

고추역병을 방제하는 PGPR균주 *Bacillus subtilis* AH18의 항진균성 Cellulase 유전자의 Cloning 및 효소 특성 조사

우상민 · 정희경 · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Cloning and Characterization of a Cellulase Gene from a Plant Growth Promoting Rhizobacterium, *Bacillus subtilis* AH18 against Phytophthora Blight Disease in Red-Pepper. Woo, Sang-Min, Hee-Kyoung Jung, and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea – Using PCR amplification, we cloned a cellulase gene (*celH*) from the *Bacillus subtilis* AH18 which has plant growth-promoting activity and antagonistic ability against pepper blight caused by *Phytophthora capsici*. The 1.6 kb PCR fragment contained the full sequence of the cellulase gene and the 1,582 bp gene deduced a 508 amino acid sequence. Similarity search in protein database revealed that the cellulase of *B. subtilis* AH18 was more than 98% homologous in the amino acid sequence to those of several major *Bacillus* spp. The *celH* was expressed in *E. coli* under an IPTG inducible *lac* promoter on the vector, had apparent molecular weight of about 55 kDa upon CMC-SDS-PAGE analysis. Partially purified cellulase had not only cellulolytic activity toward carboxymethyl-cellulose (CMC) but also insoluble cellulose, such as Avicel and filter paper (Whatman No. 1). In addition, the cellulase could degrade a fungal cell wall of *Phytophthora capsici*. The optimum pH and temperature of the *celH* coded cellulase were determined to be pH 5.0 and 50°C. The enzyme activity was activated by AgNO₃ or CoCl₂. However its activity was inhibited by HgCl₂. The enzyme activity was activated by hydroxy urea or sodium azide and inhibited by CDTA or EDTA. The results indicate that the cellulase gene, *celH* is an antifungal mechanism of *B. subtilis* AH18 against phytophthora blight disease in red-pepper.

Key words: PGPR, gene cloning, cellulase, *Bacillus subtilis* AH18, *Phytophthora capsici*

Cellulase는 cellulose를 분해하는 효소로 carboxymethyl-cellulose(CMC) 등 변형섬유소의 분해능이 뛰어난 1,4-β-D-glucan glucanohydrolase(E.C. 3.2.1.4, CMCCase)와 Avicel 등 불용성 섬유소의 분해능이 우수한 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase(E.C. 3.2.1.91, Avicelase)로 분류되며, 또한 cellobiose를 glucose로 분해하는 β-D-glucoside glucohydrolase(E.C. 3.2.1.21, β-Glucosidase) 등의 복합효소이다[1, 2, 23].

지금까지 알려진 cellulase의 이용은 농·임산 폐자원의 당화, 가축사료의 가공, 폐지의 재활용, 면직물 가공에 이용 등 여러 산업에 이용되었다[1, 5]. 이렇게 중요한 효소인 cellulase의 대량생산을 위하여 유전자 재조합기술을 이용하여 cellulase 고 생산균주를 확보하기 위한 연구가 활발히 이루어져왔다. Cellulase 유전자의 cloning은 *Bacillus* sp.[3, 7], *Cellulomonas* sp.[6], *Clostridium* sp.[14], *Pectobacterium* sp.[16], *Rhizobium* sp.[18] 등에서 보고되었다. 그리고 토양

내 수많은 미생물들이 cellulase를 생산하는 것으로 알려져 있고[5, 23], 이렇게 생산된 cellulase는 미생물들의 영양공급을 위해 이용된다. 뿐만 아니라 몇몇 식물은 cellulase로 식물세포벽을 분해하여 auxin과 같은 식물생장촉진 호르몬의 작용을 증대시키기도 하며[20], 토양전염성 식물병원성 균의 세포벽에 함유된 cellulose를 분해함으로써 친환경 생물방제에 활용될 수 있다.

고추역병균 *Phytophthora capsici*는 oomycetes에 속하며 분류학상으로 갈색 조류(brown algae)로 분류되며, 세포벽이 cellulose와 glucan 등으로 이루어져있는 것으로 알려져 있다[4, 13]. *P. capsici*의 생육을 강력히 길항하고 고추의 생육을 촉진하는 PGPR균주 *B. subtilis* AH18을 이미 선발하였으며 그 기능들을 조사한 바 있다[8].

