

최 종 연구보고서	# 299112-3
--------------	------------

염류장해 토양의 복원을 위한 환경친화형
미생물 및 신소재의 상업적 개발

Industrial Development of
Environment-Friendly Bioremediating Agents
for the Recovery of Salt Injury Soil

배 재 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “염류장해토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및
신소재의 상업적 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 일

주관연구기관명 : 배재대학교

총괄 연구 책임자 : 이 기 성

세부 연구 책임자 : 이 기 성

연 구 원 : 장 화 형

연 구 원 : 한 갑 진

협동연구기관명 : 연세대학교

협동 연구 책임자 : 최 강 열

협동연구기관명 : 원자력연구소

협동 연구 책임자 : 이 영 근

참 여 기 업 : (주)에코바이오메드

요 약 문

I. 제 목

염류장해토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및 신소재의 상업적 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 선진 각국간에는 기술우위 확보를 위해 의학, 생명과학, 환경분야에서 첨단기술의 개발 및 정보화 (database)로 불꽃튀는 경쟁을 하고 있는 중대한 시점에 있다. 서방 선진국은 개발된 신기술의 특허를 이용하여 타국의 기술개발을 규제하여 독점적 지배체제의 유지를 시도하고 있으며, 기술 및 제품에 대한 royalty도 급속히 상승시키고 있다. 더욱이 국제적인 환경보호협약의 출범은 환경분야에서도 선진국의 경제지배를 가속화시킬 것이며 이렇게 급변하는 국제질서에 대응하기 위해서 21세기 차세대형 농업환경기술과 제품의 개발은 필수적이다.

환경복원에 기여할 수 있는 환경친화형 신기술의 개발 방향은 환경 보전과 환경 관련 생산물의 부가가치 증진 등 양적, 질적 생산성을 향상시키는데 있으며, 이를 위해서는 무공해 천연 미생물의 개발로 우리의 관심을 집중해야 한다. 특히 환경보호와 생태계 보전에 관한 Green Round 협약이 국제적 관심의 대상이 되면서, 농토가 부족한 우리나라의 농업환경하에서 발달한 집약적 농업에 주로 적용하던 기존의 환경을 파괴하는 농법인 과잉의 비료시비와 과도한 농약 사용 및 연작재배 등은 국제적으로 무역활동의 위축 등을 야기하는 원인이 되고 있다. 더욱이 이런 농법으로 인하여 시설하우스의 토양은 염류가 집적되어 염류장해가 심각한 실정에 이르고 있다. 이러한 염류장해는 농작물 생육에 큰 피해를 주어 결국 농업생산성을 심각하게 감소시키는 등 환경파괴와 생산성 감소, 무역활동의 위축이라는 다 방면에서 다양한 문제를 야기하고 있어 이를 시급히 해결해야할 시점에 와있다. 즉, 토양환경을 복원하고, 과도한 시비를 억제하며 무독성 생물농약의 사용을 장려해서 무공해 환경친화적인 농업생산성의 향상을 이루기 위해 노력해야 한다.

본 연구에서는 특히 토양환경의 복원에 초점을 맞추어 국내 토양 미생물로부터 농토의 염류장해를 제거할 수 있는 염류제거 기능성 미생물의 탐색, 염류제

거 기능의 분자 생물학적 특성 규명을 통한 기능이 증강된 유전자조작 미생물의 개발, 염류제거를 통한 환경복원 능력 실험 및 환경방출 실험, 또 개발된 염류제거 기능성 미생물의 제제화를 위해 **염류장해토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및 신소재의 상업적 개발**이라는 명제하에 다음과 같은 목적을 갖고 수행되었다.

- 1) 토양염류를 효율적으로 제거하는 미생물의 개발 및 제제화
- 2) 토양염류 제거를 위한 내염성 증강 진균의 개발

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 최종목표는 염류제거능이 뛰어난 미생물을 선별하여 염류장해 토양에 접목하였을 시 식물의 성장, 생육 등에 약해가 없으며, 토양환경개량 능력과 염류제거 능력이 뛰어나며, 연작, 윤작에 영향이 없고 지하수, 토양, 하천수 등에 오염물질원으로 작용하지 않는 미생물을 개발하는데 필요한 기초 및 응용적인 생물학적 연구를 수행하고 이들을 상품화시키는 것이며 이를 위해 다음과 같은 연구내용 범위를 설정하였다.

1. 토양염류제거용 미생물 탐색

- ① 시설하우스와 간척지의 염류장해토양의 환경요인 분석
- ② 염류장해토양으로부터 내염성/호염성 균주 선별
- ③ 국내 토양으로부터 불용성 인산염 가용화 균주 선별
- ④ 방사선이용 가용화능 증강 균주 발굴

2. 인산염 가용화 균주의 분자유전학적 동정

- ① 불용성 인산염 분해세균의 생리생화학적 특성 조사
- ② 불용성 인산염 분해세균의 16S rDNA 서열을 이용한 분자생물학적 분류

3. 불용성 인산염 가용화 균주의 토양내 염류제거 효율조사

- ① 가용화 균주의 활성 스펙트럼 조사
- ② 가용화 균주 생장을 특성 분석
- ③ 가용화 균주의 phosphatases 활성 분석
- ④ 가용화 균주의 염류장해토양내 전기전도도와 이온함량에 미치는 영향 조사

4. 토양염류 중 인 제거를 위한 유전자재조합 세균의 개발

- ① *pho* regulon 유전자들(*phoB*, *phoA*, *phn* operon)의 클로닝 및 특성규명
- ② 인산염 분해 및 축적 유전자들(*ushA*, *phy*, *pqqE*)의 클로닝 및 특성규명
- ③ *PhoA* promoter를 이용한 super expression vector 구축
- ④ 항상 활성형을 나타내는 constitutive *PhoB* (*PhoB^C*) 구축
- ⑤ 인산 가용성 및 축적능이 배가된 재조합체(*Ppk^S-PhoB^C*) 구축

5. 토양염류 제거를 위한 내염성 증강 진균의 개발

- ① 내염성 조절 유전자 *Hog1* MAPK 클로닝
- ② *Hog1* 유전자가 결핍된 이스트 균주 제조
- ③ 내염성 증강 유발 *Hog1* 돌연변이 유전자 탐색 및 특성 규명
- ④ 내염성 증강 이스트 재조합균주 구축 및 특성 조사

6. 포장활성실험

- ① 가용화 균주의 작물 발아율에 미치는 영향 조사
- ② 풋트활성시험을 통한 가용화 균주의 염류장해토양 개선 효과 조사
- ③ 풋트활성시험을 통한 가용화 균주의 제제화 기법 구축
- ④ 온실활성시험을 통한 가용화 균주제제의 염류장해토양 개선 효과 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1) 연구결과의 기대효과

본 과제 연구결과는 잘 활용할 경우 다음과 같은 기대효과를 충족시킬 수 있다.

① 기술적 측면

- 균주탐색, 활성검색, 제제기술, 염류장해토양 환경요인 분석기술 등이 선진국 수준으로 올라간다.
- 염류장해 제거 및 복원기술에 대한 세계적, 독창적 선도기술이 확립된다.
===> 외국으로의 기술 이전 가능한 신기술이 개발된다.
- 염류장해에 대한 생물학적인 환경친화형 복원모델 시스템이 구축된다.
- 환경친화형 염류장해 제거 미생물 균주 및 유전공학적인 변형 균주 (GMO 균주)를 이용한 미생물 제제의 개발이 가능해진다.

- 토양의 복원 및 정화에 대한 신기술을 확보하게 되어 작물생산성 증대가 가능해진다.
- 부작용 없는 생물청정제로서의 환경친화형 염류제거 미생물 제제를 확보하게 된다.
- 내염성 작물개발을 위한 형질전환 식물 (transgenic plant) 제조용 기반기술 제공(Hog1연구결과)이 가능해진다.
- 방사선을 응용한 탈염, 탈인, 가용성이 증가된 고효율 미생물 유도기술이 확보된다.
- 국내 기능성 미생물 자원의 확보 및 유전공학적 개량 기술의 증대를 가져온다.
- 국내의 기술개발로 인한 염류장해토양 개선에 관련된 신기술의 축적되었기 때문에 지속적인 환경친화적 염류장해 개선 및 작물 생산성 향상용 미생물 제제의 제품이 탄생된다.
- 국내 관련 산업 기술의 상승효과가 있게 된다.
- 내염성 유도관련 단백질의 개발에 대한 기초지식을 제공하게 된다.
- 극한 환경에서의 미생물의 생리 생화학적 반응기작 규명에 응용할 수 있게 된다.
- 인 (phosphate) 대사에 관련된 미생물의 분자생물학적 메카니즘의 규명에 활용할 수 있게 된다.
- 미생물 제제의 고정화 기반 기술 확립에 일조할 수 있게 된다.
- 외국의 기술 의존도 및 선진국에서의 기술 종속 관계에서 탈피한다.

② 경제산업적 측면

- 국내에 염류집적으로 인해 작물 소출에 영향을 받고 있는 경작지에 적용함으로써 작물의 생산이 증대되고 토양의 비옥도가 증가되어 지속적인 경작이 가능케 된다. 이를 통해 또한 소농이 위주로 되어 있는 농민의 소득 증대에 크게 기여할 수 있을 뿐만 아니라 농민의 보건향상에도 기여할 수 있게 된다.
- 염류집적지의 염제거에 대한 고효율성의 환경친화형 **염류장해 환경 복원제**로의 적용은 국내 농경지의 토양보호는 물론 연작·윤작을 가능케 함으로써 작물의 생산성을 높일 수 있게 된다.

- 다양한 기능성 미생물 제제와 혼용하여 보다 우수한 기능을 지닌 **염류장해 환경 복원제제를 생산할 수 있어** 하우스토양 뿐 만 아니라 서해안의 간척지 등에 적용이 가능해, 간척지 조성후의 쌀 농사의 시점이 빨라지는 동시에 기능성 미생물 제제의 작용으로 토지의 영양물질 순환이 빨라져 궁극적으로는 쌀 생산의 증산에 부가적인 도움을 준다. 따라서 간척지에서의 쌀의 조기 생산 및 증산은 국내의 주 식량자원인 쌀의 자급자족을 지속적으로 가능케해 세계 국가에서 식량자원을 안보화하는 현 시점에서 산업적으로 일익을 담당할 수 있게 된다.
- 특히가 종료되는 20년간 세계 시장에서 독점적으로 판매가 가능하여 기술로알티 수입이 예상되며 또한 관련 국내 중소기업에 제조권 및 판매권을 이양하여 고용의 창출과 중소기업의 안정된 발전을 기대할 수 있게 된다.
- 국제경쟁력을 갖춘 신제품의 지속적인 창출로 지속적인 외화 획득에 기여할 수 있게 된다.
- 자원이 없는 우리나라의 입장에서 **염류장해 환경 복원제제 개발과제는** 고부가치성 기술집약형 기술의 총화이다. 따라서 지속적인 연구 개발을 통해서만 신제품이 창출되기 때문에 고급 연구인력의 참여가 필수적이다. 즉, 만능적인 고급인력의 적체를 해소하는데 기여할 수 있게 된다.
- 부작용 없는 생물 청정기술의 확보로 관련 산업 및 환경에 적용하여 국내 환경 오염 예방과 복원에 이용할 수 있다. 이를 통하여 산업화와 도시화로 인한 국내의 토양 환경 개선에 기여할 수 있게 된다.
- **염류장해 환경 복원제제** 개발의 성공으로, 부가적으로 이미 본 연구진이 개발에 성공하여 일부 상품화된 토양부숙제와 미생물농약을 함께 사용했을 때, 부영양화 되어 있는 농경지의 많은 영양염을 효과적으로 분해·제거하여 토양으로부터 유래하는 수계오염원을 원천적으로 차단하여 국내의 수생환경 보호와 개선에 일조할 수 있게 된다.

2) 활용방안

본 연구로부터 얻어진 결과들에 대하여 구체화된 활용계획을 요약하면 다음과 같다.

- ① 본 연구로부터 탐색, 분리된 16종의 인산염 가용화 및 내염성/호염성 균주

들은 염류장해토양 환경개선용 bioremediator와 biofertilizer로 생산개발에 이용될 것이다(특히, 인산염 가용화 균주들은 국내특허를 출원하였으며 참여기업인 (주)에코바이오메드에 의해 염류장해토양 개선용 미생물 제제로 2003년 8월경에 생산시판될 예정임: 상품명 '염류닥터').

- ② 8종의 인산염 가용화 균주들은 기존의 생화학적 동정방법(API, Biolog kit 등)으로는 60% 이하의 판정으로 명확한 동정이 불가능하였으나 최신의 분자유전학적 동정기법을 이용하여 99.9%이상의 정확도로 아래와 같이 분류되었다

★KSJ8 (*Leclercia adecarboxylata*) ★KSJ16 (*Enterobacter intermedius*)

★KSJ11 (*Pseudomonas putida*) ★WP38 (*Enterobacter asburiae*)

·KSJ3 (*Acinetobacter calcoaceticus*) ·WP20 (*Acinetobacter calcoaceticus*)

·WP41 (*Acinetobacter* sp.) ·WP42 (*Acinetobacter* sp.)

이중 ★ 표시된 4종류의 균주들은 국내외적으로 인산염 가용성이 있음을 본 연구를 통해 최초로 밝힌 것으로 본 균주들을 이용한 염류장해토양 개선용 미생물제제는 국외로 수출하여도 경쟁력이 있는 제품임을 기대할 수 있다.

- ③ 본 연구에서 발굴한 인산염 가용화 균주들을 제제화하여 염류장해토양에서 작물재배에 활용한 포장활성시험에서 대조군에 비해 작물의 생체중 증가율이 무려 1.7배에서 4.3배에 이르는 등 작물생산성이 증가된 결과와 염류장해토양의 물리화학적 환경요인이 개선된 결과(토양의 전기전도도가 11이상에서 6이하로 낮아지는 등)로 판단하건데 국내외적으로 염류장해토양 개선을 위한 연구분야에서 독보적인 기술력을 확보한 것으로 이 기술력을 기업화할 경우 향후 10 여년 이상 이 분야에서 독보적인 판매우위를 차지할 것으로 예측되며 또한 국내외 기업으로부터 고액의 기술료를 받을 수 있을 것으로 예측된다.
- ④ 또한, 방사선을 이용하여 인산염 가용화능을 배가시킨 5종의 균주들 [KSJ8(2균주), KSJ11(1균주), KSJ16(2균주)]은 제제화하거나 인산염 가용성의 메카니즘을 보다 상세히 연구하는 데에 활용할 수 있어서 보다 유용성이 개선된 미생물제제의 개발이 기대된다.
- ⑤ 본 연구를 통해 확보한 세균인산대사 조절 유전자들 (*pho regulon* 유전자들)과 인산염 분해 유전자들(*ushA*, *pqqE*, *phy*, *ppk*)은 이 분야의 기초학문 연구에 활용되어 선도적인 역할을 할 수 있게 될 것이다. 특히, *Enterobacter aerogenes*의 C-P lyase인 *phn operon*의 구조를 세계 최초로 규명한 결과는 세계적 저명학술지에 게재할 것으로 이 분야의 국내

연구역량을 높이는데 일조할 수 있다.

- ⑥ 본 연구에서 개발된 **super expression vector (pEAAP)**는 인산 결핍환경에서 유전자를 과발현할 수 있는 특징을 지닌 것으로 특허권을 취하는 한편 본 연구진은 국내의 연구자들과 산업체 발전을 꾀하고자 한국미생물학회지에 게재하였다(**한국미생물학회지, 2002. 38(4):318-321**).
- ⑦ 본 연구에서 개발된 5개의 신규 발현벡터들[pEAAP, pEAPHY1 (**Phy^S**), pEAPHY31 (**Phy^S+Hig tag**), pEAPPK (**Ppk^S**), pEAPQQE (**PqqE^S**)]과 항시활성형 **PhoB^C**를 제공하는 5개의 신규 벡터들[pSH1C (*phoB* 발현, high copy number vector), pSH2C, pSH3C, pSH4C, pSH5C]은 인산염 가용성을 지닌 **다양한 재조합체(GMO)**를 구축하여 상업적 목적으로 활용할 수 있을 뿐만 아니라 세균의 인산대사 메커니즘을 연구하는 기초 학문적 수준에서의 재료로 폭 넓게 활용될 수 있다.
- ⑧ 이미 본 연구를 통해 구축된 재조합체들{pSH3C/PPK (**Ppk^S-PhoB^C**, DH5a), pSH3C/PQQE (**PqqE^S-PhoB^C**, DH5a), pSH1C/PHY1 (**Phy^S-PhoB^C**, DH5a)} 중 **Phy^S-PhoB^C**는 **phytase 활성이 3.5배에 달하는 효율을 나타내어 그 유용성이 입증되었다**. 그러나, host가 *E. coli*인 때문에 상업화에 제한이 있어 본 연구에서 개발된 인산염 가용화 균주에 도입하고자 기반 연구를 수행하였다. 앞으로 참여기업인 (주)에코바이오메드와 공동으로 이에 관한 **연구과제를 제안하여** 염류장해토양 개선을 위한 유용한 GMO 균주를 상업적으로 생산할 수 있도록 계획하고 있다.
- ⑨ 본 연구에서는 유용토양진균의 염류내성을 증강시켜 염류장해토양에서 생존하여 토양의 공극을 넓히거나 유용 효소를 분비하는 등 작물의 성장에 도움을 줄 수 있도록 함으로서 염류장해토양을 개선하고자 목적하였다. 이를 달성하고자 토양 진균의 하나인 **yeast의 내염성 조절 인자인 Hog1 MAPK를 확보**하고 이를 변형하여 내염성이 보다 증강되도록 하는 **5종류의 변이 유전자[M11 (K65P), M21 (T113S), M32 (F89S), M52 (D170A), M85 (W332R)]**와 이를 도입한 5종류의 재조합 yeast를 개발하여 그 특징과 유용성을 확인하였다. 이러한 결과는 **국내외적으로 최초로 얻어진 성과**로서 확보한 Hog1 MAPK 변이유전자를 유용 토양진균에 도입하거나 혹은 유상 유전자를 토양진균으로부터 확보하여 유사한 변이를 줌으로서 기초 및 응용 연구에 활용될 수 있으며 이를 이용한 상업적 염류장해토양 개선용 진균제제를 개발할 수 있게 되었다.
- ⑩ 본 연구결과는 이미 연구 3년차 연구중 중간시기부터 마무리되는 시기까지 (2002년 7월부터 12월까지) **4차례**에 걸쳐 전국의 농업관련 과학자와 교육자

를 대상으로 교육, 홍보하였다[수출농산물 연구센터(2002.7.24, 100여명 교육), 경남농업기술원(2002.10.18, 100여명 교육), 충남농업기술원(2002.11.19, 350여명 교육), 제주농업기술원(2002.12.10, 100여명 교육)]. 염류장해토양의 미생물학적 복원 및 생체인산비료의 개념에 대한 본 연구결과를 실질적인 친환경적 접근방법으로 제시하여 찬사를 받았다. 이에 그치지 않고 계속해서 농업관련 종사자를 대상으로 본 연구결과를 교육함으로써 시설재배지와 같은 특화된 농지의 개선과 보존에 관한 기술의 전수와 친환경 농법의 효율적 접근방법을 제공하고자 한다.

- ⑪ 요컨대, 본 연구로부터 환경친화형 염류장해토양 개선용 bioremediating agents인 다양한 미생물제제가 개발되었기 때문에 기술이 국내기업에 이양되고 제품이 생산되어 국내 염류장해토양의 활용성을 극대화하여 국내 토양의 보호는 물론 작물의 생산성을 제고시킬 뿐만 아니라 세계시장에 수출되어 외화획득에 기여하여 국가 경제에 이바지하게 될 것이다. 또한 기반기술과 경험의 축적은 본 연구에서 개발된 염류장해토양 개선용 미생물제제에 국한되지 않고 지속적인 신소재 및 신 미생물제제 개발에 이용됨으로써 신제품(GMO 활용제품 등)의 지속적인 창출이 가능하다.

SUMMARY

I. TITLE

Industrial Development of Environment-Friendly Bioremediating Agents for the Recovery of Salt Injury Soil

II. RESEARCH OBJECT

Recently the developed countries have competed fiercely for developments of up-to-date techniques on the medicinal, biological and environmental sciences. They make an attempt to lead the monopolized market by controlling the development of the high techniques in the other countries through the patents on the high techniques. They also increase the royalty of the patents on the high and know-how techniques and products. Additionally, under WTO system, the international regulation of the environmental protection will control the economical activity by the developed countries. Therefore, to overcome a rapidly changing situation in the world, it is necessary that we have to develop the agricultural technologies for the environment-friendly agents and products.

The new agricultural technologies have to consist of the environment-friendly process, the bioremediating capacity and the environment-conserved method. Consequently the farm products made by the new technologies are characterized with a highly valuable, a good quality and a high quantity. The key of the new technology is the development of the native and non-hazardous microorganisms for bioremediating the agricultural soils. The intensive agricultures using the excessive chemical fertilizers, chemical pesticides and the repeated cultivation have stayed for long time and caused the destruction of the agricultural soils in our country. When the agreement of Green Round on the environmental protection and the conservation of ecosystem became

declared, the intensive agricultures causing environmental destruction should be related with the serious limitation of international trading. There are many kinds of environment destructive and/or polluted cases. One of these, salt injury soil must be the big problem. The salt injury soils lead to damage the plant growth and to decrease the crop products.

We will try to increase the productivity of the environment-friendly crops by the new agricultural techniques comprising the following functions : bioremediating the injury soils, reducing the application of fertilizer and chemical pesticides, and increasing the non-hazardous biopesticides application. Under the title "Industrial Development of Environment-Friendly Bioremediating Agents for the Recovery of Salt Injury Soil", we carried out two research objects such as

1) Development of Salt Removing Microorganisms and Formulation of Environment-Friendly Bioremediation Agents

① Screening of Salt Removing Microorganisms and Formulation of Environment-Friendly Bioremediation Agents

② Development of the Genetic Recombinant Bacteria Enhanced Capability to Remove Phosphate Compounds in Soil Salts

2) Development of the Genetically Engineered Fungi Enhanced Osmosis Adaptation to Remove Soil Salts

III. RESEARCH CONTENTS

1. Screening and the development of the salt removing microorganism
2. Classification and the phylogeny of the screened microorganism
3. Salt removing efficacy by phosphate solubilizing bacteria (PSB)
4. Development of the genetically modified bacteria for bioremediating the insoluble phosphate compounds
5. Development of the salt tolerable fungi for bioremediating the salt injury soil
6. Field test of PSB

IV. RESULTS AND THEIR FUTURE APPLICATION PLAN

- (1) Each of sixteen isolates of the phosphate solubilizing bacteria and salt tolerable bacteria screened out in this project will be applied to manufacture bioremediators and biofertilizers for overcoming the salt injury soils (final version of the agents will be available for sale on August 2003 by the collaborator, EcoBioMed Co.).
- (2) Eight phosphate solubilizing bacteria were classified by molecular genetic methods(16S rRNA homology analysis) as follows :
★KSJ8 (*Leclercia adecarboxylata*) ★KSJ16 (*Enterobacter intermedius*)
★KSJ11 (*Pseudomonas putida*) ★WP38 (*Enterobacter asburiae*)
·KSJ3 (*Acinetobacter calcoaceticus*) ·WP20 (*Acinetobacter calcoaceticus*)
·WP41 (*Acinetobacter* sp.) ·WP42 (*Acinetobacter* sp.).
Star(★) was indicated as a internationally first report owing to their phosphate solubilizing activity by our researchers. Therefore, the bioremediating agents have a competitive power in international markets.
- (3) The bioremediating agents have abilities to increase the wet weight of crops as 1.7 to 4.3 times more than those of control and to decrease the electroconductivity from above 11 to below 6. It means that the high technology to make the bioremediating agents was obtained up to a internationally leading position. It is expected that the commercialization of this technology will be accomplished a monopoly of the bioremediation agents for more than 10 years and guaranteed a high royalty when transferred to the domestic and foreign companies.
- (4) Five enhanced bacteria [**KSJ8 (2 strains), KSJ11 (1 strain), KSJ16 (2 strains)**] induced by gamma radiation will be applied to the studies related with the mechanism of phosphate solubilization and to the development for the improved bioremediating agents.
- (5) The cloned genes (*pho* regulon, *ushA*, *pqqE*, *phy*, *ppk*) can be used for the basic and applied the research on the phosphate metabolism in bacteria. The *phn* operon structure of *Enterobacter aerogenes* has never been reported internationally and will be submitted to the international journal.

- (6) In order to contribute the development of the related sciences and industry of our country, the method and the right of super expression vector(**pEAAP**) have been published through the publication in the Korean Journal of Microbiology(2002, Vol.38 No.4 pp.318-321).
- (7) In this project, we have been constructed five new expression vectors [pEAAP, pEAPHY1 (**Phy^S**), pEAPHY31 (**Phy^S+Hig tag**), pEAPPK (**Ppk^S**), pEAPQQE (**PqqE^S**)] and five constitutively activating PhoB^C vectors [**pSH1C** (*phoB* expression, high copy number vector), **pSH2C**, **pSH3C**, **pSH4C**, **pSH5C**]. These vectors can be used to make GMOs for commercial purpose and also to study on the phosphate metabolism in bacteria.
- (8) In this project, we have been constructed the GMOs [pSH3C/PPK (**Ppk^S-PhoB^C**, DH5a), pSH3C/PQQE (**PqqE^S-PhoB^C**, DH5a), pSH1C/PHY1 (**Phy^S-PhoB^C**, DH5a)] and the usefulness of **Phy^S-PhoB^C** has been proved by the expression experiment of phytase activity which is 3.5 times more than that of the control. Because the host is *E. coli* strain, it is limited to a commercialization. The adequate host for the maximized and stable expression of phosphate solubilizing genes has been studied. One of these days, we will suggest a research project on the host and GMO development for commercial purpose with EcoBioMed Co. as a collaborator.
- (9) The salt injury soil provides the strong osmotic stress to soil fungi. Yeast, one of the soil fungi, has a osmotic stress tolerant mechanism through the Hog1 MAPK signal pathway. In this study we cloned the yeast Hog1 MAPK gene and constructed the deletion mutant by the knock out of Hog1 gene. Hog1 gene was mutated by the chemical mutagenesis and was transferred to the knock out strain and then selected the improved strains with tolerant to osmotic stress more than the control. From the improved strains, we isolated the mutated Hog1 genes[**M11 (K65P)**, **M21 (T113S)**, **M32 (F89S)**, **M52 (D170A)**, **M85 (W332R)**] and determined the mutated sites of Hog1 gene for the tolerant improvement. These information and the mutated Hog1 genes will be used to develop the tolerable fungi to osmotic stress by genetically modified methods.

- (10) Year in research term, we have educated four times the results of this project to the agriculture scientists and tutors. The **special lectures** upon the practical approach of environment-friendly methods about bioremediating and biofertilizer for improving the salt injury soil were eulogized. We will plan many educational seminars continuously to give a technology on the improvement and protection of agricultural land and a instruction about the efficient approach of the environment-friendly cultivation.
- (11) In conclusion, the **environment-friendly, very efficient bioremediating agents against salt injury soil** have been developed. This technology will be transferred to domestic companies to make qualitative products, which will improve and protect the agricultural land and increase the crop yield. It will also contribute to a nation's economy when exported to the world market. The accumulation of basic data and unique technology also allow the sustainable developments of new emerging bioremediating agents.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	25
Section 1. Research objective and necessity	25
1. Research background and objective	25
2. Research necessity and goal	26
Section 2. Current situation and problems in domestic and foreign technology	28
1. Current situation and problems	28
2. Future prospect	29
3. Validity of technology transfer	30
Section 3. Research content and scope	30
1. Research object and content	30
2. Annual research object and content	32
Chapter 2. Screening and characterization of soil microorganisms with the ability of salt removing and phosphate solubilizing	33
Section 1. Introduction	33
Section 2. Screen the salt removing microorganisms	35
1. Analysis of the environment-factors of salt injury soil	35
2. Soil ion analysis	36
3. Screening halophilic and salt tolerable microorganisms	40
4. Isolation of the phosphate solubilizing bacteria(PSB)	42
5. Radiation sensitivities of isolates	53
6. Improving the salt tolerance by gamma radiation	54

7. Induction of halophilic mutants by gamma radiation	55
---	----

Chapter 3. Molecular genetic classification of phosphate solubilizing bacteria56

Section 1. Introduction56

Section 2. Physiological characterization57

1. Esculin hydrolysis test	57
2. Catalase activity test	57
3. Citrate utilization test	58
4. Gelatin hydrolyzation test	58
5. Indole productivity test	58
6. Methly Red test	59
7. Voges-Proskauer test	59
8. Oxidase test	59
9. Starch hydrolysis test	59
10. Motility test	60
11. Tryptophan hydrolysis test	60
12. Phenlyalanine deamination test	60
13. Lactose utilization test	60

Section 3. Molecular genetic classification61

1. Strains and Plasmids	61
2. Restriction enzymes and modification enzymes	62
3. Extraction of genomic DNA	62
4. Designation of primers	63
5. Amplification of 16S rDNA	63
6. Preparation of competent cell	63
7. Preparation of cloning vector	64

8. Cloning	64
9. Separation of plasmid DNA	66
10. Analysis of DNA and protein sequences	66
11. Cloning of 16S rDNA and determination of the DNA Sequence	67
Chapter 4. Bioremediating ability of phosphate solubilizing bacteria	76
Section 1. Introduction	76
Section 2. Bioremediating ability of phosphate solubilizing bacteria	78
1. Phosphate solubilizing activity spectrum of PSB	78
2. Effect of phosphate concentration on PSB growth	79
3. Phosphatases activity of PSB	82
4. Poly-Pase activity of PSB	84
5. Pi releasing activity of PSB	86
6. Effects of PSB treatment on ion profiles of salt injury soil	86
7. Formulation for improving the salt injury	89
Chapter 5. Development of the Genetic Recombinant Bacteria Enhanced Capability to Remove Phosphate Compounds in Soil Salts	92
Section 1. Introduction	92
Section 2. Development of genetically modified microbes	92
1. Cloning technologies	92
2. poly-P kinase gene (<i>ppk</i>)	92
3. <i>phoA</i> gene cloning	99

4. <i>phn</i> operon gene cloning and sequencing	101
5. Phytase gene (<i>phy</i>) cloning and sequencing	107
6. PQQ synthase gene cloning and sequencing	110
7. UDP-sugar hydrolase gene (<i>ushA</i>) cloning and characterization	115
8. <i>pho</i> regulon cloning and constitutive PhoB ^C construction	116
9. Construction of super expression vector (pEAAP)	124
10. Construction of Phy ^S and expression	125
11. Construction of Phy ^S -PhoB ^C and expression	127
12. Construction of Ppk ^S , Pqq ^S , Ppk ^S -PhoB ^C , and Pqq ^S -PhoB ^C	128
13. Conclusion	129

Chapter 6. Development of the Genetically Engineered Fungi Enhanced Osmosis Adaptation to Remove Soil

Salts	130
Section 1. Introduction	130
Section 2. State of domestic and foreign technology	131
Section 3. Research contents and results	131
1. Yeast Hog1 MAPK gene cloning	132
2. Hog1 gene mutagenesis	133
3. Construction of Hog1 gene knock out mutant	134
4. Screening the mutant Hog1 gene	134
5. Characterization of the mutant Hog1 gene	135
6. Sequencing the mutant Hog1 gene	136
7. Tolerance of the Hog1 mutant	136
8. Phosphorylation of Hog1 in wild-type and mutant	137
9. Increasing the phosphorylated proteins in mutants	138
10. Secondary selection of Hog1 mutant	138

11. Characterization of mutants	140
Section 4. Achievement of the research goal and contributions	148
Section 5. Future application of the results	149
Section 6. Oversea science technology information	149
Chapter 7. Field test of PSB	150
Section 1. Introduction	150
Section 2. Field experiment of PSB	150
1. Effect of PSB on the germination rate of seed	150
2. Pot experiment	151
3. Green house experiment	154
Chapter 8. Future application of the results	158
Section 1. Expected effects	158
1. Technology aspect	158
2. Economical aspect	159
Section 2. Application scheme	160
Chapter 9. References	164

목 차

제1장 서론	25
제1절 연구개발의 목적 및 필요성	25
1. 연구개발의 배경 및 목적	25
2. 연구개발의 필요성 및 목표	26
제2절 국내외 관련기술의 현황과 문제점	28
1. 국내외 관련기술 개발 현황과 문제점	28
2. 앞으로의 전망	29
3. 기술도입의 타당성	30
제3절 연구개발 내용 및 범위	30
1. 연구개발 목표와 내용	30
2. 연차별 연구개발 내용 및 범위	32
제2장 토양염류제거 및 인산염가용화 미생물 탐색 및 활성특징	33
제1절 서론	33
제2절 토양염류제거용 미생물의 탐색	35
1. 염류장해토양의 환경요인분석	35
2. 토양이온분석	36
3. 호염성 및 내염성 균주 선별	40
4. 불용성 인산염 가용화 균주의 선별	42
5. 분리균주의 방사선 감수성	53
6. 방사선이용 내염성/호염성 돌연변이 균주 제조	54
7. 방사선이용 염류요구성 균주제조	55

제 3 장 인산염가용화 균주의 분자유전학적 동정	56
제1절 서론	56
제2절 생리생화학적 동정 실험	57
1. Esculin hydrolysis	57
2. Catalase 생산	58
3. Citrate 이용	58
4. Gelatin hydrolyze	58
5. Indole 생성	58
6. Methly Red test	59
7. Voges-Proskauer test	59
8. Oxidase test	59
9. Starch hydrolysis	59
10. Motility test	60
11. Tryptophan hydrolysis	60
12. Phenlyalanine deamination	60
13. Lactose	60
제3절 분자유전학적 분류 실험	61
1. 균주 및 Plasmid	61
2. 제한효소 및 변형효소	62
3. Genomic DNA 추출	62
4. Primer의 제작	63
5. 16S rDNA의 PCR에 의한 증폭	63
6. Competent cell 제조	63
7. Competent cell과 cloning vector의 준비	64

8. Cloning	64
9. plasmid DNA 분리	66
10. 염기서열분석 및 상동성 분석	66
11. 16S rDNA의 cloning 및 염기서열 결정	67
제 4 장 불용성 인산염 가용화 균주의 활성능과 복원능	76
제1절 서론	76
제2절 인산염가용화 균주의 활성능	78
1. 불용성 인산염 가용화 균주의 활성 스펙트럼	78
2. 불용성 인산염 가용화 균주의 인산농도에 따른 세포생장율	79
3. 환경조건에 따른 인산화합물 분해효소들의 기여도와 발현조절	82
4. 불용성 인산염 가용화 균주의 생장에 따른 poly-Pase 활성도, ortho-P 및 염류제거능	84
5. 여러가지 불용성 인산염 가용화능과 성장률 및 염류제거능	86
6. 장해토양에 인산염 가용화 균주 접종 후 이온 변화	86
7. 제형화 기법에 따른 염류제거 효율의 증진	89
제5장 인제거용 유전자재조합 세균 개발	92
제1절 서론	92
제2절 인제거용 유전자재조합 세균 개발	92
1. 클로닝 기법	92
2. poly-P 합성 및 분해유전자(<i>ppk</i>)	92
3. <i>phoA</i> 유전자 클로닝	99
4. <i>phn</i> operon 유전자의 확보 및 서열분석	101
5. Phytase 유전자(<i>phy</i>)의 확보	107

6. PQQ synthase 유전자 확보	110
7. UDP-sugar hydrolase 유전자 <i>ushA</i> 의 클로닝 및 특성분석	115
8. <i>pho</i> regulon 조절유전자 <i>phoB</i> 의 항시활성형 <i>phoB^C</i> 의 구축	116
9. <i>phoA</i> promoter를 이용한 super expression vector(pEAAP) 구축	124
10. <i>Phy^S</i> 의 구축 및 인 제한 환경에서 과발현 확인	125
11. <i>Phy^S-PhoB^C</i> 의 구축 및 활용성 확인	127
12. <i>Ppk^S</i> , <i>Pqq^S</i> , <i>Ppk^S-PhoB^C</i> , <i>Pqq^S-PhoB^C</i> 재조합 균주 구축	128
13. 결론	129
제 6 장 내염성 증강 진균의 개발	130
제1절서론	130
제2절 국내의 기술개발 현황	131
제3절 연구내용 및 결과	131
1. 이스트 Hog1 MAPK 유전자 크로닝	132
2. Hog1 유전자 돌연변이 유도	133
3. Hog1 유전자가 결핍된 이스트 균주제조	134
4. 돌연변이 Hog1 유전자 스크리닝	134
5. 돌연변이체 확인 성격규명	135
6. 염 저항성이 증강된 Hog 1 유전자 염기서열 결정	136
7. 돌연변이 Hog1에 의한 염 저항성	136
8. Osmostress에 따른 wild-type과 돌연변이 Hog1의 인산화	137
9. 높은 염농도 저항성 돌연변이 Hog1에서 단백질 인산화 증진	138
10. 염 저항성이 뛰어난 Hog1 mutant들의 2차 선별	138
11. 토양염류 제거를 위한 내염성 이스트의 성격규명	140
제4절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	148

제5절 연구개발결과의 활용계획	149
제6절 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	149
제7장 포장활성실험	150
제1절 서론	150
제2절 포장활성실험	150
1. 작물의 발아율 변화양상	150
2. 풋트실험	151
3. 온실활성실험	154
제8장 연구개발 결과 및 활용계획	158
제1절 연구결과의 기대효과	158
1. 기술적 측면	158
2. 경제산업적 측면	159
제2절 활용방안	160
제9장 참고문헌	164

제 1 장 서론

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 배경 및 목적

현재 전 세계는 WTO 체제아래 국제간 새로운 무역질서 및 규제를 구축하고 있으며 선진 각국간에는 기술우위 확보를 위해 의학, 생명과학, 환경분야에서 첨단기술의 개발 및 정보화 (database)로 불꽃튀는 경쟁을 하고 있는 중대한 시점에 있다. 서방 선진국은 개발된 신기술의 특허를 이용하여 타국의 기술개발을 규제하여 독점적 지배체제의 유지를 시도하고 있으며, 기술 및 제품에 대한 royalty도 급속히 상승시키고 있다. 따라서 국제적인 환경보호협약의 출범은 환경분야에서도 선진국의 경제지배를 가속화시킬 것이며 이렇게 급변하는 국제질서에 대응하기 위해서 21세기 차세대형 농업환경기술과 제품의 개발은 필수적이다.

토양환경의 염류장해(salt injury)는 sodium, chloride, magnesium, calcium, carbonate, bicarbonate, sulfate, phosphate, nitrate, nitrite 등과 같은 염이 토양에 축적되어 작물생산에 문제를 야기하는 상태를 말한다. 염의 과다는 식물의 근권을 통해 흡수되어 식물에 치명적인 상해를 입힌다. 염류장해는 염류성 토양(saline soils) 및 나트륨 토양(sodic soils), 염류-나트륨 토양 (saline-sodic)의 세 가지 형태로 발생한다. 첫 번째 경우는 과도한 용해성 염을 함유한 토양으로 심한 경우 토양표면이 잔류물로 인해 하얗게 되는데, 이는 식물의 수분과 양분 흡수를 어렵게 하고 독성을 가지고 있어 염의 여과와 배수가 필수적이다. 두 번째 경우는 과도한 교환성 나트륨을 함유한 토양인데 그 자체는 직접적으로 식물에 해를 주지 않지만, 토양구성 입자가 고운 토양으로 만들어 토양간극을 좁게 하여 결국에는 수분투과 및 배수를 극히 어렵게 하고 식물의 뿌리가 성장하는 것을 방해한다. 세 번째 경우는 용해성 염과 교환성 나트륨을 함유한 토양으로서 방치하면 토양구조를 악화시켜 작물의 생육이 불가능한 상태로 되기 때문에 토양개선이 필수적으로 이루어져야 한다. (세 종류의 토양조건은 표 1 참조)

표 1. Conditions of Saline, Sodic, and Saline-Sodic Soils

Soil	pH	EC(ds/m)	ESP(%)	SAR(%)
Normal	<8.5	<4	<15	0-12
Saline	<8.5	>4	<15	0-12
Sodic	>8.5	<4	>15	>12
Saline-sodic	<8.5	>4	>15	>12

EC : Electrical conductivity

ESP: Exchangeable sodium percentage

SAR: Sodium adsorption ratio

따라서 토양관리에 있어 염류성 토양, 나트륨 토양, 염류-나트륨 토양의 발생 및 원인을 분석하고 이에 대한 대책을 마련해야할 시점에 있다. 원천적으로 물과 토양성분은 약간의 염을 보유하고 있지만, 염의 농도는 일반적으로 토양성분, 기후 및 온도와 같은 자연적인 요인에 의해 증가되고 논이나 밭 토양에서는 빈약한 배수 및 비료의 과다 살포에 기인한다. 또한 온실의 경우에는 실내의 고온으로 인해 토양표면의 습도가 증발하여 염의 농도를 더욱 증가시킨다. 비록 염류장해가 인위적으로는 물론 자연적으로도 발생하지만, 건조한 토양 및 배수가 원활하지 않은 토양은 말할 것도 없거니와 관개 배수가 원활한 토양조차 이를 효과적으로 관리하지 않으면 염류축적에 따른 염류장해가 심각해질 것이다. 현재 대다수의 국내 포장토양과 간척지토양은 이미 염류장해가 매우 심각한 상태에 놓여있다. 이러한 염류장해는 농작물생육에 큰 피해를 주어 농업생산성에 가장 커다란 걸림돌이 되는 농업환경문제중 하나이다.

