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of pGU66 plasmid DNA isolated from transformant of *B. subtilis* YBL-7.**  
 Lane 1: λ-DNA digested with *Hind*III, 2: pGU66 DNA, 3: *B. subtilis* YBL-7, and 4: transformant of *B. subtilis* YBL-7 with pGU66.

였으므로, 이 *B. subtilis* YBL-7을 host로 하여 가수분해효소 생산능이나 siderophore 생산능 등의 기타 억제능을 가진 유전자를 도입 발현시킴으로써 다목적의 생물방제균주로의 유전공학적 육종이 가능하리

라 사료된다.

상기 최적의 조건으로 형질전환하여 얻은 형질전환체를 Birnboim 등의 방법으로, 도입된 플라스미드를 분리하여 확인해 본 결과 Fig. 8에서 보는 것과 같이 그 플라스미드의 존재가 확인되었으며, 한편 1  $\mu\text{g}$ 의 pGU66 DNA를 사용하여 형질전환시킬 경우 최적의 형질전환율은 재생된 원형질체당 약  $5 \times 10^{-3}$ 이었다.

## 요 약

식물근부병의 방제균으로 선발된 *Bacillus subtilis* YBL-7의 식물근부균 *Fusarium solani*에 대한 길항력을 유전공학적 조작에 의해 다목적으로 증강시킬 수 있는지를 타진하기 위해 외부유전자인 *Bacillus pasteurii*의 urease 유전자를 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7내로 도입하고자 시도하였다. 외부 urease 유전자는 *B. pasteurii*의 urease gene을 shuttle vector인 pGR71의 *Hind*III site에 삽입하여 *E. coli*내에서 발현시킨 pGU66을 사용하여 형질전환시켰으며 이때의 최적 형질전환조건과 도입된 urease 유전자의 발현을 조사해 보았다. 그 결과 *B. subtilis* YBL-7의 원형질체를 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 lysozyme으로 42°C에서 90분 처리하였을 때 그 형질전환율이 가장 높았으며, 플라스미드 DNA 첨가농도는 1.2  $\mu\text{g}$ 까지는 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 일정하였다. 또한 최종농도가 30% (v/v)의 PEG 4000를 사용한 경우에서 최적의 형질전환율을 얻을 수 있었으며, 상기의 최적조건으로 형질전환시켜 본 결과 약  $5 \times 10^{-3}$ 의 빈도를 나타냈다. 그리고 형질전환체에서 urease 생성력도 강하게 나타났으며 플라스미드 안정성도 비교적 높았다. Urease 유전자를 함유한 pGU66으로 형질전환된 형질전환체에서도 *F. solani*에 대한 항진균성 물질이 숙주균주와 동일하게 생성되었다.

## 참고문헌

1. Baker, R.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **6**, 263 (1968)
2. Henis, Y. and I. Chet: *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**, 85 (1975)
3. Papavizas, G.C. and R.D. Lumsden: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **18**, 389 (1980)

4. Blakeman, J.P. and N.J. Fokkema: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **20**, 167 (1982)
5. Cook, R.J.: *Phytopathol.*, **75**, 25 (1985)
6. Baker, R.: Biological control of plant pathogens. Academic Press, Inc., 25 (1985)
7. 김용수, 임호성, 김상달: 식물근부균의 생육억제균 검색 및 억제균의 유전공학적 개발, 한국과학재단 연구보고서, 85 (1990)
8. Morrissey, R.F., E.P. Dugan and J.S. Koths: *Soil Biol. Biochem.*, **8**, 23 (1976)
9. Hadar, Y., I. Chet and Y. Henis: *Phytopathol.*, **69**, (1979)
10. Elad, Y., I. Chet and J. Katan: *Phytopathol.*, **70**, 119 (1980)
11. Lifshitz, R., M.Y. Windham and R. Baker: *Ecology and Epidemiology*, **76**, 720 (1986)
12. Neiland, J.B.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **36**, 285 (1982)
13. Schroth, M.N. and J.G. Hancock: *Science*, **216**, 1376 (1982)
14. Scher, F.M. and R. Baker: *Phytopathol.*, **72**, 1567 (1982)
15. Neilands, J.B. and S.A. Leong: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **37**, 187 (1986)
16. Kim, S.D. and J. Spizizen: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 297 (1985)
17. Kim, S.D. and J. Spizizen: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 345 (1985)
18. Mckeen, C.D., C.C. Reilly and P.L. Pusey: *Ecology and Epidemiology*, **76**, 136 (1986)
19. Chang, S. and S.N. Cohen: *Molec. Gen. Genet.*, **168**, 111 (1979)
20. Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513 (1979)
21. Norris, R. and K. Brocklehurst: *Biochem. J.*, **159**, 245 (1976)
22. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1617 (1982)
23. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2887 (1981)
24. Bibb, M.J., J.M. Ward and D.A. Hopwood: *Nature*, **294**, 398 (1978)
25. Kondo, J.K. and L.L. Mckay: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 252 (1984)
26. Hopwood, D.A.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **35**, 237 (1981)
27. Sladek, T.L. and J. Maniloff: *J. Bacteriol.*, **155**, 734 (1983)
28. Lévi, C., K. Fodor and P. Schaeffer: *Molec. Gen. Genet.*, **179**, 589 (1980)
29. Vorobjeva, I.P., I.A. Khmel and I. Alföldi: *FEMS Microbiol. Letters*, **7**, 261 (1980)

(Received June 12, 1991)