따라서 본 연구는 생장촉진기능과 식물병원성 곰팡이 및 조류의 생물 방제 균으로 선발된 PGPR균주 *B. subtilis* AH18이 cellulase를 생산하는 것을 확인하고, 생산된 cellulase가 고추역병균에 대한 길항능력을 발휘하는지 확인하고자 그 유전자를 cloning하였으며, cloning된 cellulase gene의 특성 확인 및 발현된 cellulase의 효소학적 특성을 조사하여 고추역병균 길항기작의 연구에 활용하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-810-4663

E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

사용한 균주 본 연구실에서 경산지역 경작지 토양에서 분리한 auxin 및 siderophore를 생산하는 *Bacillus subtilis* AH18을 사용하였다[8]. *E. coli* DH5 α 를 host cell로 pUC 18를 cloning vector로 사용하였다.

배지 및 배양

B. subtilis AH18은 Nutrient broth에 30°C에서, *E. coli* DH5 α 는 LB broth에 37°C에서 진탕배양 하였다. *E. coli* DH5 α 형질전환 균주의 cellulase 활성 확인은 ampicillin이 50 μ g/ml와 0.1% CMC를 함유한 LB agar을 선택배지로 사용하였다.

Cellulase 생산능 확인

Cellulase 생산능 확인은 0.1% carboxymethyl-cellulose (CMC)를 첨가한 Nutrient agar에 *B. subtilis* AH18을 toothpick하여 30°C에서 48h 배양 후 Congo red plate[22] 방법으로 확인하였다.

DNA 분리, PCR 그리고 sequencing

B. subtilis AH18의 chromosomal DNA 분리는 QIAGEN사의 DNeasy[®] Tissue Kit를 사용하였다. 분리된 DNA를 주형으로 PCR을 수행하였으며, primer는 cel H(+); 5'-AGAAGTGTAGAGCCAAAATGATGCGAAGGA-3', cel H(-); 5'-CGGACATCGTTACTGATGTCCGCC-3'로 디자인하여 이용하였다. PCR 조건은 94°C(pre-denaturation) 5분 후 94°C(denaturation) 1분, 64°C(annealing) 1분, 72°C(polymerization) 90초, 29cycle를 수행한 후 72°C(post-polymerization) 90초를 행하였다. 그리고 *Taq* DNA polymerase는 Solgent Co., Ltd. Korea의 *pfu* DNA polymerase를 사용하였고, DNA sequencing도 동시에 의뢰하여 확인하였다.

Cellulase gene cloning 및 형질전환 균주의 cellulase 활성 측정

Recombinant DNA 제작 및 gene cloning 방법은 Sambrook 등[19]의 방법에 준하여 수행하였다. pUC 18 vector를 *Sma*I로 처리하였으며, agarose gel 상에서 분리한 PCR product와 ligation(16°C, overnight) 후 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하여 LB agar에 ampicillin, IPTG, X-gal이 첨가된 배지에 도말하여 형질전환 균주를 분리하였다. 분리된 균주를 선택배지에 toothpick하여 37°C에서 24시간 배양 후 Congo red plate방법으로 측정하였다.

CMC-SDS-PAGE를 이용한 분자량 측정

형질 전환체 *E. coli* DH5 α (pCM 41)에서 발현된 cellulase

의 분자량은 0.1% CMC가 함유된 12% SDS-PAGE를 사용하여 확인하였으며[15], 표준단백질은 β -galactosidase (116.0k Da), Bovine serum albumin(66.2k Da), Ovalbumin (45.0k Da), Lactate dehydrogenase(35.0k Da) Restriction endonuclease *Bsp* 981(25.0k Da), β -lactoglobulin(18.4k Da), Lysozyme(14.4k Da)을 사용하였다.

Cellulase의 기질특기성 확인

E. coli DH5 α (pCM 41)의 cellulase의 기질확인을 위해 Avicel, filter paper, CMC, pNPG, *P. capsici*의 건조 cell wall을 기질로 확인하였으며, 활성측정은 정 등[3]의 방법에 준해서 확인하였다.