2. 연구개발의 필요성 및 목표

환경복원에 기여할 수 있는 환경친화형 신기술의 개발 방향은 환경 보전과 환경 관련 생산물의 부가가치 증진 등 양적, 질적 생산성을 향상시키는데 있으며, 이를 위해서는 무공해 천연 미생물의 개발로 우리의 관심을 집중할 수 있다. 특히 환경보호에 관한 국제적 관심이 고조되는 이 시점에서 염류장해를 제거할 수 있는 미생물의 선별 및 응용을 통한 산업화는 매우 시급한 과제이다. 이러한 과제를 성공적으로 수행하기 위해서는 염류제거 및 인산염가용화 기능성 미생물의 탐색, 분자 생물학적 특성 규명을 통한 유전자조작 미생물의 개발

및 활용, 염류제거를 통한 환경복원 능력 실험 및 환경방출 실험, 또 이들 염류 제거 기능성 증강미생물의 제제화 기술 등의 분야에서 국제 경쟁력을 갖춘 산학의 협동 및 공동연구가 필수적이라 하겠다. 따라서 본 연구에서는 “**염류장애 토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및 신소재의 상업적 개발**”이라는 총괄과제 하에 다음과 같은 세부 연구를 수행하고자 하였다.

세부과제 : 토양염류를 효율적으로 제거하는 미생물의 개발 및 제제화
 협동과제 : 토양염류 제거를 위한 내염성 증강 진균의 개발

가. 기술적 측면

- ① 현재 국제적으로 행해지고 있는 염류제거법으로는 경작적 제어, 배수로의 개발, 내염성 식물의 개량에 의한 방법 등이 있다. 염류를 흡수, 축적 및 분해, 제거하는 기능이 증강된 유전자재조합 미생물의 개발과 이들을 이용한 염류제거용 환경복원제가 개발될 경우 이와 같은 연구개발내용은 지금까지 전혀 국제적으로 연구 보고된 바 없기 때문에 본 연구를 성공적으로 수행한다면 염류장애제거에 관한 종합기술 시스템을 확립하게 된다.
- ② 현재와 같은 경제위기에서는 중소기업의 활성화가 절실히 요구되는 시점이기 때문에 연구기술의 이전은 침체 일로에 있는 중소기업에 활력을 불어넣을 수 있다.
- ③ 국내에서 자생하는 고유의 미생물을 이용함으로써 국제적으로 독창적인 신물질과 신소재가 창출되는 획기적인 계기가 되며 염류장애를 효과적으로 제거하는 bio-controller로서 이용될 수 있다.
- ④ 염류제거용 GEM(유전자조작미생물) 개발은 전세계적으로 태동기에 있다. 현재 개발 중인 염류제거용 GEM은 폐수처리에 일부 적용되고 있을 뿐 염류장애 토양에 적용된 예는 전혀 없다. 따라서 토양에서 염류제거 활성이 증강된 GEM 및 환경친화형 신소재의 개발은 기술의 예측화를 탈피할 수 있을 뿐만 아니라 이 분야에서 선도적인 역할을 할 수 있다.

나. 경제, 산업적 측면

- ① 염류장애에 의해 손실되는 작물의 경제적 손실은 통계자료가 없어 정확

히 추정할 수 없지만 엄청난 규모로 추정된다.

- ② 국내에서 자생하는 미생물을 개발하여 염류제거의 효능이 우수하면 세계 특허를 획득할 수 있고 상품화하면 국제적으로 각광을 받아 수출까지 할 수 있는 여건이므로 경제적인 효과는 막대하다.
- ③ 토양을 보호하고 농작물을 보호하는 고성능 미생물 제제 및 환경친화형 신소재의 개발은 농산물의 증산은 물론이고 우리나라와 같이 점점 감소하는 농업인력의 획기적인 대체효과를 가져온다.
- ④ 조만간 체결될 환경협약이 본격적으로 가동되면 천연 미생물 제제 및 환경친화형 신소재의 시장이 크게 확대될 것이다.
- ⑤ 연구에 의해 창출된 GEM, 신물질, 그리고 환경복원제 개발 및 생산기술이 우리 중소기업에 이전되면 외국으로부터 수입함으로써 발생하는 경제적 손실을 줄일 수 있다. 실용성과 수요에 의해 국제특허에 대한 royalty를 받을 수 있어 외화획득에 일조할 수 있다.

다. 사회, 문화적 측면

- ① 하우스 시설내의 토양환경의 염류축적은 매우 심하기 때문에 무독성, 선택성 생물학적 제제의 개발이 시급하다.
- ② 포장환경에 방출시 잔존하지 않고 분해되어 환경보호에 일익을 담당할 수 있다.
- ③ 무공해 및 무독성 미생물 제제 및 신소재는 환경 보호물질로서의 역할을 수행할 수 있다.

제2절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내외 관련기술 개발 현황과 문제점

- 국내외에서 수행되고 있는 염류장해 극복 방안 중 하나는 염에 내성을 가진 식물(salt tolerant crops)을 재배하는 경작적 제어법에 의존하고 있다. 그러나 높은 내성을 가진 작물은 목화, 보리 등 몇 종에 국한될 뿐만 아니라, 종자가 발아하기 위해서는 토양의 염류농도가 한계수준 이하의 비교적 낮은 수준에서만 가능하다. 대부분의 식물은 이보다 더 염류농도에 민감하다.
- 물리적인 극복방안은 문제가 되는 포장에 토관 배수로(tile drainage)를 설

치하여 문제를 해결하고 있는 실정이다. 대단히 광범위한 염류장해토양(시설재배지, 간척지)을 대상으로, 배수로 공사를 할 경우 천문학적인 비용이 들므로 경제적인 부담은 이루 헤아릴 수 없는 상황이다. 뿐만 아니라 대다수의 자연 배수로로는 토양염류를 잘 여과할 수 있는 능력이 결여되어 있다.

● 현재까지 국내외적으로 염류장해토양의 복원에 대한 구체적이고도 성공적인 환경친화형 기술은 전무한 실정이다. 그러므로 본 연구진들에 의해 제안된 연구과제가 성공적으로 수행될 경우, 국내외적으로 선도하는 염류장해토양의 복원기술과 방안이 정립되고 상용화될 수 있다. 이러한 현황아래 본 연구진들이 연구를 비교적 단시간내 효율적으로 성공할 수 있으리라는 가능성은 이미 확립하였거나 확보한 기반기술과 연구성과물들과 같은 배경이 있기 때문이다.

2. 앞으로의 전망

환경친화형 염류장해환경 복원제제 및 다기능적 bio-controller제제는 궁극적으로 시장에 나와 판매가 이루어져 실제로 염류장해토양에 사용되어야 한다. 따라서 고부가가치성 환경복원제제 개발에 있어서는 염류장해의 종류에 따라 적용될 수 있는 제제로 구분하여 개발하는 것이 매우 중요하다. 따라서 염류장해환경 복원제제 및 다기능적 bio-controller의 개발에는 다음의 세가지 사항을 필수적으로 고려하여야 한다.

- ① 특허성(국내외)
- ② 시장성(국내외적)
- ③ 한국적 실정의 감안(염류장해토양현황, 기업의 현황을 고려)

여기서 한국적 실정을 감안할 때 다음과 같은 3가지 우선적 선정 조건이 필요하다.

- 짧은 개발 기간
- 간단한 활성 시험과 독성 시험
- 큰 시장성

큰 시장성은 기술수출은 물론이거니와 제품수출에 있어서 결정적 요인이 되므로 염류장해환경 복원제제와 다기능적 bio-controller의 거대한 시장성은 이들에 대한 연구개발의 필요성을 재차 강조하게 한다. 또 기능이 증강 향상된 유전자재조합 균주의 구축기술과 제제화 기술은 신규기술력이기 때문에 국제적

으로도 기술우위를 확보하는데 매우 중요한 문제로 대두될 전망이다.

3. 기술도입의 타당성

본 연구과제의 관련해당 기술은 개발된 바가 없는 독창적인 신규기술이기 때문에 이러한 연구개발 기술은 장기간에 걸친 기술, 정보, 경험의 축적된 연구진들에 의해 시도될 수 있기 때문에 한번의 기술 도입으로 그러한 능력을 갖출 수 없으므로, 단발적인 기술 도입에 의한 기술의 정립은 불가능하다. 국제적인 기술보호 여건이나, 이를 극복해야 하는 국내 여건으로 볼 때 국내 대학 및 정부연구소의 우수 연구진과 국내 기업이 효과적인 연구 공조체계를 이루어 연구를 진행해야 한다. 현재 본 연구팀들은 해당 분야에서 국내외적으로 탁월한 연구능력을 인정받고 있는 연구진들이므로 본 연구의 추진전략 체계대로 수행할 경우, 우리나라 고유의, 또 국제적으로 선도되는 기술력을 확보할 수 있기 때문에 기술도입보다는 국내 연구진들로 개발하는 것이 우리나라 실정에 더욱 합당하다고 여겨진다.

제3절 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 목표와 내용

“현재까지 본 연구진들에 의하여 확보된 수 천종의 기능성 미생물(환경친화형 항진균활성, 유기물분해활성, 농약분해활성, 질소고정능, 광합성능 보유 미생물 등)과 분자생물학적 도구들(클론, 벡터, 돌연변이체)을 포함하여, 1차 및 2차 년도의 과제에서 시설재배지나 염류장해토양 등과 같은 다양한 환경으로부터 새롭게 탐색한 염류제거능이 우수한 균주들로부터”

- 1) 염류장해 토양의 생물학적 복원과 작물의 생산성 증대를 위해 염류제거 활성 및 염류의 분해와 세포내 축적능이 뛰어난 **환경조화형 염류제거용 미생물**을 탐색 개발한다.
- 2) 환경조화형 미생물들에 대하여 유전자 재조합 기술을 이용함으로써, 염류장해의 주원인이 되는 음이온과 양이온을 동시에 효과적으로 제거하면서, 한편으로는 염류내성이 증강된 유전자재조합 미생물(GEM; Genetically Engineered Microorganisms)들을 구축하여 **염류장해복원용 GEM**으로 활용한다.
- 3) 분자생물학적 기법(PCR, Site-directed mutagenesis), 생화학적 방법(EMS

등) 등을 이용하여, 염류제거능, 염류내성이 증강된 들연변이체 제조 실험을 심도 깊게 행하고 이들의 토양생태계내 안정성, 독성 등을 평가한 후, 역시 염류장해복원용 균주로 적극 활용한다.

- 4) 1) ~ 3)항에 해당하는 연구결과로 구축된 균주들과 본 연구진이 이미 보유하고 있는 제제화 기반기술을 응용하거나 변형함으로써, 본 연구과제의 최종 목표인 독창적인 염류장해환경 복원제제를 개발하여 상품화한다.
- 5) 아울러 이들 염류장해환경 복원제제에 본 연구진이 이미 확보한 다양한 기능성 미생물 균주를 적절히 조합함으로써, 환경친화형이면서 환경정화 기능까지 포함시킨 다기능적 bio-controller로서 적용가능한 상품을 개발한다.

1) ~ 5)의 연구개발 목표 및 내용을 달성하는데 필요한 염류장해용 복원제제의 특성으로는 ① 독성이 포유동물에 대하여 기존 농약이나 미생물제제보다 낮으면서, ② 식물의 성장, 생육 등에 약해가 없어야 되며 ③ 기존의 화학적 제제나 물리적 처리방법에 비하여 잔류성 문제 등과 더불어 토양환경개량 능력과 염류제거 능력이 뛰어나야 한다. ④ 이로써 연작, 윤작에 영향이 없고 지하수, 토양, 하천수 등에 오염물질원으로 작용하지 말아야 한다.

이상과 같은 연구목표를 효율적으로 달성하기 위해, “염류장해토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및 신소재의 상업적 개발”이라는 총괄과제하에, 아래와 같은 구체적인 세부과제 및 협동과제를 구성하여 연구를 진행하였다.

세부과제 : 토양염류를 효율적으로 제거하는 미생물의 개발 및 제제화 (Development of Salt Removing Microorganisms and Formulation of Environment-Friendly Bioremediation Agents)

- ① 토양염류 제거용 미생물 탐색 및 제제화 (Screening of Salt Removing Microorganisms and Formulation of Environment-Friendly Bioremediation Agents)
- ② 토양염류중 인 제거를 위한 유전자재조합 세균의 개발 (Development of the Genetic Recombinant Bacteria Enhanced Capability to Remove Phosphate Compounds in Soil Salts)

협동과제 : 토양염류 제거를 위한 내염성증강 진균의 개발 (Development of the Genetically Engineered Fungi Enhanced Osmosis Adaptation to Remove Soil Salts)

2. 연차별 연구개발 내용 및 범위

구분	연구개발목표		연구 개발 내용 및 범위
	총괄연구개발 목표	세부연구개발 목표	
1차년도 (1999)	<p>염류장해토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및 신소재의 상업적 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 유용균주 선발 	염류제거 미생물의 탐색 및 활성화	①호염성 및 내염성균주 선별 ②염류제거용 유용균주의 분리 및 동정 ③염제거능 조사
		인제거용 유전자조작 세균개발	①Polyphosphate kinase 유전자, <i>ppk</i> 클로닝 ② <i>phoB</i> 유전자 클로닝
		내염성 증강 진균개발	①유용토양 진균류의 선별 ②삼투압 관련 Hog1 유전자클로닝 및 특성규명
		토양염류분석, 내염성/호염성균주선발	①방사선이용 내염성/호염성 돌연변이균주 제조 ②방사선이용 염류요구성 균주제조 ③토양염류량 분석
2차년도 (2000)	<p>염류장해토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및 신소재의 상업적 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 기능증강 균주 개발 	염류제거 미생물의 분자생물학적 연구 및 선발균주의 제제화	①염류제거활성이 증진된 균주개발 ②유전자재조합 다기능성 균주개발 ③제제화 기반연구
		인제거용 유전자조작 세균개발	①Ppk ^S 돌연변이체 제조 ②PhoB ^C 돌연변이체 제조 ③Ppk ^S , PhoB ^C 특성규명 ④온실활성실험 ⑤토양염류분석
		내염성 증강 진균개발	①진균류의 Hog1 유전자의 재조합 ②Site-directed mutagenesis에 의한 돌연변이체 제조
3차년도 (2001)	<p>염류장해토양의 복원을 위한 환경친화형 미생물 및 신소재의 상업적 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 포장활성 • 제제화 • 염류장해 환경복원 제제개발 	염류제거 유용균주의 제제화 완성 및 포장 실험	①온실활성실험 ②제제화기법 완성 ③생태적 안정성 및 무독성 평가 ④포장활성실험 ⑤제제화기법/특허출원
		인제거용 유전자조작 세균개발 및 응용	①Ppk ^S 균주구축 ②PhoB ^C 균주구축 ③Ppk ^S PhoB ^C double mutant 균주구축 ④균주기탁/특허출원
		내염성 증강 진균개발 및 응용	①기능증강 Hog1 유전자를 포함하는 형질전환 진균제조 ②포장활성 실험 ③균주기탁/특허출원

제 2 장 토양염류제거 및 인산염가용화 미생물 탐색 및 활성특징

제1절 서론

토양 미생물은 토양의 비옥도를 증진시키고, 특히 식물에 유용한 질소원을 비롯한 다양한 영양원을 공급한다. 토양의 물리적, 화학적, 생물학적 작용과 깊은 관련이 있는 토양응결체(soil aggregate)의 성상은 미생물의 성장활성에 중요한 의미를 갖는다.

토양에 서식하는 미생물의 생장에 영향을 미치는 물리화학적 환경 요인중에 수분의 가용성은 자연환경에서 미생물에 영향을 미치는 가장 중요한 인자중 하나이다. 수분의 가용성은 물에 녹아 있는 염이나, 당 등의 농도에 달려 있는데, 물에 녹아 있는 용질은 물에 대한 친화성을 갖고 있기 때문에 용질에 흡착되어 있는 물은 미생물이 이용할 수 없는데 기인한다. 수분가용성은 농업용 토양의 경우 일반적으로 0.90 - 1.00 정도이다. 대부분의 미생물들은 수분활성도가 낮은 환경에서는 견디지 못하고 사멸하거나 휴면 상태로 생명을 유지한다.

세포외 염농도의 증가는 수분활성도를 저하시켜 세포막의 구성에 변화를 가져오기 때문에, 팽압을 유지하기 위해 세포질내에 유기화합물이나 염을 고농도로 축적하는 현상이 나타난다. 세포외의 염농도에 대응하는 기작을 크게 두가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째로 세포내의 이온 농도를 평형시켜 염 자극에 대응하는 기작(호염성 세균의 경우, KCl을 세포내에 농축시킴), 둘째로는 주로 진정세균에서 발견되는 것으로, 이온성 기질을 세포외로 방출하고 정상적인 세포의 기능을 파괴하지 않는 유기화합성 용질을 축적하는 기작을 들 수 있다.

일반적으로 수용성 염류의 농도가 0.2% 이상이면 염류토라 하고 이런 토양에서는 토양 미생물 뿐만 아니라 작물 또한 잘 자라지 못한다. 토양에 염류가 축적되면 작물의 발아가 느려지고 미성숙, 고사병, 발육 및 성장 저해, 잎마름병, 황엽현상, 뿌리 죽음, 낙엽, 뿌리발달 저해 등으로 인한 작물의 점진적 혹은 급진적인 치사를 가져온다. 고농도의 토양염류로 인하여 뿌리가 직접 영향을 받지 않는 경우에도 작물의 잎과 줄기에는 실질적인 염류장해가 온다. 이 경우에 수용성 염류는 뿌리에 들어가서 관다발을 통하여 잎으로 이동한 후, 물이 증발하게 되면 점차 염류가 고농도로 축적되어 독성을 나타나게 된다. 특히,

토양의 수용성 염류가 지나치게 높으면 뿌리는 물을 흡수할 수 없고 오히려 역삼투가 일어나 궁극적으로 작물은 고사하게 된다. 건기가 오래 지속되거나 화학 비료의 반복적인 과다 사용, 퇴비의 과다사용 등으로 인하여 이러한 문제는 보다 심각해진다. 토양에 따라서는 몇 시간의 건조 후에도 염류 장해(salt injury)의 결과를 초래할 수 있다.

염류 집적화(salinization)는 자연적으로는 건조지대의 배수 불량한 곳과 salt lake 주변 및 해안의 간척지 등에서 볼 수 있으며 연중 강수량보다 증발량이 훨씬 많은 곳에서 칼륨, 나트륨, 칼슘, 마그네슘 등의 염화물, 황산염, 탄산염 등이 집적되어 알칼리성 토양을 형성한다. 경작지와 시설재배지의 경우, 자연적인 염류의 집적에 의해서 보다는 농약과 화학비료의 과다사용과 축산분뇨 등으로 인하여 농업용수 등의 농업환경 오염에 따른 인위적인 염류집적의 폐해가 증가하고 있다.

농업용 폴리에틸렌의 대량공급과 더불어 시설재배 면적은 급속도로 증가하고 있으며 매우 광범위하게 분포하고 있는 실정이다. 시설재배는 강우가 차단된 조건에서 계절에 관계없이 1년에 3~4회 연속적으로 집약적 재배를 실시하므로 일반 노지재배의 토양 환경조건과는 매우 상이하다(신과 박, 1988., 이와이, 1985.). 대부분의 시설재배지에서는 과다한 비료의 시용과 시설에 의한 강우차단, 고온에 의한 표면증발 및 작물의 증산작용으로 인하여 토양용액 중에 용해되어 있는 염류들도 함께 이동되어 표층토의 염류 과다축적을 유발시킨다(육 등, 1993.). 특히 K와 P 등의 특정 염은 우리나라 진토양의 평균함량보다 상회하는 시설재배지가 거의 대부분으로서 유기인산의 축적은 토양 유기태질소의 무기화 작용과 질산화성작용을 조장하여 탈질작용을 촉진한다고 보고(강 등, 1993.)되고 있다.

염류집적에 의한 장해의 대책은 기본적으로는 과잉시비의 억제, 윤작이나 휴작, 토양내로의 환경오염원 유입 억제 그리고 효율적인 관개를 통해 이를 수 있으나 경제적인 면과 실질적인 추진에 많은 어려움이 있다. 염류집적 장해를 극복하기 위한 연구 및 실용화는 세계적으로도 미미한 실정이다.

이러한 배경하에서 본 연구진은 염류장해 토양에서 문제시되는 염류를 효과적으로 축적하거나 환경적으로 무해한 화합물로 전환시키는 대사체계를 갖는 환경친화적인 미생물을 탐색하여 염류집적장해를 해결하기 위한 환경복원제

를 개발하고자 한다. 즉, 농가 포장에서 가장 문제시되는 토양내의 인산염을 효과적으로 제거하여 작물의 생산을 배가시키고, 아울러 토양내의 미생물상을 복원하여 이차적으로 토양내 물질순환을 원활하게 하며 작물에 유용한 영양원의 미생물적 공급을 활성화 하고자 한다.

제2절 토양염류제거용 미생물의 탐색

1. 염류장해토양의 환경요인분석

자연생태계에 다양하게 서식하고 있는 호염성 또는 내염성 미생물들을 대상으로 토양내의 염류집적의 대표적 수용성 염인 음이온성 인산염과 양이온(K^+ , Na^+ , Mg^{++} 등) 염을 분해 또는 축적할 수 있는 우수한 균주를 선별하여 염류집적 장해의 극복과 동시에 식물병 방제가 우수한 다기능적 bio-controller 제제를 개발하고자 충남농촌기술원에 염류장해 현황을 문의하여 타 지역보다 염류장해가 심한 충남지역의 당진군 일대 시설재배지와 서해간척지의 시험농경지 및 개간지를 선정하여 2000년 1월 26일~27일 기간에 토양 시료를 채취하였다(표 1 참조). 또 시설재배지에서의 토양 채취는 무작위로 3개의 지점에서 상층(표층), 중층(10~20cm) 및 하층(30cm이하)으로 구분하여 채취하였으며, 토양 채취시 관수방법, 재배년수 및 재배작목 등을 설문조사하여 분석자료와 관련지어 해석하고자 하였다.

표 1. 시설재배지 및 간척지의 토양 채집지

채집지	행정구역	재배년수	재배작목
시설재배지 1	충남 당진군 면천면 자개리	8년	파리고추, 상추, 쪽파
시설재배지 2	충남 당진군 고대면 슬항리	3년	파리고추
시설재배지 3	충남 당진군 송산면 유곡리	4년	오이
시설재배지 4	충남 당진군 신평면 금천리	5년	방울토마토
간척지(농경지)	충남 당진군	2년	
간척지(개간지)	충남 당진군	개간중	

각각의 토양에 대한 환경요인을 조사한 결과는 표 2와 같으며, 시설하우스 및 간척지 토양의 환경요인 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

- 토양온도 : 현지에서 지중 온도계를 사용하여 측정
- 토양 pH : 현지에서 토양 pH 측정기(DM15, Japan)를 사용하여 측정
- 토양수분함량 측정 : 중량법에 의하여 함량을 측정하여 백분율로 환산
- EC(전기전도도), NaCl 함량 : 시료를 실내에서 건조한 후 풍건토 중량의 5 배에 해당하는 증류수를 혼합하여 교반시킨 후, Hanna Instrument Co.의 HI9032 conductivity meter로 측정

표 2. 시설재배지 및 간척지 토양의 환경요인

채집지	온도 (℃)	pH	수분함량 (%)	EC (dS/m)	NaCl (%)
자개리	6.4	5.92	19.61	6.92	4.22
슬항리	13.4	5.50	26.37	6.01	4.06
유곡리	13.2	5.80	27.26	15.74	6.94
금천리	18.0	5.78	16.51	4.05	4.58
개간지			38.89	6.40	3.80
농경지			36.99	1.88	4.80

그 결과 시설재배지의 온도 및 pH는 각각 6.4~18.0℃와 5.50~5.92로 나타났으며, 수분함량은 16.51~38.89%로 나타났다. 한편, EC(전기전도도)는 염의 총량을 나타내는 것으로 토양염분도의 대표적 지표인데, NaCl을 포함하는 각종 염류 및 음·양이온 등의 함량 등에 의하여 결정된다. 시설재배지에서의 EC는 4.05~15.74dS/m로 유곡리 > 자개리 > 슬항리 > 금천리의 순으로 조사되었으며, 간척지에서는 1.88~6.40dS/m로 나타났다. NaCl 농도를 살펴보면 3.80~6.94%로 나타났다. 이처럼 EC 값은 토성, 해수, 육수의 영향 및 지하수위의 깊이 등에 따라 달라짐을 알 수 있었다. 가장 중요하게 평가되어야 할 것은 공시토양에서 EC 값이 4dS/m이상의 염류토양이라는 것이다. 이는 공시토양 모두가 역시 염류장해토양임을 밝히는 직접적인 증거인 것이다.

2. 토양이온분석

시료 채취지의 각 토양내 5종의 양이온 농도, 5종의 음이온 농도 및 6종의

중금속 농도를 조사하기 위하여 시료를 아래와 같이 전처리 한 후 한국기초과학지원연구소의 이온크로마토그래피(IC)와 유도플라즈마결합분석기(ICP)를 이용하여 정량하였다.

가. 이온크로마토그래피 분석을 위한 시료 전처리

토양 1g에 18 MΩ의 증류수 10 ml을 첨가하여 1일동안 진탕하였다. 이후 20분의 초음파 처리 및 10분 정체의 단계를 3회 반복하여 Whatman paper No.1에 여과하였다. 여과된 시료를 0.45 μm syringe filter에 재여과하여 이를 음이온 및 양이온의 분석시료로 이용하였다.

나. 음이온(Anion) 분석

토양내 주요 음이온 중 F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, PO₄⁻³, SO₄⁻² 등, 5종의 음이온을 분석대상으로 하였다. Bio-LC DX-300(Dionex, USA) 시스템을 이용하였으며, 결과는 표 3과 같이 조사되었다.

표 3. 시설재배지 및 간척지 토양의 음이온 농도

채집지	F ⁻ (ppm)	Cl ⁻ (ppm)	NO ₂ ⁻ (ppm)	PO ₄ ⁻³ (ppm)	SO ₄ ⁻² (ppm)
자개리	1.162	58.994	233.794	18.634	179.930
슬항리	2.222	33.362	150.162	30.586	32.890
유곡리	2.110	164.804	213.014	36.740	360.284
금천리	1.280	57.758	97.778	17.078	146.934
개간지	0.560	57.510	3.380	-	45.620
농경지	0.750	12.500	2.280	-	6.690

- : not detected

그 결과 F⁻이온은 0.560~2.222ppm, Cl⁻이온은 12.500~164.804ppm, NO₂⁻이온은 2.280~233.794ppm, PO₄⁻³이온의 경우 17.078~36.740ppm, SO₄⁻²이온은 6.690~360.284ppm으로 조사되었다. 이러한 결과는 개간지와 농경지에서는 모든 이온들이 시설재배지에 비하여 현저히 낮음을 알수 있었다.

다. 양이온(Cation) 분석

토양내 주요 양이온 중 Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 등, 5종의 양이온을 분석 대상으로 하였다. Bio-LC DX-300(Dionex, USA) 시스템을 이용하였으며, 그 결과는 표 4와 같이 조사되었다.

표 4. 시설재배지 및 간척지 토양의 양이온 농도

채집지	Ca^{2+} (ppm)	Na^+ (ppm)	NH_4^+ (ppm)	K^+ (ppm)	Mg^{2+} (ppm)
자개리	139.488	26.390	7.478	32.382	43.906
슬항리	36.114	18.298	5.090	36.638	16.410
유곡리	129.076	71.904	12.153	146.884	64.778
금천리	50.928	58.090	4.875	23.448	28.312
개간지	1.030	69.860	7.390	10.180	1.990
농경지	0.370	23.660	3.620	5.410	0.860

그 결과 Ca^{2+} 이온은 0.370~139.488ppm, Na^+ 이온은 18.298~71.904ppm, NH_4^+ 이온은 3.620~12.153ppm, K^+ 이온의 경우 5.410~146.884ppm, Mg^{2+} 이온은 0.860~43.906ppm으로 조사되었다. 이러한 음이온 및 양이온 농도의 결과는 앞에서 언급한 EC 값과 아주 유사한 결과를 보여주고 있는데, 이는 EC 값은 양이온 및 음이온의 농도에 의하여 결정되며, 토양 내 염의 함유 정도를 나타내는 지표로 이용되었다.

본 연구에서 활용한 토양환경분석방법 및 음이온, 양이온 함량의 결과는 시설재배지와 간척지의 토양염류장해 지표로 활용되어질 수 있으며, 본 연구의 연구목표 중 “유용균주 선발” 및 토양염류장해 토양내 미생물 군집 분석 등을 수행하는데 있어 매우 적격한 토양채집지였음을 확인할 수 있었다.

라. 수용성 염류의 총체적 함량

표 3과 표 4에서 본 대표적 지역 중 하나인 유곡리의 경우 실제적 수용성 염류함량을 토양 1g당으로 환산하여 나타내면 (즉, 각 이온의 측정치에 토양처리시 희석한 비율인 10배를 곱하여 나온 수치의 총합계) 11,800 ppm/g으로서 이는 토양 1g에 1.18%의 수용성이온이 함유되어 있음을 보여준다. 토양의 염류

장해 기준이 0.2% 이상임으로 유곡리의 토양은 이 기준의 약 6배에 해당하는 매우 심한 염류장해토양임을 알 수 있다. 따라서, 본 연구에서 채취한 염류장해 토양은 매우 적합한 채집지였음을 나타내며 이러한 토양의 특성분석과 함유된 미생물의 개체수 분석 및 내염성/호염성 균주의 탐색은 매우 적절하다고 할 수 있다.

마. 중금속 농도

2 mm체에 거른 각 토양을 건열건조기에서 말린 후, 막자사발을 이용하여 약 100 ms도 정도되게 grinding 하였다. 분말화 된 토양시료 1g에 붕산이 포함된 중금속 추출용액을 첨가하여 1일 동안 끓여 ICP(dionex, USA)에 적용하여 Cr, Cu, As, Cd, Pb 등, 5종의 중금속 농도를 측정하였으며, 결과는 표 5와 같이 조사되었다.

그 결과 시설재배지에서의 크롬(Cr)은 33.60~124.40ppm, 구리(Cu)는 22.24~44.70ppm, 비소(As)는 4.23~15.86ppm, 카드뮴(Cd)의 경우 0.18~0.30ppm, 납(Pb)는 14.80~29.18ppm으로 조사되었으며, 개간지(개간지, 농경지)의 경우에는 크롬(Cr)은 60.60~61.40ppm, 구리(Cu)는 14.80~16.70ppm, 비소(As)는 8.48~14.50ppm, 카드뮴(Cd)의 경우 0.24~0.28ppm, 납(Pb)는 21.20~27.20ppm으로 조사되었다. 이러한 결과는 토양환경보전법(1999)에서 제시한 농경지 등에서 토양오염 우려기준(카드뮴 1.5, 구리 50, 비소 6, 수은 4, 납 100, 6가크롬 4, 단위:ppm)과 비교하였을 때 크롬은 전지역에서 우려기준보다 훨씬 상회하는 것으로 나타났으며, 특히 비소의 경우는 토양환경보전법에서 토양중의 비소농도가 6ppm 이상에서는 농작물 등의 생육저해를 보인다고 제시되어 있는데, 자개리를 제외한 지역에서 높게 나타나 이들 지역에서의 크롬과 비소에 의한 토양오염 대책이 시급한 것으로 조사되었다.

표 5. 시설재배지 및 간척지 토양의 중금속 농도

채집지	Cr(ppm)	Cu(ppm)	As(ppm)	Cd(ppm)	Pb(ppm)
자개리	124.40	44.70	4.23	0.18	14.80
슬항리	52.26	41.16	15.86	0.27	22.44
유곡리	38.92	28.88	10.51	0.30	23.90
금천리	33.60	22.24	6.84	0.27	29.18
개간지	61.40	16.70	14.50	0.28	27.20
농경지	60.60	14.80	8.48	0.24	21.20

3. 호염성 및 내염성 균주 선별

대부분의 미생물은 서식환경의 염분도가 4%이상일 때 급격하게 성장 및 생존이 억제된다. 따라서, 8%의 염분도를 기준으로 토양미생물 군집의 변화가 있고 이때 생존 및 성장하는 균주의 경우 극호염성 및 극내염성 균주일 가능성이 매우 높다.

이러한 배경하에 본 연구에서는 유용한 호염성 및 내염성 후보 균주 탐색을 위하여 일차로 채취한 염류장해토양을 대상으로하여, 2mm체로 거른 토양시료 1g에 멸균증류수 또는 Ringer's 용액을 첨가하여 진탕한 후, 희석평판법을 이용하여 다양한 고체배지(NA, 1/10 NA, R₂A 및 PIA 등)에 도말하여 총 미생물군집량을 조사하였다(표 6 참조). 총균집량을 조사한 후 호염성 및 내염성 균주를 선별하고자 NA 배지와 1/10 NA 배지에 NaCl 농도를 달리한 고체배지(4%, 8%, 16% 및 24%)에 상기의 방법으로 처리한 토양추출시료를 도말하였다. NaCl 농도에 따른 균집 총량의 변화는 표 7과 같이 예상대로 8%에서 급격히 감소하였으며 16% 배지에서는 수 십개의 colony만이 생존, 성장하는 결과를 얻었으며 24%의 배지에서는 생존하는 균주를 거의 발견할 수 없었다.

표 6 및 표 7의 결과를 기초로하여 1차적으로 후보균주 908 균주를 분리한 후, 염류내성배지인 STM(salt tolerance medium) 배지를 통하여 103 균주를 확보하였으며, STM 배지에 NaCl을 10%, 14%, 16%의 농도로 처리한 고체배지 상에서 16%에서 생존한 내염성 및 호염성 미생물 8 균주를 선별하였다. 최종 선별 균주들을 대상으로 토양과 증류수를 1:1로 혼합하여 조제한 토양 추출

배지에서의 성장여부를 확인하였으며, 최적 온도조건을 확인하고자 다양한 온도구간(20℃, 25℃, 30℃ 및 35℃)에서 조사한 결과 다소의 차이는 있으나 최적 성장 온도는 35℃로 조사되었다(표 8 참조).

따라서, 본 연구에서 제시된 호염성 및 내염성 균주의 탐색전략은 매우 합리적이고 타당하다고 판단되며 또한, 선발된 균주들은 이후의 토양염류장해 극복에 관련한 일련의 연구에 있어서 중요한 공시 균주로 활용되었다.

표 6. 미생물균집 조사

(단위 : $\times 10^5$ CFU/g)

채집지	NA	R2A	EC	PIA	EMB	YPD	PDA
자개리	420.00	898.00	10.52	17.12	154.68	21.08	79.28
슬항리	729.40	1501.60	11.35	9.96	24.17	13.00	108.26
유곡리	5312.04	5602.60	31.63	20.15	517.07	1117.20	123.47
금천리	898.00	435.90	0.35	20.89	93.08	22.68	22.10
개간지	522.50	219.00	0.19	10.30	50.55	13.13	62.86
농경지	153.00	257.50	0.26	1.00	3.58	6.32	2.27

NA, R₂A : 총중속영양세균분리용배지

EC : 대장균분리용배지

PIA : Pseudomonas분리용배지

EMB : 장내세균분리용배지

YPD : Yeast분리용배지

PDA : 곰팡이분리용배지

표 7. NaCl 농도별 균집조사

(단위 : $\times 10^5$ CFU/g)

채집지	NA				1/10 NA			
	4%	8%	16%	24%	4%	8%	16%	24%
자개리	23.23	0.85	SG, FF	NG	5.17	0.35	SG, FF	NG
슬항리	24.59	0.29	SG, FF	NG	21.75	0.16	SG, FF	NG
유곡리	60.26	3.64	SG, FF	NG	72.81	3.38	SG, FF	NG
금천리	13.13	2.04	SG, FF	NG	5.62	2.29	SG, FF	NG
개간지	1.73	0.18	SG, FF	NG	0.22	NG	NG	NG
농경지	1.55	0.14	SG, FF	NG	0.19	NG	NG	NG

SG : Slow Growth, FF : Few Colony Formation, NG : No Growth

표 8. 내염성·호염성 분리균주의 생리적 특성

분리균	토 양 추출배지	NaCl 농도			온도조건			
		10%	14%	16%	20℃	25℃	30℃	35℃
KSG1	+++	+++	+++	++	+	++	+++	+++
KSG2	+++	+++	+++	+++		+	++	+++
KSG3	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
KSG4	++	+++	+++	+++		+	++	+++
KSG5	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
KSG6	+++	+++	+++	+++	+	++	++	+++
KSG7	++	+++	+++	+++	+	+	+	+
KSG8	++	+++	+++	+++	+	++	++	+++

NG : No Growth, + : 미약, ++ : 양호, +++ : 매우 양호

내염·호염성 균주를 확보하였으나, 1차년도 연구평가 보완요구사항에 따라, 2차년도 연구부터는 제2협동과제의 gamma-ray에 의한 염류제거 효율 증강 돌연변이체 제조 연구를 제외시켰고 토양염류분석은 주관기관에서 수행하도록 하였다. 특히 주관기관의 세부과제는 염류집적 시설 하우스 토양의 집적된 불용성 인산염의 가용화 연구를 보다 중점적으로 수행하도록 연구추진 전략을 수립하였다.

4. 불용성 인산염 가용화 균주의 선별

모든 미생물은 성장을 위하여 인(P, phosphorus)이 필수 영양소이기 때문에 여러 가지 형태의 인 화합물을 이용한다. 인화합물의 가장 주된 형태는 무기인산(inorganic phosphate, Pi), organophosphate, pyrophosphate(PPi)와 metaphosphate, C-P화합물(살충제, 제초제의 성분), 그리고 energy 저장원으로 작용하는 polyphosphate(무기인산중합체) 등이 있다. 인은 식물체에서 핵산, 인지질 등의 중요 구성 성분이며, 식물성장에 필요한 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 원소이다. 식물에 충분한 양의 인을 공급하기 위해 인산염 형태의 비료를 공급해 주는데 이중 식물이 이용하는 인산의 양은 10%에 불과(Holford, 1997)하고 90%는 토양내에서 불용성으로 변화된다. 특히, 인산은 시

설재배지의 특성상 다량의 유기물과 석회성 인산질 비료가 시용되어 Ca-P가 크게 증가되었다고 생각할 수 있으며, pH 5.5 이상인 토양이 많은 시설재배지에서는 토양 인산의 유효도 증가는 기대하기 어렵다(서 등, 1995). 이와같은 인의 불용화는 작물의 생육을 저해하는 원인이 되며, 궁극적으로 염류장해 토양화 되어 작물재배가 불가능하게 된다.

가. 불용성 인산염 가용화 균주 선발

특수한 미생물은 성장에 필수적인 인(P, phosphorus)을 상기한 불용성 염화 상태인 인화합물로부터 얻을 수 있다. 이에 본 연구에서는 인 자원의 재활용 및 토양 내 과잉상태의 인화합물을 제거한다는 측면에서 불용성 인화합물을 가용화시킬수 있는 능력이 뛰어난 토양미생물을 탐색하는 것은 토양염류장해의 한 요인인 불용성 인화합물의 제거 내지 가용화를 통한 토양회복에 있어 필요 불가결한 연구이다. 불용성 인산염을 가용화 시킬 수 있는 균주를 탐색하고자 불용성 인화합물의 하나인 tricalciumphosphate가 함유된 고체배지에 토양추출액을 도말하여 30℃에서 3~5일간 배양한 후 균체주위에 불용성 인화합물의 가용화 기준인 투명대를 형성하는 500여 균주를 1차 선별하였다. 이들을 대상으로 patching 접종 방법을 사용하여 불용성 인산염 가용화능이 우수한 균주를 최종적으로 8균주(KSJ 3, KSJ 8, KSJ 11, KSJ 16, WP 20, WP 38, WP 41, WP 42)를 선별하였다.



그림 1. 불용성 인산염 가용화 균주들의 가용화능
H:Hydroxyapatite 첨가배지, T:Tricalciumphosphate 첨가배지

나. 불용성 인산염 가용화 균주의 염류제거능 조사

가항의 연구에 의해 선별된 가용화 균주가 불용성 인화합물을 가용화 하였

을때 배양액내 염류지표에 어떠한 변화가 초래되는지를 조사하고자 Tri-calcium phosphate가 함유된 BISTCP액체배지에 접종 한 후 200 rpm으로 진탕배양하면서 시기별로 배양 상등액을 5ml씩 회수하여 EC, Fert., NaCl 및 TDS를 측정 한 결과 KSJ 3, KSJ 8, KSJ 11 및 KSJ 13 균주에서 그림 2와 같이 5일 경과후 EC와 염류농도가 각각 46.4%, 47.0%, 65.2% 및 45.6% 감소하였으며, Fertilizer는 EC의 결과와 유사한 47.6%, 47.8%, 64.6%, 46.0%가 감소하였고, TDS는 46.6%, 47.4%, 65.3%, 46.1%가 감소되는 것으로 보아 이들 균주들이 불용성 인화합물을 제거하는 능력이 탁월한 것으로 사료된다. 또한, KSJ 16도 가용화능이 뛰어난 것으로 판명되었다.

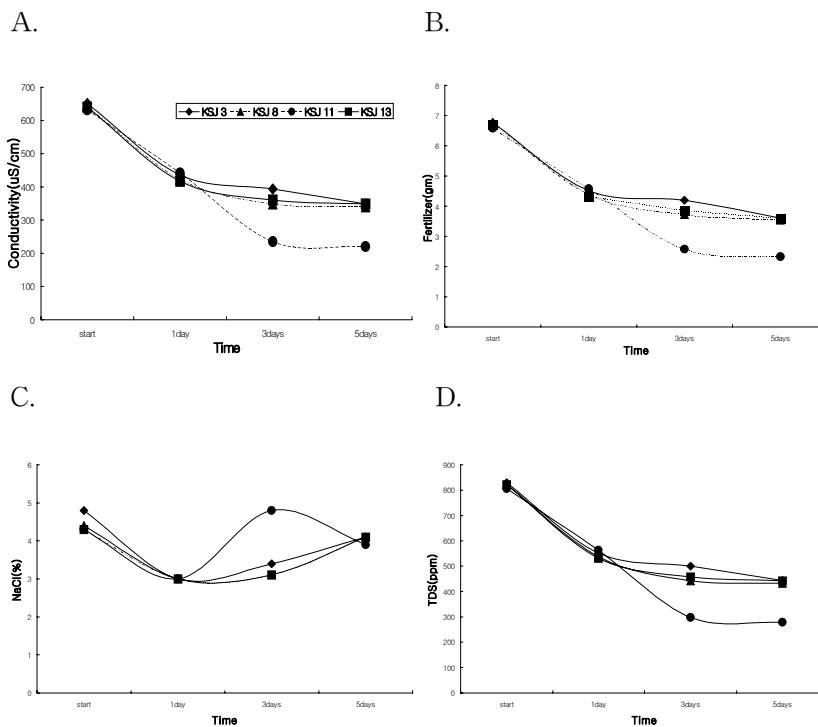


그림 2. 불용성 인산염 가용화 균주의 BISTCP 액체배지에서 염류농도 변화능
A : 전기전도도(EC : Electrical Conductivity), B : 비료농도(Fertilizer)
C : NaCl, D : 총용해성고형물(TDS : Total Dissolved Solid)

다. 불용성 인산염 가용화 균주의 염류장해토양 추출액내 염류제거능 조사

염류장해토양에서 분리한 불용성 인화합물 가용화능이 우수한 균주들이 과연 염류장해토양에 포함된 염류를 효과적으로 제거할 수 있는 지 알아보고자 하였다. 이를 위해서 가용화능이 뛰어난 KSJ 3, KSJ 8, KSJ 11 및 KSJ 16을 대상으로 토양추출액 배지에 적용하여 EC, Fert., NaCl, TDS를 균체수의 Abs.(OD) 값과 병행하여 측정 한 결과 그림 3 ~ 6과 같이 나타났다. 토양추출액 배지에 적용하였을 때 성장률 및 지속성이 가장 우수한 균주는 KSJ 8로 나타났으며, EC의 변화율에 있어서는 KSJ 3, KSJ 8 및 KSJ 16 균주들은 유사한 경향을 나타낸 반면에 KSJ 11 균주는 다른 균주들에 비하여 EC 감소율이 낮았다. NaCl 농도, Fertilizer의 농도 및 TDS의 농도 변화는 EC의 변화 양상과 유사하였다. 이러한 결과는 첫째로, 염류장해토양에 포함된 염류(NaCl)들이 미생물에 의하여 축적·제거됨을 알 수 있으며, 둘째 불용성 인화합물의 가용화됨에 따라 염류농도 및 EC가 변화됨을 보여주는 것으로 이들 가용화 균주가 기본적으로 호염성 및 내염성 뿐 아니라 가용화 대사과정의 일부가 NaCl의 축적은 물론 내성 생리현상에 관여하면서 환경내 EC 값을 변화시키는 총체적 대사과정이 있을 것으로 판단된다. 셋째, 염류장해토양의 구성성분에서 EC에 영향을 미치는 불용성 인화합물이 상당량 함유되어 있음을 반영하는 것이다.

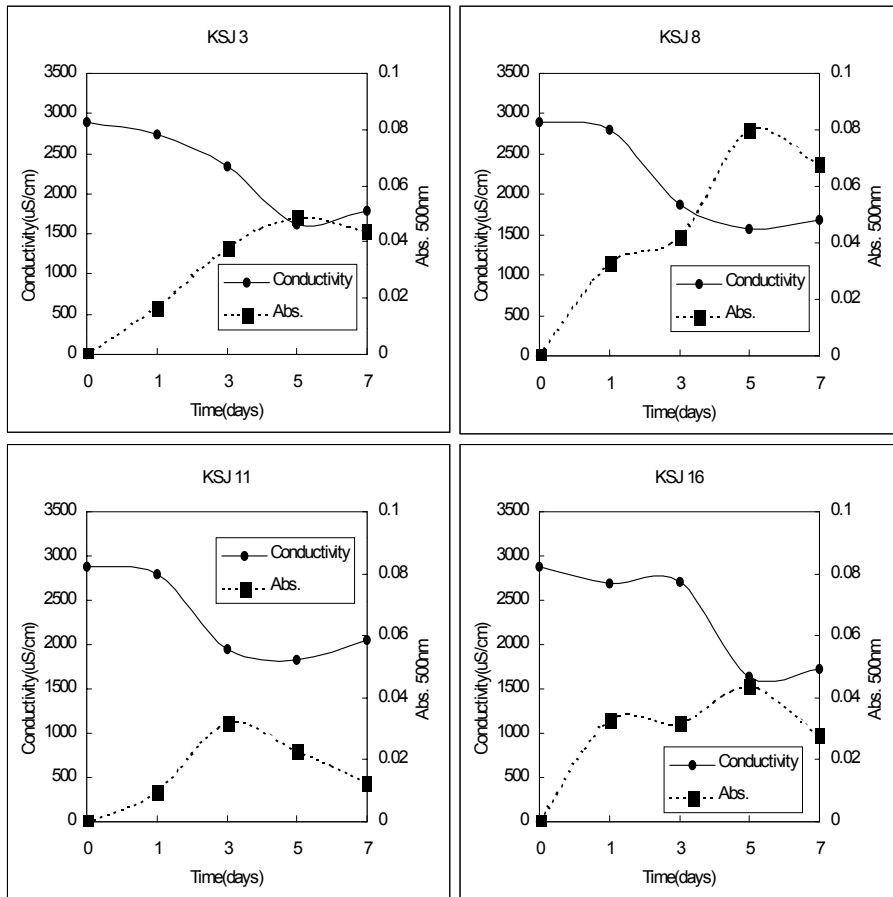


그림 3. 토양추출액배지에서의 균주의 성장율에 따른 Conductivity의 변화

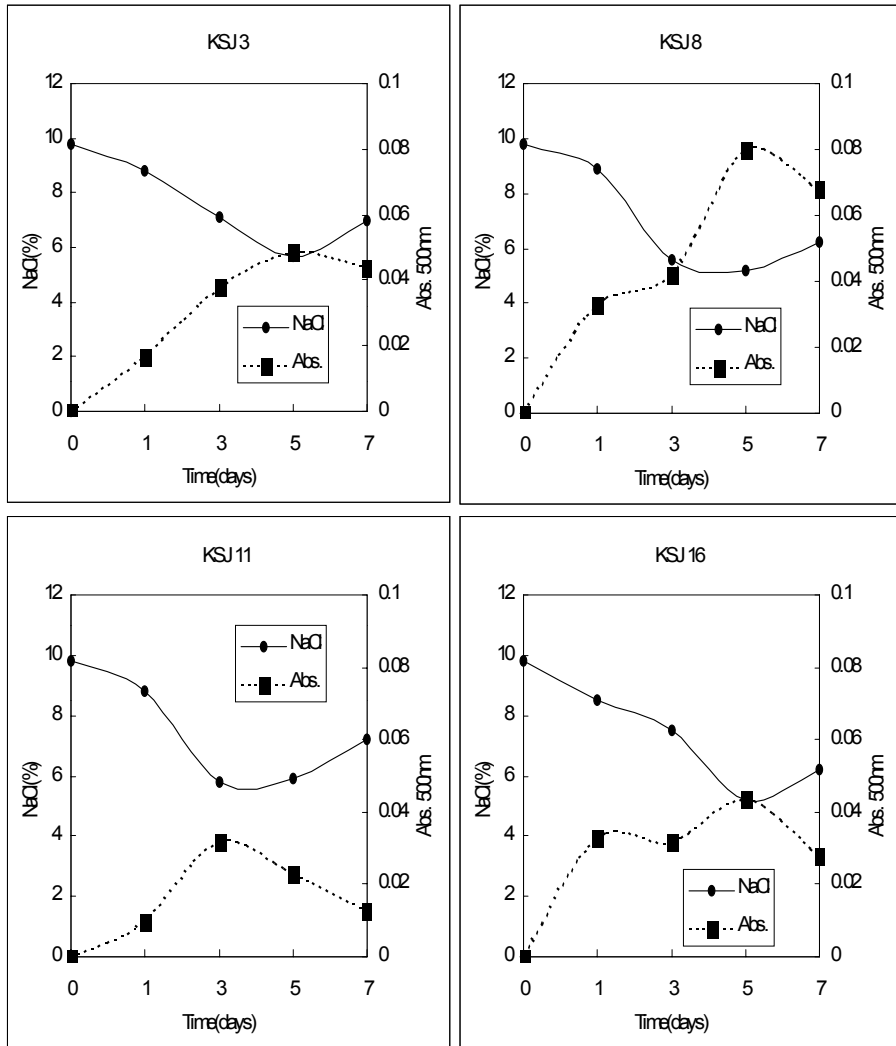


그림 4. 토양추출액 배지에서의 균주의 성장에 따른 NaCl의 농도변화

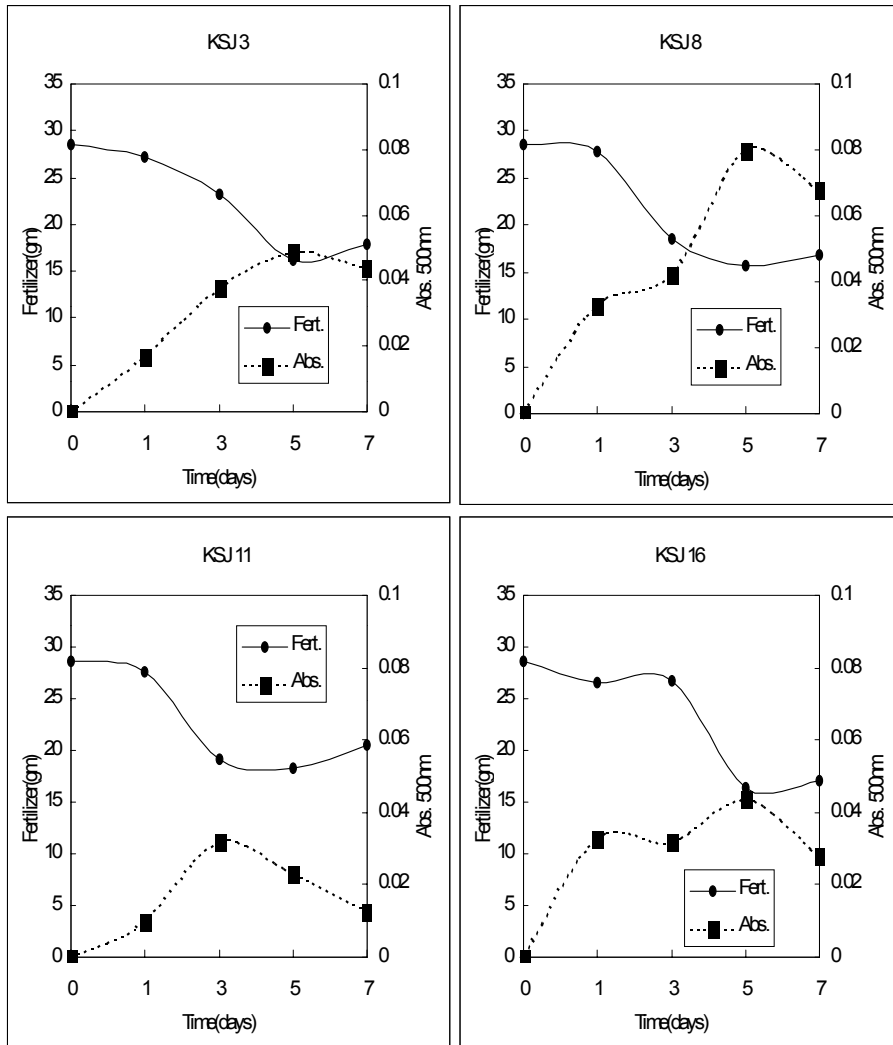


그림 5. 토양추출액 배지에서의 균주의 성장율에 따른 Fertilizer의 농도변화

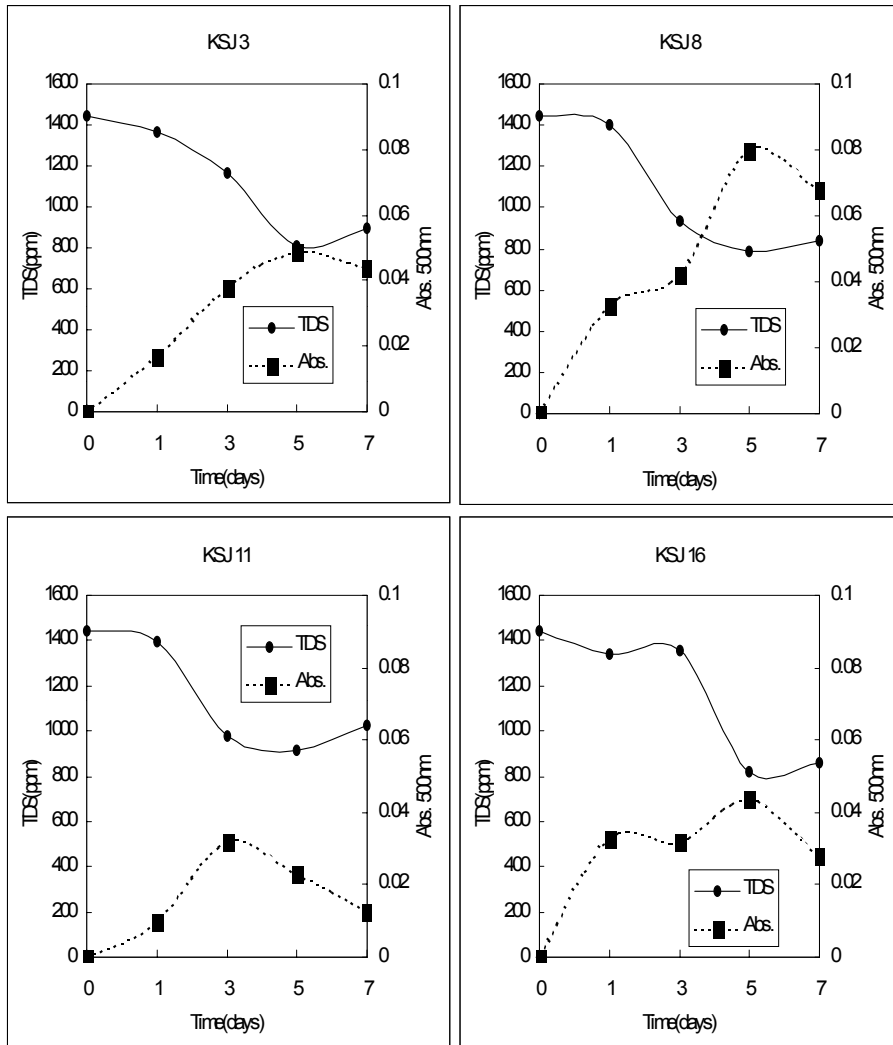


그림 6. 토양추출액 배지에서의 균주의 성장율에 따른 TDS의 농도변화

라. 불용성 인산염 가용화 균주의 농약 저항성

염류장해복원에 이용될 불용성 인화합물 가용화 균주가 실제 농경지에서 다량 살포되는 다양한 농약에 대해 저항성과 분해능이 있어야만 효과적인 활용이 가능할 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 선발된 16 종의 가용화 균주를 대상으로 농경지에서 가장 높은 빈도로 사용되고 있는 농약에 대한 저항성을 조사하고 가장 유독한 살균제로 알려진 copperhydroxide의 분해능을 조사하였다.

사용된 농약은 살균제(fungicide) 10종류, 살충제(insecticide) 5종류 및 제초제(herbicide) 2종류 등 총 17종류를 선정하였고(특급시약, 순도 87% 이상) (표 9), 실제 농가에서 사용되는 농도를 기준으로 용도에 따라 구별하여 처리하였다. 가용화 균주를 농약이 첨가된 NA 고체배지에서 30℃로 3일간 배양한 후 성장여부를 조사하여 저항성 지표로 삼았다.

총 17종류의 농약에 대한 저항성 분석을 실시한 결과 표 10과 같이 균주에 따라서 다양한 양상을 보였다. 그 중 KSJ 3와 KSJ 7 균주는 copperhydroxide를 제외한 모든 농약에 대하여 저항성을 나타내었고 KSJ 10 균주는 copperhydroxide와 fenpyroximate를 제외하고 거의 모든 농약에 대해 저항성을 나타내었다. 특기할 것은 가장 유독한 살균제로 알려진 copperhydroxide에 대해 적응하는 5 균주를 발견하였다(KSJ 1, KSJ 3, KSJ 4, KSJ 6과 KSJ 15). 이들의 copperhydroxide 내성적응능을 액체배양하면서 조사한 결과는 그림 7와 같았다. 집중 균주의 세포수가 증가하면서 copperhydroxide 고유의 blue color가 투명해지는 양상을 보였기에 이들 균주가 copperhydroxide에 적응하여 산화환원 과정을 통하여 이들을 변형시키면서 분해하거나 세포내로 흡수 자화시키는 것으로 판단되며 가장 투명한 균주부터 나열하면 KSJ 4>KSJ 15>KSJ 3>KSJ 1>KSJ 6 균주의 순으로 나타났다. 이중 KSJ 3 균주는 불용성 인화합물의 가용화능이 뛰어난 균주에 속하는 균주이므로 농약 저항성까지 갖추고 있는 다기능성 균주로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

표 9. 실험에 사용된 농약의 종류 및 용도

용도	일반명	순도	적용농도(ppm)	용매
살균제	Flusilazole	98.6	20	메탄올
	Tebuconazole	98.0	250	이소프로판올
	Oxadixyl	98.0	250	메탄올
	Edifenphos	95.0	300	메탄올
	Tricyclazole	96.0	375	메탄올
	Pencycuron	97.0	250	이소프로판올
	Azoxystrobin	98.4	100	아세톤
	Copperhydroxide	89.0	800	암모니아수
	Isoprothiorane	96.0	400	메탄올
	Iprobenphos	97.0	50	아세톤
살충제	Chlorfenapyr	93.2	50	아세톤
	Imidacloprid	95.0	50	이소프로판올
	Fenpyroximate	98.0	25	메탄올
	Chlorpyrifos	93.0	200	메탄올
	Diazinon	95.0	30	아세톤
제초제	Butachlor	87.0	50	아세톤
	Glyphosate	98.0	50	증류수

Control K SJ 6 K SJ 1 K SJ 3 K SJ 15 K SJ 4



그림 7. 불용성 인화합물 가용화 균주의 copperhydroxide 내성적응능

표 10. 농약 저항성

균주/농약	살균제										살충제					제초제	
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰
KSJ 1	NG	G	G	G	G	G	G	SG	G	G	G	G	G	G	G	G	G
KSJ 2	G	G	NG	G	NG	NG	G	NG	NG	G	NG	NG	NG	G	G	G	G
KSJ 3	G	G	G	G	G	G	G	SG	G	G	G	G	G	G	G	G	G
KSJ 4	G	G	G	G	NG	NG	G	SG	G	G	G	G	G	G	G	G	G
KSJ 5	G	NG	G	G	G	G	NG	NG	G	G	G	G	G	G	G	G	G
KSJ 6	G	G	NG	G	NG	NG	G	SG	NG	G	NG	NG	NG	G	G	G	G
KSJ 7	G	G	G	G	G	G	G	NG	G	G	G	G	G	G	G	G	G
KSJ 8	G	G	G	G	NG	NG	G	NG	NG	G	NG	NG	NG	G	G	NG	G
KSJ 9	G	NG	G	G	G	G	NG	NG	G	G	G	G	G	G	G	G	G
KSJ 10	G	G	G	G	G	G	G	NG	G	G	G	G	NG	G	G	G	G
KSJ 11	NG	NG	G	G	G	G	NG	NG	G	G	G	G	G	G	G	G	G
KSJ 12	G	G	NG	G	G	NG	G	NG	G	G	NG	G	NG	G	G	G	G
KSJ 13	G	NG	NG	G	G	G	NG	NG	G	G	G	G	G	G	G	NG	G
KSJ 14	G	G	NG	G	G	NG	G	NG	G	G	G	G	NG	G	G	G	G
KSJ 15	NG	NG	G	G	G	G	NG	SG	NG	G	NG	G	G	G	G	G	G
KSJ 16	G	G	NG	G	NG	NG	G	NG	NG	G	NG	G	NG	G	G	NG	G

G : growth, SG : slow growth, NG : no growth

①: Flusilazole, ②: Tebuconazole, ③: Oxadixyl, ④: Edifenphos, ⑤: Tricyclazole,

⑥: Pencycuron, ⑦: Azoxystrobin, ⑧: Copperhydroxide, ⑨: Isoprothiorane,

⑩: Iprobenphos, ⑪: Chlorfenapyr, ⑫: Imidacloprid, ⑬: Fenpyroximate,

⑭: Chlorpyrifos, ⑮: Diazinon, ⑯: Butachlor, ⑰: Glyphosate

5. 분리균주의 방사선 감수성

선별된 균주를 이용하여 방사선을 이용한 제어능 증강 돌연변이체를 유도하기 위한 전 실험으로서 이들 균주들의 방사선 감수성 및 멸균선량을 알아보기 위하여 이들 균주들을 먼저 5 ml NB배지에 전배양하여 30℃에서 1일간 배양하였다. 전배양체를 동량으로 1.5 ml micro-tube에 분주한 후, 한국원자력연구소 방사선 조사시설을 이용하여 5 kGy 구간으로 0 ~ 25 kGy의 선량으로 조사하였다. 방사선이 조사된 균주를 평판회석법을 이용하여 비조사된 균주의 세포수와 비교하여 각 선량 구간의 생존 세포수를 계수하여 방사선에 의한 대략적인 멸균 선량을 1차로 구하였다. 1차 결과를 토대로 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 kGy의 방사선 조사를 실시한 후, 위와 같은 방법으로 각 균주의 방사선 감수성 및 멸균선량을 구하였다.

표 11. 분리 세균의 D₁₀값 및 멸균선량

Strain	D10 value	멸균선량
인산염 가용화 균주		
KSJ 1	0.5311	5 kGy
HSJ 2	0.5660	6 kGy
KSJ 3	0.5228	5 kGy
KSJ 4	0.5311	5 kGy
KSJ 5	0.6064	5 kGy
KSJ 6	0.6079	5 kGy
KSJ 7	0.7966	5 kGy
KSJ 8	0.6405	6 kGy
KSJ 9	0.3807	4 kGy
KSJ 10	0.4968	4 kGy
KSJ 11	0.7942	5 kGy
KSJ 12	0.5750	5 kGy
KSJ 14	0.5031	4 kGy
KSJ 15	0.4176	5 kGy
KSJ 16	0.4995	5 kGy
염류내성 균주		
KSG 1		
KSG 2		5 kGy
KSG 3		2 kGy
KSG 4		5 kGy
KSG 5		5 kGy
KSG 6		5 kGy
KSG 7		4 kGy
KSG 8		4 kGy

6. 방사선이용 내염성/호염성 돌연변이 균주 제조

방사선을 이용하여 분리된 유용미생물의 염저항성 및 인산염가용화능이 증강된 돌연변이체를 유기하기 위하여 전항에서 실시된 방사선 감수성 결과를 기초로, 분리된 인산가용성 균주 16균주 중, 활성이 뛰어난 KSJ 3, KSJ 8, KSJ 11 및 KSJ 16 strain의 각 배양액에 LD95 선량의 방사선을 조사하였다. 조사된 배양액을 평판희석법에 따라 NA 배지에 도말한 후, 50-100개의 colony가 출현한 plate에서 무작위적으로 48개의 colony를 인가용화 세균 분리배지 및 16%, 18%, 20%의 염이 첨가된 NA 배지에 각각 접종하였다. 또한 각 배지에 각 균주의 야생형 균주를 접종하여 37°C에서 배양하였다. 야생형과 비교하여 인가용화 분리세균 배지에서 투명환이 증가된 균주를 방사선에 의해 유기된 인가용화 증강 돌연변이체 후보균주로 분리하였다. 또한 16% 이상의 염류가 포함된 NA배지에서 생장이 불가능한 야생형 균주에 비해 18% 및 20%의 염이 첨가된 NA배지에서 성장하는 균주는 내염성 증강 돌연변이체 후보 균주로 분리하였으며, 인산염 가용화 능이 증가된 5종의 mutant 후보미생물을 그림 8과 같이 확보하였다.

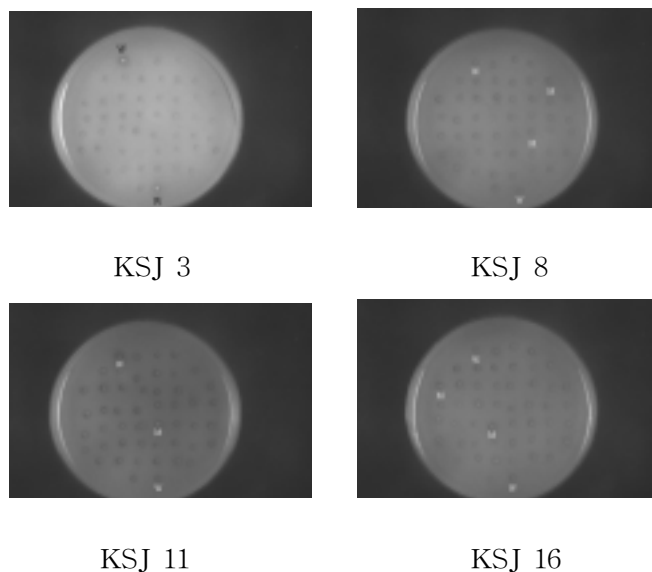


그림 8. 방사선처리 인산가용성 분해세균의 돌연변이체 선별

W : 미방사선처리 인산가용성 세균, M : 인산가용성 증강 돌연변이체 후보 균주

7. 방사선이용 염류요구성 균주제조

GM 63 최소배지에 호염성 및 내염성 균주들을 접종하여 염류요구성을 조사한 결과 모든 균주가 놀랍게도 0.8% 이하의 NaCl 농도에서는 생존하지 않았으며, 최소배지에 NaCl 염류농도를 0.8% 이상 첨가하였을 때 성장 및 생존을 확인하였다(표 12 참조).

표 12. 염류요구성 확인

균주	GM 63 최소배지				
	NaCl 0%	NaCl 0.2%	NaCl 0.4%	NaCl 0.8%	NaCl 1.0%
KSG 1	NG	NG	NG	G	G
KSG 2	NG	NG	NG	G	G
KSG 3	NG	NG	NG	G	G
KSG 4	NG	NG	NG	G	G
KSG 5	NG	NG	NG	G	G
KSG 6	NG	NG	NG	G	G
KSG 7	NG	NG	NG	G	G
KSG 8	NG	NG	NG	G	G

G : growth, NG : no growth

제 3 장 인산염가용화 균주의 분자유전학적 동정

제1절 서론

지구상에 존재하거나 현존하는 생물을 구분하는 것은 매우 오랜 인류의 관심사였다. 미생물의 분류는 그 존재가 알려진 이후 현미경의 발달과 밀접하게 발전하였으며, 그 분류를 위한 방법의 개발이 급속하게 이루어졌다. 미생물의 분류는 형태학이나 생화학적 특성(Shah *et al.*, 1997) 및 DNA-DNA 유사성에 바탕을 두고 시도되어 왔으며(Persing *et al.*, 1993; Fredricks and Relman, 1996), 최근까지 일정한 미생물 균의 경우 생리·생화학적 방법을 응용한 kit화(API kit : BioMérieux Vitek, Hazelwood, Mo., USA; Microplate : Biolog Co. Inc. USA)한 방법을 사용하기에 이르렀다(Charteris *et al.*, 2001). 그러나 기존의 미생물 분류방법은 다양한 미생물을 구분하는데 한계성이 있으며, 그 한계성에는 배양여부, 배양조건, 물리적 환경요인(온도, pH 등), 성장시기 등에 따른 미생물의 생리·생화학적 특징이 변화되어 평가할 수 없는 등의 문제가 제기되었다(De Vries *et al.*, 2001; Marchesi *et al.*, 1998). 상기한 문제점을 해결할 수 있는 분자생물학적 수단으로는 유전자 염기서열을 이용한 비교·동정방법이며 모델 유전자의 특징은 ① 진화적으로 중요한 생물학적 기능을 공통점으로 갖고 있는 것, ② 부분적으로 모든 생물에 매우 보존적인 부위가 있을 것, ③ 부분적으로 매우 다양한 부위가 있을 것이라 할 수 있다. 상기의 분류 key 조건에 가장 부합한 것이 rRNA임을 인지하여 이를 이용한 분자생물학적 분류동정방법이 개발되고 있는 실정이다(Harmsen *et al.*, 2001). rRNA는 단백질 합성공장이라 할 ribosome을 구성하므로 모든 생물체에서 가장 중요한 기능을 나타내며, rRNA의 구조에는 기능상 모든 생물체에 동일하게 보존된 부위를 지니며, 부분적으로는 그 변화가 큰 부위도 있어 계통분류에 있어 매우 유용한 분류 key로 활용할 수 있다. 더욱이 rRNA의 유전자인 rDNA의 염기서열을 조사하거나(Drancourt *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2001; Harmsen *et al.*, 2001), 간접적으로 제한효소 절단체 길이 다양성(RFLP:Restriction Fragment Length Polymorphism)을 조사하는(Koeleman *et al.*, 1998; Nemeč *et al.*, 2001) 등의 방법으로 비교하므로써 생물 진화관련 계통분류가 가능하다.

현재 rRNA는 동·식·미생물의 계통 분류에 광범위하게 응용되고 있으며, 특히 곤충(Misof *et al.*, 2001), 꿀(Jozefowicz and O'Fioghil., 1999). 계(Stillman and Reeb, 2001)등은 미토콘드리아 16S rDNA의 염기서열을 이용해 계통분류를 수행하고 있으며, 또한 Green algae(Burja *et al.*, 2001)나 mycoplasma(Konigsson *et al.*, 2001)에서도 유용한 진화계통 분류 수단으로 활용되고 있다. 미생물의 경우에는 16S rRNA를 이용하여 형태학적으로 구분하기 힘든 유사종들의 구분에 잘 활용된다. 그 예로는 병원성 미생물의 감염부위로부터 병원균의 분류·동정에 활용되고 있으며(Kharsany *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1998; La Scola *et al.*, 2001), 표현형적으로 매우 유사한 것으로 알려진 *Acinetobacter* 속의 미생물들을 구분하기에 유용한 수단으로서 16S rRNA 염기서열의 RFLP 결과가 매우 유용하다고 주장되고 있다(Garcia-Arata *et al.*, 1997). 또한 기존에 생리·생화학적으로 분류했던 *Moraxellaceae* family에 속한 미생물의 16S rRNA 염기서열을 비교한 결과 93%의 상동성을 보이는 group을 새로운 속으로 분류해야할 필요가 있음을 확인한 결과도 있다(Pettersson *et al.*, 1998).

상기와 같이 16S rDNA 염기서열의 분석을 통하여 미생물의 속과 종 수준에서 계통분류를 수행하는 것은 매우 타당하며 다양한 서식환경에서 생존하는 미생물과 새로운 기능을 지닌 미생물들에 적용하여 새로운 종(species)을 밝혀낼 수 있는 유용한 방법으로 인식되고 있다.

본 연구에서는 토양환경으로부터 분리한 불용성 인산염에 대해 분해능이 있는 균주를 생리·생화학적 특징 및 16S rRNA 유전자의 분자생물학적분석을 이용하여 분류·동정하고자 한다.

제2절 생리생화학적 동정 실험

불용성 인산염 가용화능이 우수한 공시균주에 대하여 그람염색을 실시한 결과 그람음성 간균으로 나타났으며, 이들에 대한 생리·생화학적 실험은 다음과 같이 수행하였으며, 그 결과는 표 1에 나타내었다.

1. Esculin hydrolysis

세균이 esculin을 esculetin과 glucose로 분해하는 esculinase 활성이 있는가를 조사한 것으로 분해산물인 esculetin이 ferric citrate등의 ferrica 이온과 반

응하여 암갈색이나 검정색 계통의 phenolic iron 복합체를 형성하게 된다. 실험 결과 KSJ3을 제외한 나머지 7균주는 양성을 보였다.

2. Catalase 생산

산소를 사용하는 대부분의 호기성 또는 통성혐기성 균들은 자신의 효소계에 저해한 과산화수소(H_2O_2)를 생산한다. 그러나 이러한 환경에서도 그들 자신의 생존이 가능한 것은 이들이 hydrogen peroxide를 물과 산소로 전환하는 Catalase를 생산하기 때문인데, Catalase 생산력이 없거나 있다는 사실은 세균의 그룹에 있어서 매우 중요한 차별점이 된다.

실험 결과 모든 8균주에서 양성을 보였으며, 그에 상응하는 *Acinetobacter*와 *Pseudomonas*도 양성임을 Bergey's manual(1984)에서 확인할 수 있었다.

3. Citrate 이용

Simmon's citrate agar는 Citrate를 탄소원으로 하는 세균의 능력을 검사하는 데 이용된다. 이러한 합성 배지에서 sodium citrate는 유일한 탄소원이며, nitrogen은 아미노산 대신 ammonium에서 공급된다. 즉, 질소원으로 $NH_4H_2PO_4$ 가 첨가된 배지에서 Citrate를 유일한 탄소원으로 이용할 수 있는지를 조사하였다. 그 결과 본 실험에 사용되었던 8균주 모두 양성으로 나타났다.

4. Gelatin hydrolysis

단백질 분해균을 조사하는 여러 가지 방법 중에서 젤라틴의 액화능을 조사하는 방법으로, gelatin 배지에 실험균주를 배양하였을 때 gelatin이 분해되면 액화현상이 일어나는 특성을 이용하여 관찰하였다. 실험결과 WP38과 WP41을 제외한 모든 균주는 양성을 나타냈다.

5. Indole 생성

아미노산 중 tryptophane 이용 여부를 검정하는 방법으로, tryptophanase의 작용으로 생성된 indole을 Kovac's 용액으로 검출한다. 양성반응시 붉은색으로 나타나며, 음성반응에는 변화가 없다. 실험결과 KSJ8과 WP20을 제외한 모든 균주는 양성을 나타내었다.

6. Methly Red test

포도당 발효 결과 생성된 산에 의하여 배지의 pH가 변화하는지 아니면 산의 생성이 일어나지 않거나, 생성되더라도 그 양이 적거나, 산이 안정된 상태로 유지되지 못하여 배지 자체의 완충능에 의하여 배지의 pH가 변화하지 않게 되는지를 조사하였다.

배지의 pH는 CO₂와 H₂의 비율에 따라 결정되는 것으로 이 비율은 결국 세균이 어떤 경로로 포도당을 이용하는가에 따라 결정되는 것이다.

MRVP 액체배지관에 배양하였을 때 양성반응시 붉은색을 띠며, 음성반응시에는 노랑이나 오렌지색으로 나타난다. 실험결과 KSJ11과 WP42를 제외한 모든 균주는 양성을 나타내었다.

7. Voges-Proskauer test

포도당이 발효되어 acetyl-methyl-carbinol(acetoin) 또는 2,3-butandiol이 생성되는가를 검증하는 방법이다. 그런데 산소와 알칼리가 존재하면 acetoin이나 2,3-butandiol이 diacetyl로 산화되며, diacetyl은 creatine(guanidine)과 결합하여 분홍색으로 나타난다. 실험결과 KSJ3, KSJ8, KSJ11과 KSJ16은 음성반응을, WP20, WP38, WP41과 WP42는 양성반응을 나타내었다.

8. Oxidase test

Gram negative bacteria 중 호기성세균과 조건적 혐기성세균을 구분하는데 쓰이는 방법이다. 환원형의 cytochrome이 전자전달계의 최종 전자수용체인 산소에 의하여 산화되는 과정을 촉매하는 효소인 cytochrome oxidase의 활성 유무를 조사하는 방법이다. 균주들을 NA 배지에 배양한후 colony가 생성되면 95% 에탄올에 1%로 녹인 α-naphtol과 새로 만든 1% dimethyl-p-phenylenediamine oxalate 수용액의 1:1 혼합액을 배지상의 colony에 몇 방울 가한다. 10-30초 이내에 colony나 배지가 짙은 청색으로 변하면 양성이다. 실험결과 모든 실험균주가 양성을 나타내었다.

9. Starch hydrolysis

세균 중에서 Amylase 생산능이 있는 것은 녹말을 분해할 수 있다. Starch

hydrolysis agar 배지에 균주를 배양한 후 Gram's iodine을 떨어뜨려 배지상에 분비된 amylase의 작용을 검증하였다. 가수분해되지 않은 부분은 Iodine-starch 반응의 결과인 보라색이 나타났고, 가수분해된 부분은 투명환이 나타났다. 실험 결과 KSJ8과 KSJ16을 제외한 모든 균주에서 양성반응을 보였다.

10. Motility test

균주의 Motility를 확인하는 실험으로 배지관에 점종침으로 균을 접종하여 실험균주의 motility를 확인하였다. KSJ11을 제외한 모든 균주에서 motility 양성반응을 나타내었다.

11. Tryptophan hydrolysis

균주의 Tryptophan 분해능을 검사하는 실험으로 Tryptone broth에 배양된 균주가 Kovac's 시약에 노출되었을 때의 붉은색으로 변화하였을 때 양성으로 간주한다. 실험결과 WP20, WP41 및 WP42 균주는 음성, KSJ3, KSJ8, KSJ11, KSJ16, WP38 균주들은 양성을 나타내었다.

12. Phenylalanine deamination

Phenylalanase 생산의 증거가 되는 Phenylpyruvic acid의 생성을 검사하기 위한 실험이다. 일부 세균들은 Phenylalanine을 탈아민하여 phenylpyruvic acid(PPA)를 생산하는 phenylalanase를 분비한다. 분비된 phenylpyruvic acid에 10% Ferric chloride에 노출되면 반응이 일어나 녹색으로 변하는 성질을 이용하여 Phenylpyruvic acid의 생성 유무를 검사한다. 실험결과 모든 실험균주에서 녹색을 띤 양성반응을 나타내었다.

13. Lactose 분해

Lactose를 분해하는 β -galactosidase가 있는가를 확인하는 검사방법의 하나로 분해산물에 의해 균체주위에 불투명대가 형성된다. 실험결과 WP 20은 음성으로 나타났고 그 외 균주는 양성이었다.

표 1. 생리생화학적 실험 결과

생화학적실험	KSJ 3	KSJ 8	KSJ 11	KSJ 16	WP 20	WP 38	WP 41	WP 42
Gram 염색	-, rod	-, rod	-, rod	-, rod	-, rod	-, rod	-, rod	-, rod
Esculin 가수분해	-	+	+	+	+	+	+	+
Catalase 시험	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate 이용	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin 액화	+	+	+	+	+	-	+	-
Indole생성	+	-	+	+	-	+	+	+
Methly Red 검정	+	+	-	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer 검정	-	-	-	-	+	+	+	+
Oxidase 검정	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch 가수분해	+	-	+	-	+	+	+	+
Motility	+	+	-	+	+	+	+	+
Tryptophan 가수분해	+	+	+	+	-	+	-	-
Phenlyalanine 탈아민	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose 이용	+	+	+	+	-	+	+	+

상기한 기초 생리생화학적 실험이외에 인산염가용화 세균의 분류 동정을 위해 과거에 많이 이용되어 왔던 API kit 및 Biolog test를 사용하여 2차적으로 동정 실험을 시도하였으나, 50% 이하의 신뢰도를 보여 종의 구분이 불가능하였다. 따라서, 최신 연구기법인 분자유전학적 계통분류 연구방법(16s rDNA 서열결정 및 비교분석)을 적용할 필요가 있었다.

제3절 분자유전학적 분류 실험

1. 균주 및 Plasmid

본 실험의 cloning에 이용된 균주는 *E. coli* strain DH5a를 사용하였고, plasmid는 pBluescript II SK(+)(Stratagen Co.)를 사용하였다.

표 2. 본 연구에 사용되어진 균주 및 plasmid

Name	Phenotype	Ref.
Strains		
KSJ 3	불용성인산염가용화균주	본 연구
KSJ 8	불용성인산염가용화균주	본 연구
KSJ 11	불용성인산염가용화균주	본 연구
KSJ 16	불용성인산염가용화균주	본 연구
WP 20	불용성인산염가용화균주	본 연구
WP 38	불용성인산염가용화균주	본 연구
WP 41	불용성인산염가용화균주	본 연구
WP 42	불용성인산염가용화균주	본 연구
Plasmids		
pBluescript II	pBluescript II SK(+/-) phagemid, Amp ^r , lacZ gene, MCS	Stratagen
<i>E. coli</i>		
DH5a	F ⁻ Φ80dlacZΔ(lacZYA-argF)U160 endA1 recA1 hsdR17(r _k -m _k +) deoR thi-1 supE44 λ-gyrA96 relA1	Promega

2. 제한효소 및 변형효소

Hind III, *Sac* I 등의 제한효소와 T4 DNA ligase, T4 DNA polymerase, *E. coli* polymerase, RNase 등의 modifying enzyme들은 TaKaRa, Promega, New England Biolabs(NEB), Amersham, Bioneer에서 구입하였으며, 각 회사에서 제시한 조건들에 맞추어 사용하였다.