온도 및 pH의 최적조건 및 안정성

E. coli DH5 α (pCM 41)이 생산하는 cellulase의 최적 반응온도를 조사하기 위해 20°C에서 80°C까지 반응시켰으며, 최적 pH는 pH 4.0에서 pH 11.0까지 조정된 완충액을 첨가하여 반응시킨 후 DNS법[17]으로 생산된 환원력 활성을 측정하였다. 열에 대한 안정성은 20°C에서 80°C까지 각각의 온도에서 30분간 열처리 후 활성을 측정하였으며 pH에 대한 안정성은 pH 4.0에서 pH 11.0까지 조정된 완충액에 4°C에서 12시간 전처리 후 위와 동일한 방법으로 활성을 측정하였다.

금속염, 저해제에 대한 안정성

E. coli DH5 α (pCM 41)이 생산하는 cellulase가 금속염들과 저해제들에 어떠한 영향을 받는지 확인하기 위해 최종농도를 10-3M로 하여 4°C에서 12시간 전처리 후 위와 동일한 방법으로 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Cellulase 생산 확인 및 cellulase gene cloning

Auxin, siderophore를 생산하는 *B. subtilis* AH18의 cellulase 생산을 추가적으로 Congo red plate[22] 방법으로 확인하였다(Fig. 1). 그리하여 *B. subtilis* AH18 균주는 식물성장을 촉진하는 auxin, 식물병원성에 뛰어난 방제능이 있다고 보고된 siderophore[8], 그리고 섬유소 분해효소인 cellulase를 생산하는 것을 최종 확인하였다. *B. subtilis* AH18의 경우 이미 밝혀진 siderophore로 인해 식물병원균의 방제가 가능하지만, cellulase의 경우 식물병원균에 대한 방제연구가 전혀 보고되지 않았다. 그리하여 *B. subtilis* AH18의 cellulase gene을 cloning 하여 cellulase의 고추역병균인 *P. capsici*를 대산균주로 방제능을 확인하려 하였다. Cellulase gene의 cloning은 정제된 *B. subtilis* AH18의 chromosomal DNA를 주형으로 PCR 수행 결과 blunt end를 형성하는 1.6 kb 정도의 PCR product를 확인하였으며, 이

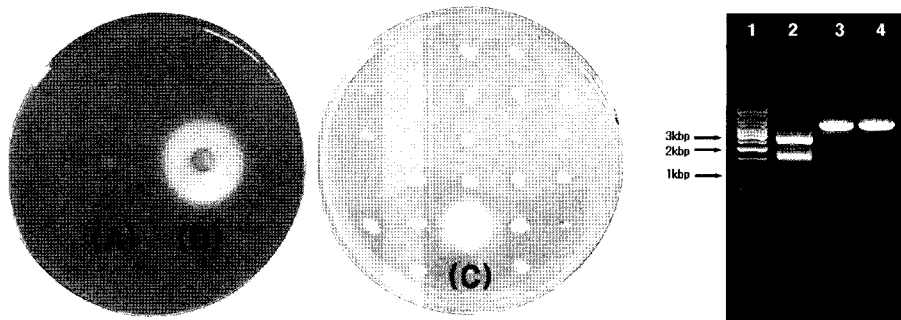


Fig. 1. Confirmation of halo zone and detection of *B. subtilis* AH18 cellulase gene harboring recombinant *E. coli* DH5 α (pCM 41) clones by congo-red staining of nutrient and LB agar plates containing CMC and agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid DNA. A: *E. coli* DH5 α (Bacterium not producing cellulase), B: *B. subtilis* AH18, C: *E. coli* DH5 α (pCM 41), Line 1: 1kb DNA Ladder, 2: *Bam*HI and *Sac*I digested plasmid DNA, 3: *Bam*HI digested, 4: *Sac*I digested.

를 insert로 사용하였다. pUC 18 vector와 insert를 ligation 후 competent화 된 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하여 수 백의 형질 전환된 colony를 획득하였다. 일반적인 *Taq* DNA polymerase를 이용한 PCR의 경우 PCR product의 양 발달에 A-tailing을 형성하여 cloning을 쉽고 간편하게 할 수 있지만, 낮은 확률의 mis-match를 가지고 있다. 그리하여 본 연구는 PCR 증폭 시 *B. subtilis* AH18의 DNA sequence를 mis-match를 최소화하여 cloning 하기 위해 *pfu* DNA polymerase를 사용하였다.