3. Genomic DNA 추출

NB 5ml에 균주를 접종하여 30°C에서 4~5시간동안 전배양 한 후 NB 50ml에 전배양 된 균주를 다시 접종하여 12~16시간동안 배양하여, 4°C, 13,000rpm에서 10min동안 원심분리하여 상등액은 버리고 세포를 얻은 후 여기에 TE buffer 567μl, 10% SDS 30μl, proteinase K(20mg/ml) 3μl를 첨가한 후 vortexing으로 균질화하여 37°C에서 1시간동안 incubation하였다. 5M NaCl 100μl와 CTAB/NaCl solution 80μl를 첨가 후 vortexing하여 65°C에서 10min동안 반응시켰다. 같은 부피의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)을 첨가하고 5분 동안 원심분리하여 상등액을 새 tube에 옮겼다. 또다시 동량의 phenol :

chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하여 10분간 원심분리하여 상등액을 새 tube에 옮겼다. 얻어진 상등액에 0.6배 부피의 isopropanol을 첨가하여 genomic DNA를 추출하였다.

4. Primer의 제작

16S rDNA의 증폭에 이용된 primer는 Marchesie 등(1998)이 설계한 randome primer를 변형하여 HP16-F(*E. coli* numbering 42~63 : 5'-CCCCAAGCTTAACTGCAGCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3')와 BS16-R(*E. coli* numbering 1386~1404 : 5'-CGGGATCCCGAGCTCGCGCGWGTGTACAAGC-3')로 제작(제노텍, Korea)하였다. 각 primer는 증폭된 PCR 산물의 cloning을 위하여 두 개의 제한효소를 5'쪽에 삽입하였다(HP16S-F : *Hind*III · *Pst* I ; BS16S- R : *Bam*HI · *Sac* I).

5. 16S rDNA의 PCR에 의한 증폭

균주에서 추출한 genomic DNA를 template DNA로 사용하였고, PCR 증폭은 Gene CycleTM(BIO-RAD Co.)을 사용하여 수행하였다. PCR 반응용액은 제작된 primer(10pmol)을 각각 1 μ l씩 첨가, Template DNA(10ng Genomic DNA) 1 μ l, 멸균증류수 47 μ l를 PCR Mixer(Bioneer Co. Korea)에 첨가하여 혼합한 후 mineral oil을 첨가하였다.

PCR 반응조건은 95 $^{\circ}$ C 5min간 denaturation을 1 cycle, 90 $^{\circ}$ C 1min 동안 denaturation, 52 $^{\circ}$ C/54 $^{\circ}$ C 2min간 annealing-primer attack, 72 $^{\circ}$ C 1min 30sec간 elongation-polymerization을 30cycle을 시행한 후 72 $^{\circ}$ C 5min 동안 final extension을 하였다. 증폭된 16S rDNA를 0.8% agarose gel로 전기영동하여 1.4Kb를 확인하였다.

6. Competent cell 제조

숙주 *E. coli* strain DH5 α 를 TYE-Amp 평판배지에 도말한 후 37 $^{\circ}$ C에서 over night 동안 배양하여 single colony를 얻었다. Single colony를 5ml SOB(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.058% NaCl, 0.019% KCl, pH 7.0)에 1/100 부피로 접종하고 A₆₀₀ 값이 0.4~0.6이 될 때까지(약 3시간)더 배양하였

다. 배양액을 4°C에서 원심분리(4,000 rpm, 10분)한 후 10% glycerol을 첨가하여 3회 세척하였다. 이렇게 제조된 competent cell을 각각 80 μ l(10⁹/1 μ g)씩 분주하여 electroporation을 위해 -70°C에 보관하며 사용하였다.

7. Competent cell과 cloning vector의 준비

*Hind*III와 *Sac* I 으로 enzyme digestion된 pBluescript vector를 self-ligation한 것과 pBluescript vector(제한효소 절단 안한 것) 1 μ l을 각각 제조한 competent cell에 eletroporator를 이용하여 아래와 같이 transformation을 실행하였다. 그 결과 제한효소 전달을 하지 않은 vector에서는 TYE agar(+ Amp) 배지에 blue colony가 10⁷/1 μ g 정도였으나, ligation한 이중 제한효소절단 vector에서는 colony가 전혀 나타나지 않아 cloning vector로 사용키로 하였다.

8. Cloning

그림 8과 같은 계획 하에 16S rDNA를 cloning 하고자 하였다. 증폭된 PCR product(16S rDNA)를 pBluescript vector를 *Hind*III와 *Sac* I 으로 digestion하였다. 절단한 PCR 산물과 8항에서 준비한 cloning vector를 사용하여 아래의 조성으로 ligation을 4°C에서 18시간 실행하였다.

Ligation 조성

pBluescript vetor	1 μ l
Insert	15 μ l
T4 ligase(Enzyme)	0.5 μ l
10 \times buffer	2 μ l
D.W	1.5 μ l
<hr/>	<hr/>
Total	20 μ l

Ligation 반응액을 20-30분간 Drop dialysis를 실행하여 salt를 제거한 후, cuvette에 *E. coli* DH5a와 ligation sample을 섞어 30분간 ice에서 처리한 후 eletroporation을 실시하였다. SOC 1ml(SOB 980 μ l, 2M Mg²⁺ 10 μ l, 40% glucose 10 μ l)에 cuvette의 sample을 옮겨 담은 후 37°C의 shaking incubator에서 1-2시간동안 배양하였다. 80 μ l의 X-gal(20mg/DMF 1ml)이 smear된 TYE

agar media에 SOC 배양된 제조합체를 도말하여 37°C에서 16시간동안 배양하였다. PCR 산물의 Vector내 삽입유무를 확인하기 위하여 colony를 10항과 같이 배양하고 plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid는 *Hind*III와 *Sac* I 을 가하여 37°C에서 2시간동안 digestion한 다음 0.8% agarose gel에서 insert를 확인하였다.

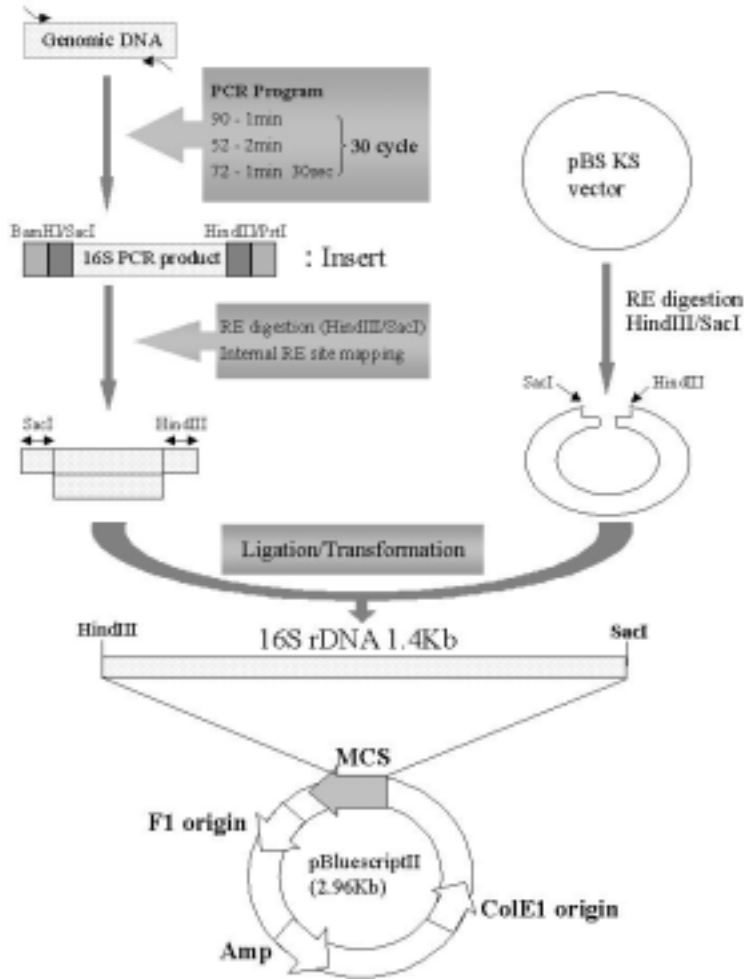


그림 1. 16S rDNA의 클로닝 단계

9. plasmid DNA 분리

항생제(Amp)가 첨가된 TYE broth 배지 5ml에 균주를 접종하여 37°C에서 12~16 시간동안 배양한 후, 4°C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 cell을 얻었다. 얻어진 cell에 100 μ l의 Solution I (0.9% glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 4mg/ml)을 넣고 vortexing하여 균질화 한 후, 200 μ l의 Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣어 용해시켜 얼음에 5분 동안 반응시켰다. 10분이 경과하지 않도록 주의하면서 150 μ l의 solution III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, dH₂O 28.5ml)를 첨가한 후 10분 동안 얼음에서 반응시킨 후 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 새 tube에 옮기고 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 처리하여 혼탁 시킨 다음 5분 동안 상온에서 원심분리하였다. 얻어진 상등액을 새 tube에 옮긴 후 100% 에탄올(-20°C) 1ml을 첨가하여 salt를 제거하고 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 버린다. 이어서 70% 에탄올(-20°C) 1ml을 첨가하여 침전시킨 후 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고 건조시킨 다음 멸균증류수로 녹이고 RNase(10mg/ml)로 RNA를 분해하여 -20°C에 보관하였다.

염기서열분석을 목적으로하는 plasmid DNA 분리 시 Promega사의 plasmid purification kit를 사용하였다.

10. 염기서열분석 및 상동성 분석

염기서열 분석은 자동염기서열 분석기를 사용하였으며 그 기종은 DNA sequencer Long ReadIF 4200이며, 4% Long Ranger(FMC : Rockland, ME, USA) gel을 사용하여 전개하였고, Sequencing 반응용 Kit는 Thermostequence (Part number L US78500, Amersham Life Science : Cleveland, Ohio, USA)제품을 사용하였다.

상동성분석에는 NCBI의 BLAST research program을 사용하여 실시하였고 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)에서 상동성에 따라 GenBank에 등록된 16S rDNA 염기서열을 활용하여 EMBL의 EBI ClustalW program(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)을 실행하였다. 이때 얻어진 phylogenetic tree와 유사도 값을 사용하였다.

11. 16S rDNA의 cloning 및 염기서열 결정

HP16-F와 BS16-R primer를 사용하여 불용성 인산염 가용화능이 뛰어난 8균주의 Genomic DNA로부터 16S rDNA를 증폭하여 pBSSK vector에 삽입하였고 염기서열결정을 수행하였다. 결정된 염기서열을 ClustalW로 배열한 결과는 그림 2와 같았으며 이들로부터 phylogenetic tree를 분석한 결과는 그림 3과 같았다. 또한 상동성 분석결과는 표 3에 제시하였다.

각 균주는 사용한 primer를 제외하고 KSJ3과 WP20는 1343bp, WP41과 WP42는 1344bp, KSJ11은 1342bp, KSJ8, KSJ16, WP38은 1345bp로 구성되어 있었다. 8균주의 16S rDNA 염기서열을 ClustalW로 multiple alignment한 결과 281곳의 변화가 있음을 확인할 수 있었으며, 240개의 염기 단위로 구분할 경우 nt1~nt240의 위치에서 76개의 염기에 변화가 있어 가장 변화가 심한 부위임을 알 수 있었으며 그 외의 구간은 42~45개의 염기에 변화가 있었으나 nt721~nt960 구간은 32개의 염기가 변화되어 가장 보존적인 부위였다.

8균주간 16S rDNA 서열을 이용한 계통수를 조사한 결과 KSJ3과 WP20이 1 group, WP41과 WP42가 1 group, KSJ8과 KSJ16이 1 group 그리고 WP38과 KSJ11이 각각 1개의 group을 구성하는 것을 알 수 있었다.

8균주의 상동성을 비교해보면 역시 상기 계통수와 유사한 결과를 보였으며 WP41과 WP42는 KSJ3과 KSJ16과 보다 유사하여 96% 이상의 상동성을 보였다. KSJ8과 KSJ16 그리고 WP38은 각각에 대해 97% 이상의 상동성을 보였다. KSJ11은 다른 균주들에 대해서 84~87%의 상동성을 보여 다른 속에 속함을 알 수 있었다. Drancourt 등(2000)에 따르면 99%이상의 상동성을 보이면 species 수준에서 동일하고, 97% 이상의 상동성이 있으면 genus 수준에서 동일하며 그 이하의 상동성을 보이면 진화적 계통수의 위치에서 family 수준에 놓일 수 있다고 하므로 이 견해를 받아들인다면 본 연구에 사용된 8균주는 최소 4개 속에 6종으로 구분될 수 있을 것으로 판단된다. 이에 보다 상세한 연구를 위하여 BLAST 검색을 통해 GenBank에 등록된 미생물의 16S rDNA의 염기서열과 비교하였다.

	241	300
KSJ3-16S	ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC	
WP20-16S	ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC	
WP41-16S	ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC	
WP42-16S	ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC	
KSJ11-16S	ATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTC	
KSJ8-16S	ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCGGCCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTC	
KSJ16-16S	ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCGGCCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTC	
WP38-16S	ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCGGCCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTC	
	*** ** * ***** * * ***** ***** *****	
	301	360
KSJ3-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCC	
WP20-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCC	
WP41-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCC	
WP42-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCC	
KSJ11-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC	
KSJ8-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAGGCCTGATGCAGCCATGCC	
KSJ16-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC	
WP38-16S	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC	
	***** ***** * * ***** ***** *****	
	361	420
KSJ3-16S	GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTA	
WP20-16S	GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTA	
WP41-16S	GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCTTTTG	
WP42-16S	GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCTTTTG	
KSJ11-16S	GCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGCAGGGCAGTAA	
KSJ8-16S	GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGAGGAAGGTGTTGTG	
KSJ16-16S	GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGAGGAAGGCAGTAAAG	
WP38-16S	GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGAGGAAGGCAGTAAAG	
	***** ***** * * ***** * ***** * ***** *	
	421	480
KSJ3-16S	GATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA	
WP20-16S	GATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA	
WP41-16S	GTTAATACCCAAGATGAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA	
WP42-16S	GTTAATACCCAAGATGAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA	
KSJ11-16S	GCGAATACCTTGC-TGTTTTGTCGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA	
KSJ8-16S	GTTAATAACCGTAGCAA-TTGACGTTACCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA	
KSJ16-16S	GTTAATAGCTTACCGA-TTGACGTTACCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA	
WP38-16S	GTTAATAACCTTGTGCGA-TTGACGTTACCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA	
	* **** * * ***** ***** ***** *****	

	481	540
KSJ3-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGC	
WP20-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGC	
WP41-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGC	
WP42-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGC	
KSJ11-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGC	
KSJ8-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCAC	
KSJ16-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCAC	
WP38-16S	GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCAC	
	*****	*
	541	600
KSJ3-16S	GTAGGCGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGCA	
WP20-16S	GTAGGCGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGCA	
WP41-16S	GTAGGCGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGCA	
WP42-16S	GTAGGCGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGCA	
KSJ11-16S	GTAGGCGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGCA	
KSJ8-16S	GCAGGCGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCATTGCA	
KSJ16-16S	GCAGGCGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCATTGCA	
WP38-16S	GCAGGCGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCATTGCA	
	* * * * *	* * * * *
	601	660
KSJ3-16S	TACTGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG	
WP20-16S	TACTGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG	
WP41-16S	TACTGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG	
WP42-16S	TACTGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG	
KSJ11-16S	AACTGGCAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCG	
KSJ8-16S	CACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG	
KSJ16-16S	AACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG	
WP38-16S	AACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG	
	*****	*****
	601	720
KSJ3-16S	TAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAG	
WP20-16S	TAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAG	
WP41-16S	TAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAG	
WP42-16S	TAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAG	
KSJ11-16S	TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCCACCTGGACTGATACTGACACTGAG	
KSJ8-16S	TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCACCTGGACTGATACTGACACTGAG	
KSJ16-16S	TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCACCTGGACTGATACTGACACTGAG	
WP38-16S	TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCACCTGGACTGATACTGACACTGAG	
	**** *	*****

	721	780
KSJ3-16S	GTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGAT	
WP20-16S	GTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGAT	
WP41-16S	GTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGAT	
WP42-16S	GTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGAT	
KSJ11-16S	GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT	
KSJ8-16S	GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT	
KSJ16-16S	GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT	
WP38-16S	GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT	
	*****	*****
	781	840
KSJ3-16S	GTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACC	
WP20-16S	GTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACC	
WP41-16S	GTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACC	
WP42-16S	GTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACC	
KSJ11-16S	GTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACC	
KSJ8-16S	GTCTACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACC	
KSJ16-16S	GTCTACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACC	
WP38-16S	GTCTACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACC	
	*** ** * * * * * ***** * * ** ***** *****	
	841	900
KSJ3-16S	GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
WP20-16S	GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
WP41-16S	GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
WP42-16S	GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
KSJ11-16S	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
KSJ8-16S	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
KSJ16-16S	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
WP38-16S	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC	
	***** ***** ***** ***** *****	
	901	960
KSJ3-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATAGT	
WP20-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATAGT	
WP41-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATAGT	
WP42-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATAGT	
KSJ11-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGCA	
KSJ8-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCA	
KSJ16-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCA	
WP38-16S	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCA	
	***** ***** ***** ***** *****	

	961	1020
KSJ3-16S	AAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTACATACAGGTGCTGCATGGCT	
WP20-16S	AAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTACATACAGGTGCTGCATGGCT	
WP41-16S	AGAAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTACATACAGGTGCTGCATGGCT	
WP42-16S	AGAAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTACATACAGGTGCTGCATGGCT	
KSJ11-16S	GAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCT	
KSJ8-16S	GAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCT	
KSJ16-16S	GAGAACTTAGCAGAGATGCTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCT	
WP38-16S	GAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCT	
	*****	*****
	1021	1080
KSJ3-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCC	
WP20-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCC	
WP41-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCC	
WP42-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCC	
KSJ11-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCC	
KSJ8-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGTAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCC	
KSJ16-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGTAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCC	
WP38-16S	GTCGTCAGCTCGTGTGTAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCC	
	*****	*****
	1081	1140
KSJ3-16S	TTATTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGA	
WP20-16S	TTATTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGA	
WP41-16S	TTACTTGCCAGCATTTCGGAT-GGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGA	
WP42-16S	TTACTTGCCAGCATTTCGGAT-GGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGA	
KSJ11-16S	TTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA	
KSJ8-16S	TTTGTGGCCAGCG-GCTAGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA	
KSJ16-16S	TTTGTGGCCAGCG-GTTCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA	
WP38-16S	TTTGTGGCCAGCG-GTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA	
	** ** *****	*** ** *****
	1141	1200
KSJ3-16S	AGGCGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAA	
WP20-16S	AGGCGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAA	
WP41-16S	AGGCGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAA	
WP42-16S	AGGCGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAA	
KSJ11-16S	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAA	
KSJ8-16S	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA	
KSJ16-16S	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA	
WP38-16S	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA	
	*** *****	*****

```

1201                                     1260
KSJ3-16S TGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTA
WP20-16S TGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTA
WP41-16S TGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTA
WP42-16S TGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTA
KSJ11-16S TGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTA
KSJ8-16S TGGCGCATAACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTA
KSJ16-16S TGGCGCATAACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTA
WP38-16S TGGCGCATAACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTA
***      **** * * * * *      ****      * * * * *      ****
1261                                     1320
KSJ3-16S GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
WP20-16S GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGGATCGCTAGTAATCGCGGATC
WP41-16S GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
WP42-16S GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
KSJ11-16S GTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTCGGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC
KSJ8-16S GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATC
KSJ16-16S GTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATC
WP38-16S GTCCGGATTGGAATCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATAGTAGATC
***** * * ***** * ***** ***** * ***** *
1321                                     1350
KSJ3-16S AGAATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
WP20-16S AGAATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
WP41-16S AGAATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
WP42-16S AGAATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
KSJ11-16S AGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
KSJ8-16S AGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
KSJ16-16S AGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
WP38-16S AGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGT
***** *****

```

그림 2. 불용성 인산염 가용화 균주(8종)간 16S rDNA 염기서열의 상호비교



그림 3. 불용화 인산염 가용화 균주 간 근연관계도

ClustalW 분석결과 16S rDNA 염기서열의 유사도는 KSJ8을 기준으로 유사도 순으로 배열하였을 때 KSJ16>WP38>KSJ11>KSJ3>WP20>WP42>WP41 순이었다. 또한 유사도의 상호관계 및 근연계통수를 분석한 결과는 표 3에 제시하였다. 유사도 상호관계는 83%에서 99%의 값을 보여주었다. 근연계통수를 보면 본 연구에서 선발된 불용성 인산염 가용화 균주간에는 KSJ16과 KSJ8, WP38, KSJ11, WP41과 WP42, KSJ3과 WP20의 5개군으로 구분됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 선발된 불용성 인산염 가용화 균주들의 분자생물학적 동정을 위하여 BLAST프로그램을 이용하여 각 선발균주의 16S rDNA 염기서열과 가장 유사한 16S rDNA를 지니고 있는 박테리아들의 유사성크기 순으로 분류하였다.

표 3. 불용화 인산염 가용화 균주 간 16S rDNA 염기서열의 유전유사도

	KSJ3	KSJ8	KSJ11	KSJ16	WP20	WP38	WP41	WP42
KSJ3	100							
KSJ8	84	100						
KSJ11	87	84	100					
KSJ16	84	97	84	100				
WP20	99	84	84	84	100			
WP38	85	97	85	97	85	100		
WP41	96	84	96	83	96	84	100	
WP42	97	84	96	83	96	84	99	100

위 결과로 불용성 인산염 가용화 균주의 분류·동정 결과를 표 4에 정리하였다. KSJ3와 WP20은 *Acinetobacter calcoaceticus*로 WP41와 WP42는 *Acinetobacter*속의 새로운 종으로 동정하였다. KSJ11은 *Pseudomonas putida*로, KSJ16은 *Enterobacter intermedius*의 새로운 종으로, WP38은 *Enterobacter asburiae*로, KSJ8은 *Enterobacter*속과 유사한 *Leclercia adacarboxylata*로 동정하였다.

본 연구는 토양에서 유래된 기능성 균주의 분자생물학적 계통분류 분석을 통한 동정을 수행한 것이다. 대상유전자는 그 database가 비교적 잘 구축된 유전자의 하나인 16S rDNA이었다. Drancourt 등(2000)은 GenBank에 등록된 균주들의 16S rDNA의 염기서열과 99% 이상의 상동성이 있는 경우에 종(species) 수준에서 동일한 것으로 분류할 수 있다. 본 연구팀이 탐색 선별한 균주들은 불용성 인산염 가용화 균주로 국내외적으로 최근에 연구되어진 균주들의 일부와 genus level 수준에서는 동일하지만 species level에서는 국내외적으로 처음 보고된 것들일 뿐 아니라 (KSJ 11 ; *Pseudomonas putida*, KSJ 16 ; *Enterobacter intermedius*), 불용성 인산염 가용화 활성이 있다는 것을 genus level에서도 국내외적으로 처음으로 보고되는 균주(KSJ 8 ; *Leclercia adacarboxylata*)도 있다. 즉, 균주 동정·분류결과, 본 연구에 의해 탐색된 균주들은 신규성이 있는 중요한 연구성으로 평가되어 현재 국제특허균주로 등록하였으며, 또한 국내특허출원 중에 있다.

표 4. 본 연구에 의해 선별된 불용성 인산염 가용화 균주의 동정

Clone	Taxon
KSJ3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
WP20	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
WP41	<i>Acinetobacter</i> sp.
WP42	<i>Acinetobacter</i> sp.
KSJ11	<i>Pseudomonas putida</i>
KSJ8	<i>Leclercia adacarboxylata</i>
KSJ16	<i>Enterobacter intermedius</i>
WP38	<i>Enterobacter asburiae</i>

제 4 장 불용성 인산염 가용화 균주의 활성능과 복원능

제1절 서론

최근 시설재배면적의 급격한 증가는 농가의 재배환경에 대한 인식부족으로 염류 및 양분의 과잉축적을 일으켜 토양 중 필수양분의 불균형, 작물의 수분흡수 저해, 염류농도장해 등 작물생육에 장애를 유발 시설재배의 중요 문제점으로 대두되고 있다. 무기염류는 농작물의 생육에 있어서 중요한 요소이다. 농작물은 필요한 량의 염류를 흡수하고 나머지는 흡수하지 않으므로 미생물이 소비하거나 흡비력을 높여 제거하지 않으면 염류가 계속 축적되어 식물은 살아 갈 수 없게 된다.

본 연구진에 의하여 제안된 염류장해 토양에서 미생물의 역할을 간단히 살펴보면 토양서식 **곰팡이**의 경우 그림 1과 같이 균사의 증식으로 토양 공극을 증가시켜 토양 내 공기 및 물의 흐름이 활발하게 할 수 있는 데, 장해토양에서 과도한 염류에 대응할 수 있는 곰팡이는 특유의 삼투저항성과 연관된 MAPK 활성 증가로 균사 분열이 촉진되어 결국은 토양공극이 커지는 물리적 변화를 일으키고, 토양의 물리적인 변화는 염의 배출력 증진으로 이어지게 된다. 따라서, 염류장해토양에 서식하는 내염성 곰팡이의 균사분열 연관 MAPK 활성을 증가시킬 수 있다면 곰팡이를 이용한 장해토양 개선에 일조할 수 있을 것이다. 또한, **박테리아**의 경우는 그림 2와 같이 각종 토양 내 인화합물을 분해, 흡수 및 축적하는 대사에 관련한 다양한 유전자들이 알려져 있다. 이들 유전자의 활성은 모든 박테리아에서 동일하지 않으며 특수하게 보다 높은 활성을 지닌 박테리아가 있다. 따라서, 인화합물의 가용화, 분해, 흡수 및 축적능이 뛰어난 박테리아를 선발하고 이들을 직접 이용하거나 더불어 다양한 인화합물 대사관련 유전자의 활성을 증가시킨 유전자 재조합체로 개량하여 장해토양 개선에 사용할 수 있을 것이다.

이러한 배경하에 2장에서 탐색되어진 불용성 인산염 가용화 균주를 이용하여 대표적 불용성인산염들을 첨가하여 제조한 배지에서의 활성스펙트럼을 조사하였고, 장해 토양에 접종하여 토양내 염류제거 및 가용화 효율을 조사하여 염류장해토양의 개선 및 복원효과를 분석하였다.

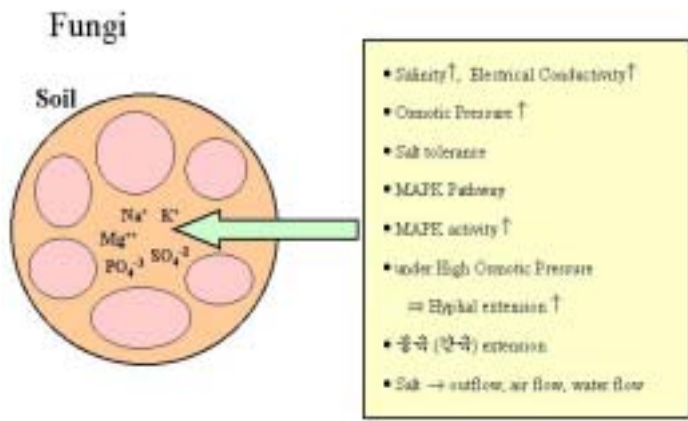


그림 1. 염류장애 토양 내 곰팡이의 역할

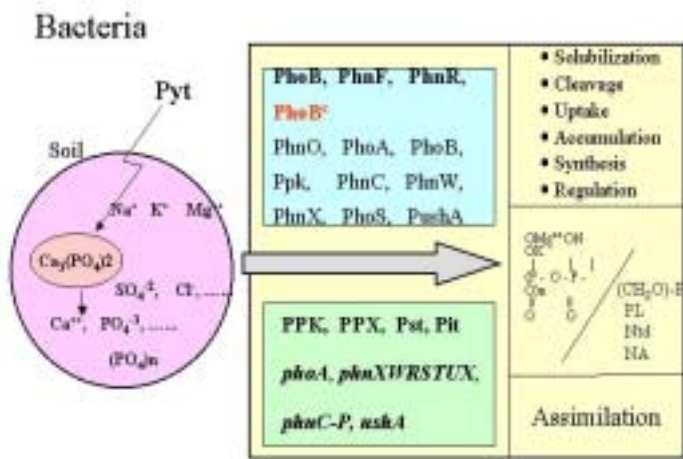


그림 2. 박테리아의 각종 인화합물 대사관련 유전자들

제2절 인산염가용화 균주의 활성능

1. 불용성 인산염 가용화 균주의 활성 스펙트럼

2장에 의해 탐색되어진 균주를 대상으로 우선적으로 tricalciumphosphate 가용화 균주로서 선별된 8개 균주(KSJ 3, KSJ 8, KSJ 11, KSJ 16, WP 20, WP 38, WP 41, WP 42)와 기확보된 KL 1114와 EBM 1, EBM 13, EBM 31 균주들을 대표적 불용성인산염인 hydroxyapatite, 인광석 및 phytic acid 등을 0.5% 농도로 첨가하여 제조한 배지에 접종하여 30℃에서 3~5일간 배양한 결과 나타난 활성스펙트럼은 표 1과 같이 나타났다.

그 결과, KSJ 11, KSJ 16, WP 42, WP41, KSJ 8 균주의 순으로 tricalciumphosphate 가용화 능이 뛰어났으며, KSJ16, KSJ 11, KSJ 8, WP 42 균주의 순으로 hydroxyapatite도 모두 가용화 시키므로써 광범위한 가용화 활성 스펙트럼을 지닌 불용성 인산염 가용화 균주로서 폭넓게 활용될 수 있을 것이다.

표 1. 불용성 인산염 가용화 스펙트럼

균주	tricalciumphosphate	hydroxyapatite	인광석	phytic acid
KSJ 3	◎	◎	○	○
KSJ 8	◎	●	○	◎
KSJ 11	●	●	○	◎
KSJ 16	●	●	○	◎
WP 20	○	◎	○	◎
WP 38	○	○	○	○
WP 41	◎	◎	○	◎
WP 42	●	●	○	○
KL 1114	-	-	-	◎
EBM 1	-	-	-	○
EBM 13	-	-	-	○
EBM 31	-	-	-	○

-:가용화능 없음, ○:보통(투명대 5mm이하), ◎:우수(투명대5~10mm), ●:매우우수(투명대 10mm이상)

2. 불용성 인산염 가용화 균주의 인산농도에 따른 세포생장을

인산염 가용화에 관련된 일련의 미생물 대사과정 연구결과, 토양처럼 가용성 인이 부족할 때 일반 미생물(*E. coli*, *Bacillus* sp.)에서는 인관련 대사가 촉진되는 효과(starvation effect)가 나타난다. 즉 인산결핍하에서도 인화합물의 분해, 흡수, 축적과 관련된 효소들의 활성이 증가되면서 환경에 잘 적응하게 되는데, 드물게는 세균수가 증가(생장증가) 되기도 하지만 일반적으로 생명만 유지할 수 있는 상태가 되거나, spore 등을 형성하여 척박한 환경에서 사멸되는 것을 방지하기도 한다. 이와같은 인 대사의 활성변화 조절과정을 선별된 불용성 인산염 가용화 균주의 경우에도 조사하여 체제화 및 균주활용에 필요한 기초 자료로 이용하고자 하였다.

선별된 균주를 대상으로 인의 농도를 다양하게(결핍, 제한, 충분 등의 상태로) 조정하였을 때 나타나는 starvation effect의 척도로 성장률 변화를 조사하였다. KH_2PO_4 를 농도별(0, 0.01, 0.02, 0.05 및 0.1 M)로 첨가한 NB와 MOPS 배지에서 배양하였을 때 대조군에 비해 흡광도가 40배 증가 했으나, KH_2PO_4 첨가 농도간 성장률은 유의적 차이는 없었다(data not shown).

또한, 불용성 인산염 가용화능이 우수한 균주를 대상으로 환경내 인산농도에 따른 성장률을 조사하기 위해서 **NB, MOPS, 일반토양추출액 및 장해토양추출액 배지**와 이들 배지에 0.1 M KH_2PO_4 를 첨가한 배지에 선별된 균주를 접종하여 30°C에서 1일간 교반 배양한 후 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하여 상대적 세포 성장률을 비교 조사하였다. 세포 성장율은 영양배지인 NB 배지에서는 차이를 보이지 않았으나, 최소배지인 MOPS 배지와 일반토양 추출액 배지 및 장해토양 추출액 배지에서는 KH_2PO_4 를 첨가하여 배양하였을 때 훨씬 더 좋은 성장률을 보였다(그림 3. 참조).

각각의 배지에 KH_2PO_4 를 첨가하지 않았을 때에도 약간의 성장이 이루어진 것은 배양배지에 인산이 결핍되어 있어도 세포분열에 필요한 무기인산은 세포내 인산(무기인산 중합체 등)에 좌우된다고 할 수 있다. 즉, 영양배지 조건에서는 세포생장을뿐 아니라 대사과정도 활발하여, 세포의 성장과 더불어 poly-P의 세포내 축적 보다는 분해활성이 활발하게 이루어져 그에 따라 세포의 생장이 높아지는 것으로 판단된다. 이에 비해 MOPS배지, 일반토양 및 장해토양 추출액 배지의 경우 성장율은 완전배지에 비해서 매우 낮았는데, 이는 영양원과

가용성 인의 량에 따른 생장의 억제 내지는 낮은 대사활동에 기인한 것으로 여겨진다.

그러나, KH_2PO_4 를 첨가한 경우는 독특한 성장율의 상대적 증가를 볼 수 있었다. 완전배지에서는 성장율이 균주에 따라 유사하거나 높아지는 경향을 보이므로 이는 영양원과 공급된 인의 량의 증가에 기인하는 것으로 판단된다. 이때 세포는 인을 poly-P 형태로 세포내에 축적하거나 직접 대사과정에 이용하는 것으로 판단된다. MOPS, 일반토양과 장해토양배지의 경우는 대조군에 비해 매우 높은 성장율의 증가를 볼 수 있다. MOPS 배지의 경우는, 탄소원과 질소원 등의 영양원은 기본적으로 포함되어 있으나 인은 완전히 제거된 배양액이므로, 성장 제한 요인으로 인이 작용하여 생장이 거의 억제된다. KH_2PO_4 를 첨가하였을 때는 공급된 인을 세포내에 poly-P상태로 축적하기보다는 직접 성장 관련 대사과정에 사용하므로서 급격한 성장 증가를 나타낸다고 할 수 있다. 이에 비해 일반토양의 경우는 인의 량뿐 만 아니라 영양원도 부족한 상태이므로 비록 성장율은 4 ~ 5배 증가되나 전체적으로는 매우 낮은 균체의 증가를 나타낸 것이다. 장해토양의 경우는 영양원과 인의 함량은 상대적으로 부족하지 않으나 인의 경우 불용성염화 인화합물 상태이므로 균주가 이를 가용화하는데 있어 시간을 필요로 하는 것으로 여겨지며 이에 따라 배양 1일 동안의 성장율이 높지 않은 결과를 나타내는 원인으로 설명할 수 있다.

이처럼, 균주의 성장 정도는 배양조건 뿐 아니라 균주간에서도 차이를 나타내기 때문에 장해토양의 개선에 본 균주들을 사용할 때에는 이러한 성장양상을 고려하면서 염류장해 토양내 불용성 인산염 가용화 능력, 토양내 인산염 함량 및 기타 인 화합물의 분해·축적 등에 관련한 여러 가지 기구(효소, 수송단백질, 조절단백질)들의 종합적인 cross regulation까지 감안할 때야 비로서 환경 복원제의 formulation이 완성될 수 있다.

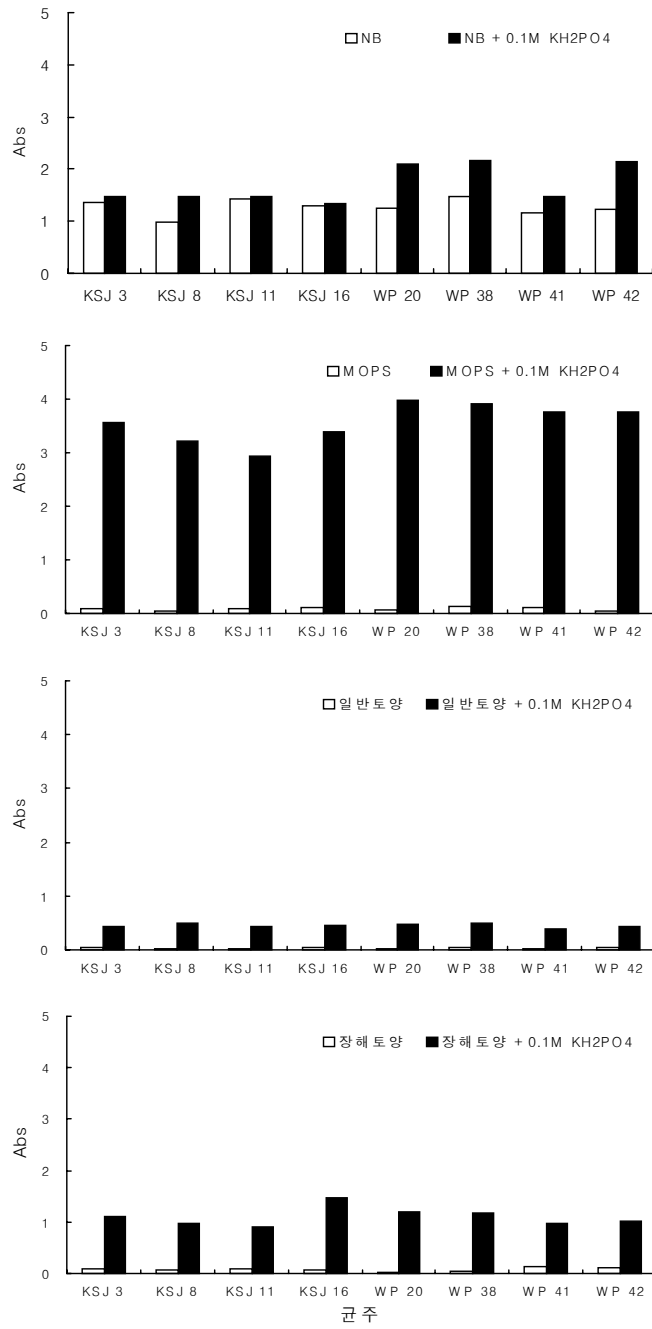


그림 3. 불용성 인산염 가용화 균주의 인산첨가에 따른 생장을 비교

3. 환경조건에 따른 인산화합물 분해효소들의 기여도와 발현조절

인산염 과다축적 정도에 따른 인산화합물 분해효소의 환경내 역할을 조사하기 위해 여러조건하에서 (NB, NB + 0.1 M KH_2PO_4 , MOPS, MOPS + 0.1 M KH_2PO_4 , 일반토양, 일반토양 + 0.1 M KH_2PO_4 , 장해토양, 장해토양 + 0.1 M KH_2PO_4) 인산화합물 분해효소의 활성도를 측정하여 인 결핍시와 인 충분시의 효소활성도 및 발현정도를 비교조사 하였다.

인산화합물 분해효소의 활성도 측정법은 다음과 같다.

탐색되어진 균주들을 표 1의 배지에 0.1 M의 KH_2PO_4 를 첨가하거나 첨가하지 않은 배지에서 배양하였으며, 배양된 세포를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 수확한 후 0.2 M NaCl 용액으로 2번 세척하였다. 세척한 세포를 Huges의 방법에 따라 4°C에서 5분간 초음파 마쇄하여(Sonic dismembrator, Sonics & Materials, 500W) 세포내 단백질을 추출하였다. 이와같이 조제된 효소추출액의 acid phosphatase(ACPase), neutral phosphatase(NEPase) 및 alkaline phosphatase(ALPase)의 활성도를 측정하기 위하여 Ernst(1975)가 고안한 방법을 적용하였다. 즉, p-NPP를 분해하는 효소는 여러 가지 type이 존재하므로 이들을 구분하기 위하여 basic 반응액(p-NPP 5 mM, MgCl_2 10 mM, KCl 10 mM)에 ALPase는 pH 9.0(0.1 M Tris-Cl buffer), NEPase는 pH 7.0(0.1 M Tris-Cl buffer), ACPase는 pH 4.5(0.1 M acetate buffer)를 사용하였다.

이와같이 조제된 반응액에 효소추출액을 1ml씩을 넣고, 대조군에는 동량의 증류수를 넣어 잘 섞은 후, 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, 37.5% TCA(trichloroacetic acid) 용액을 0.5 ml을 첨가하여 효소의 반응을 정지시켰다. 반응이 중지된 후 재발색시키기 위하여 1 N NaOH 용액 2.5 ml을 넣은 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 노란색의 p-NP 상등액을 410 nm에서 나타내는 흡광도를 측정하여 ALPase, NEPase, ACPase 활성도를 측정하였다.

한편, Polyphosphatase (poly-Pase)의 활성도 측정은 Kulaev와 Konoshenko(1971)의 방법에 의거하였다. 0.5 M Tris-Cl buffer(pH 7.4) 0.1 ml, 0.01 M MgCl_2 0.5 ml, 2 M KCl 0.05 ml, 기질용액(poly-P(n=15) 1 mg/ml) 0.1 ml에 효소추출액 0.2 ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 7% PCA 용액을 0.5 ml 가하여 반응을 정지 시켰다. 원심분리 후 상등액을 적량

취하여 ortho-P 정량방법을 이용하여 효소의 반응결과 생성된 ortho-P를 정량함으로써 활성도를 구하였으며, 단백질의 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 적용하였다.

즉, 인대사과정 중 대부분의 인산염 분해효소의 조절과정은 인결핍시에 상대적으로 효소발현이 induction되며 인충분시에는 효소발현이 repression된다. 따라서 starvation 상태(인 결핍시, induction 상태)때 효소활성도를 (I), Vegetative 상태(인충분시, repression 상태)때 효소활성도를(R)이라고 할 때 상대적비율(I/R)을 조사하였다. 단, 이미 NB 배지의 경우 충분한 인이 함유되었으므로 추가로 인을 첨가 안 했을 때 효소활성도(VI), 추가로 인산을 첨가했을 때 효소활성도(VR)로 한다. 이러한 I/R 값의 지표는 인산 축적정도에 따른 인산염 분해효소의 발현 정도를 이해할 수 있어 I/R 값은 토양상태에 따라 가용화 균주의 활용과 관련된 선별기준 지표로 이용될 수 있다. 불용성 인산염 가용화 세균(8종)의 인 결핍시와 인 충분시의 인화합물 분해효소 활성도 변화는 거의 유사한 경향을 나타내어 이들의 평균 활성도 값을 적용하여 I/R 값을 산출하였다.

ALPase, NEPase, ACPase 모두 인결핍시(일반토양, 장해토양, MOPS)에 인충분시에 비하여 효소활성이 상대적으로 높아 토양환경내에서도 인화합물 분해에 유용한 효소균으로 판명되었다. 특히, poly-Pase는 인산결핍시, 충분시 모두 상당한 활성도를 유지함으로써 토양 생태계내에서 인산화합물 순환과정에 중요한 역할을 하는 효소임이 입증되었다.

표 2. 인산화합물 분해효소의 발현비율

배양조건	ACPase	I/R	NEPase	I/R	ALPase	I/R	poly-Pase	I/R
NB(VI)	6147	0.54	2977	0.60	3984	0.87	7267	1.47
NB + 0.1(VR)	11415		4968		4601		4944	
MOPS(I)	5733	0.58	33060	5.63	31989	10.47	16212	6.21
MOPS + 0.1(R)	9893		5872		3055		2612	
일반토양(I)	426	3.41	308	2.08	4038	1.64	10611	0.72
일반토양 + 0.1(R)	125		148		2457		14790	
장해토양(I)	1240	3.06	159	1.59	4081	1.65	15894	0.93
장해토양 + 0.1(R)	405		100		2477		17242	

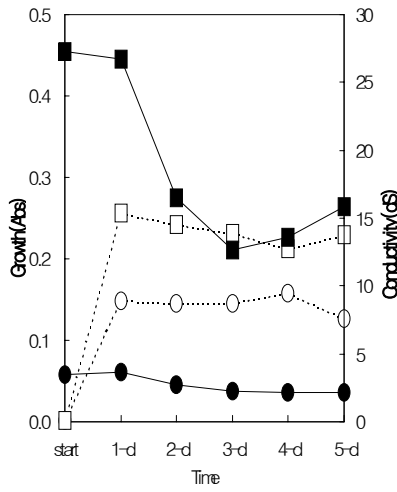
4. 불용성 인산염 가용화 균주의 생장에 따른 poly-Pase 활성도, ortho-P 및 염류제거능

상기의 결과를 토대로 KSJ 8, WP 38 및 WP 42 균주와 본 연구진들에 의하여 개발된 기능성 균주인 KL 1114 균주에 대하여 시기별로 성장률과 poly-Pase 활성도 및 염류제거능과의 상호 연관성을 알아보하고자, 토양 추출액 배지에 각각의 균주를 접종하여 시기별로 성장률을 측정하면서 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 수획한 세포를 이용하여 poly-Pase 활성도를 측정하였으며, 배양 상등액을 이용하여 conductivity를 측정하였다.

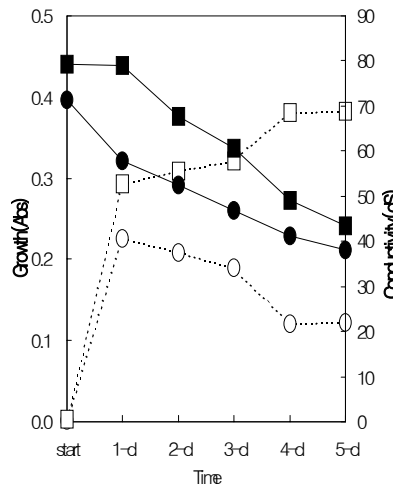
불용성 인산염 가용화 균주들인 KSJ 8, WP 38 및 WP 42 균주들은 일반토양 추출액배지에서의 성장률은 1일째만에 최대생장을 하였다. 기능성 균주인 KL 1114의 경우는 지속적인 성장을 하였으며, 인산염 장해토양 추출액 배지에서는 일반토양 추출액 배지보다 성장율이 증가하였는데 이는 인산염 장해토양에는 시비 등으로 인하여 토양내에 잔존되어 있는 영양분들과 불용성 인산염을 가용화 시키면서 성장을 하기 때문에 일반토양에 비하여 성장률이 증가한 것으로 판단된다.

염류장해의 척도로 이용되고 있는 conductivity값 변화의 경우 불용성 인산염 가용화 균주들에서 모두 점차적으로 conductivity 값을 감소시키는 경향을 보이고 있으나 KL 1114 균주에서는 불용성 인산염 가용화 균주들에 비하여 conductivity 값을 감소시키는 능력이 부족한 것으로 나타났다.

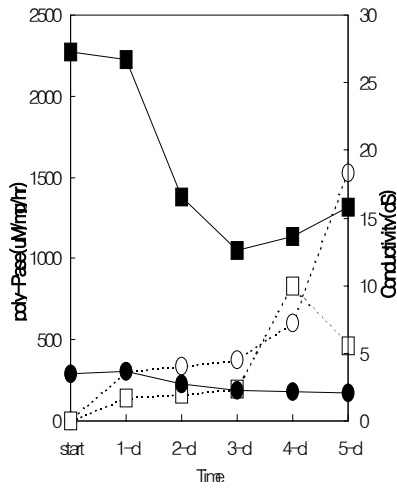
일반토양 추출액 배지와 장해토양 추출액 배지에서의 poly-Pase 활성도 변화의 경우 KSJ 8 균주와 WP 38 균주는 일반토양 추출액 배지에서 장해토양 추출액 배지에 비하여 더 좋은 활성을 나타냈다. Poly-Pase의 활성도는 conductivity 변화와 반비례되어 나타나 부의 상관관계를 나타내어, conductivity 값이 최대로 감소될 때 최고의 활성을 나타내어, 염류제거에 중요한 일익을 담당하는 효소균으로 생각된다.



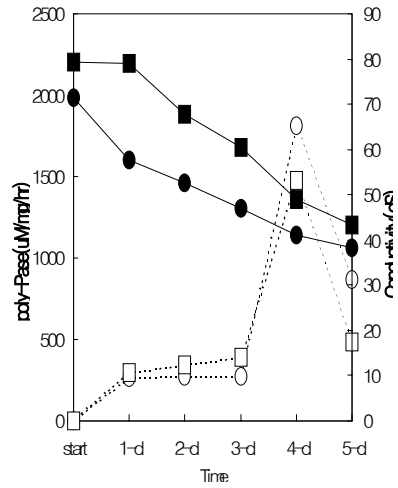
토양추출액배지



토양추출액배지 + 0.1 M KH₂PO₄



토양추출액배지



토양추출액배지 + 0.1 M KH₂PO₄

그림 4. 불용성인산염 가용화 균주(KSJ 8)의 생장률과 poly-Pase 활성도 및 Conductivity 변화

- 일반토양, 일반토양 + 0.1 M KH₂PO₄ : Growth,
- 장해토양, 장해토양 + 0.1 M KH₂PO₄ : Growth,
- 일반토양, 일반토양 + 0.1 M KH₂PO₄ : Conductivity
- 장해토양, 장해토양 + 0.1 M KH₂PO₄ : Conductivity

5. 여러 가지 불용성 인산염 가용화능과 성장률 및 염류제거능

다른한편으로 최소배지인 MOPS 배지에 phosphate를 결핍시킨 후 불용성 인산염인 phytic acid, tricalciumphosphate, hydroxyapatite 및 인광석을 phosphate solubilizing media에 각각 0.5%로 첨가하여 배지를 조제한 후 균주들을 접종하여 시기별로 10 ml씩 취하여 성장률을 측정한 후 배양액을 원심분리한 후 상등액을 이용하여 배지에 가용화된 Pi를 측정하여, 불용성 인산염의 가용화와 분해정도를 조사하였다.

그 결과 성장률은 그림 5와 같이 불용성 인산염 배지간에 다소 차이는 있으나 공시균주 대부분이 배양후 3일째에 최대성장량을 보였다. 유리된 Pi 함량변화의 경우 유일한 인원으로 공급한 hydroxyapatite 배지 그리고 tricalciumphosphate 배지 순서로 공시균주 모두에서 Pi의 양이 높게 나타나 hydroxyapatite와 tricalciumphosphate의 가용화가 매우 왕성함을 보였다.

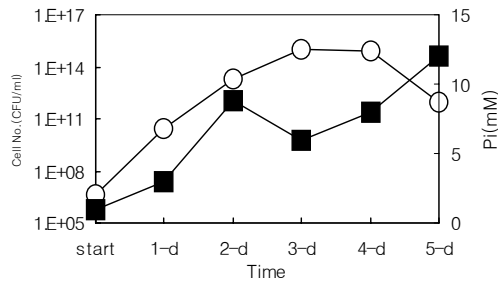
6. 장해토양에 인산염 가용화 균주 접종 후 이온 변화

토양내 4가지 주요 양이온(Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+})의 대부분은 화학비료와 토양개량제의 사용과 유기질 비료의 분해과정 중에 발생되며, 주요 음이온(Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{2-})들은 주로 화학비료에 의해 토양에 공급되어 화학적으로 해리되어 생기거나, 생물학적 전환에 의해 토양내에 존재한다(정 등, 1997). 시설재배지내 이온들은 일반 노지 토양에 비해 약 3배 이상 높다고 보고(정 등, 1994)되었다.

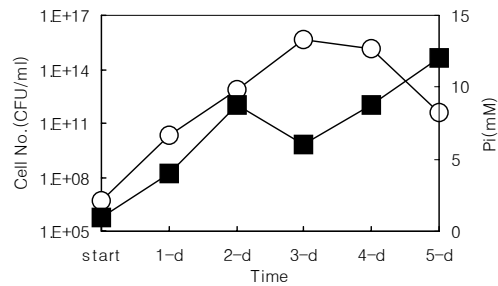
이러한 배경하에 본 연구진에 의하여 탐색되어진 인산염 가용화 균주들을 장해토양에 접종하여 시기별로 이온변화를 한국기초과학지원연구소의 이온크로마토그래피(IC)와 유도플라즈마결합분석기(ICP)를 이용하여 정량하였다.

가. 시료 전처리

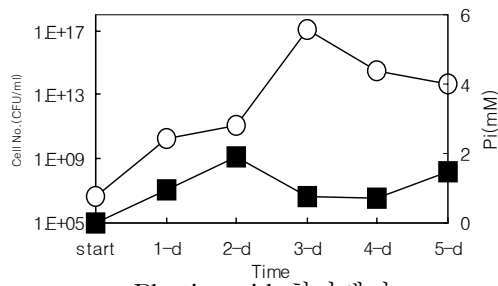
각각의 균주들을 LB 배지 5ml에서 전 배양하여 멸균 증류수 1ml에 현탁시킨 후 LB 배지 100ml에 현탁액 100 μ l를 접종하여 16 ~ 18 시간동안 배양하여 원심분리(12,000rpm, 10분) 후 상등액을 제거한 각각의 균주에 0.85% saline으로 3번 washing한 후 멸균 증류수로 2번 washing하여 각각의 균주들을 ml당 10^7 CFU(KSJ8 : 4×10^7 CFU/ml, KSJ16 : 9.6×10^7 CFU/ml, WP38 : 2.22×10^7 CFU/ml, KL1114 : 9.27×10^7 CFU/ml)가 되도록 현탁하여 멸균된 염류장해토



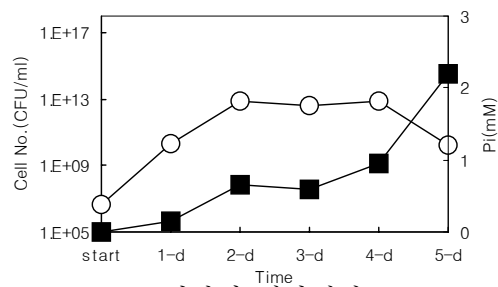
Tricalciumphosphate 첨가배지



Hydroxyapatite 첨가배지



Phytic acid 첨가배지



인광석 첨가배지

그림 5. 불용성 인산염 첨가배지에서 불용성 인산염 가용화 균주(KSJ8)의
 생장률 및 가용화 ○-○ : Growth, ■-■ : Pi

양 150g에 현탁액 50ml을 접종하여 시기별로 10g씩을 회수하여 멸균증류수를 50ml를 첨가하여 30분 동안 교반시켰다. 교반 후 원심분리(12,000 rpm, 15분)하여 상등액을 취하여 Millipore co.의 0.22 μ m filter paper를 이용하여 여과한 후 Millipore co.의 Microcon YM-3(3,000 NMWL)로 재여과하여 음이온 및 양이온 분석용 시료로 이용하였다. 이온분석은 한국기초과학지원연구소의 이온크로마토그래피(IC)와 유도플라즈마결합분석기(ICP)를 이용하여 정량하였다.

나. 음이온분석

토양내 주요 음이온 중 Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} 등, 4종의 음이온을 분석대상으로 하였으며, 한국기초과학지원연구소의 Bio-LC DX-300(Dionex, USA) 시스템을 이용하였다.

장해토양에 인산염 가용화 균주를 접종하여 토양내의 수용성 음이온 변화를 조사한 결과(그림 6. 참조), Cl^- 이온과 NO_3^- 이온의 경우 커다란 차이를 보이지 않았으나, SO_4^{2-} 이온의 경우 KSJ 8 균주를 처리하였을 때 3일째 큰 폭으로 감소하였으며, PO_4^{3-} 이온의 경우에는 각각의 균주들에서 3~4일째에 큰 폭으로 감소되었다. Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} 이온들은 토양교질과 비특이적 음이온반응 특성을 가지고 있어 결합력이 비교적 약하고 토양수에 의해 이행성이 높은 결과로 해석되어 질 수 있다. 한편, PO_4^{3-} 이온은 토양교질과 특이적 음이온반응에 의한 강한 결합력으로 인하여 물에 의한 용출이 거의 이루어지지 않으며(정 등, 1997), 또한 인산의 함량이 높은 비옥한 토양이라도 토양 용액 중 농도가 매우 낮기 때문에 토양중에서 거의 이동되지 않는다는 것이 일반적인 통념으로 받아들여지고 있으나(Mengel, 1985, Sharma *et al.*, 1985), 본 연구진에 의하여 탐색되어진 균주들은 인산염을 가용화 시키는 능력이 탁월하여 이러한 일반적인 통념들을 바꿀 수 있는 획기적인 균주들이라 할 수 있겠다.

다. 양이온분석

토양내 주요 양이온 중 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 등, 4종의 양이온을 분석대상으로 하였으며, 한국기초과학지원연구소의 Bio-LC DX-300(Dionex, USA) 시스템을 이용하였다.

장해토양에 인산염 가용화 균주를 처리하여 토양내의 양이온을 분석한 결과

그림 7과 같이 나타났다.

사용된 균주들은 Ca^{2+} 이온의 변화가 가장 크게 나타났는데, 이는 토양내 Ca^{2+} 과 결합할 수 있는 불용성 염의 양(특히, tricalciumphosphate)을 변화시킬 수 있음을 보여준다.

또한 그 함량은 변화가 미미하나 연속적인 변화를 모든 양이온에서 나타내고 있어 본 균주들이 토양내에서 왕성히 활동하여 토양의 염 형성을 변화시키므로써 가용성 인의 노출은 지속적으로 제공하는 것으로 판단된다.

이와같은 균주들의 활동은 작물이 성장하는 토양에 본 균주들을 접종하였을 때 유용한 양이온과 가용성 인의 함량을 높여 궁극적으로 작물의 생육을 증진시킬 수 있는 토양환경을 제공할 것으로 판단된다.

7. 제형화 기법에 따른 염류제거 효율의 증진

염류제거 효율의 증진을 위하여 불용성인산염 가용화능이 우수한 WP 42 균주를 식물섬유소성 소재인 CCF, POF와 염류장해 개선제로 시중에서 판매되고 있는 키틴함유제를 본 균주와 혼합한 제제를 염류장해 토양에 적용하여 염류제거능을 조사하였다.

부동재(CCF, POF, 키틴함유제)와 DW를 1 : 3(v : v)의 비율로 섞은 다음, WP42 균주를 10^7 (CFU/ml)로 조정하여 혼합한 후 장해토양에 접종하였다. 접종 후 3일째에 염류제거능을 조사한 결과 표 4에서와 같이 WP42 균주에 식물섬유소성 소재인 POF를 첨가하였을 때에 염류제거능이 가장 우수하게 나타났다. 반면에 CCF와 키틴함유제는 오히려 conductivity를 증가시키므로써 부동재로서는 부적절하였다. 이러한 결과를 토대로 식물섬유소성 소재인 POF와 본 연구에 사용되어진 불용성인산염 가용화 균주를 혼합하여 염류장해 토양에 적용하면 염류제거는 물론 토양 개량 증진에 탁월한 효과를 가져오리라 판단된다.

표 3. 인산염 가용화 균주를 장해토양에 3일간 처리 한 후 염류제거 개선도

장해토양	균주 + DW	균주 + POF	균주 + CCF	균주 + 키틴함유제
0	+21%	+45%	-32%	-15%

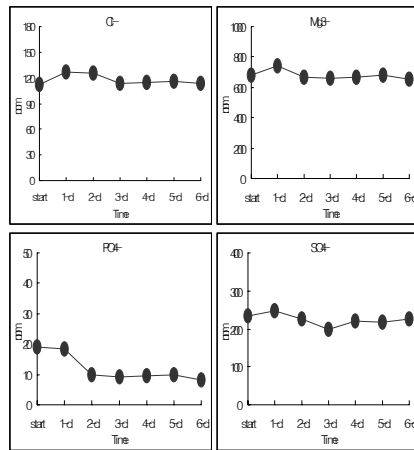
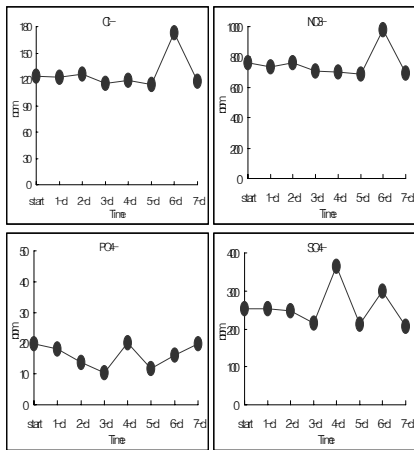
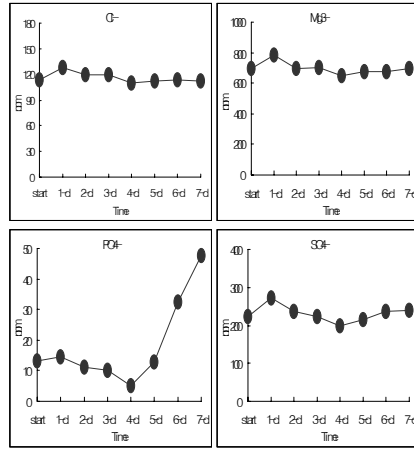
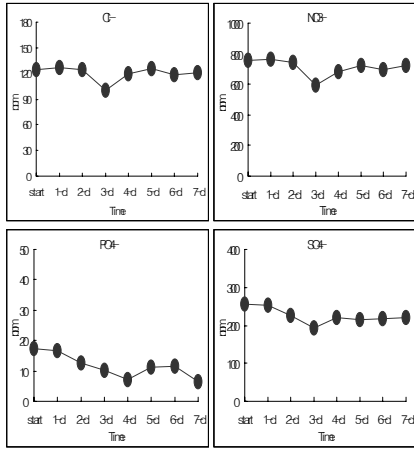
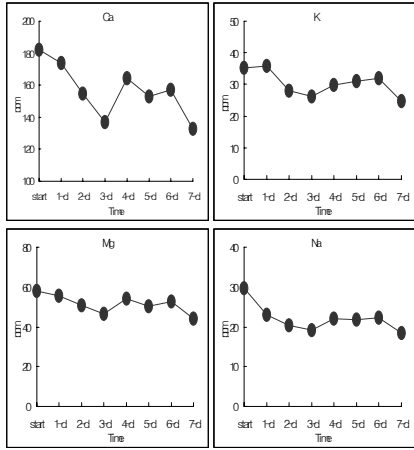
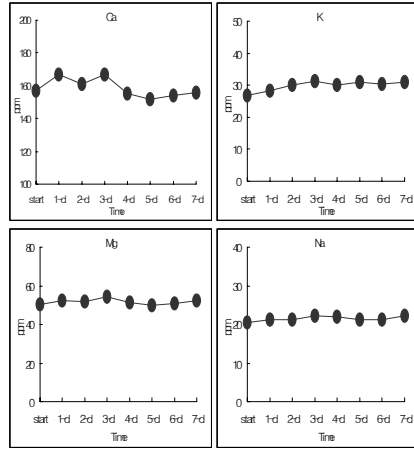


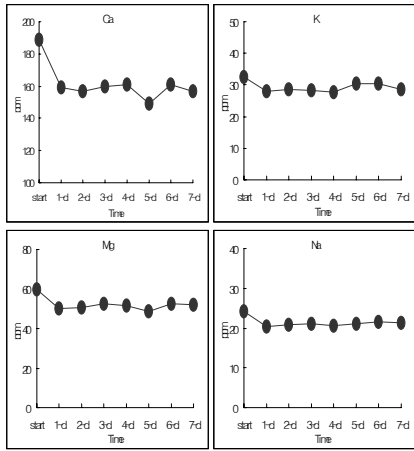
그림 6. 장해토양에 인산염 가용화 균주 처리시 음이온 변화



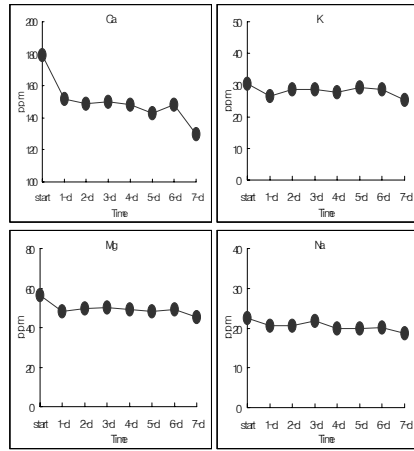
KSJ 8



KSJ 16



WP 38



KL 1114

그림 7. 장해토양에 인산염 가용화 균주 처리시 양이온 변화

제 5 장 인제거용 유전자재조합 세균 개발

제1절 서론

미생물은 환경에 존재하는 불용성 및 가용성 인화합물을 이용하기 위해 독특한 인화합물 대사과정을 지니고 있다(그림 4-1, 4-2). 본 연구과제에서는 인화합물 대사과정에 관여하는 여러 가지 유전자를 활용하여 ① 염류장해 토양내의 불용성 인산염 가용화를 비롯하여, ② 가용화된 인산을 농작물이 이용하기 쉽도록 하면서, 또한 ③ 여분의 가용화된 인산을 미생물 세포내로 수송·축적하는 자화과정을 통해 미생물의 지속적인 생장을 유지하면서 계속적으로 불용성 인산염을 가용화함으로써, ④ 일련의 토양생태계내 인화합물의 순환이 원활할 수 있도록, ⑤ 인산 염류의 분해·가용화, 수송·축적·자화능이 증강된 유전자재조합 세균을 개발하고자 하였다.

요약하건데, 본 항에서는 ① 불용성 인산염 가용화 균주로부터 가용화 유전자(phytase gene, *pqq* gene 등)의 클로닝, 구조분석과 특성규명, ② 가용성 인산화합물 분해, 수송, 축적 및 조절에 관여하는 유전자들(*phoA*, *ushA*, *phnFGHIJKLMNOP*, *ppk*, *phnR*, *phnO*, *phoBR*)의 클로닝, 구조분석, 특성규명과 과대발현계 구축은 물론 ③ 이들의 총체적인 형질전환 재조합체 구축 뿐만 아니라, ④ 전사 조절 유전자의 돌연변이연구와 강력한 promoter 부위의 활성도 연구 등을 통하여 ⑤ 보다 강력한 인대사관련 염류장해 토양 복원용 초강력 재조합체 (불용성 인산염 가용화 능력이 증강되고 각종 인산화합물의 분해, 수송, 축적, 자화 능력이 증강된)를 구축하고자 하였다.

제2절 인제거용 유전자재조합 세균 개발

1. 클로닝 기법

본 연구에서 유전자 클로닝 기법은 유전자에 따라 *in vivo* molecular cloning, PCR cloning, shotgun cloning 방법들을 사용하였다.

2. poly-P 합성 및 분해유전자(*ppk*)

Poly phosphate (poly-P)는 orthophosphate (Pi)가 수개 혹은 수백 개가 연

결된 polymer로서 고에너지 phosphoanhydride bond를 형성하고 있는 세포내 대량의 인 보관물질이다. Poly-P는 현재까지 다음과 같은 여러가지 중요한 기능들을 수행하는 것으로 밝혀져 왔다. ① 에너지 저장원, ② 금속이온의 chelator, ③ alkaline에 대한 완충역할, ④ 세균의 capsule 구성성분, ⑤ DNA transformation에 영향, ⑥ 부영양화에 미치는 pollutant phosphate의 제거에 유용, ⑦ 세포의 성장, 발달, stress, 영양고갈 등에서 생리조절인자와 ⑧ stationary phase에서 생존에 영향을 주는 등 세포내에서 다양한 기능을 보인다. 세균에서는 poly-P 대사에 관련하여 poly-P kinase(Ppk)와 exopolyphosphatase(Ppx)가 주로 작용한다. Ppk는 poly-P를 ATP로 전환시키며 그 역반응도 가능하다 ($n\text{ATP} \leftrightarrow \text{poly P}_n + n\text{ADP}$). PPK는 ADP가 과량 있을 때 poly P를 ATP로 전환시킨다. PPK는 poly P의 말단 잔기로부터 무기인산 (Pi)을 점차적으로 제거한다. 따라서 *ppk* 유전자의 발현 증강 재조합체 구축은 장해토양의 개선에 유용하다.

ppk 유전자를 확보하고자 다양한 primer를 제작(표 1)하여 사용하였다. 그 결과 8균주의 PSB 균주중에 WP38과 KSJ8 균주에서 *ppk*를 클로닝하였다. 염기서열을 결정한 결과 WP38의 경우 *Klebsiella aerogenes*의 *ppk* 유전자와의 상동성이 98%로 가장 높았고 *Pseudomonas aeruginosa*와는 25%로 가장 낮았다. KSJ8의 경우도 *Klebsiella aerogenes*의 *ppk* 유전자와 상동성이 87%로 가장 높았고 *Pseudomonas aeruginosa*와는 25%로 가장 낮았다. WP38과 KSJ8의 *ppk* 염기서열상의 상동성을 분석한 결과 87%로 나타났다(표 2, 그림 1). 또한 아미노산 서열의 homology를 비교한 결과 WP38은 *Klebsiella aerogenes*와 98%로 가장 높았고 *Pseudomonas aeruginosa*와는 33%로 가장 낮았다. KSJ8의 경우도 *Klebsiella aerogenes* 95%로 가장 높았고 *Pseudomonas aeruginosa*와는 33%로 가장 낮았다. WP38과 KSJ8의 Ppk 아미노산 서열 상동성은 96%로 나타났다(표 3, 그림 2).

표 1. *ppk* 클로닝용 primer들

Primer	Sequence
ppk 2F	5'-CGGGATCCATATGAGTGCCGATAAGCTGTACATC-3'
ppk 2R	5'-CCCAAGCTTTTACTIGACTACTIGTIGTCATCGTTTC-3'
ppk 3F	5'-AACTGCAGATGCAAACAATCCGAATATG-3'
ppk 3R	5'-CGCTCGAGTTAGTTTTCTTTGAAAAGTTAGAAGCTAAG-3'
ppk 4F	5'-AACTGCAGCATATGGGTCAGGAAAAGCTATATATC-3'
ppk 4R	5'-AACTGCAGCATATGGGTCAGGAAAAGCTATATATC-3'

KSJ8 -----ATGGGTCAGGAAAAGCTATATCTCGAGAAAAGATTAAG 38
 WP38 -----ATGGGTCAGGAAAAGTTATATATCTCGAGAAAAGAGCTAAG 38

 KSJ8 CTGGTTAGCATTCAACGAGCGGTGCTTCAGGAAGCAGCGGATAAAAGTAAACCCGCTGAT 98
 WP38 CTGGTTAGCATTCAACGAGCGTGTACTCCAGGAAGCGGACAAAAGTAAACCCGCTTAT 98

 KSJ8 TGAGCGCATGCGTTTTCTGGGGATTACTCAAAACAATCTGGACGAGTTCTACAAAGTTTCG 158
 WP38 CGAGCGCATGCGTTTTTTGGGCATTTATTCACCAACCTGGATGAGTTCTACAAAGTTTCG 158

 KSJ8 CTTTGTGAAGTCAAACGCGAATCATCATTAGCGAAGAGCAGGGTTTGAACTCGAAATTC 218
 WP38 CTTTGCAGACTGAAAGAGCGCATCATCATCAGCGAAGAACAGGGCTTAAACTCGCACTC 218

 KSJ8 GCGTCATCTGCTTGGCAAGATCCAGTCCCGGGTCTAAAAGCCGATCAGGAATTTGACA 277
 WP38 GCGCATCTGCTGGGCAAAATCCAGTCCCGGTGCTGAAAGCCGATCAGGAATTTGACG 277

 KSJ8 GTCTGTATAACGAATTGCTGCTGGAGATGGCAACCAATCAAACTTCCCTGAT 329
 WP38 GCCTGTATAACGAATTGCTGCTGGAGATGGCGCGCAATCAAACTTCCCTGAT 329

 KSJ8 CAACGAGCGACAACCTCTCGGTCAACCAGCAGAACTGGCTGCGCCACTATTTCAAACAGT 388
 WP38 TAACGAACCGCCAGCTTTCGGTTAAACCAACAACCTGGCTGCGCCACTACTTCAAACACT 388

 KSJ8 ATCTGCGCCAGCACATCAACCCCATTTCTGATTAACCGTGAACCCGATCTGGTGCAGTTCC 448
 WP38 ATCTGCGCCAGCACATCAACCCGATTTCTATCAACCCGCAACCCGATCTGGTTCAAGTTCC 448

 KSJ8 TGAAGGATGACTACACCTATCTGGCGGTGGAAATTAATCCGCGCACAGCAITTCGCTATG 508
 WP38 TGAAGGATGATTACACCTACCTGGCGGTGGAAATTAATTCGCGGTGAATCTATCCGTTACG 508

 KSJ8 CGCTGCTGGAGATCCCGTCCAGATAAGTGGCGCGCTTCGTCATCTGCGCG 559
 WP38 CGCTGCTGGAGATCCCGTCCGACAAGTGGCGCGCTTTGTAACCTGCGCG 559

 KSJ8 CGGAAACGCGCGCTGCTGCAAGCCGATGATCCTGCTGGATAACATCTGCGCTACTG 617
 WP38 CGGAAACCGCGCGCACAGCAAGCCGATGATCCTGCTGGATAACATCTGCGCTACTG 617

 KSJ8 TCTGGAGCAGCATCTTAAAGGCTTCTCGATTAACGACCGCTGAACGCCTATTTCCATGAA 677
 WP38 TCTGGAGCAGCATCTTAAAGGCTTCTCGATTAACGACCGCTTAAACGCCTATTTCCATGAA 677

 KSJ8 GATGACCCGTGAGCGCGAGTACGACCTGGTGACAGAGATGGAAGCCAGCCTGATGGAGCT 737
 WP38 GATGACCCGTGAGCGCGAATATGACCTGGTGACAGAGATGGAAGCCAGCCTGATGGAGCT 737

 KSJ8 GATGCTCCAGCCTTAAAGCAAGCTTACCGCGAGCCGCTGCGCTTTGTTTATCAGCG 797
 WP38 GATGCTCCAGCCTGAAACAGCGCTGACGGCCGAAACCGGTACGTTTGTCTATCAGCG 797

 KSJ8 CGATATGCCGGATGCGATGGTCCGATGCTGCGTGAAGAGTACCATCTCCCGCTACG 856
 WP38 CGATATGCCGGAGCCCATGGTGGAGATGCTGCGGAGAAACTGACCATTTCCCGCTATG 856

 KSJ8 ACTCCATCGTGCAGGGTGGTTCCTATCAACTTTAAAGACTTTATCGGCTTCCCGAAC 915
 WP38 ACTCCATCGTACCGGGCGTCTTACCACACTTTAAAGACTTTATGGCTTCCCGAAC 915

 KSJ8 GTCCGGCAAGCCAACTGGTGAACAGCCGCTGCGCGCCTGCGCCATATTTGGTT 971
 WP38 GTCCGGCAAGCCAACTGGTGAACAGCCGCTGCGCGCCTGCGCCATCTGTGGTT 971

 KSJ8 CGATAAGTCCGCAACGGCTTCGATGCCATCCGCGAGCGGACCTCTGCTCTA 1025
 WP38 CGATAAATTCGCAACGGATTTCGATGCCATCCGCGAAGCGGACCTCTGCTCTA 1025

 KSJ8 CTACCCGTACCACACCTTTGAACACGCTGCTGGAGCTGATGCGTCAGGCGTCTGATCC 1085
 WP38 CTATCCGTATCACACGTTTGAACACGCTGCTGAACTGCTGCGTCAGGCGTCTGATCC 1085

 KSJ8 CAACGTGCTGGCGATCAAATCAACATCTACCGCGTGGCGAAAGACTCCCGCATTATTGA 1145
 WP38 GAGCGTCTGGCGATCAAATCAACATCTACCGCGTGGCGAAAGACTCCCGCATTATTGA 1145

 KSJ8 TGCATGATTCATGCGGCCATAACGGGAAGAAAGTACCCTGGTGGTAGAGTTGCA 1202
 WP38 TGCATGATTCATGCGGCCATAACGGGAAGAAAGTACCCTGGTGGTAGAGTTGCA 1202

 KSJ8 GGCACGCTTCGATGAAGAGCCCAATATCACTGGCGCGCGCTGACCGAAGCGGGCGT 1262
 WP38 GGCACGCTTCGATGAAGAGCCCAATATCACTGGCGCGCGCTGACCGAAGCGGGCGT 1262

 KSJ8 ACACGTGATCTTCTCGGCCCGGGGCTGAAGATCCACGCCAAGCTGTTCTCATCTCCG 1322
 WP38 GCACGTGATCTTCTCGGCCCGGGGCTAAAATTCACGCCAAGCTGTTCTCATCTCCG 1322

 KSJ8 TAAAGAGGGGATGATGTCGTGCTTATGCCACATCGGCACCGCAACTTTAACGAGAA 1382
 WP38 TAAAGAGGGTGAAGATGATGTCGTGCTTATGCCACATCGGTACCGGGAACCTTTAACGAGAA 1382

 KSJ8 GACGGCGGAATTTACACCGACTACTGCTGCTCACCGCGATGCGGCATAAACCAACGA 1442
 WP38 AACGGCGGAATTTATACCGACTACTGCTCTTAAACCGGATGCGGCATCACTAACGA 1442

 KSJ8 GGTGCGCGGGTCTTTAACTTCAATGAGAACCCTGATCGTCCGGTCACTTCGACTATCT 1502
 WP38 AGTGGCGGGTCTTTAACTTCAATGAGAACCCTGATCGTCCGGTCACTTCGACTATCT 1502

 KSJ8 GCTGGTATCACCGCAAACTCCCGTCCGCTGCTGTATGATATGATCGACAAAGAGATCG 1562
 WP38 GCTGGTCTCGCCGAGAACTCCCGTCCGCTGCTGTATGATATGATCGATAAAGAGATCG 1562

 KSJ8 CAATGCCAGAAAGGGCTGCTGCTCGGCATACCGTGAAGCTTAAACACCTGGT 1616
 WP38 CAATGCCAGAAAGGGCTGCTGCTCGGCATACCGTGAAGCTTAAACACCTGGT 1616

```

***** ** ** * ***** *****
KSJ8 CGATAAAGGGCTGGTGGATCGTCTGTATGCAGCGTCCAGCTCCGGGGTTCAGGTCAATCT 1676
WP38 CGACAAAGGGCTGGTGGACAGGCTGTATGCAGCGTCCAGCTCCGGCGTGCCTGTTAACCT 1676
***** ** ** * ***** *****
KSJ8 ACTGATACGCGGTATGTGCTCCCTGATCCCGAGCTGGAAGGGATCAGCGAAAATATTCG 1736
WP38 GCTGGTCCGCGCATGTGCTCCTGATCCCGGACTGGAAGGCATCAGCGACAATATTCG 1736
***** ** ** * ***** *****
KSJ8 CGTCATGAGCATCGTTGACCGCTATCTTGAACACGATCGCATCTATATTTTGAGAACGG 1796
WP38 CGTGATCAGCATCGTTGACCGTTACCTGGAACACGATCGGATCTATATTTTGATAATGC 1796
***** ** ** * ***** *****
KSJ8 TGGCGATAAACCGGTTTACCTCTCTTCGCGAGACTGGATGACGCGCAACATCGATTATCG 1856
WP38 GGGTGATAAACAGGCTATCTCTCTTCGCGAGACTGGATGACGCGCAATATGACTACCG 1856
***** ** ** * ***** *****
KSJ8 AATCGAAGTGGCGCACCCGCTGCTCGACCCGCGATTGAAGCAGCAAATCTAGATATCAT 1916
WP38 TATTGAAGTGGCGCACCCGCTGCTGGATCCGCGACTGAAGCAGCAGATCTCGACATCAT 1916
***** ** ** * ***** *****
KSJ8 CGATTTATTGTTAAGCGATACTGTAAAAGCAGCTTATATCGATAAAGAAGTGAAGCAACCG 1976
WP38 CGAGATTCTGTTACGCGATACCGTGAAAGCAGCTATATCGACAAGAAGTCAAGTAAACCG 1976
***** ** ** * ***** *****
KSJ8 CTATGTCCCGCGCGCAATCGCCGTAAGTACGGGCACAGCTGGCGATTTACGACTATAT 2036
WP38 CTATGTACCGCGCGCAACCGCCGCAAGTGGGTCGCAACTGGCGATTTACGACTATAT 2036
***** ** ** * ***** *****
KSJ8 CAAATCACTCGAGCAACCCGATTAA----- 2061
WP38 CAAATCACTCG-GCAACCAGACTAA----- 2060
***** ** ** * *****

```

그림 1. *ppk* 유전자의 염기서열 비교. KSJ8 (*Leclercia adacarboxylata*), WP38 (*Enterobacter asburiae*).