형질전환 균주의 cellulase 활성 확인 및 sequencing

형질전환체로 분리된 균주를 선발 배지에 toothpick하여 배양하였으며, 그 활성을 Congo red plate[22] 방법으로 확인한 결과, pUC 18 vector의 *lac* promoter를 이용해 *B. subtilis* AH18의 cellulase gene이 *E. coli* DH5 α 에서 발현된 하나의 cellulase positive균주를 분리, 선발하였다(Fig. 1). 이를 *E. coli* DH5 α (pCM 41)이라 명명하였으며 형질전환된 균주의 plasmid를 정제하여 제한효소인 *Sac*I, *Bam*HI 으로 처리하여 형질전환 여부를 확인하였다(Fig. 1). 확인 결과 약 1.5 kb의 insert를 확인하였으며, 이 제조업체인 Solgent Co., Ltd. Korea에 의뢰하여 insert부위의 DNA sequence를 확인하였다. 획득한 *B. subtilis* AH18의 cellulase gene 염기서열을 NCBI의 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)에 등록하였다(GenBank accession no. EF070194). *E. coli* DH5 α (pCM 41)는 pUC 18 vector 사이에 *B. subtilis* AH18의 1,582 bp 크기의 DNA fragment를 함유하며, *B. subtilis* AH18의 cellulase structure gene의 크기는 1,524 bp이며 508개의 amino acid가 암호화된 것으로 추정된다. 이 cloning된 cellulase gene의 단백질염기서열은 지금까지 알려진 *Bacillus* spp.들이 생산하는 cellulase와 98% 이상 일치하였다(Fig. 2).

Cellulase의 분자량 측정

SDS-PAGE를 응용한 CMC-SDS-PAGE 방법으로 cellulase

의 분자량을 측정하기 위해 *E. coli* DH5 α (pCM 41)의 배양 상등액과 loading buffer를 1:1로 혼합하여 30 μ l loading하였으며, 50°C 항온조에서 배양 후 Congo red 염색으로 활성을 확인한 결과 *E. coli* DH5 α (pCM 41)가 생산하는 cellulase는 약 55 kDa의 부위에서 활성밴드를 확인할 수 있었고(Fig. 3), 이는 cloning된 DNA 유전자의 예측결과와 일치하는 결과를 확인할 수 있었다. 이로써 CMC-SDS-PAGE 방법은 단백질 분자량을 직접적으로 간편하게 확인가능하므로 널리 이용될 것이다. *B. subtilis* AH18 유래의 cellulase는 김 등[9], 설 등[21]이 보고한 52 kDa, 53 kDa와 유사하였으며, 김 등[10, 11]이 보고한 80 kDa, 92 kDa보다 작았으나 cellulase의 구조유전자를 포함할 수 있는 충분한 크기라고 생각되어진다.

Cellulase의 기질특이성 확인

E. coli DH5 α (pCM 41)가 생산하는 cellulase의 여러 기질들에 대한 분해특이성을 확인한 결과 가용성 섬유소인 CMC를 가장 잘 분해하였다. 또한 불용성 섬유소인 Avicel, filter paper 그리고 고추역병균인 *P. capsici*의 건조 cell wall도 분해하였다(Table 1). 지금까지 보고된 cellulase 관련 연구 중에는 식물병원성을 나타내게 하는 식물세포벽 분해용 cellulase[15]와 식물 뿌리에 균류형성을 유도하는데 관여한다는 연구도 있었다[18]. 하지만 cellulose로 구성된 식물병원성균의 세포벽을 분해하여 식물병을 방제하는 연구는 확인되지 않았다. 본 연구는 PGPR균인 *B. subtilis* AH18이 식물에 병원성을 유발하는 균들 중 세포벽에 cellulose를 함유한 식물병원균의 생물학적 방제에도 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 차후 *in vitro* 및 식물 pot 실험을 통해 방제능을 확인할 것이다.