표 2. *ppk* 유전자의 유사도

	KSJ8	WP38	Eco	Sal	Pseu	Ser	Vib	Kleb
KSJ8	100	87	82	82	25	81	65	87
WP38		100	83	81	25	80	65	98
Eco			100	82	24	78	65	83
Sal				100	24	77	65	81
Pseu					100	52	21	25
Ser						100	64	80
Vib							100	65
Kleb								100

KSJ8	-----MGQEKLYLEKELSW	14
WP38	-----MGQEKLYLEKELSW	14
Kleb	-----MGQEKLYLEKELSW	14
Pseudomonas	MNTQQGLDEIERIAADEVVANVESEAEVKMAETIPVETPPAVVPSVDDSSLYIHRELSQ	60
Salmonella	-----MGQEKLYLEKELSW	14
Serratia	-----MGQEKLYLEKELSW	14
Vibrio	-----MSADKLYIDKELSW	14
Escherichia	-----MGQEKLYLEKELSW	14
	: . . . ** : : ***	
KSJ8	LAFNERVLQEAADKSNPLIERMRFLGIYSNNLDEFYKVRFAELKRRRIISSEEQGLNS---	71
WP38	LAFNERVLQEAADKSNPLIERMRFLGIYSNNLDEFYKVRFAELKRRRIISSEEQGLNS---	71
Kleb	LAFNERVLQEAADKSNPLIERMRFLGIYSNNLDEFYKVRFAELKRRRIISSEEQGLNS---	71
Pseudomonas	LQFNIRVLEQALDESYPLLERLKFLIFSSNLDEFFETIRIAGLKKQITFAREQAGADGLL	120
Salmonella	LAFNERVLQEAADKSNPLIERMRFLGIYSNNLDEFYKVRFAELKRRRIISSEEQGSNS---	71
Serratia	LSFNERVLQEAADKSNPLIERMRFLGIYSNNLDEFYKVRFAELKRRRIISSEEQGSAG---	71
Vibrio	LSFNERVLQEAADKSNPLIERMRFLGIYSNNLDEFYKVRFAELKRRRIISSEEQGSNS---	71
Escherichia	LSFNERVLQEAADKSNPLIERMRFLGIYSNNLDEFYKVRFAELKRRRIISSEEQGSNS---	71
	* * * * * : : * : * * * : * * * : * * * * * : : * : * : * : * : *	
KSJ8	NSRHLLGKIQSRVLKADQEFDSLYNELLEEMARNQIFLINERQLSVNQNWLRHYFKQYL	131
WP38	HSRHLLGKIQSRVLKADQEFDSLYNELLEEMARNQIFLINERQLSVNQNWLRHYFKHYL	131
Kleb	HSRHLLGKIQSRVLKADQEFDSLYNELLEEMARNQIFLINERQLSVNQNWLRHYFKHYL	131
Pseudomonas	PHQALARISELVHEQVSRQYRILNETLLPELAKHQIRFIRRRHWTLKIKTWVRRFFRDEI	180
Salmonella	HSRHLLGKIQSRVLKADQEFDSLYNELLEEMARNQIFLINERQLSVNQSWLRHYFKHYL	131
Serratia	SSRHLLKTIQAKVLKTDQEFDSLYNELLEEMARNQIFLINERQVSENQITWLRQYFKQHL	131
Vibrio	ISKHLLSRMQSKALKLNQDFDNLNELILEMARRRIFLVNETQLDEIQLKWKVKYFHKVM	131
Escherichia	HSRHLLGKIQSRVLKADQEFDSLYNELLEEMARNQIFLINERQLSVNQNWLRHYFKQYL	131
	: * : : : * : * : * * : * : : : * : * : * : * : *	
KSJ8	RQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGDSIRYALLEIPSDK--VPRFVNLPPET	189
WP38	RQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGESIRYALLEIPSDK--VPRFVNLPPET	189
Kleb	RQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGESIRYALLEIPSDK--VPRFVNLPPET	189
Pseudomonas	APIITPIGLDPTHFPFLVNKSLNFIVELEGMDAFGRDGLAIIPAPRLLPRIIRLPEDV	240
Salmonella	RQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGDTINYALLEIPSDK--VPRFVNLPPET	189
Serratia	RQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGARTDYALLDIPSDK--VPRFVNLPPET	189
Vibrio	LPHVTPIMLRDDIDVMQFLKDEYAVIAVEMRSGDEFKYALIEIPTDQ--LPRFVMLPEQK	189
Escherichia	RQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGDTIRYALLEIPSDK--VPRFVNLPPET	189
	: * * * : : : : : : : : * : * : * * : * * :	
KSJ8	PRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMMKTRDAEYDLVHEMEASLMELMSS	249
WP38	PRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMMKTRDAEYDLVHEMEASLMELMSS	249
Kleb	PRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMMKTRDAEYDLVHEMEASLMELMSS	249
Pseudomonas	GGEEDNYVFLSSMIHAHADLFP---GMKVGCYQFRLTRNADLSVDTEDVEDLALARG	297
Salmonella	PRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMMKTRDAEYDLVHEMEASLMELMSS	249
Serratia	PRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMMKTRDAEYDLVHEMEASLMELMSS	249
Vibrio	GKRRKTIILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMMKTRDAEYDLRHEVEYSLLEQMSE	249
Escherichia	PRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFDDYDALNAYSMMKTRDAEYDLVHEMEASLMELMSS	249

```

      . . . :*: : : : * : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :
KSJ8      SLKQRLTAEPVRFVYQRDMPDAMVEMLRKLTISRYSIVPGGRYHNFKDFIGFPNVGKA 309
WP38      SLKQRLTAEPVRFVYQRDMPDAMVEMLRKLTISRYSIVPGGRYHNFKDFIGFPNVGKA 309
Kleb      SLKQ-PDAEPVRFVYQRDMPDAMVEMLRDCLTISRYSIVPGGRYHNFKDFIGFPNVGKA 308
Pseudomonas.  ELFSRRYGDVAVRLEVVDTCPQNLNLYLLKQFGLSESELYKVSQGVNLTRLFVSTGLESHP 357
Salmonella    SLKQRLTAEPVRFVYQRDMPAALVDVLRKLTISRYSIVPGGRYHNFKDFINFPNVGKA 309
Serratia     SLKQRLTAEPVRFVYQRDMPNEMVELLRGKLGISNYDSVIAGGRYHNFKDFISFPNVGKA 309
Vibrio       GLSQRLTALPVRFVYVEREMPEAMLKFLCYLKI SHYDSLIPGGRYHNFKDFISFPNVGRD 309
Escherichia  SLKQRLTAEPVRFVYQRDMPNALVEVLRKLTISRYSIVPGGRYHNFKDFINFPNVGKA 309
      * . . . :*: : : : * : : * : : : * : : : * : : : * : : :
KSJ8      NLVKNKPLPRLRHLWFDK--FRNGFDAIRERDVLLYYPYHTFEHVLELMRQASFDPNVLA 367
WP38      NLVKNKPLPRLRHLWFDK--FRNGFDAIRERDVLLYYPYHTFEHVLELLRQASFDPSVLA 367
Kleb      NLVKNKPLPRLRHLWFDK--FRNGFDAIRERDVLLYYPYHTFEHVLELLRQASFDPSVLA 366
Pseudomonas.  ELQYPPFTPAIPRLQLK--KENLFNVLKLDVLLMHFFESFPTVIDLLRQAAKDPNVLA 415
Salmonella    NLVKNKPLPRLRHLWFDKFKFRNGFDAIRERDVLLYYPYHTFEHVLELLRQASFDPSVLA 369
Serratia     NLVKNKPLPRLRHLWFDG--FRNGFDAIREKDVLLYYPYHTFEHVLELLRQASFDPSVLA 367
Vibrio       YLENKPLPMTCAFEG--YANAFDAIRAQDILLHVPYHSFEHMTLVRQASFDPKVSI 367
Escherichia  NLVKNKPLPRLRHLWFDKAQFRNGFDAIRERDVLLYYPYHTFEHVLELLRQASFDPSVLA 369
      * * : . . . : : * * : : * : : * : : : * : : : * : : : * : : :
KSJ8      KINIYRVAKDSRIIDAMIHAAHNGKKTVVVVEL-QARFDEEANIHWARRLTEAGVHVIFS 426
WP38      KINIYRVAKDSRIIDAMIHAAHNAKKTVVVVEL-QARFDEEANIHWARRLTEAGVHVIFS 426
Kleb      KINIYRVAKDSRIIDAMIHAAHNAKKTVVVVEL-QARFDEEANIHWARRLTEAGVHVIFS 425
Pseudomonas.  KQTLYRSGANSEIVDALVEAARNGKEVTAVIEL-RARFDEESNLQLASRLQAGAVVIYG 474
Salmonella    KINIYRVAKDSRIIDSMIHAHNGKKTVVVVEL-QARFDEEANIHWAKRLTEAGVHVIFS 428
Serratia     KINIYRVAKDSRIIESMIR-AHNGKKTVVVVELLQARFDEEANIHWANGLTEAGVHVIFS 426
Vibrio       KINIYRVAKDSKLMNSLVDVAVHNGKRVVVVVEL-QARFDEEANIWSRILTDAGVHVIFG 426
Escherichia  KINIYRVAKDSRIIDSMIHAHNGKKTVVVVEL-QARFDEEANIHWAKRLTEAGVHVIFS 428
      * . : * * . : * : : : : . : * * . : * : * : * : * : * : * : * : * :
KSJ8      APGLKIHAKLFLISRKEGDDVVRVYAHIGTGNFNEKTARIYTDYSLLTADARITNEVRRVF 486
WP38      APGLKIHAKLFLISRKEGDDVVRVYAHIGTGNFNEKTARIYTDYSLLTADARITNEVRRVF 486
Kleb      APGLKIHAKLFLISRKEGDDVVRVYAHIGTGNFNEKTSLIYTDYSLLTADARITNEVRRVF 485
Pseudomonas.  VVGFKTHAKMMLILRREDGELRRYAHIGTGNVHAGNARLYTDYSLLTADVALCEDLHKL 534
Salmonella    APGLKIHAKLFLISRKEGDDVVRVYAHIGTGNFNEKTARLYTDYSLLTADARITNEVRRVF 488
Serratia     APGLKIHAKLFLISRREGDEIVRYAHIGTGNFNEKTARIYTDYSLLTADSRTITNEVRRVF 486
Vibrio       VPGMKIHAKLLITRKEGDEFVRYAHIGTGNFHERTARIYTDYSLLTANQELAAEVRAVF 486
Escherichia  APGLKIHAKLFLISRKENGEVVRVYAHIGTGNFNEKTARLYTDYSLLTADARITNEVRRVF 488
      . : * * * : * * * : * : . : . * : : * : : * : : * : : * : : * : : * :
KSJ8      NFNIENPYRPVSFDYLLVSPQNSRRLLYDMIDKEIANA--QNGLPAGITLKLNNLVDKGLV 544
WP38      NFNIENPYRPVSFDYLLVSPQNSRRLLYDMIDKEIANA--QKGLSSGITLKLNNLVDKGLV 544
Kleb      NFNIENPYRPVSFDYLLVSPQNSRRLLYDMIDKEIANA--QKGLSSGITLKLNNLVDKGLV 543
Pseudomonas.  NQLIGMGKITLRMKLLHAPFTLKKNLLEMINREAAQA--ALGQPAHIMAKVNSLTDPKVI 592
Salmonella    NFNIENPYRPVTFDYLVMVSPQNSRRLLYEMIDREIANA--QQGLPSGITLKLNNLVDKGLV 546
Serratia     NFNIENPYRPVTFDNLVSPQNSRLKLYELIDNEIANANAQAGEQAGIMLKINNLVDKGLV 546

```

```

Vibrio          GYIENPFRPVKFNHLIVSPRNSRTQIYRLLDSEITANA--KAGKKAATLKVNNLVDKGLI 544
Escherichia    NFIENPYRPVTFDYLMVSPQNSRRLLYEMVDREITANA--QQGLPSGITLKLNNLVDKGLV 546
               . . . . . : : : . * : * * . : : : : * * * * * . : * * * * * . * : :
KSJ8           DRLYAASSSGVQVNNLLIRGMCSLIPLEGISENIRVMSIVDRYLEHDRIYIFENGGDKRV 604
WP38           DRLYAASSSGVQVNNLLVRGMCSLIPLEGISDNIRVISIVDRYLEHDRIYIFDNAGDKQV 604
Kleb           DRLYAASSSGVQVNNLLIRGMCSLIPLEGISDNIRVISIVDRYLEHDRIYIFDNAGDKQV 603
Pseudomonas.  RALYKASQAGVRIDLVRGMCCLRPGIPGVSHNIHVRSIIGRFLEHSRIYVFLNGGDEKL 652
Salmonella     DRLYAASSSGVQVNNLLVRGMCSLIPQLEGISDNIRAISIVDRYLEHDRVYIFENGGDKQV 606
Serratia      DRLYTASGAGVKIRLLVRGMCSLIPNLPGISDNIRVISIVDRYLEHDRVYVFDNKGDKRV 606
Vibrio        NKLYGASAGVKIRMLIRGMCSLIPNLPGISDNIRVISIVDRYLEHDRVYVFDNKGDKRV 604
Escherichia    DRLYAASSSGVQVNNLLVRGMCSLIPNLEGISDNIRAISIVDRYLEHDRVYIFENGGDKKV 606
               * * * * * : * * * * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
KSJ8           YLSSADWMTRNIDYRIEVAAPLLDPRLKQQILDIIDLLSDTVKARYIDKELSNR-YVPR 663
WP38           YLSSADWMTRNIDYRIEVAAPLLDPRLKQQILDIIEILFSDTVKARYIDKELSNR-YVPR 663
Kleb           YLSSADWMTRNIDYRIEVAAPLLDPRLKQQILDIIEILFSDTVKARYIDKELSNR-YVPR 662
Pseudomonas.  YLSSADWMERNLDMRVETCFPVEGKLVQRVKELETYLTNTQAWVLQADGSYQRLSPT 712
Salmonella     WLSSADWMTRNIDYRIEVAATPILDPRKQRVLDIIDILFSDTVKARFIDKELSNR-YVPR 665
Serratia      YLSSADWMTRNIDYRIEVAVSLLDPAKQRVLDILEILFSDTVKARYVDKELSNQ-YVPR 665
Vibrio        FISSADWMERNIDHRIEVMAPIRDERLKQRIIDILNIQFIDTVKARRIDKEMSNO-YVER 663
Escherichia    YLSSADWMTRNIDYRIEVAATPILDPRKQRVLDIIDILFSDTVKARYIDKELSNR-YVPR 665
               : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
KSJ8           GNRKVRQALAIYDYIKSLEQPD----- 686
WP38           GNRKVRSQLAIYDYIKSLGNQT----- 686
Kleb           GNRKVRSQLAIYDYIKSLEQPD----- 685
Pseudomonas.  GNQNPRTQATLLEKLAAPVLTAR----- 736
Salmonella     GNRKVRQALAIYDYIKSLEQPD----- 688
Serratia      GNRKVRQAVAIYEVLKALEQPGQ----- 689
Vibrio        GNRKVRSQLAIYDYILKNVEKQTRKAKGQQTNDNSSQ 701
Escherichia    GNRKVRQALAIYDYIKSLEQPE----- 688
               * * : . . : * : : : :

```

그림 2. Ppk 아미노산서열의 비교. KSJ8 (*Leclercia adacarboxylata*), WP38 (*Enterobacter asburiae*), *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella aerogenes*.

표 3. Ppk 아미노산 서열의 유전유사도

	KSJ8	WP38	Eco	Sal	Pseu	Ser	Vib	Kleb
KSJ8	100	96	93	93	33	84	63	95
WP38		100	93	94	33	84	64	98
Eco			100	96	34	86	63	96
Sal				100	34	84	64	93
Psedo					100	34	32	32
Ser						100	64	84
Vib							100	63
Kleb								100

3. *phoA* 유전자 클로닝

Bacterial alkaline phosphatase (BAP)는 *phoA* 유전자 산물이며 phosphate esters를 분해한다. *phoA*는 인산결핍 환경에서 1000배 이상 발현되어 BAP는 전체 단백질의 6%까지 도달한다. 따라서 *phoA* 유전자산물인 BAP를 이용하여 phosphate esters의 분해뿐 아니라 1000배 이상 발현되는 특성을 이용하기 위하여 각 종 인화합물 분해 유전자의 과발현 벡터 시스템을 구축하고자 하였다. 우선, *Enterobacter aerogenes*에서 *phoA* 유전자를 클로닝하고 그 promoter 부위를 연구하였다. Mini-Mu plasmid를 이용한 *In vivo* molecular cloning 기술로 *phoA* 유전자를 지닌 mini-Mu plasmid를 선별한 후, 이를 subcloning하여 *phoA*가 포함된 3 kb의 DNA 조각을 확보하였다. 염기서열 결정결과 *E. aerogenes*의 *phoA* 유전자임이 확인되었다. 또한, 클로닝된 *phoA* 유전자는 *phoA* 결실 균주에 재 삽입하였을 때 complementation이 됨을 확인하였다(그림 3).

*Sma*I
 cccgggcccgtggtggacgacctgacaccagcttctgcagcaa
 tatataaaaaagctgctcggcatcctgtaactaa
 pho box
 TCATGTGACCAGTAAGGATGCTGTCAITTTTTTGTGACACCCACTTTTA
 -10 SD
 TAAAGTCTCCCTCGTTTTTGTTTTTTAAGTAITTTTTTACATGGAGACGACAAA

phoA →
 1 gtgaaattatctgcccctctttattgcccctgttacccgctgctggct
 M K L S A L F I A L L P L L A
 46 ccccgggttattcatgcacaaacactctctgcccggctgctggaa
 P P V I H A Q T T S S P V L E

*Eco*RI
 91 aatcgcgcccgcaggggatatacagaccocaggggggcgcgc
 N R A A Q G D I T T P G G A R
 136 cgtttaacgggogatcagaccgaagcctgocgcttctgtaatc
 R L T G D Q T E A L R A S L I
 181 aataagccggcgaaaaatatttttgcctcattggogaaggcatg
 N K P A K N I I L L I G D G M
 226 ggtgattcagaaattacgcgcgcagcaaaattatgcgaaggcgc
 G D S E I T A A R N Y A E G A
 724 atgggtgattcagaaattacgcgcgcagcaaaattatgcgaaggc
 M G D S E I T A A R N Y A E G
 769 gcggcggttctttaaaggtattgatccctgcgcctgacgggc
 A G G F F K G I D A L P L T G
 814 caatacaccattattctctggataaaaaaacggcaagocggat
 Q Y T H Y S L D K K T G K P D
 859 tacgtgacggattccgcgcctcggcaacocgctggaacocggc
 Y V T D S A A S A T A W T T G
 904 gtgaaaagctataacggcgcctggcgcttgatatacagaaaa
 V K S Y N G A L G V D I H E K
 949 gatcatcagaccctcttgagctggcgaagocggcgtcttgcc
 D H Q T I L E L A K A A G L A

*Pst*I
 994 accggcaatgtctogacggctgaactgcaggatgcgaocggcg
 T G N V S T A E L Q D A T P A
 1039 gcgcaggtggcccatgtgacctcgcgtaaatgctatggccctagc
 A Q V A H V T S R K C Y G P S
 1084 gtgaccagcgaaaaatgcgcagcaacgcctggaaaagggcgc
 V T S E K C A S N A L E K G G
 1129 aaggcctctatcaccgaacaactgctgaatgcccgtccggatgc
 K G S I T E Q L L N A R P D V
 1174 tctttagcgcggggcgaagaccttgcgtaaacggcgcgcgca
 S L G G G A K T F A E T A T A
 1219 gggagtgccaggggaaaaacccctgcatgagcggcggctcgtcgc
 G E W Q G K T L H E Q A V A R
 1264 ggctatcagattgtgacgcgcgccttcaactcgcgcctatcagc
 G Y Q I V T D A A S L A A I S
 1309 gaagcaaatcagggtaaaccactgctcgtctgtctcgcagggc
 E A N Q G K P L L G L F S D G
 1354 aatatgcgggtgcgggtgggaagccgaaagcctcttcaaggc
 N M P V R W E G P K A S Y H G

1399 aata togacaaaacgcggtaacctgtaccccaaa tcogaaaacgc
 N I D K P P V T C T P N P K R
 1444 gatgcttccgtaccgaagcctggcgcagata gaccogaaaaagcgatt
 D A S V P T L A Q M T E K A I

*Pst*I
 1489 gatctccttagcgcgaacgagaaaaggttctctcgcaggttgag
 D L L S R N E K G F F L Q V E
 1534 gggcgctctatcoga taaacaggaccacogggcaaaccttgccggc
 G A S I D K Q D H A A N P C G

*Sa*II
 1579 cagattggogaaaacgcctcogatagaagcggctacagaaaacgc
 Q I G E T V D L D E A V Q K A
 1624 ctggagtttgccaaaaagagggtaa tacccctggatgctcacc
 L E F A K K E G N T L V I V T
 1669 gcoga taocgccactcagocagatta tccggcagacagaaaa
 A D H A H S S Q I I P A D T K
 1714 gcgcggccctgaccocggcctgacgaocaaagatggcgggta
 A P G L T Q A L T T K D G A V
 1759 atgggtgagagctatggcaactctgaagaagagtgatggaacac
 M V M S Y G N S E E S M E H
 1804 accggcacccaactgcgaattgcggcctatggccgcgatggggc
 T G T Q L R I A A Y G P H A G
 1849 aacgtggggctcaccgaocagacogactgttttacaccatg
 N V V G L T D Q T D L F Y T M

1894 aaagacgcgctggggcctgaaataa 1917
 K D A L G L K *

CCCGCGCCGTAATGAATTCAGTTACCGGCTGGTTTTTTTGTCT
*Ban*HI
 GATAGCGACCAGACTTACAGGGATCCACTAACAGAGGGATGTTGT
 G

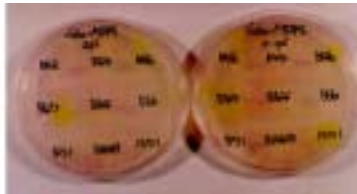


그림 3. *Enterobacter aerogenes*의 *phoA* 유전자 구조와 상보성 실험결과.

예상되는 *phoA* promoter의 활성을 조사하기 위하여 deletion 클론을 확보하였 으며 이들을 CAT assay vector에 삽입하고 CAT의 발현을 조사하였다. *phoA* 유전자는 인산결핍시 PhoB에 의해 조절되므로 대조군으로 $\Delta phoBR$ strain을 사용하였다. 그 결과 *phoA* promoter의 *pho* box가 PhoB에 의해 조절됨을 확인하였다(표 4).

표 4. CAT assay을 이용한 *phoA* promoter 활성도 조사

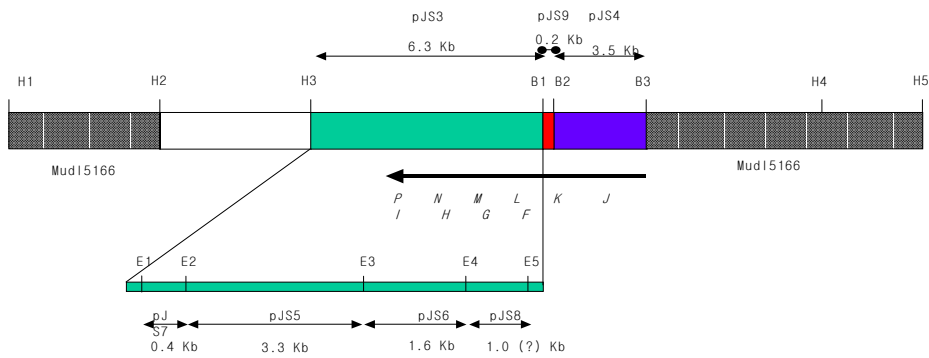
Strain	Plasmid	Activity	
		Low Pi(0.1mM)	High Pi(2mM)
		mean	mean
CSH26	pho box	587.1±55.2	1.34±0.13
	△pho box	1.36±1	0.96±0.23
	vector	0.52±0.02	0.1±0.005
CSH26△BR	pho box	3.09±1	2.76±0.3
	△pho box	3.2±0.7	2.38±0.65
	vector	0.83±0.04	0.76±0.03
ANCK10	pho box	476.5±66.2	3.11±0.53
	△pho box	2.6±2	2.08±1.19
	vector	1.32±0.06	0.49±0.002
ANCK10△BR	pho box	3.09±1.7	2.42±9
	△pho box	4.16±1.17	2.22±0.55
	vector	2.13±0.1	0.79±0.03

4. *phn* operon 유전자의 확보 및 서열분석

Phosphonate(Pn, C-P화합물)는 열 및 화학적으로 매우 안정한 carbon-to-phosphorus(C-P) bond를 지니고 있다. C-P화합물은 화학적 안정성과 구조 특이성 때문에 농약과 의약 등에 사용되지만, 그 독성과 잔류성 때문에 환경독성 문제를 야기한다. C-P화합물을 유일하게 분해할 수 있는 C-P lyase 유전자군을 *phn* operon 이라 한다. *phn* operon은 *phnCDE*의 transpoter와 *phnF*, *phnO*의 조절유전자, 그 밖의 C-P lyase 복합체 등 10여개 이상의 유전자로 구성되어 있다.

phn operon 유전자를 이용하여 C-P lyase의 활성이 증가된 유전자 재조합 균주를 개발하기 위해 *E. aerogenes*의 *phn* operon 유전자를 mini-Mu

plasmid를 이용한 *in vivo* molecular cloning 기술로 mini-Mu plasmid를 선별한 후(그림 4), subcloning하고 그 염기서열을 결정하였으며(그림 6) 각각의 유전자를 과대발현할 수 있는 과대발현벡터를 구축하였다(그림 7). 또한 *phnF* promoter의 활성을 CAT assay를 통해 확인하였다(표 5). *E. aerogenes*의 경우 본 연구결과 *phnF*와 더불어 조절유전자의 하나로 알려진 *phnO* 유전자가 없음이 확인되었다(그림 5, 6).



Gene arrangement from the partial DNA sequencing
(H: *HindIII*, B: *BamHI*, E: *EcoRV*)

그림 4. *Enterobacter aerogenes*의 *phn* operon이 든 mini-Mu plasmid의 구조

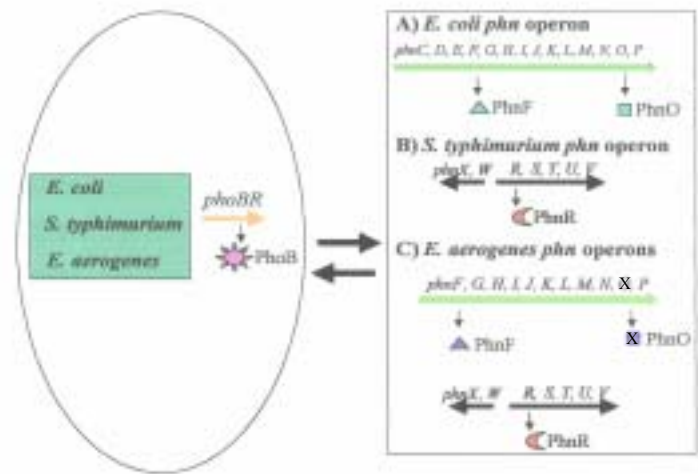
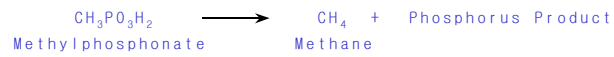
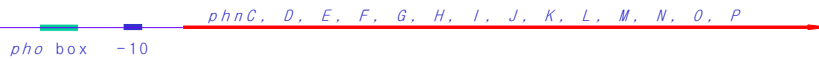


Fig. 4. 장내세균 3종에 있는 *phn* operon들의 다양성과 구조단백질들

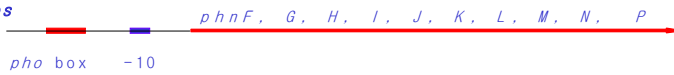
A) C-P compound cleavage



B) *E. coli*



C) *E. aerogenes*



Comparison of *phn* gene arrangement and *pho* box localization between *E. coli* and *E. aerogenes*.

그림 5. 장내세균 3종의 현재까지 알려진 *phn* operon의 구조.

> *phn* operon of *Enterobacter aerogenes* (*phnFGHIJLKNP*)

CTCTTCAATCCGCTCATCGTACTTAACAGGAATGTACAAAAACCGGT
CAGTATCGGCCACCGCTCAACGGGAAACCCCAAGGTACTTAGTGGGCTCG
ATAACC

phnF
ATGACTTATCCAGACATCCGACAGTTACCCACCCTGATCAGAAATT
MYLSRHPSTSYPTBYQEI
GCCGCCAGCTTBAACAGGACTGCGCATCTATGCTGCGGACTAT
AARLEQELRHVRYCGDY
TTGCGCGGAAACACAGCTGCGCGCCCTTTGAAGTTAACGCCACACC
LPAEQALAREFVNRHT
CTAGCGCGCCATCGATCACTGCTGTAAGCGCGGATGCGTCCAGCGCGC
LRAIDQLVERG#VQRR
CAGCGCGTGGCTGCTGATTTGATGCGCCCATCGACTACCCCTCAAC
QGVGVLLVLMRPTDYP
LW
GCCAGCGCGTITTAGCGAAGTCTGCTGGAAGAGCGCACCCCGACC
AQRPSQWLELQESHPT
AGCGAGAACTGCTCTGCTGCTGCGCGCCAGCGCACCTGTCGSA
SEKLRISDRFPASHTA
GCCITGCGCATGCGCAAGCGAAACCGTCAITCATCTGCGACCTGCGC
AFGEIVHRTLR
CGGTTAAGCGCGTGGCTGTGTTTBAITGACACTACTGCGGACTG
FVNGVALLDHFADL
CGCTTCTGCGCGTGGCAACCTTCAACCGTCTGCTGCTACAGACTG
FHPVQLTFHSTKIS
CTGCGGACCACTCGCCATGAGCTGACCGCGTACGCCAAAAATCAGC
LRDQLALDGLTGRVTR
GCCCGCGCGCGCGCGGAAAGAGAGCACTGCTGGAATGCCAATATG
ARRAFAKESKLETPNM
GCGACTGCTGCTGCTAGCGACCTCAATAGCCCGCGAGAGAGCTC
APLRLVSREREG
ACGAGTACTCGCTGAGCGCGCGCACATGATGAATTCACC
TTEYSVSLTRADMIET
ATGAGACTGA

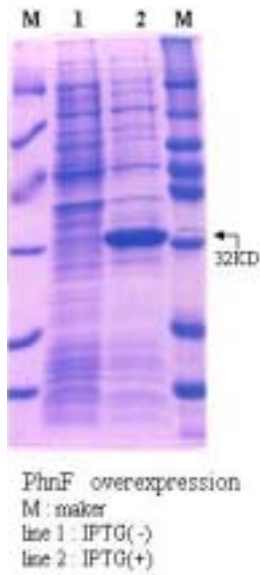
phnG
ATGACTTATCCAGACATCCGACAGTTACCCACCCTGATCAGAAATT
MYLSRHPSTSYPTBYQEI
GCCGCCAGCTTBAACAGGACTGCGCATCTATGCTGCGGACTAT
AARLEQELRHVRYCGDY
TTGCGCGGAAACACAGCTGCGCGCCCTTTGAAGTTAACGCCACACC
LPAEQALAREFVNRHT
CTAGCGCGCCATCGATCACTGCTGTAAGCGCGGATGCGTCCAGCGCGC
LRAIDQLVERG#VQRR
CAGCGCGTGGCTGCTGATTTGATGCGCCCATCGACTACCCCTCAAC
QGVGVLLVLMRPTDYP
LW
GCCAGCGCGTITTAGCGAAGTCTGCTGGAAGAGCGCACCCCGACC
AQRPSQWLELQESHPT
AGCGAGAACTGCTCTGCTGCTGCGCGCCAGCGCACCTGTCGSA
SEKLRISDRFPASHTA
GCCITGCGCATGCGCAAGCGAAACCGTCAITCATCTGCGACCTGCGC
AFGEIVHRTLR
CGGTTAAGCGCGTGGCTGTGTTTBAITGACACTACTGCGGACTG
FVNGVALLDHFADL
CGCTTCTGCGCGTGGCAACCTTCAACCGTCTGCTGCTACAGACTG
FHPVQLTFHSTKIS
CTGCGGACCACTCGCCATGAGCTGACCGCGTACGCCAAAAATCAGC
LRDQLALDGLTGRVTR
GCCCGCGCGCGCGCGGAAAGAGAGCACTGCTGGAATGCCAATATG
ARRAFAKESKLETPNM
GCGACTGCTGCTGCTAGCGACCTCAATAGCCCGCGAGAGAGCTC
APLRLVSREREG
ACGAGTACTCGCTGAGCGCGCGCACATGATGAATTCACC
TTEYSVSLTRADMIET
ATGAGACTGA

ATGA(*phnG*와 *phnH*의 중복사용부위)
phnH
ATGACTTATCCAGACATCCGACAGTTACCCACCCTGATCAGAAATT
MYLSRHPSTSYPTBYQEI
GCCGCCAGCTTBAACAGGACTGCGCATCTATGCTGCGGACTAT
AARLEQELRHVRYCGDY
TTGCGCGGAAACACAGCTGCGCGCCCTTTGAAGTTAACGCCACACC
LPAEQALAREFVNRHT
CTAGCGCGCCATCGATCACTGCTGTAAGCGCGGATGCGTCCAGCGCGC
LRAIDQLVERG#VQRR
CAGCGCGTGGCTGCTGATTTGATGCGCCCATCGACTACCCCTCAAC
QGVGVLLVLMRPTDYP
LW
GCCAGCGCGTITTAGCGAAGTCTGCTGGAAGAGCGCACCCCGACC
AQRPSQWLELQESHPT
AGCGAGAACTGCTCTGCTGCTGCGCGCCAGCGCACCTGTCGSA
SEKLRISDRFPASHTA
GCCITGCGCATGCGCAAGCGAAACCGTCAITCATCTGCGACCTGCGC
AFGEIVHRTLR
CGGTTAAGCGCGTGGCTGTGTTTBAITGACACTACTGCGGACTG
FVNGVALLDHFADL
CGCTTCTGCGCGTGGCAACCTTCAACCGTCTGCTGCTACAGACTG
FHPVQLTFHSTKIS
CTGCGGACCACTCGCCATGAGCTGACCGCGTACGCCAAAAATCAGC
LRDQLALDGLTGRVTR
GCCCGCGCGCGCGCGGAAAGAGAGCACTGCTGGAATGCCAATATG
ARRAFAKESKLETPNM
GCGACTGCTGCTGCTAGCGACCTCAATAGCCCGCGAGAGAGCTC
APLRLVSREREG
ACGAGTACTCGCTGAGCGCGCGCACATGATGAATTCACC
TTEYSVSLTRADMIET
ATGAGACTGA

phnI
ATGACTTATCCAGACATCCGACAGTTACCCACCCTGATCAGAAATT
MYLSRHPSTSYPTBYQEI
GCCGCCAGCTTBAACAGGACTGCGCATCTATGCTGCGGACTAT
AARLEQELRHVRYCGDY
TTGCGCGGAAACACAGCTGCGCGCCCTTTGAAGTTAACGCCACACC
LPAEQALAREFVNRHT
CTAGCGCGCCATCGATCACTGCTGTAAGCGCGGATGCGTCCAGCGCGC
LRAIDQLVERG#VQRR
CAGCGCGTGGCTGCTGATTTGATGCGCCCATCGACTACCCCTCAAC
QGVGVLLVLMRPTDYP
LW
GCCAGCGCGTITTAGCGAAGTCTGCTGGAAGAGCGCACCCCGACC
AQRPSQWLELQESHPT
AGCGAGAACTGCTCTGCTGCTGCGCGCCAGCGCACCTGTCGSA
SEKLRISDRFPASHTA
GCCITGCGCATGCGCAAGCGAAACCGTCAITCATCTGCGACCTGCGC
AFGEIVHRTLR
CGGTTAAGCGCGTGGCTGTGTTTBAITGACACTACTGCGGACTG
FVNGVALLDHFADL
CGCTTCTGCGCGTGGCAACCTTCAACCGTCTGCTGCTACAGACTG
FHPVQLTFHSTKIS
CTGCGGACCACTCGCCATGAGCTGACCGCGTACGCCAAAAATCAGC
LRDQLALDGLTGRVTR
GCCCGCGCGCGCGCGGAAAGAGAGCACTGCTGGAATGCCAATATG
ARRAFAKESKLETPNM
GCGACTGCTGCTGCTAGCGACCTCAATAGCCCGCGAGAGAGCTC
APLRLVSREREG
ACGAGTACTCGCTGAGCGCGCGCACATGATGAATTCACC
TTEYSVSLTRADMIET
ATGAGACTGA

ATGA(*phnI*와 *phnJ*의 연결부위)
phnJ
ATGACTTATCCAGACATCCGACAGTTACCCACCCTGATCAGAAATT
MYLSRHPSTSYPTBYQEI
GCCGCCAGCTTBAACAGGACTGCGCATCTATGCTGCGGACTAT
AARLEQELRHVRYCGDY
TTGCGCGGAAACACAGCTGCGCGCCCTTTGAAGTTAACGCCACACC
LPAEQALAREFVNRHT
CTAGCGCGCCATCGATCACTGCTGTAAGCGCGGATGCGTCCAGCGCGC
LRAIDQLVERG#VQRR
CAGCGCGTGGCTGCTGATTTGATGCGCCCATCGACTACCCCTCAAC
QGVGVLLVLMRPTDYP
LW
GCCAGCGCGTITTAGCGAAGTCTGCTGGAAGAGCGCACCCCGACC
AQRPSQWLELQESHPT
AGCGAGAACTGCTCTGCTGCTGCGCGCCAGCGCACCTGTCGSA
SEKLRISDRFPASHTA
GCCITGCGCATGCGCAAGCGAAACCGTCAITCATCTGCGACCTGCGC
AFGEIVHRTLR
CGGTTAAGCGCGTGGCTGTGTTTBAITGACACTACTGCGGACTG
FVNGVALLDHFADL
CGCTTCTGCGCGTGGCAACCTTCAACCGTCTGCTGCTACAGACTG
FHPVQLTFHSTKIS
CTGCGGACCACTCGCCATGAGCTGACCGCGTACGCCAAAAATCAGC
LRDQLALDGLTGRVTR
GCCCGCGCGCGCGCGGAAAGAGAGCACTGCTGGAATGCCAATATG
ARRAFAKESKLETPNM
GCGACTGCTGCTGCTAGCGACCTCAATAGCCCGCGAGAGAGCTC
APLRLVSREREG
ACGAGTACTCGCTGAGCGCGCGCACATGATGAATTCACC
TTEYSVSLTRADMIET
ATGAGACTGA

ATGA(*phnJ*와 *phnK*의 중복부위)
phnK
ATGACTTATCCAGACATCCGACAGTTACCCACCCTGATCAGAAATT
MYLSRHPSTSYPTBYQEI
GCCGCCAGCTTBAACAGGACTGCGCATCTATGCTGCGGACTAT
AARLEQELRHVRYCGDY
TTGCGCGGAAACACAGCTGCGCGCCCTTTGAAGTTAACGCCACACC
LPAEQALAREFVNRHT
CTAGCGCGCCATCGATCACTGCTGTAAGCGCGGATGCGTCCAGCGCGC
LRAIDQLVERG#VQRR
CAGCGCGTGGCTGCTGATTTGATGCGCCCATCGACTACCCCTCAAC
QGVGVLLVLMRPTDYP
LW
GCCAGCGCGTITTAGCGAAGTCTGCTGGAAGAGCGCACCCCGACC
AQRPSQWLELQESHPT
AGCGAGAACTGCTCTGCTGCTGCGCGCCAGCGCACCTGTCGSA
SEKLRISDRFPASHTA
GCCITGCGCATGCGCAAGCGAAACCGTCAITCATCTGCGACCTGCGC
AFGEIVHRTLR
CGGTTAAGCGCGTGGCTGTGTTTBAITGACACTACTGCGGACTG
FVNGVALLDHFADL
CGCTTCTGCGCGTGGCAACCTTCAACCGTCTGCTGCTACAGACTG
FHPVQLTFHSTKIS
CTGCGGACCACTCGCCATGAGCTGACCGCGTACGCCAAAAATCAGC
LRDQLALDGLTGRVTR
GCCCGCGCGCGCGCGGAAAGAGAGCACTGCTGGAATGCCAATATG
ARRAFAKESKLETPNM
GCGACTGCTGCTGCTAGCGACCTCAATAGCCCGCGAGAGAGCTC
APLRLVSREREG
ACGAGTACTCGCTGAGCGCGCGCACATGATGAATTCACC
TTEYSVSLTRADMIET
ATGAGACTGA



A.
phnF -
gcatccoccatctaatcaatcaaacacgaatcaatcaatcactctctttcatttcaaacggg
Mini-Mu
aaagcaagtttttcgaatttatctgcaaacggttttcgggtttttcgtgagggcctcact
PhnF1- *Pho* Box PhnF2 - -10
cttcaatcctgggtcactgcttaccacaaatgtaacaaacgggtcaglataggcc
RBS
cagcctcaagggaacccaaggtaacttagtgggctcgataacc
atgtacttatccagacatccgaccagttaaccacacgggtatcaggaatctggggcagc
M Y L S R H P T S Y P T R Y Q E I A A S
PhnF3 -
gttgaacagacttggacatcaactatcgtcggggcattttccggggcaacacag
V E Q E L R H H Y R C G D Y L P A E Q Q

B.
phnF1 5' - TCCccggcCTTCATCTG - 3'
SmaI
phnF2 5' - TCCccggcACGATGT - 3'
SmaI
phnF3 5' - CGGATCWAATAGTGGGGC - 3'
BamHI

A. Putative *phn* operon of promoter region sequence.
B. PCR amplification primer of *Enterobacter aerogenes*.

그림 7. *Enterobacter aerogenes*의 *phnF* 유전자의 과대발현

표 5. *phnF* promoter의 CAT assay 결과

Strain	Plasmid	Activity	
		Low Pi(0.1mM)	High Pi(2mM)
		mean	mean
CSH26	pho box	470.2±20.4	19.1±1.3
	Δpho box	2.7±0.7	36.5±4.3
	vector	6.0±2.4	33.3±3.5
CSH26 ΔBR	pho box	11.5±3.1	10.1±1.5
	Δpho box	7.5±2.7	25.6±5.6
	vector	3.7±1.5	24.4±2.3
ANCK10	pho box	1258.8±78.8	28.8±1.1
	Δpho box	108.4±20.3	24.5±1.9
	vector	15.7±4.06	56.5±2.2
ANCK10 ΔBR	pho box	19.8±4.9	70.0±2.3
	Δpho box	61.4±10.7	168.9±0.5
	vector	64.9±12.1	123.2±4.3

5. Phytase 유전자(*phy*)의 확보

시설 재배지를 포함한 작물의 경작지에서는 시비를 통해 유입되는 인의 90% 정도가 토양의 각종 이온과 화학결합하여 작물이 사용할 수 없는 인산염 상태가 되는 데 특히, 그중 50% 이상은 phytate 형태로 변성된다. 본 과제에서 확보한 불용성 인산염 가용화 균주는 phytate 배지에서도 탁월한 분해능을 보이고 있어 *phy* 유전자를 확보하여 활용한다면 매우 유용한 불용성 인산염 분해 제거 균주를 개발할 수 있을 것이다.