Cellulase의 효소학적 특성

E. coli DH5 α (pCM 41)가 생산하는 cellulase는 50°C에서 효소활성이 가장 높았으며, 60°C에서 30분간 처리 후 활성이 85%까지 유지되는 비교적 온도 저항성이 높은 효소라고

EF070194	93	DDWGI TVFRAAMYTADGGYIDNPSVKNKVKKEAVEAAKELGIYVIIDWHILNDGNPNQNK	152
AAK94871	93	152
AAC02536	84	143
AAV34758	84QF.....	143
EF070194	153	KAKEFFKEMSSLYGNTPNVIEIANEPNGDVNWKRDIKPYAEEVIVSVIRKNDPDNIIIVG	212
AAK94871	153ECD.....	212
AAC02536	144	203
AAV34758	144	203
EF070194	213	TGTWSQDVNDAADDQLKDANVMYALHFYAGTHGQFLRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDA	272
AAK94871	213	272
AAC02536	204	263
AAV34758	204	263
EF070194	273	SGNGGVFLDQSREWLKYLDSKTI SWVNWNLSDKQESSALKPGASKTGGWRLSDLASAGT	332
AAK94871	273	332
AAC02536	264	323
AAV34758	264N.....	323
EF070194	333	FVRENILGTDKSTKDI PETPAKDKPTQENGISVQYRAGDGMNSNQIRPQLQIKNNGNTT	392
AAK94871	333R.....	392
AAC02536	324A.....	383
AAV34758	324S.....	383
EF070194	393	VDLKDV TARYWYNAKNGQNVDCDYAQLGCGNVTYKFVTLHKPKQGADTYLELGFKNGL	452
AAK94871	393K.....F.....I.....H.....	452
AAC02536	384K.....I.....H.....	443
AAV34758	384K.....F.....I.....H.....	443
EF070194	453	APGASTGNIQLRLHNDWSNYAQSGDYSEFFKSNFTTKKILTYDQGKLIWGTEPN	508
AAK94871	453	508
AAC02536	444	G.....	499
AAV34758	444S.....	499

Fig. 2. Sequence alignment of deduced amino acid sequences for *Bacillus* spp. cellulase. The sequences shown here are EF070194 from *E. coli* D5 α (pCM41), AAK94871 from *B. subtilis*, AAC02536 from *Bacillus* sp. 79-23, AAV34758 from *Bacillus* sp. HY2-3.

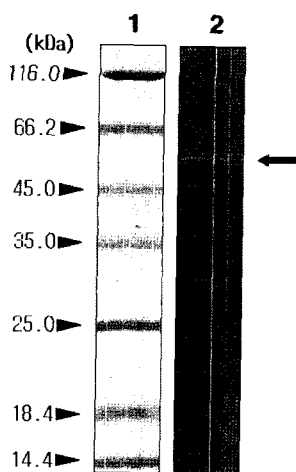


Fig. 3. Detection of cellulase activity of the *celH* of *E. coli* DH5 α (pCM 41) on CMC-SDS-PAGE. line 1: protein molecular weight marker, 2: activity staining band of the *celH* of *B. subtilis* AH18.

Table 1. Substrate specificity of *celH* protein of *E. coli* DH5 α (pCM 41).

Substrates	Relative activity(%)
Carboxymethyl-cellulose	100
Avicel	16.2
Fiter paper (Whatman No. 1)	22.5
Phytophthora capsici cell wall	10.8
p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	no activity

E. coli DH5 α was cultured in LB containing ampicillin for 36 hr at 37 °C. The mixture was subjected to the enzyme assay. The numbers were presented enzymatic capacity as percentage (%) relative to buffer control.

생각된다. 이는 고온에서도 활성을 유지하여 식물병원균의 세포벽을 용해할 수 있음을 시사한다. 그리고 pH 4.0에서 9.0까지 80% 이상의 활성을 유지하였으며, 최적반응 pH는 pH 6.0이었다(Fig. 4). 이는 산성화된 토양에서도 *B. subtilis*

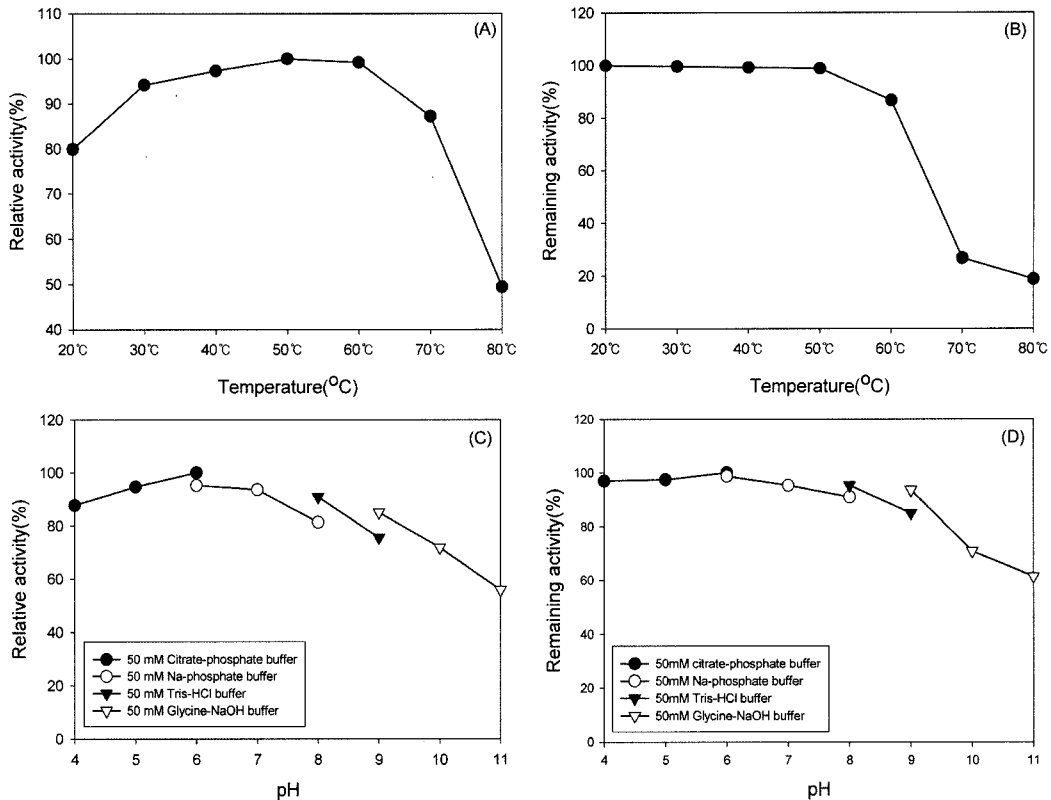


Fig. 4. Enzymatic properties of the celH protein of *E. coli* DH5 α (pCM 41) on different temperature and pH. (A): optimum reaction temperature, (B): thermostability, (C): optimum reaction pH, (D): pH stability. The relative activity was expressed as % activities at various temperatures (A) and pH (C) values compared to the enzyme activity. The enzyme was pre-incubated at various temperature (B) for 30 min and pH values (D) for 12 hr at 4°C. The residual activities were determined under the standard assay conditions immediately after incubation.

AH18의 cellulase의 활성이 유지되어 고추역병 방제에 크게 기여할 것으로 생각되어진다. 그리고 AgNO₃ 또는 CoCl₂ 첨가 시 활성이 1.7배와 2배 정도 증가시켰고, MnSO₄, Na₂SO₄, ZnSO₄, CuSO₄ 등 많은 금속이온들이 효소활성을 증가시켰다. 하지만 HgCl₂ 첨가 시는 활성이 24%만 잔존하였고 FeCl₃, FeSO₄ 역시 효소활성을 저하시켰다(Table 2). 이 결과는 김 등[9], 유 등[24]이 보고한 CoCl₂, AgNO₃ 첨가 시 활성이 증가하였다는 보고와 동일하였고, *B. subtilis* AH18의 경우 siderophore를 생산하여 외부의 철 이온을 결합함으로써 cellulase의 효소활성 저하는 나타나지 않을 것으로 사료된다. 또한 여러 화학저해제들 중 Sodium azide, Hydroxy urea, SDS, L-cystein은 효소 활성을 저해하지 못하였으나, CDTA 또는 EDTA는 섬유소분해능을 70% 이하로 감소시켰고 p-CMB와 PMSF 역시 효소활성을 저해하였다. 위의 결과로 보아 *E. coli* DH5 α (pCM 41)가 생산하는 cellulase는 금속이온을 갖고 있는 metalloenzyme으로 추정된다. 또한 PMSF의 저해를 거의 받지 않는 것으로 보아 serine 잔기가 존재하지 않는 것으로 추정되며, 지금까지 효소저해제로 가장 많이 알려진 SDS 역시 효소활성을 크게 저해하지 못하였다.