본 연구에서 탐색되어진 불용성 인산염 가용화 균주와 본 연구진들에 의하여 이미 확보한 기능성 균주들로부터 phytase 유전자를 클로닝하고자 하였다. Gene bank에 등록된 phytase 유전자의 염기서열을 분석하여 coding region을 PCR을 통해 확보하고자 primer를 표 6과 같이 변형 제작하여 PCR cloning을 시도하였다.

표 6. *phy* 유전자 클로닝용 primer들

Primer	Sequence
phy 1F phy 1R	5'-CGAATCCATATGAATCAITCAAAAACACTT-3' 5'-CGGGATCCCTCGAGITTTCCGCTTCGTGCG-3'
phy 2F phy 2R	5'-GGGTACCCCAITGTGAACAATTCAGCGAG-3' 5'-GCGAGCTCGTTAATTTCCGCTTCGTGCG-3'
phyC F phyC R	5'-AACTGCAGCATATGGARACKSARCCGGTY-3' 5'-CGGAATTOCCAKGGCACGAKYTT-3'
phyA F phyA R	5'-CGGAATTCITTAGGRTYCCARWYYTG-3' 5'-AACTGCAGCATATGAAAACMCSKYAAAA-3'

PSB 균주에서는 PCR 산물을 합성할 수가 없었다. 그러나, 본 연구진이 발굴한 다기능성 균주인 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* KL1114(KCTC 8913P)로부터 PCR 산물을 증폭할 수 있었다. 이를 클로닝하여 염기서열을 결정 한 결과 그림 8과 같았다. 염기서열을 비교한 결과 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus amyloliquefaciens*에서 확인된 *phy* 유전자와 각각 97%와 91%의 높은 상동성을 보였으며 아미노산 서열에서도 각각 98%와 91%의 상동성을 나타내었다(그림 9, 표 7). 이러한 결과로 KL1114 균주에서 클로닝된 *Bsa-phy1* 유전자는 *phyC*로 분류하였다. KL1114는 식물병원성 진균류에 대한 항진균 활성이

뛰어나며, 인체에 무독성이어서 이미 생물농약으로 상품화가 이루어진 특허균주이다. 따라서 본 연구결과는 KL1114의 유용성, 특히 농작물재배에 있어서의 실용성이 매우 높은 다기능성 균주임을 다시 한번 더 입증한 것이다.

```

ATGTTGAACAATTTTCAGCGAGTTAATGAAAGAAACCAATAAAATCAAAAATTAGAGAAAAACATTAATCTGATGCGCTTTTATATCGCTTTA
CCTGGTTAATAGAAATAGAAATCACAATAAAACATTGTACTAAATGTTCAITTTTAAATATTTGCTCATGTCAATCTTCTCTCATAAAT
TCTCACATGCGGACAATCTTCAAAAAACTTAAACACTGAACTTCCTGTATGTAITTTTACAATTAAGTACACTTTTCATAAAAAGGAGGAAGG
-35 -10 RBS
AAAATGAATCATTCAAAAACACTTTTGTAAACCGCGGCAGCCGGATTGATGCTCACATGCGGTGCGGTTTCTTCCAGGCCAAGCATAAAGC
M
TGTCGTATCCTTATCATTTTACCGTGAATGCGCGCGCGGAAACCGGAACCGGTTGATACAGCAGGTGATGCAGCTGATGATCCTGCGATTG
GCTGGACCCCAAGAATCCTCAGAACAGCAAAATTGATCACAACCAATAAAAAATCAGGCTTAGTCTGTACAGCCTAGAGGGAAAGATGCTT
CATTCTATCTACCGGGAAGCTGAACAATGTTGATATCCGCTATGATTTTCCGTTGAAACGGAAAAAAGTATGATGCGCGGCGCATCCA
ATCGGTTCTGAAGGAAAGAAATACCAATTGAGATTTACACCAATTGACCGGAAAAACGGCACATTACAAAGCATTACGAACCCAGACCCCGCGAT
TGCAATCAGCAATTTGATGAAGTATACGGTTTCAGCTTGTACACAGTCAAAAAACAGGAAAAATATTACGCGATGGTGACAGGAAAAAGAGGC
GAATTTGAACAATACGAATTAATGCGGATAAAAAATGGATACATATCCGCGCAAAAAGGTAAAGGCGTTTAAATGAATTTCTCAGACAGAAG
GGATGGCAGCAGATGACGAATACGGCAGTCTTTATATCGCAGAAGAAGATGAGGCCATCTGGAAGTTACGCGCTGAGCCGGACGGCGGCAG
TAACGGAAACGGTGAATCGATCGTGCCGACGGCAGGCATTTAACTCCTGATATTTGAAGGACTGACGATTTACTACGCTGCTGACGGGAAAGGT
TATCTGCTTGCCTCAAGCCAGGGTAAACAGCAGCTACGCGATTTATGAAAGACAGGGACAGAACAAATATGTTGCGGACTTTCAGATAACAG
ACGGGCGTGAACAGACGGCACAAGCGATACAGACGGAATTGACGTTCTGGGTTTCGGGCTGGGACCTGAATATCCGTTCCGCCCTTTTGT
CGCACAGGACGGAGAAAAATATAGATCACGGCCAAAAGGCCAATCAAAAATTTTAAATGTTGCCCTGGGAAAGAATCGCTGATAAAAATCGGC
CTTACCCGCGAGGTCAATAAACAGGTTGACCCAAAGAAAACCTGACCGACAGAAGCGGAAAATAACG
    
```

그림 8. *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* KL1114(KCTC 8913P) 의 phytase 유전자(*Bsa-phy1*) 염기서열. 예상되는 -35, -10 과 ribosome binding site(RBS) 서열은 밑줄로 표시함. 개시코돈은 음영처리함.

표 7. Phytase의 아미노산 서열의 유사성

	1	2	3	4	5	6
1	100					
2	4	100				
3	3	5	100			
4	98	3	3	100		
5	91	4	2	91	100	
6	4	5	2	4	5	100

1. KL1114; 2. *Enterobacter cloacae*; 3. *Klebsiella pneumoniae*; 4. *Bacillus subtilis*; 5. *Bacillus amyloliquefaciens*; 6. *Aspergillus ficuum*

1114	-----MNHSKTLLLTAAGMLTCG-----AVSSQAKHKLSDPYHFTVNAAAETEPVD	48
B. sub	-----MNHSKTLLLTAAGMLTCG-----AVSSQAKHKLSDPYHFTVNAAAETEPVD	48
B. amylo	-----MNHSKTLLLTAAGMLTCG-----EVSSQAKHKLSDPYHFTVNAAAETEPVD	48
A. ficu	-MGVSAVLLPLYLSSGVTSLAVPASRNQSTCDTVDQGYQCFSSETSHLWGQYAPFFSLAN	59
E. clo	-----MMKTSAKLAASGLVALLLTGCAS-----STHQTAGQQQLGQQSVLAVNWFQQSG---	48
K. pneu	MQDIRGCYACLSPARCRWCNLPPrDwQLEKVVLSRHGIRPPTPATGKPSRPPPTV	60
1114	TAGDAADDPA-----IWLDPKNPQNSKLIITNKKSG-----LV	81
B. sub	TAGDAADDPA-----IWLDPKNPQNSKLIITNKKSG-----LV	81
B. amylo	TAGDAADDPA-----IWLDPKTPQNSKLIITNKKSG-----LV	81
A. ficu	KSAISPDVPAGCHVTFAQVLSRHGARYPTDSKGGKYSALIEEIQNATTFFEGKYAFLKTY	119
E. clo	-----	
K. pneu	DRVDHPCRGAHR-----PWLRRGQQRACGRPALPPAR-----PAAG	97
1114	VYSLEGKMLHSYPTGKLNNDIRYDFPLN-----GKKVDIAAASNRSEGKNT	128
B. sub	VYSLEGKMLHSYPTGKLNNDIRYDFPLN-----GKKVDIAAASNRSEGKNT	128
B. amylo	VYSLDGKMLHSYNTGKLNNDIRYDFPLN-----GKKVDIAADPNRSEGKNA	128
A. ficu	NYSLGADDLTPFGEQELVNSGVKFKYQRYESLTRNIVPPIRSSGSSRVIASGNKFIIEGFQS	179
E. clo	--EYQALTWQAFNTARMAFDQAPSLTGKP-----KAVIVDLDETMLDN---	89
K. pneu	RMPDGGVDIRARQSAAAYASDRPGAGGWRLPRLRRRYPQLCQRGCRSPVSDRQVRRHANRP	157
1114	IEIYITDGNK-----TLQSIITNPDRIASAIDEVYGFSLYHSQKTGKYAMVTGKE	180
B. sub	IEIYAITDGNK-----TLQSIITDPRPIASAIDEVYGFSLYHSQKTGKYAMVTGKE	180
B. amylo	IEIYATDGNK-----TLQSIITDHPPIASAINVYGFSLYHSQKTGKYAMVTGKE	180
A. ficu	TKLKDPRAPQGGSPKIDVVI SEASTSNNTLDPGTCTVFEDSELADDEANFTATFVPSI	239
E. clo	SAYSAWQAKNGQ-----PFSSKTWSAWTQARQAKAVPGAVEFARHVTENGGLTFVVSN	142
K. pneu	RPPAGGGEREGRGSGAASAGLAPTIQLLKQAVCQADKSCPIFDITPQVQEQSKSGKTTISG	217
1114	GEFEQYELN---ADKNGYISGKKVRAFKMNSQTEGMAADDEYGSLYIAEED-----AI	231
B. sub	GEFEQYELN---ADKNGYISGKKVRAFKMNSQTEGMAADDEYGSLYIAEED-----AI	231
B. amylo	GEFEQYELK---ADKNGYISGKKVRAFKMNSQTEGMAADDEYSRLYIAEED-----AI	231
A. ficu	RQRLENDLSGVSLTDTEVTYLMDCSFDITISTSTVDTKLSPFCDLFTHEEWINVDYLQSL	299
E. clo	RDQKDYAAT---VANMQQLGFPNVSDKTVRLNTDSSNKQARFDAIKNAGYN-----V	191
K. pneu	LSVMANMVETLRLGWSENLPLSQLAWGKITQARQITALLPLLTENYDLSNDV-----	269
1114	WKFSAEPDGGSSNGTVI DRADGRHLTPDIEGLTIYYAADGKGYLLAS-----SQGNSSYAI	286
B. sub	WKFSAEPDGGSSNGTVI DRADGRHLTPDIEGLTIYYAADGKGYLLAS-----SQGNSSYAI	286
B. amylo	WNFSAEPDGGSSNGTVI DRADGRHLTPDIEGLTIYYAADGKGYLMAS-----SQGNSSYAI	286
A. ficu	NKYVGHGAGNPLGPTQGVGYANELIARLTHSPVHDDTSSNHTLDSNP-ATFPLNSTLYAD	358
E. clo	VLYVGDNLNDFGGATWHKGNQ---TRRDFVNLNHQQFGTQFIVLP-----NPLYGD	239
K. pneu	-LYTAQKRGSVLLNAMLGDVKPEANPNRWLLLVADHTNIAMVRTLMNFSWQLPGYSRGN	328
1114	YERQ-GQNKYVADFQITDGPETDGTSDTDGIDVLG-FGLGPEYPPF-----LFVAQDGENI	340
B. sub	YERQ-GQNKYVADFQITDGPETDGTSDTDGIDVLG-FGLGPEYPPF-----FFVAQDGENI	340
B. amylo	YDRQ-GKNKYVADFRI TDGPETDGTSDTDGIDVLG-FGLGREYPPF-----IFVAQDGENI	340
A. ficu	FSHDNGIISILFALGLYNGTKPLSSITTAENITQTDGFSSARTVVFASRMVEMMQCQSEQ	418
E. clo	WESG-----MAENYNKLT-----	252
K. pneu	IPPGSSVLERWRTRRAENATCGSIFQAGGIDDLR-----RLQTPD	369
1114	DHGQKANQNFKMVPWERIADKIGLHPQVKNQVDPKLTDRSGK-----383	383
B. sub	DHGQKANQNFKMVPWERIADKIGFHPQVTKQVDPKLTDRSGK-----383	383
B. amylo	DHRQKANQNFKIVPWERIADQIGFRPLANEQVDPKLTDRSGK-----383	383
A. ficu	EPLVRVLVNDRVPLHGCPVDALGRCTRDSFVKGLSFARSGGDWAECEFA-467	467
E. clo	-----PEQQLSVRESRLQSWNGK-----270	270
K. pneu	AQHPMLROEWHQPGCRQTDVGTLCPPQAAITALGQRIDRSSAPAVAMVLP419	419

그림 9. KL114와 *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus ficuum*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*간의 phytase 아미노산 서열 비교.

Cloning된 *phy* 유전자의 coding region을 pET22b(+) bacterial expression vector에 삽입하여 pETPHY31-3을 구축하였고 발현을 확인하였다(그림 10). pETPHY31-3은 phytase에 N-말단에는 signal peptide인 pelB가 부착되며 C-말단에는 6X His가 tagging 되어있어 IPTG로 발현을 유도하고 His-tag column으로 분리하기가 용이하도록 하였다. 과발현을 유도한 후 His-tag column으로 분리하였으나 그림 10과 같이 5종류의 단백질이 정제되었다. 대조군으로 pET vector만을 도입한 균주에서는 아무런 단백질도 정제되지 않았다. 이러한 원인은 유전자 내부에 내재된 개시코돈들에 의한 것으로 판단된다. 이들 중 41kDa의 band만이 phytase활성을 갖는지를 조사하고 있다.

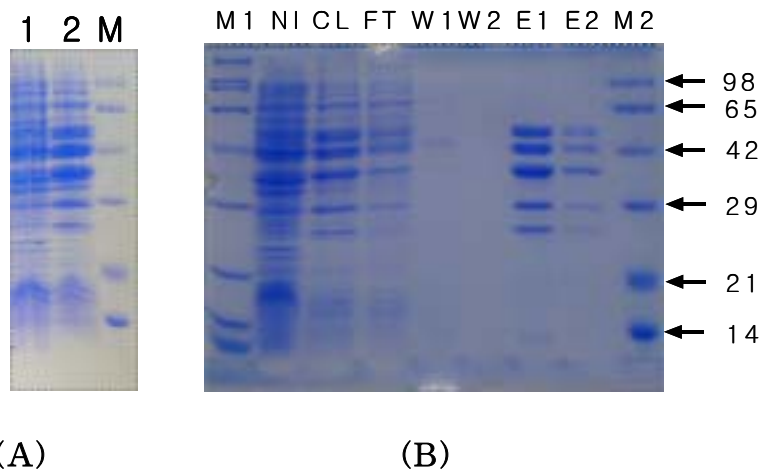


그림 10. (A) *E. coli* BL21(DE3)::pETPHY31-3의 발현산물의 SDS-PAGE 분석 1, IPTG 무처리균; 2, 1mM IPTG 처리균; M, Marker (B) 6x His-tagged phytase의 Ni-NTA spin column을 이용한 정제. M1, Marker; NI, IPTG 무처리균; CL, IPTG 처리균; FT, flow-through; W1 과 W2, 세척액; E1와 E2, 용출단백질; M2, Marker.

6. PQQ synthase 유전자 확보

*E. coli*는 quinoprotein인 glucose dehydrogenase (GDH)로 aldose sugar를 분해하여 사용한다. 이때 cofactor로서 pyrroloquinoline quinone (PQQ)이 필요하다. *E. coli*는 PQQ를 합성하는 효소가 없어 외부로부터 PQQ를 받아들여 이

과정을 수행한다. PSB 특성을 보이는 균주들은 hydroxyapatite(HAP)를 acidification 과정을 통해서 분해할 수 있다. 즉, 그림 11과 같이 PQQ와 GDH의 작용으로 활성화된 holo-GDH는 glucose를 분해하여 유기산인 gluconic acid를 합성할 수 있다. 이 gluconic acid는 HAP를 분해하여 가용성인을 생성할 수 있게된다. PQQ을 합성하는 효소들은 일부의 미생물에서 밝혀졌는데 하나의 operon을 구성하고 있다(그림 12). 이 *pqq* operon의 구성 유전자중에서 PQQ을 합성하는데 가장 중요한 유전자는 *pqq-E*로 알려졌다(Liu *et al.*, 1992, Goosen *et al.*, 1989).

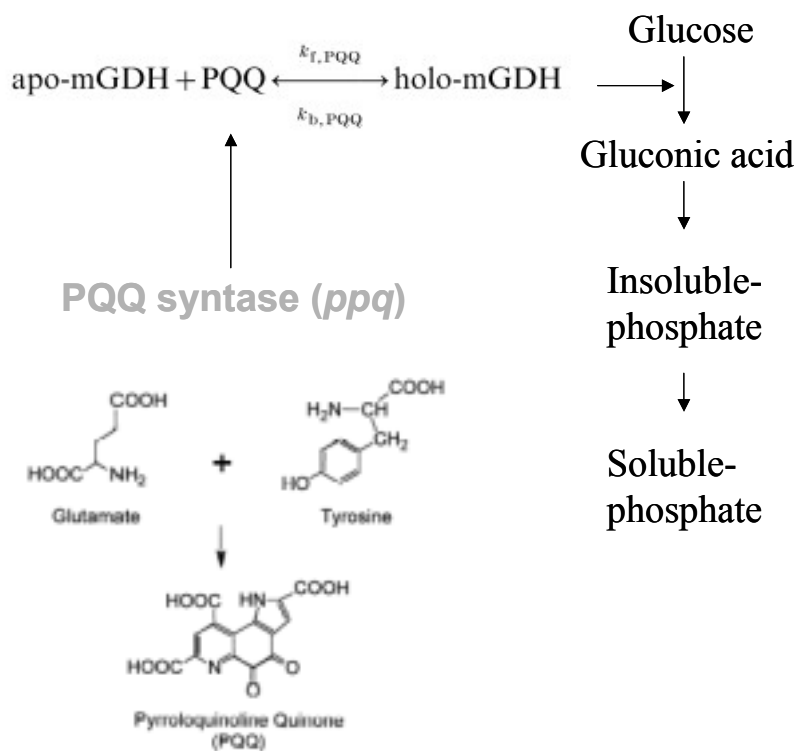


그림 11. PQQ합성 및 조효소역할

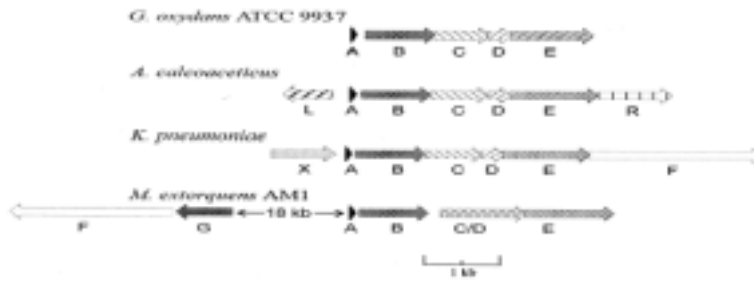


그림 12. 일부 세균에서 확인된 *pqq* operon의 구조

8종의 PSB에서 *pqq-E* 유전자를 탐색하기 위해서 기존에 알려진 *pqq* 유전자 염기서열로부터 *pqq*-1(5'-GCTCTAGACATATGGCCAAACTGAACG-3')과 *pqq*-2(5'-CCGGAATTCGGTGACGCGCTGCTTAAAG-3')를 합성하였다. PCR 결과 KSJ16(*Enterobacter intermedius*) 균주에서만 PCR 산물이 합성되었으며 이를 클로닝하여 염기서열을 결정하고 분석한 결과 그림 13의 구조를 보였다. KSJ16 균주의 *pqq-E*는 GTG를 개시코돈으로 사용하며 *pqq-D*의 3'쪽과 중복사용되고 있음을 알 수 있었다. 아미노산 서열의 유사도는 KSJ16이 *Klebsiella pneumoniae*와는 86%, *Gluconobacter oxydans*와는 48%을 나타내었다(그림 14, 표 8). 본 연구에 사용된 8균주의 PSB 중에서 4균주 (KSJ3, WP20, WP41과 WP42)는 *Acinetobacter* 속의 균주들이며 WP38도 *Enterobacter* 속의 균주로서 *pqq* 유전자가 존재할 것으로 기대되었으나 본 연구에 사용된 primer로는 증폭되지 않았다. 이들 균주에서 *pqq*를 탐색 및 확보하기 위해서는 Southern blot를 이용하여 확인하거나 새로운 primer를 설계하여 사용해야 할 것으로 판단된다.

TCTAGACATATGGCCAACTGAACGAGACCGCCGTGGCGATCCTCGAACTGGTGGATGGCAACAGGATGTGGCGGATCGTTGCCACGC

pqq-D → M A K L N E T A V A I L E L V D G K Q D V A A I V A T L
 TGGATGCGCGTTTCCCGGACCGCGGGCGGTGTGGCGAGACGTC AAGAGTTCCTGCAATCGCCATTGAACAAAATGGATACAGTGTCC
 D A R F P D A G G V G D D V K E F L Q S A I E Q K W I Q C R

pqq-E → M
 TGAACCCGAGTAAAAGCGTGAACCGCCGCTGTGGCTGCTGGCAGAACTGACCTATCGCTGCCCGCTGCAGTGTCCATATTGCTCCAAATCC
 E P E *

N P S K S V T P P L W L L A E L T Y R C P L Q C P Y C S N P
 GCTGGATTTTCCAGCAGGAGAAAGAGCTGACCACCGAACAGTGGATTGAGGTGTTTCGTGACGGCGCGCCATGGCGAGCGTGCAGCTC
 L D F S Q Q E K E L T T E Q W I E V F R Q A R A M G S V Q L
 GGTITTTCCGGCGGCAACCGCTAACCGTAAAGACCTGCCGGAGCTGATTCGCGCGCGCGGATTCGGTTTCTACACCAACCTGATCA
 G F S G G E P L T R K D L P E L I R A A R D F G F Y T N L I T
 CCTCCGGCATCGGCTGACGGCGAAAAAAGCTGACGCGCTTGGCGAGCGCGACTCGATCGTATCCAGATCAGCTTCCAGGCGAGCGATGA
 S G I G L T A K K L D A F A D A G L D R I Q I S F Q A S D E
 AACCTGAACCGCGCGCTGGCGGGTCAAAAAAGGCTTCCAGCAGAAGCTGGAGATGGCGAAAGCGGTGAAGCGCACCGCTATCCGATG
 T L N A A L A G S K K A F Q Q K L E M A K A V K A H G Y P M
 GTGCTGAATTCGTGTCATGCCACAAATATCGACAGATCGACAAAATCATGATCTCTGTATCGAACTGGAGCGCGAGATGTGAGC
 V L N F V L H R H N I D Q I D K I I D L C I E L E A D D V E L
 TGGCAGCTGCAATTCATGCTGCGTGGCGCGAGCTCAATCGTGAAGGATTGCTGCGAGCGCGAGCAGATCGCAACCGCGAAGCGGTGGT
 A T C Q F Y G W A Q L N R E G L L P T R E Q I A N A E A V V
 GGCGAATTATGTCAGCGCATGGCGCGCGCGCAATCTCACCAATCTGCTGTGCTGAGCGCGGATTACTACGAGAGCGCGCGAAACCC
 A D Y R Q R M G A S G N L T N L L F V T P D Y Y E E R P K P
 TGCATGGCGGATGGGATCGATCTTCCCTCAGCGTCAAGCGTGAACCGCGCGTGGCGTCCACAGCGCGCTCAGCTGCCGTTGGGT
 C M G G W G S I F L S V T P D G T A L P C H S A R Q L P V A F
 TCCGTCGCTGCTGGAGCGCGCGTGGAGCATATCTGGTACAACTCGTTTGGTTTAAACCGCTATCGCGCTTGGATGGATGGCGAAAC
 P S V L E R T L D D I W Y N S F G F N R Y R G F D W M P E P
 CTGTCCTCTCGATGAAAAGAGAAAGACTTTGGCGGCTGTGCTGTGAGGCTTTATGCTGACCGCGATCCGATAACACCGATCCG
 C R S C D E K E K D F G G C R C Q A F M L T G D A D N T D P
 GTATGCAAGAAATCGCCCATCGCGCAAGATCCTCGAAGCAGCGTGAAGCGCACTGACCGACATCAAAATCCAGCAGCTGCAGTTCC
 V C S K S P H H G K I L E A R R E A N C S D I K I Q Q L Q F R
 GCAATGCGCAACTCCGAAGTGTATTAAAGCGCGGTCAACCGAATCC
 N R S N S E L I F K Q R V T

그림 13. KSJ16의 *pqq-D* 와 *pqq-E* 유전자 구조. Primer는 음영처리하였음

표 8. Pqq-E 아미노산 서열의 유사도

	1	2	3	4	5	6	7
1	100						
2	86	100					
3	81	81	100				
4	80	80	81	100			
5	70	69	66	69	100		
6	62	62	60	62	49	100	
7	48	48	48	47	49	45	100

Sequence 1: KSJ16 379 aa *Enterobacter intermedius* KSJ16
 Sequence 2: P27507 380 aa *Klebsiella pneumoniae*
 Sequence 3: AAC38153 396 aa *Rahnella aquatilis*
 Sequence 4: Q01060 377 aa *Pantoea agglomerans*
 Sequence 5: AAG05377.1 381 aa *Pseudomonas aeruginosa* PA01
 Sequence 6: CAA29756.1 384 aa *Acinetobacter calcoaceticus*
 Sequence 7: CAB83201.1 359 aa *Gluconobacter oxydans*

```

KSJ16 -----MNSK-----SVTPPLWLLAELTYRCPLQCPYCSNPLDFSQEKE 40
P27507 -----MSQSKP-----TVNPPPLWLLAELTYRCPLQCPYCSNPLDFARQDKE 41
AAC38153 MMTLKISSLRPMHKSGLPSVNLKPAVKPPSWLLAELTYRCVQCPYWSNPLDFAKQEKE 60
Q01060 -----MTDH-----APTVPPLWLLAELTYRCPLQCPYCSNPLDFAAQEKE 41
AAG05377.1 -----MRNSGSS----CSESVGPPPLWLLAELTYRCPLQCPYCSNPLEFAREGAE 45
CAA29756.1 -----MTEG-----VGLPPLWLLAELTYRCPLQCPYCSNPLDYAQHKNE 38
CAB83201.1 -----MTLP-----SPPMSLLAELTHRCPLSCPYCSNPLELERKAAE 37
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
KSJ16 LTTEQWIEVFRQARAMGSVQLGFSGGEPLTRKDLPELIRAARDLGFYTNLITSGIGLTAK 100
P27507 LTTEQWIEVFRQARAMGSVQLGFSGGEPLTRKDLPELIRAARDLGFYTNLITSGIGLTAK 101
AAC38153 LTTAQWIKVFEAREMGAUVQIGFSGGEPLVRKDLPELIRGARDLGFYTNLITSGIGLTK 120
Q01060 LSTEQWIEVFRQARAMGSVQLGFSAGEPLVRKDLPELIRAARDLGFYTNLITSGIGLTK 101
AAG05377.1 LSTAEWIEVFRQARELGAAGLQVGGGEPVLRQDLAELIEAGRGLGFYTNLITSGIGLDEA 105
CAA29756.1 LITQEWDFVQARQMGAVQLGFSGGEPLVRQDLQVVAHQGGFYTNLITSGMGLTEQ 98
CAB83201.1 LDTATWTVAVLEQAELGVLQVHFSGGEPMPARPDVELVSVARRLNLYSNLITSGVLLDEP 97
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
KSJ16 KLDADFADAGLDRIQISFQASDETLNAALAGSKAFQQLLEMAKAVKAHGYPMVNLNVLHR 160
P27507 KLDADFSEAGLDHIQISFQASDEVLNAALAGNKAQQLLAKAVKAVKARDYPMVNLNVLHR 161
AAC38153 KIDAFQAAGLDHIQISFQASDEELNAALAGNAKAFQQLLAKAVKAVKAHGYPMVNLNVLHR 180
Q01060 KLQTFADAGLDHIQISFQASDETLNAALAGSAAKAFQQLLAKAVKAVKAGYPMVNLNVLHR 161
AAG05377.1 RLARFAEAGLDHVQISFQAADDEVNLLAGSRKAFQQLLAKAVKAVKAHGYPMVNLNVLHR 165
CAA29756.1 RIDLQKAGLDHIQVSVQASDPVNDALAGSKHAFQYEMCRLVKKYDYPVNLNVLNHR 158
CAB83201.1 KLEALDRAGLDHILSFDQVTEGGAERIGGLKGAQARKIAAARLIRASGIPMILNVLNHR 157
: : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
KSJ16 HNIDQIDKIIDLCIELEADDVELATCQFYGWAQLNREGLLPTREQIARAEAVVADYRQRM 220
P27507 HNIDQLDKIIDLCIELEADDVELATCQFYGWAFLNREGLLPTREQIARAEQVVDYRQKM 221
AAC38153 HNIDQIDKIIDLSIELDADDVELATCQFYGWAQLNREGLLPTREQIARAEVVDYRQRM 240
Q01060 HNIDQIDRIIELATQLDADDVELATCQFYGWAHLNREGLLPTREQIARAEVVDYRQRM 221
AAG05377.1 HNIDNIERIIQLCIELEADYVELATCQFYGWAALNREGLLPTRAQLERAERITAEYRQL 225
CAA29756.1 HNIDQIEQIIDLCIELEADYVELATCQFYGWAFLNREGLLPTREQIARAEVVDYRQRM 218
CAB83201.1 ENVARIPEMFALARELAGRVEIAHTQYQYWGWLKNRDALLPSRDQLEESTRAVEAERAKG 217
: : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
KSJ16 GASGNLNLFLVTPDYEEERPKCMGGWGSIFLSVTPDGTALPCHSARQLP-VAFPSVLE 279
P27507 AASGNLNLFLVTPDYEEERPKCMGGWGSIFLSVTPDGTALPCHSARQLP-VAFPSVLE 280
AAC38153 AGTGNLNLFLVTPDYEEERPKCMGGWGAIFLSVTPDGTALPCHSARQLP-VAFPSVLE 299
Q01060 AVDGLANLFLVTPDYEEERPKCMGGWGAIFMSVTPDGTALPCHSARQLP-VQFPNVRE 280
AAG05377.1 AAEGNPKCLIFVTPDYEEERPKCMGGWASVFLDITPDGTALPCHSARQLP-VQFPNVRE 284
CAA29756.1 KAGNHPCKLIFVTPDYEEERPKCMGGWGIFFTVAPDGMALPCHSARQLP-ISFPNVRE 277
CAB83201.1 GLS-----IDYVTPDYHADRPKCMGGWGRFVNVTPSGRVLPCAAEIIIPDVSFPNVKD 272
: : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
KSJ16 RTLDDIWNYSFGFNRYRQGFDMPEPCRSCEKEKDFGGCQCQAFMLTGDADNDPVCSSK 339
P27507 QSLESIWYDSFGFNRYRQGFDMPEPCRSCEKEKDFGGCQCQAFMLTGSADNDPVCSSK 340
AAC38153 NTLQEIWYDSFGFNRYRQGFDMPEPCRSCEKEKDFGGCQCQAFMLTGNADNDPVCSSK 359
Q01060 HDLEHIWYDSFGFNRYRQGFDMPEPCRSCEKEKDFGGCQCQAFMLTGDADNDPVCSSK 340
AAG05377.1 HSLRHIWYDSFGFNRYRQGFDMPEPCRSCEKEKDFGGCQCQAFMLTGDADNDPVCSSK 344
CAA29756.1 HKLSDIWYKSTGFNFRGDWMPGCRSCPDKDRDFGGCQCQAFMLTGDADNDPVCSSK 337
CAB83201.1 VTLSEIWNISPLFNMFRGTDWMPGCRSCERKERDGGCQCQAFMLTGNADNDPVCSSK 332
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
KSJ16 PHHGKILEARREANCSDIKIQQLQFRNRNSSELIFKQRT----- 379
P27507 PHHHKILEARREANCSDIKVSQQLQFRNRNRSQLYQTRDL----- 380
AAC38153 EHHGMILAAREQANCTNIQINQLQFRNRNSQLIFKQ----- 396
Q01060 PHHGTILAAREANRTQLGIDQLRFRNQANSRLFYK----- 377
AAG05377.1 ARHDLILAARQAEEAPLGLDALTRNQRASRLICKA----- 381
CAA29756.1 PYHMIQARAEASQLVAP-LQNLVFRNRSRNSKLSATQNPVHTITDI 384
CAB83201.1 PFT--ILWNRQGVKKQLNSIGGKVRVSF----- 359
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

그림 14. Pqq-E의 아미노산 서열비교

7. UDP-sugar hydrolase 유전자 *ushA*의 클로닝 및 특성분석

Bacterial alkaline phosphatase (BAP)는 *phoA* 유전자에 의해 생성된다. 그러나 많은 자연산 유기인화합물들 (예로, 5'-nucleotide, 5-romo-4-chloro-4-indolylphosphate-p-toluidine(XP)와 bis-p-nitrophenyl phosphate(bis-pNPP) 등)은 BAP 외에도 *ushA* 유전자 산물인 UDP-sugar hydrolase에 의해서 분해되어 Pi를 생산하는 기작이 존재한다. *Enterobacter aerogenes*로부터 *ushA* 유전자를 *in vivo* molecular 클로닝하여 염기서열을 확인하였다(그림 15).

```

1          GAATTCGCGCTGCAGCAGCGGATAAATGCCAGGATGAGCGACTGGATCATATGTTTAGCAGAT
66  GGGAGAGGCTAATTGCCCGCAGGATGCCAATGAGGTGGCGCTTTTTCGGCGCGCGCCGGTACCGGGTAAGGACTGAGCGGATTGGT
156  TGGTGTGCATAGGTTCCACTTCAGCGAGTCTATTGTTGTAGAGAATGACAGGTTGAATTATTATCCGACTAACATACCTGTCCCTAAGGT
246  TTGAAGGAAGTCGAATTCGAAAAACATATTGTCAAAAGCGCTGACTGCTATACCTTTCCGCACTTGTATTAAAGTCAGGGAATGAAAC
          -35          -10          RBS
┌ushA
336  ATGCAATTAATTAAGACGCGGATGCGCTGGCGTTATTGCGCGCTTATGCTGGCGAGCGCTGTCAGCGCAGGCGCTATGAGCAGGACAAA
MetHisTyrLeuLysArgGlyValAlaLeuAlaLeuPheAlaAlaLeuSerLeuGlySerLeuSerAlaGlnAlaTyrGluGlnAspLys
          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
426  ACCTATAAAATCAACCTCTGCACACTAAGCAACCAACCGGTCATTCTGCGCAACGACTATGCGCAATATGCGCTTGCGCCACAGAAAG
ThrTyrLysIleThrIleLeuHisThrAsnAspHisHisGlyHisPheTrpArgAsnAspTyrGlyGluTyrAlaLeuAlaAlaGlnLys
516  ACGCTGGTGGACGGTATCCGCAAGAGGTGGCGCGGAAAGCGGTAGCGTCTCTGCTGTCTCCGCGCGGATATCAATACCGGGGTGCCG
ThrLeuValAspGlyIleArgLysGluValAlaAlaGluGlyGlySerValLeuLeuLeuSerGlyGlyAspIleAsnThrGlyValPro
606  GAATCCGATTTACAGGATGCAGAACTGATTTTCGCGCATGAACCTGATTGGCTACGATGCCATGGCGGTTTGCCAACCATGAGTTTGTAT
GluSerAspLeuGlnAspAlaGluProAspPheArgGlyMetAsnLeuIleGlyTyrAspAlaMetAlaValGlyAsnHisGluPheAsp
696  AACCCCTCAGCGTCTGCGCCAGGAGAAAGTGGTGAAGTTCCTTTCTGTGCGCAATATCTATCAGAAAAGCACCGCGAAACGCG
AsnProLeuSerValValArgGlnGlnGlnLysTrpSerLysPheProPheLeuSerAlaAsnIleTyrGlnLysSerThrGlyGluArg
786  CTGTTTAAACCCCTGGGCGCTGTTTAAAGCGCGCGGCTTAAATTTGCGGTGATTGCTTAAACGACCGACGATACGCGAAAATTCGCAAC
LeuPheLysProTrpAlaLeuPheLysArgGlyGlyLeuLysIleAlaValIleGlyLeuThrThrAspAspThrAlaLysIleGlyAsn
876  CCGGAATATTTCACCGATATCCGAATTCGGTAAATCCGCGCGAGAAAGCCAGCTGGTGAATTCAGGAGCTGCAGCAAAATGAAAAGCCGAC
ProGluTyrPheThrAspIleGluPheArgAsnProAlaAlaGluAlaLysLeuValIleGlnGluLeuGlnGlnAsnGluLysProAsp
          *
966  GTGATTCGGGACCAACCATATGGGCCACTATGACAACGGTAATCACGGCTCAACGCGCTGGCGAGCTTGAATGGCGCGGAGTTTA
ValIleLeuAlaThrThrHisMetGlyHisTyrAspAsnGlyAsnHisGlySerAsnAlaProGlyAspValGluMetAlaArgSerLeu
          *
1056  CCTCGGGATCGCTGGCGATGATGCTGGCGCCATTGCGAGGATCCGGTCTGCATGCGCTCGGAAAATAAAAAGCAGGTGATTAATC
ProAlaGlySerLeuAlaMetIleValGlyGlyHisSerGlnAspProValCysMetAlaSerGluAsnLysLysGlnValAspTyrIle
1146  CCCGCCACCCCGTGGCGCCGATGCGCAGAATGGCATCTGGATCGTGCAGGCTCAGGATGGGGTAAATATGTCGCGACCGCGGATTTT
ProGlyThrProCysAlaProAspArgGlnAsnGlyIleTrpIleValGlnAlaHisGluTrpGlyLysTyrValGlyArgAlaAspPhe
          *
1236  GAATTCGCAACCGGGAGATGAAGCTGTCACACTACGCTGATCCCGTCAACCTGAAGAAGAAGTCACTCGGATAACGGTCAAGAC
GluPheArgAsnGlyGluMetLysLeuValHisTyrGlnLeuIleProValAsnLeuLysLysValThrTrpAspAsnGlyGlnSer
1326  GAGCGCTATTGTATACCGCGCAATTTGCTGAAAACCGCGAGATGCTCTGCTGTAAACGCGTTCAGAAATAAAGGCAAGGCGCAGTTA
GluArgValLeuTyrThrProGlnIleAlaGluAsnProGlnMetLeuSerLeuLeuThrProPheGlnAsnLysGlyLysAlaGlnLeu
1416  CAGGTGAAAATAGCGAGCTCAACGCCATCTTGAAGCGATGCGCAAGGTTGCTCTGTACAAACCAATATGGGCGCTCTGCTGCTG
GlnValLysIleGlySerValAsnGlyHisLeuGluGlyAspArgSerLysValArgPheValGlnThrAsnMetGlyArgLeuLeu
          *
1506  GCGGCGCAGATGGCGCGCAGCAATGCTGATTTGCGGTGATGAGCGCGCGGTATTTCGCGACTTATCGAAGCGGGTGATATTACCTAT
AlaAlaGlnMetAlaGlySerAsnAlaAspPheAlaValMetSerGlyGlyGlyIleArgAspSerIleGluAlaGlyAspIleThrTyr
1596  AAAGCGTGTATGAAGTTCAGCGCTTCCGCAACCTGCTGACTTACGTGATATGAGCGGTAAAGAGGTGACTGAGTACTTGCACCCGCTC
LysAspValMetLysValGlnProPheGlyAsnValLeuThrTyrValAspMetSerGlyLysGluValThrGluTyrLeuThrAlaVal
          *
1686  GCGCAGATGAAGCGGATTCCGGCGCTTATGCGCAGTTGCGCAACGTCAGTTTTCGTTGCCAAGATGGCAAGCTTAACGATCTGAAAATC
AlaGlnMetLysProAspSerGlyAlaTyrAlaGlnPheAlaAsnValSerPheValAlaLysAspGlyLysLeuAsnAspLeuLysIle
1776  AAAGCGCAACCGGTGGATCCGGCGAAAACCTTACCGTATGGCGAGCGTGAGCTTTAACGCCACCGCGCGTGCAGGCTACCGCGAGATCGAT
LysGlyGluProValAspProAlaLysThrTyrArgMetAlaThrLeuSerPheAsnAlaThrGlyArgAspGlyTyrProGlnIleAsp
1866  AATAAACCGGATACGTCAATACCGCTTATCGATGCCAGGTTGCTGAAAGAGTACATCGAGAAGAAGCTGCGCGCTGGATGCGCGCGCT
AsnLysProGlyTyrValAsnThrGlyPheIleAspAlaGluValLeuLysGluTyrIleGluLysAsnSerProLeuAspAlaAlaAla
1956  TACGAGCCGAAGGCGAAGTCACTGCGAGTAAGCTATGCTTAACGGATCCCGGATAAGGCGCGAAC
TyrGluProLysGlyGluValSerTrpGlnStop
    