Table 2. Effect of various metal ions on the cellulase activity of celH protein of *E. coli* DH5 α (pCM 41).

Metal ions	Relative activity(%)
None	100
CoCl ₂	214.5
AgNO ₃	174.7
MnSO ₄	164.3
Na ₂ SO ₄	117.6
ZnSO ₄	117.2
CuSO ₄	116.3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	113.1
KCl	110.9
LiCl	108.6
Na ₂ MoO ₄	105.9
ZnCl ₂	105.4
BaCl ₂ · 2H ₂ O	102.3
CaCl ₂	95.9
FeSO ₄	91.4
FeCl ₃	79.6
HgCl ₂	24.0

The enzyme was pre-incubated with various metal ions in 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 6.0) for 12 hr at 4 °C. After incubation, the mixture was subjected to the enzyme assay. The numbers were presented enzymatic capacity as percentage (%) relative to buffer control.

Table 3. Effect of various chemical inhibitors on the cellulase activity of *celH* protein of *E. coli* DH5 α (pCM 41).

Chemicals	Relative activity (%)
None	100
Sodium azide	114.0
Hydroxy urea	108.6
SDS	101.9
L-cystein	101.4
p-CMB ^a	98.2
PMSF	95.5
EDTA(pH 7)	65.6
CDTA(pH 7)	63.8

The enzyme was pre-incubated with various inhibitors in 50 mM Citrate-phosphate buffer (pH 6.0) for 12 hr at 4°C after incubation, the mixture was subjected to the enzyme assay. The numbers were presented enzymatic capacity as percentage (%) relative to buffer control. SDS; sodium dodecyl sulfate, p-CMB: p-chloromercuribenzenesulfonic acid, PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid, CDTA: *trans*-1,2-diaminocyclohexanetetraacetic acid.

a : Final conc.: 10-5M

요 약

식물생육을 촉진하고 고추역병균을 방제하는 다기능 PGPR 균주 *Bacillus subtilis* AH18의 항진균성 cellulase 유전자 클로닝을 이용해 pUC18과 재조합 후 *E. coli* DH5 α 에 cloning하여 *E. coli*내에 발현시켰으며, 그 형질전환 균주를 *E. coli* DH5 α (pCM 41)이라 명명하였고, 발현된 cellulase를 *celH*라 하였다. *E. coli* DH5 α (pCM 41)의 insert 부위는 *B. subtilis* AH18의 1,582 bp 유전자를 포함하며 cellulase의 유전자는 1,524 bp로 508개의 amino acid가 암호화된 것으로 추정되었고, CMC를 함유한 SDS-PAGE의 방법으로 약 55 kDa의 분자량을 확인하였다. *B. subtilis* AH18이 가지는 *celH*는 3종의 대표적인 *Bacillus* spp. 들의 cellulase 유전자의 DNA와 아미노산 배열이 98% 이상 유사하였으며, CMC(carboxymethyl-cellulose) 뿐만 아니라, 불용성 섬유소인 Avicel, filter paper(Whatman No. 1)와 특히 고추역병균인 *Phytophthora capsici*의 건조 cell wall도 분해하였다. 또한 *celH*의 cellulase는 50°C에서 효소활성이 가장 높았으며, 최적 pH는 pH 6.0이었다. 그리고 AgNO₃ 또는 CoCl₂ 첨가시 활성이 1.7배, 2배 정도 증가하였고 HgCl₂ 첨가시 활성이 20%까지 떨어졌다. 또한 여러 화학 저해제들 중 Sodium azide 또는 Hydroxy urea는 효소 활성을 증가시켰으며, CDTA 또는 EDTA는 섬유소분해능을 감소시켰다. 이들의 결과는 고추역병균 *P. capsici*의 생육을 억제하는 *B. subtilis* AH18의 진균세포벽 용해성 cellulase의 효소학적 특성을 구명한 것이라고 할 수 있다.

감사의 글

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

참고문헌

- Beguín, P. and J. P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulase. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 25-58.
- Bisaria, V. S. and T. K. Ghose. 1981. Biodegradation of Cellulosic materials : substrate, microorganisms, enzymes and products. *Enz. microbiol. technol.* **3**: 90-104.
- Chung, Y. C., Y. W. Kim, S. K. Kang, J. S. Rho, J. H. Park, and N. K. Sung. 1991. Cloning of Thermophilic Alkalophilic *Bacillus* sp. F204 Cellulase gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **23**: 31-36.
- Daw, I. W. and I. W. Sutherland. 1992. Microbial physiology. 2nd ed. Blackwell Scientific. London.
- Gilbert, H. J. and G. P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulase and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.
- Her, S., D. S. Kim, S. J. Choi, and D. H. OH. 1993. Cloning and DNA Sequence of Carboxymethylcellulase(CMCase) Gene from *Cellulomonas* sp. YE-5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 86-90.
- Hong, I. P., H. K. Jang, S. Y. Lee, and S. G. Choi. 2003. Cloning and Characterization of a Bifunctional Cellulase-Chitinase Gene from *Bacillus licheniformis* NBL420. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 35-42.
- 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.
- Kim, J. H., J. C. Lee, Y. K. Lee, K. H. Kim, S. B. Chun, and K. C. Chung. 1993. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase IV from *Penicillium verruculosum*. *Kor. J. Mycology* **21**: 28-37.
- Kim, J. Y., S. H. Hur, and J. H. Hong. 2004. Isolation and characterization of an alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-180. *Kor. J. Microbiol.* **40**: 139-146.
- Kim, S. H., S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1997. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 305-309.
- Kim, S. J., and W. W. Kim. 1982. Studies on the isolation, purification and characterization of Cx enzyme produced by *Pyricularia oryzae* C-7. *Kor. J. Mycology* **10**: 67-73.
- Kim, S. S., S. W. Kwom, S. Y. Lee, S. J. Kim, B. S. Koo, H. Y. Weon, B. Y. Kim, Y. S. Yeo, Y. H. Lim, and S. H. Yoon. 2006. Taxonomy of a soil bacteria YNB54 strain which shows specific antagonistic activities against plant pathogenic *phytophthora* spp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 101-108.

14. Lee, J. K., K. H. Yoon, B. H. Kim, G. S. Kwon, and S. B. Kim. 1992. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Cellulase Genes from a Mesophilic *Clostridium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 50-55.
15. Lim, S. T., Y. Y. Park, S. J. Cho, and H. D. Jun. 1997. Phytopathogenicity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and Procuction of CMCase Isozymes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 468-476.
16. Lim, W. J., S. K. Ryu, S. R. Park, M. K. Kim, C. L. An, S. Y. Hong, E. C. Shin, J. Y. Lee, Y. P. Lim, and H. D. Yun. 2005. Cloning of celC, Third Cellulase Gene, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34 and its Comparison to Those of *Pectobacterium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 302-309.
17. Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
18. Park, Y. W., S. T. Lim, K. Y. Kang, and H. D. Yun. 1995. Clonig of CM - cellulase Gene of *Rhizobium meliloti* TAL1372 in *Escherichia coli*. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.* **38**: 313-319.
19. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 1, 2, 3. 3th ed. Cold Spring Harbor. New York.
20. Stephen C. Fry. 1989. Cellulase, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. *Physiol. Plant* **75**: 532-536.
21. Sul, O. J., D. K. Chungi, I. S. Han, and C. S. Jeong. 2005. Chracterization of Endoglucanase (F-I-III) Purified from *Trichoderma* sp. C-4. *Kor. J. Microbiol.* **41**: 81-86.
22. Teather, R. and P. J. Wood. 1982. Use of Congo red-poly-saccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 777-780.
23. Tomme. P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physoil.* **37**: 1-81.
24. Yoo, K. H. and H. S. Chang. 2002. Purification and chracterization of carboxymethyl cellulase from *Stropharia rugosoannulata*. *Kor. J. Mycology* **30**: 113-118.

(Received Oct. 4, 2006/Accepted Dec. 8, 2006)