```

그림 15. 인화합물 대사과정에서 *ushA* 유전자의 역할 및 *Enterobacter*

*aerogenes*의 *ushA* 유전자 구조

8. *pho* regulon 조절유전자 *phoB*의 항시활성형 *phoB^C*의 구축

미생물에서 각종 인화합물의 분해, 흡수, 축적 등에 관련된 유전자들은 *pho* regulon에 속한다(그림 16). *pho* regulon은 전사활성인자인 PhoB에 의해 조절된다. PhoB는 *pho* regulon의 전사활성 activator로서 alkaline phosphatase 유전자 *phoA* 등 30여개 유전자가 PhoB에 의존하여 발현한다. PhoB는 그 기능이 활성화되기 위해서는 53번째 잔기인 aspartate가 인산화된다. 그러나, PhoB가 활성화되는 조건은 저인산 환경이다. 저인산 환경에서는 미생물의 생육이 느릴 수밖에 없고 생물량이 극도로 제한될 수밖에 없다. 따라서 인산의 농도에 관계없이 항상 강력한 활성형을 갖는 PhoB 단백질(PhoB^C)를 생산하는 균주를 구축한다면(그림 16) 보다 효율적인 인화합물의 분해 및 축적이 이루어질 것이다.

가. *E. coli* PhoB^C의 구축

E. coli phoB 유전자를 대상으로 site-directed mutagenesis을 통하여 PhoB의 인산기 부착 아미노산인 53번 잔기를 D53E로 변환시킨 돌연변이 *phoB* 경우에 Δ *phoBR* 균주에 도입하였을 때 Pi의 농도에 관계없이 PhoB^C의 특성이 계속적으로 나타났음을 BAP 활성 조사를 통해 확인하였다(표 9). 즉, PhoB가 활성화되기 위해서 인산화가 필수적인데 이때 53번 잔기가 인산화된다. 이 53번 잔기를 변화시켜 인산화 없이 활성화되는 PhoB^C를 구축한 것이다. 그러나, PhoB의 인산화는 PhoR 뿐만아니라 CreC와 세포질내 acetyl phosphate에 의해서도 인산화되어 활성화된다. 따라서, 원천적으로 인산화 잔기를 제거한 D53E의 변형체는 이러한 시너지효과가 배제되어 있다.

표 9. *E. coli* PhoB^C을 도입한 Δ *phoBR* 균주에서 BAP의 활성도 조사

Strain	Genotype	BAP Activity
BW24885	<i>DphoBR580 attl::pSK96[PrhaB-phoB593 (D53E)]</i>	116 ± 7.00
BW24886	<i>DphoBR580 attl::pSK97[PrhaB-phoB594 (D53A)]</i>	3.4 ± 0.25
BW24889	<i>DphoBR580 attl::pAH136[PrhaB-phoB (W.T.)]</i>	1.7 ± 0.30

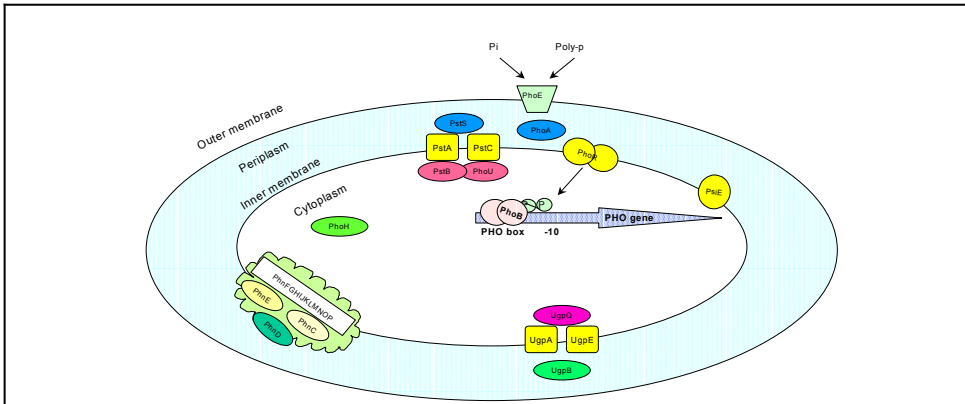


Fig.1. Products of genes induced by PhoB during phosphate starvation

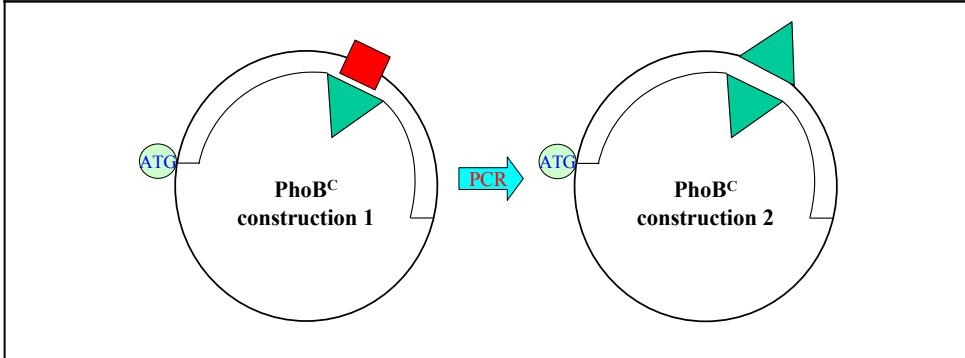
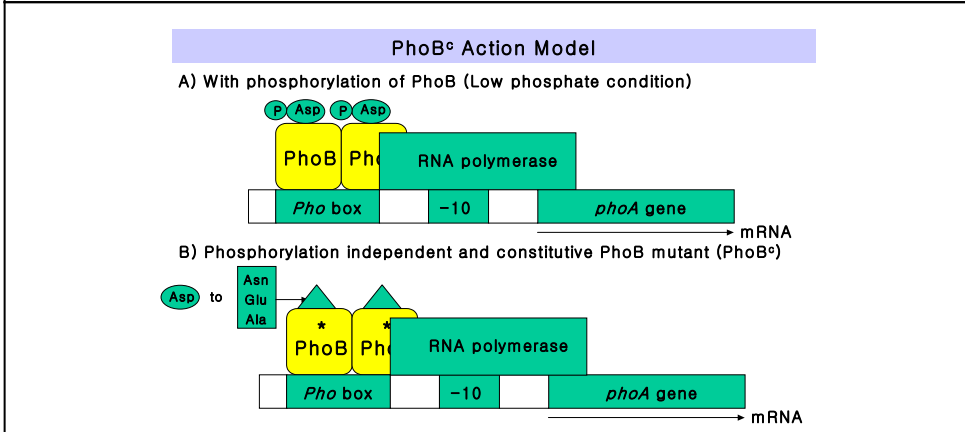


그림 16. *Pho* regulon에 의한 *pho* gene의 발현 연계와 *pho* regulon 조절

능 증가용 PhoB^C의 개념도 및 PhoB^C 구축방법 개념도
 (□ phosphorylation site, △ mutated phosphorylation site).

나. *Enterobacter aerogenes*의 PhoB^C 구축

*E. coli*의 PhoB의 아미노산 치환 변이체인 PhoB-D53E의 PhoB^C로의 활성은 있었으나 Zundel 등(1998)과 Allen 등(2001)의 연구에서 다른 부위의 아미노산 치환과 제거 결과에 비해 미미한 수준의 활성도를 보였다. 따라서 이들의 연구결과를 반영하여 보다 활성이 증가된 PhoB^C를 개발하고 연구결과의 특허출원 등을 고려하여 국내외 적으로 잘 연구된 *E. coli*의 *phoB* 유전자를 사용하지 않고 본 연구진에 의해 최초로 확인된 *Enterobacter aerogenes*의 *phoB* 유전자를 사용하였다(그림 17). 변형을 주고자하는 아미노산도 receiver domain에서 인산화가 이루어지는 D53이 아니라 PhoB의 인산화가 일어나는 acidic pocket부위를 구성하는 잘 보존된 산성 아미노산들 중에 E9과 E11을 변화시킨 것과 PhoB의 receiver domain과 DNA에 부착하는 output domain을 연결하는 linker 부위를 제거한 PhoB를 대상으로 PhoB^C로서의 역할과 활성크기를 조사하였다.

pSH1C는 본 연구진이 확보한 *E. aerogenes*의 *phoB-phoR* operon 중에서 promoter와 *phoB* coding region 그리고 *phoR* 유전자 일부가 포함된 1.8 kb의 *Pst*I 조각을 pBSSK(+) vector의 *Pst*I site에 클로닝한 것이다(그림 18).

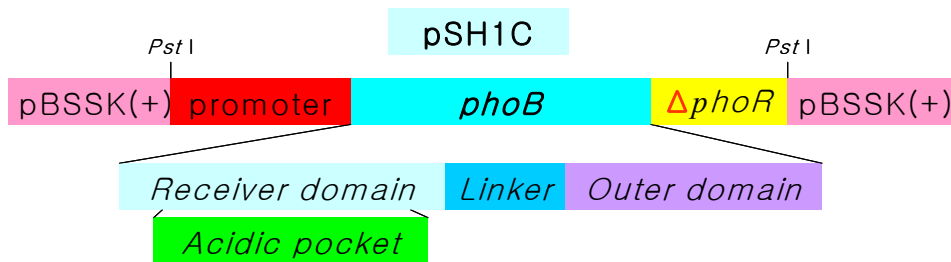


그림 18. *Enterobacter aerogenes phoB* 유전자를 지닌 pSH1C의 구조

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90
Ec							0
Ea	CAAGAATTTTCCCGT	CGTCGACGCGCGCA	GCTCAACGCGCGCG	CCGTGATAGTGCAT	CCGCGTGGTTGCGGG	CGCGGTTCGGCTCC	90
Ec	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
Ec							0
Ea	AGAAGGCGCGATAGG	CGGTGCCCCGAACT	CAAATTCACCTTCGG	CCAGGCACTCGCGG	T--GTGCGGGTTCAT	CAGATCGTTTTGCGA	178
Ec	181	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270
Ec							0
Ea	TTGCGATACGCTGCT	CAGCGCGCGGTTTC	GTGGTACAGCGGAG	--ACA--GATAGCAT	CTAACAGGGTGGTTT	TCCCGCGCGCGTCC	264
Ec	271	285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360
Ec	--CCAGTCAA--GA	AAAGCC--TGATG--	-----TTGAGCTT	C--GGGCTTTTAC	TGTAGAGTTCGCGC	CGAGATGCCAGTCTG	71
Ea	GCCCGTAATCGCGA	ATAACCCATTGCTGG	CGAACGGTTCAGCGG	TAAAGTCGATTTTCC	ATTGCGCTTTCAG--	CGAGTTAAGGTTTTT	352
Ec	361	375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450
Ec	-AGGTGTGA--AG	GATGCGCATAAAGGT	TCCCTGGCGAAAAAG	CATGGCGCGATTAT	ACCCAAACAGATGTG	CCATTGCTTTTT--T	154
Ea	CAGCGGTAGGCTCAG	GATTCACACAGCGT	TCTCACCGTTCAGG	CTATGCAAGGTTT--	CCGTAAACAGTGTCT	CCAGCGCGCTGTGCT	440
Ec	451	465 466	480 481	495 496	510 511	525 526	540
Ec	TCGTGCGCACGGAAA	TCAATAACCTGAAGA	TATGTGCGACGAGCT	TTTCAT--AAAT	CTGTCAATAATCTGA	CGCATAATGACGCTC-	238
Ea	GTGGAGCATCAAGAG	TTTCCAGCGCCAGGC	GGCGCGCAACACCT	CTTGGACCTGCAGTT	CGCTCAGCG--TTTC	CGCTGAACCGCGGC	529
Ec	541	555 556	570 571	585 586	600 601	615 616	630
Ec	--GCATTAATGA	TCGCAACCTATTAT	TACAACAGG-GCAAA	TCAT--GCG-GAGAC	GTATTCGTGCTGTAG	AAGATGAAGCTCCAA	319
Ea	AGAATGCTTTCAGCG	TGGCGCGACTCGGA	CGCACAGCAGCACT	TCCACCGCGAGGAT	TGGTCTGCT-GCTG	AATTTTTCTTTGGAT	618
Ec	631	645 646	660 661	675 676	690 691	705 706	720
Ec	TTGCGAAATGGTCT	GCTTGG--TGTGAA	--CAAAAT--GGCT	TTGAGCGGTGGAAG	CGGAAGATTATGACA	GTCGTGTGAATCAAC	403
Ea	ATGCTGCA--GGTAT	TCATGCTGGT-GAT	TTGATATTCAGCCA	TACCGGCGCTGCTG	CGCGTATCCGCCA	CTGCTG--AAGTGT	703
Ec	721	735 736	750 751	765 766	780 781	795 796	810
Ec	TGAATGAACCTGCG	--CGGATTTAAT	T--CTGCT-GGACTG	GATGTTACCTGCGG	CTCCGATCCAGTT	CA--TCAAACACCT-	482
Ea	TGCGGTGATG--TGGC	GAAATGCGCTTTTCAG	TACCGCCAGCGGCTG	GGTAT--CGG	CACCGTTAGCGGGGT	GACTTCACTGAGCTT	786
Ec	811	825 826	840 841	855 856	870 871	885 886	900
Ec	-CAGGCG--GA	GTC--GATGACCGG-	--GGATATTCCAGT	GGTATGTGAC--	-CGCCAGAGGGGAA-	--GAAG--AAGAT	549
Ea	GCCCTGCTGAATGA	GACCAGATTACGCT	TTTGTTTTTTCGGT	T-TCATCAAACTCA	GCGCGACGCGGAAAC	GCTGTGTAGGAATAT	875
Ec	901	915 916	930 931	945 946	960 961	975 976	990
Ec	CGGTGC-GCGGCT	TGAACCGG-CGCGG	ATGACTATATC--AC	CAAGCGTTTTGCGC	GAAGG--AGCTGT	GGC-GCGAA--TC	627
Ea	-GCTGCGCGCGCA	ACCAACTGGCGCG-	ATGAATATGGCGAG	CGCGATGTAATCGC	GCGCGGAAAGCGATT	GCGCGGAAAGCGCTC	963
Ec	991	1005 1006	1020 1021	1035 1036	1050 1051	1065 1066	1080
Ec	AAAG--CGTA--	ATGCGCGTATTTC	GCCAAAT--GGC	GGTGAAGAGGTGAT	TGAGATGCAGGGATT	AA--GTCGCAACC	701
Ea	GAGGGTGCCTATATA	GATTCACGGACCGC	GTGCTTTTGTGCTGC	GCCGACGGTGGTGG	GTGGCGCTGGCAAT	AATGCTAGTGTGCGG	1053
Ec	1081	1095 1096	1110 1111	1125 1126	1140 1141	1155 1156	1170
Ec	GACATCTCACCGAGT	GATGCGGGCGAAGA	--GCGCTGG-AGAT	GGGCGGACAGATT	TA--AACTGCTGCAC	TTTTTTATGACGCAT	786
Ea	TTGCGCGCGAGATC	CGAGGCTGCTGATA	TTCCTGCTGATAGTA	GTGCTGATGGCGGT	GAGCAACTGCTGCTG	TTTTT--CGCGG	1138
Ec	1171	1185 1186	1200 1201	1215 1216	1230 1231	1245 1246	1260
Ec	CCTGAGCGCGGTAC	AGCC--GC-GAGCAG	CIGITAAACACGTC	TGGGAACTAACGTG	TATGTG--GAAGACC	GCAC-GGTGATGTC	870
Ea	CTGGAG--TGGCC	AGCCTGCTGACCAC	CAGTT--CGCG-C	GGCGCAAAAACGCG	ACCGGCGAAGACC	GCGCGGGCGCC-GCC	1218
Ec	1261	1275 1276	1290 1291	1305 1306	1320 1321	1335 1336	1350
Ec	CAKATTCGTGCGCTG	CGTAAAGCACTGGAG	CCCGCGGGCATGAC	CGCA-TGGTG-CAG	-ACCGTGGCGGTAC	AGGATA-TGTTTTT	965
Ea	GTGCGCGCGCGCAA	GATAAAGGGCGGTG	GCCGCGGTGGCGAC	CACGTTGGTTTTTCAG	GAAGCGAGTATTTC	GCGGACTGTTTTAA	1308
Ec	1351	1365 1366	1380 1381	1395 1396	1410 1411	1425 1426	1440
Ec	CAACCGCTTTTAAAC	GCC-TTG--					976
Ea	GCTGCGACCGAATC	GTGGTTGCCCCGAG	CACCACCAACTGGCA	GCCGTTTTGCTGCAG	TTGAACGCAAAAACG	GTTATACAGT--TC	1395
Ec	1441	1455 1456	1470 1471	1485 1486	1500 1501	1515 1516	1530
Ec							976
Ea	GCGCGGTAGTTCGG	CGGAGAGCGGTATC	AAAAATATCGCCAGC	GAGGATAATGGCATC	CACCTGTTGTT-CCT	GCGCGCGCGCCAGCA	1484
Ec	1531	1545 1546	1560 1561	1575 1576	1590 1591	1605 1606	1620

그림 17. *phoB*의 염기서열 비교
(Ec-*E. coli*, Ea-*Enterobacter aerogenes*)

pSH1C를 template로 하여 표 10과 같이 설계된 primer들과 T7, T3 primer를 사용하여 확보한 PCR products를 pBSSK(+)에 ligation 한 후 염기 서열을 분석하여 원하는 부위에 정확하게 point mutation과 deletion mutation 이 되었음을 확인하였다. 이처럼 돌연변이를 지닌 PCR 산물의 내부 enzyme site인 *EcoR* I 과 *BamH* I 으로 digestion하여 pSH1C의 같은 조각과 치환하여 pSH2C(Δ linker(125-131)), pSH3C(E9Q/E11A), pSH4C(E9Q)와 pSH5C(E11A) 인 4개의 *phoB* mutant를 구축하였다(표 10).

표 10. *phoB*^C 구축용 primer 및 이를 포함한 plasmid들

Primer	Sequence	Plasmids	Note
PhoDelmcu F	5'-GCGGCGTATTTGATTGAGATGCAGGGGCTG-3'	pSH2C	Deletion of linker Δ linker(125-131)
PhoDelmcu R	5'-CAGCCCCTGCATCTCAATCGAAATACGCCG-3'		
Pho911 F	5'-GGTCGTTCAAGATGCAGCTCCAATC-3'	pSH3C	Point mutation E9Q/E11A
Pho911 R	5'-GATTGGAGCTGCATCTTGAACGACC-3'		
Pho9Q F	5'-TCTGGTCGTTCAAGATGAAGCTCC-3'	pSH4C	Point mutation E9Q
Pho9Q R	5'-GGAGCTTCATCTTGAACGACCAGA-3'		
Pho11A F	5'-TCGTTGAAGATGCAGCTCCAATCCG-3'	pSH5C	Point mutation E11A
Pho11A R	5'-CGGATTGGAGCTGCATCTCAACGA-3'		

PhoB^C의 활성을 측정하기 위해서 *E. coli* BW14649 (Δ *phoB-phoR*, *creB510*)와 JM109를 host로 사용하였다. BW14649는 PhoB의 인산화가 오직 세포질내 acetyl phosphate에 의해서만 이루어지는 strain이다. JM109는 PhoB-PhoR 신호전달계가 정상적으로 작동되어 BAP의 활성이 인제한환경에서 증가하는 strain이다. *E. areogenes*의 *phoB* mutant들은 모두 pBSSK(+)에 도입된 상태이므로 ampicillin (Amp)이 첨가된 배지에서 high copy number로 host에 존재한다. 또한, *phoB* 고유의 promoter가 들어있으므로 host에서 PhoB가 만들어진다면 이는 *phoB* promoter를 인식하여 *phoB*를 발현시키는 경로가 작동하고 있음을 나타낸다.

BAP의 활성을 정성적으로 측정하기 위하여 형질전환체를 Glu-MOPS-Amp 고체배지에 XP를 첨가하여 blue color가 형성되는 여부와 동일배지에서 배양 후 p-NPP를 첨가하여 yellow color를 형성하는 여부를 조사하였다. 그 결과는

표 11과 같았다. BW14649 균주에 형질전환한 경우에는 pBSSK(+)와 pSH4C(E9Q)을 형질전환한 균주들은 전혀 BAP활성을 보이지 않았다. 그러나 그외의 형질전환체들은 인의 농도에 상관없이 모두 BAP 활성에 의한 color의 변화가 있었다. JM109에 형질전환한 경우에도 유사한 결과를 보였으나 pBSSK(+)와 pSH4C(E9Q)의 경우에는 인이 풍부한 상태 (HP)에서는 BAP 활성이 나타나지 않았다. 이상의 결과는 최소한 pSH1C(wild type), pSH2C, pSH3C와 pSH5C에 의해 만들어진 다양한 종류의 PhoB들이 인이 풍부한 상태(HP)에서 PhoB^C와 같은 기능을 하고있음을 보여준다. 특기할 것은 wild type의 *E. aerogenes* *phoB* 유전자를 high copy number의 pBSS(+)에 삽입하여 형질전환할 경우 JM109에서처럼 정상적인 *phoB-phoR* system이 작동하고 있음에도 불구하고 PhoB^C로서 BAP활성이 HP 상태에서도 증가된다는 것이다.

표 11. *E. aerogenes phoB* 유전자 및 이의 변이체로 형질전환된 *E. coli* BW14649와 JM109.의 배지상에서 XP와 *p*-NPP 분해활성도

Strains	Substrate	pSH1C		pSH2C		pSH3C		pSH4C		pSH5C		pBSSK(+)	
		HP	LP	HP	LP	HP	LP	HP	LP	HP	LP	HP	LP
BW14649	XP	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	<i>p</i> -NPP	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
JM109	XP	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	<i>p</i> -NPP	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

HP: High(2mM) Pi, LP: Low(0.1mM) Pi

BAP의 활성을 정량적으로 비교하기 위하여 Glu-MOPS-Amp 액체배지에 HP(2mM Pi)와 LP(0.1mM Pi)의 인을 첨가하여 형질전환균주들을 배양하였다. 배양된 세포를 수확하여 periplasmic space의 BAP를 용출하였고 이를 BAP효소원으로 사용하여 *p*-NPP의 분해에 의한 yellow color의 정도를 420nm에서 측정하였다. 그 결과는 그림 19(BW14649에 형질전환한 균주들)와 그림 20(JM109에 형질전환한 균주들)에 제시하였다.

BW14649를 host로 사용한 경우는 그 양상이 고체배지에서 color 변화로 측

정한 경우와 동일하게 나타났음을 알 수 있다(그림 19, 표 11). 그러나 정량적인 측정치에서는 형질전환된 *phoB*의 종류에 따라 다양한 양상을 보였다. wild type의 *phoB* 유전자를 삽입한 것과 비교하였을 때 HP상태에서는 pSH5C가 200%이상 증가하였으며 pSH2C는 40% 감소하는 경향을 보였다. 그러나, LP 상태에서는 wild type에 비해 pSH3C에서 가장 높아 200%정도의 증가를 보였고 pSH2C에서는 70%가 감소됨을 알 수 있었다. BW14649를 host로 사용하였으므로 도입된 *phoB*의 종류에 따라 세포질내 acetyl phosphate에 의한 인산화로 활성화된 *PhoB*가 되거나 혹은 인산화에 상관없이 BAP를 발현시키는 활성형이 된 것으로 예견된다.

p-NPP Degradation by Periplasmic BAP of BW14649

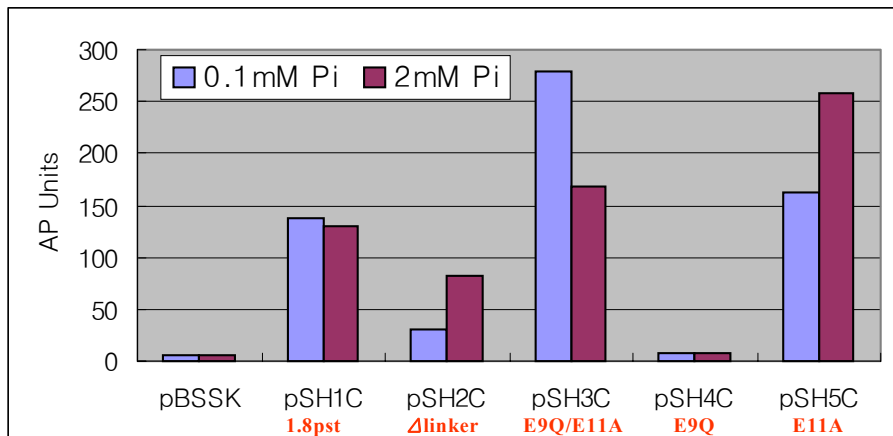


그림 19. BW14649를 host로 한 형질전환체의 periplasmic BAP활성도

JM109를 host로 사용하여 형질전환한 균주들의 경우에 periplasmic BAP의 활성양상도 고체배지에서 color 변화로 정성적으로 측정된 결과와 유사하였다 (그림 20, 표 11). 그러나, 정량적인 수치에 있어서는 도입된 *phoB* 유전자의 종류에 따라 다양한 결과를 보였다. HP 상태에서는 wild type을 도입한 경우와 비교하였을 때 pSH3C은 무려 10배 이상의 증가를 확인할 수 있었으며 pSH2C와 pSH5C에서도 2배 이상 증가되었음을 볼 수 있었다. LP 상태에서는 특이한 현상을 확인할 수 있었다. 즉, 어떤 종류의 *phoB* 유전자가 도입되었든지 간

에 pBSSK(+) vector만을 도입한 경우에 비해서 30% 이상 감소되었으며 pSH2C는 불과 20%에 지나지 않는 BAP 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 host인 JM109가 HP 상태에 비해 LP에서 거의 1500배 이상 BAP활성이 증가하는 균주이지만 외래 도입된 *phoB* 유전자가 있을 경우에는 오히려 감소되는 양상을 보인 것이다. 이러한 감소의 원인은 현재까지의 연구결과로는 명확히 알 수 없으나 도입된 *E. aerogenes*의 PhoB 단백질과 host의 PhoB 단백질간의 heterodimer 형성이나 *E. coli phoA* 유전자의 promoter에 있는 *pho* box에 대한 친화력의 차이 등을 그 원인으로 제시할 수 있다. 앞으로 이러한 원인을 규명하기 위해서는 *E. aerogenes*의 PhoB 단백질을 이용한 결합력 test 등을 수행해야 할 것이다.

p-NPP Degradation by Periplasmic BAP of JM109

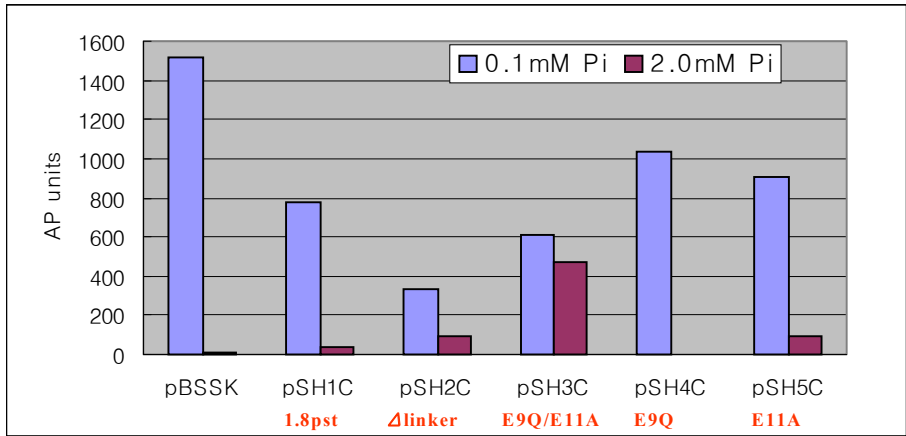


그림 20. JM109를 host로 한 형질전환체의 periplasmic BAP활성도

이상의 *E. aerogenes* PhoB^C 활성도 연구결과에서 중요한 두가지 type을 확인할 수 있었다. 즉, PhoB^C의 역할을 할 수 있는 경우는 ① 두 개의 acidic residue를 변화시킨 pSH3C(E9Q/E11A)가 정량적으로 가장 효과 높은 PhoB를 형성한다는 것과 ② wild type이라도 *phoB*와 같은 조절유전자를 high copy number의 vector를 이용하여 도입하면 PhoB^C와 같은 효과를 볼 수 있다는 것이다.

9. *phoA* promoter를 이용한 super expression vector(pEAAP) 구축

PhoB에 의해 발현이 조절되는 *pho* regulon에 속하는 유전자들의 promoter에는 *pho* box라는 활성형 PhoB 부착 서열이 있다. *pho* regulon에 속하는 *phoA* 유전자는 인제한 환경에서 무려 1000여배 이상의 발현 증가를 보여주는 강력한 promoter를 지니고 있다. 따라서 *phoA* 유전자의 promoter를 발현벡터의 promoter로 활용하면 PhoB에 의해 유용유전자들을 과발현시킬 수 있으며 많은 연구자들에 의해 *E. coli phoA* promoter를 이용한 발현벡터가 개발되어 사용되고 있다.

본 연구에서는 이미 개발되어 사용되는 *E. coli phoA* promoter가 아닌 본 연구진에 의해 본 과제를 통해 클로닝되고 그 특성이 규명된 *E. aerogenes phoA* 유전자의 promoter 부위를 좀더 작게 설계하여 강력한 promoter의 활성을 지닌 pEAAP 과발현 벡터를 구축하였다.

Enterobacter aerogenes IFO 12010(ATCC 15038)로부터 min-Mu phage를 이용하여 in vivo molecular cloning 방법을 통해 확보한 *phoA* 유전자와 CAT assay를 통해 확인된 promoter 부위의 염기서열 정보를 활용하였다(그림 3). *E. areogenes phoA*의 염기서열로부터 APF primer (5'-CGGGATCCAGATCTTGTGACCAGT-3', *Bam*HI와 *Bgl*III 삽입)와 APR primer (5'CCCAAGCTTTCTAGATAATTTTCAC-3', *Hind*III와 *Xba*I 삽입)를 합성하였다. 이 primer들을 이용하여 *phoA* promoter부위인 134 bp의 DNA를 증폭하였다. *Ea-phoAP*에는 *pho* box인 5'-CTGTCATTTTTTTGTCAC-3'와 -10 부위(5'-TAAAGT-3')가 포함되어 있다. pET-22b(+) (Novagen)를 *Bgl*III와 *Xba*I으로 절단하여 T7 promoter와 *lac* operator를 제거하였다. PCR로 확보한 *Ea-phoAP*를 *Bgl*III와 *Xba*I으로 절단하였고 이들을 ligation하여 pEAAP를 구축하였다. APF와 APR primer를 이용하여 pEAAP의 염기서열을 결정하여 PCR error가 없음을 확인하였다(그림 21).

pEAAP는 pET-22(+)⁺의 muticloning site을 모두 지니고 있으나 T7 promoter와 *lac* operator를 *Ea-phoAP*로 치환한 것으로 인 제한환경에서 PhoB가 부착되어 전사가 개시될 수 있는 *pho* box가 promoter역할을 하도록 만든 것이다. 따라서, pEAAP 발현벡터는 인 제한 환경에서 정상적인 PhoB-PhoR two-component transcriptional signal system이 작동하는 host에서 발현이 유

도될 수 있다. 또한, pET-22b(+) 벡터의 특징인 N-terminal 쪽에 *pelB* signal peptide와 C-terminal 쪽에 6xHig-tag가 부착되는 fusion protein을 발현시킬 수도 있다.

```

BgIII          pho box          -10
AGATCTGTGACCAGTAAGGATGCTGTCAATTTTTTGTGCACACCACCTTTTATAAAGTCCCTCGTTTTGTTTTT
                                     XbaI          rbs
TAAGTATTTTTACATGGAGACGACAAAGTGAATTTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA
NdeI
CATATGAAATACCTGCTCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTCTCTCTGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGAT
MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuLeuAlaAlaGlnProAlaMetAlaMetAsp
          BamHI EcoRI SacI SalI HindIII NotI XhoI His-tac
ATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCAGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCAC
IleGlyIleAsnSerAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGIuHisHisHisHisHis
CACTGA
HisEnd

```

그림 21. pEAAP의 promoter와 클로닝부위의 염기서열 및 구조.

10. Phy^S의 구축 및 인 제한 환경에서 과발현 확인

인 제한 환경에서 PhoB에 의해 발현이 유도되는 super expression vector인 pEAAP의 활용성을 확인하고자 본 연구에서 클로닝된 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* KL1114(KCTC 8913P)의 phytase 유전자인 *Bsa-phy1*을 pEAAP에 도입한 pEAPHY1을 구축하였다. pEAPHY1은 Phy-1 (5'GGAATTCCATATGAATCATTCAAAAACACTT-3', *EcoRI*과 *NdeI* 삽입)와 Phy-4 (5'-GCGAGCTCGTTATTTTCCGCTTCTGTTCGG-3', *SacI*과 stop codon 포함) primer를 제작하여 *Bsa-phy1* 유전자의 coding region을 PCR 증폭한 후 *NdeI*과 *SacI*으로 절단하여 pEAAP 벡터에 ligation하여 pEAPHY1을 구축하고 이를 JM109에 형질전환하였다.

*Bsa-phy1*의 발현이 인 제한 환경에서 유도되는지 확인하기 위하여 pEAPHY1이 형질전환된 JM109 균주를 LB-amp 배지에서 18시간 배양한 후 100 μ l의 세포를 수거하여 ampicillin이 첨가된 Glu-MOPS LP(0.1 mM Pi) 배지에 접종하였다. 접종 후 5, 6, 12 및 24 시간에 발현양상을 조사한 결과 배양 후 12시간부터 41 kDa의 *Bsa-Phy1*이 발현됨을 확인하였다(그림 22).

Phytate를 유일 인산원으로 첨가한 고체배지에서 KCTC8913P 균주와 pEAPHY1, p1114-3 및 p1114-5 (pBSSK(+)::*Bsa-phy1*)를 JM109에 각각 형질

전환한 균주들을 접종하여 phytate의 분해능을 조사한 결과 KCTC8913P 균주와 pEAPHY1을 도입한 균주에서만 투명환이 형성됨을 확인하였다(그림 23).

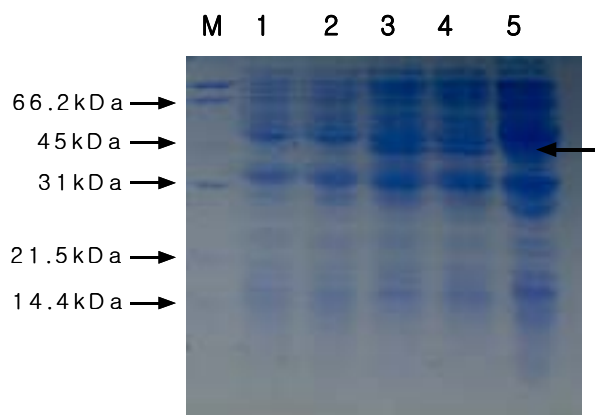


그림 22. Glu-MOPS-Amp 배지에 0.1mM Pi을 첨가하여 pEAPHY1을 지닌 JM109 형질전환체를 배양하였을 때 Bsa-Phy1의 과발현(41kDa, 화살표) 확인. M, Marker; 1~4, 각각 5, 6, 12 및 24 시간 배양; 5, LB에서 배양한 경우.

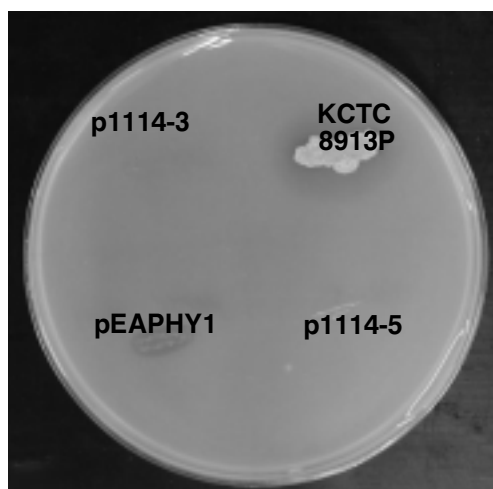


그림 23. Phytate를 유일 인산원으로 첨가한 배지에서 pEAPHY1을 형질전환한 JM109의 phytate 분해능.

11. Phy^S-PhoB^C의 구축 및 활용성 확인

8항의 *E. aerogenes phoB*가 든 pSH1C의 PhoB^C로써의 활성이 있음을 확인한 결과와 10항의 *Bsa-phy1*이 든 pEAPHY1의 Phy^S로써의 활성이 있음을 확인한 결과는 매우 고무적인 것이다. 즉, 본 연구과제에서 발굴된 다양한 인대사관련 유전자들의 super expression이 가능하며 특히, PhoB^C와 더불어 사용할 경우 인의 농도에 상관없이 어떤 환경조건에서도 발현시킬 수 있다는 본 연구의 최종목표를 Phy^S를 사용함으로써 phytate 분해에 따른 투명환의 크기를 비교하여 쉽게 확인할 수 있는 실험이 가능하게 되었다.

우선 host로는 *E. coli* DH5a를 선택하였는데 이 균주는 고체배지에서 XP의 분해능을 검사한 결과 인의 농도에 관계없이 color를 나타내지 못하였다. 즉, BAP의 활성이 없거나 혹은 정상적인 PhoB-PhoR 전사조절기능이 작동하지 않는 균주인 것이다. pEAPHY1과 더불어 새로운 super vector로서 pEAAP vector의 특징인 세포밖으로 분비할 수 있는 pelB signal peptide를 활용할 수 있도록 *Bsa-phy1* 유전자의 coding region을 도입한 pEAPHY31를 구축하였다.

DH5a의 competent cell에 pEAPHY1, pEAPHY31 및 pET vector를 각각 형질전환하였다. pEAPHY1을 형질전환한 균주를 competent cell로 만든 후 pSH1C를 재 도입하여 high copy 복제 origin을 지닌 pSH1C과 low copy 복제 origin을 지닌 pEAPHY1을 동시에 갖는 pSH1C/PHY1 형질전환체를 구축하였다.

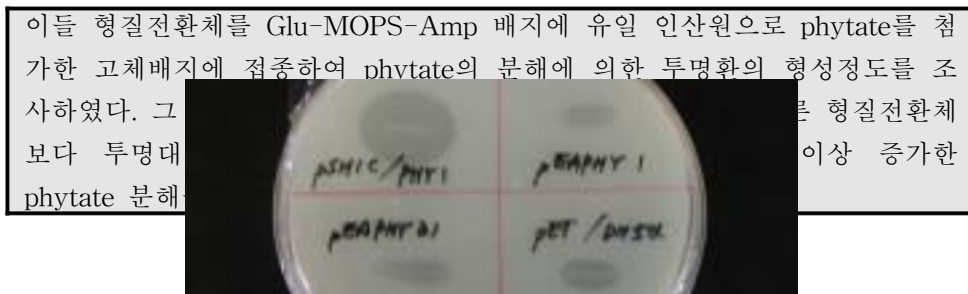


그림 25. Phy^S-PhoB^C의 phytate 분해활성도 조사

12. Ppk^S, Pqq^S, Ppk^S-PhoB^C, Pqq^S-PhoB^C 재조합 균주 구축

Phy^S-PhoB^C의 phytate 분해 활성이 성공적으로 증가됨을 확인한 연구성과에 힘입어 pEAAP super expression vector에 *ppk* 유전자와 *pqq* 유전자를 각각 도입한 Ppk^S와 Pqq^S를 구축하였다. 또한 *E. coli* strain들에 이들 구축된 벡터들을 각각 도입하고 여기에 pSH1C나 pSH3C를 도입하여 Ppk^S-PhoB^C와 Pqq^S-PhoB^C 재조합 균주를 구축하였다. Ppk^S와 PhoB^C를 동시에 지닌 재조합 균체의 경우엔 어떤 환경조건 하에서도 활성이 강한 PhoB와 Ppk가 존재하기 때문에 인 자화(assimilation)가 훨씬 빠르며 미생물에 의한 토양염류장해 제거를 매우 고효율적으로 할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 그러나 host가 *E. coli*인 점 때문에 실용성이 낮은 단점이 있다.

Phy^S-PhoB^C의 성공적인 연구성과는 host를 분자생물학적 연구에 사용되는 *E. coli* stain들 뿐 아니라 PSB와 같은 유전형이 다양하지 않은 균주들에도 적용할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에 사용된 8종류의 PSM 균주의 XP 분해 test를 한 결과 표 12와 같이 다양하게 나타났다.

표 12. PSB 균주의 XP 분해활성

Strains	High Pi	Low Pi
WP20	-	++
WP38	-	-
WP41	+	++
WP42	+	++
KSJ3	-	-
KSJ8	++	++
KSJ11	-	++
KSJ16	++	++

본 연구에서 발굴한 PSB에 super vector와 PhoB^C vector들을 도입하고자 시도하였다. KSJ11과 KSJ16 그리고 WP38은 ampicillin에 저항성이 있어 이들 벡터의 maker인 Amp^R을 사용할 수가 없었다. 이에 새로운 maker gene을 이들 벡터에 도입하려고 시도하고 있다. 그 외의 균주들은 competent cell의 효율

이 낮아 이를 개선하고 있다. 다른 한편으로는 구축된 super expression 벡터에서 *phoA* promoter와 *ppk*, *phy*, *pqq-E* 등의 유전자를 같이 절단하여 mini-Tn5나 Tn-Mod의 transposon vector에 도입하여 PSB 균주의 genomic DNA에 삽입하기 위해 준비중에 있다.

13. 결론

- ㉠ *E. aerogenes*에서 확보한 *phoA* 유전자의 promoter를 이용한 super expression vector인 pEAAP vector를 구축하였다.
- ㉡ pEAAP vector에 *Bsa-phy1*을 도입한 phy^S 를 구축하여 과연 phytase가 인제한 환경에서만 발현이 증가되어 phytate를 성공적으로 분해하는 것을 확인하였다.
- ㉢ *pho* regulon의 조절유전자인 *phoB* 유전자를 활용하여 인의 농도에 관계없이 *pho* regulon을 항상 활성화하게 하는 유전자 재조합 균주를 만들기 위해서 항시 활성형(constitutive) PhoB ($PhoB^C$)의 특성을 갖는 *phoB* 유전자를 발현하는 vector들인 pSH1C, pSH3C, pSH5C을 구축하였다.
- ㉣ 과연 $PhoB^C$ 가 활성을 갖는가를 확인하기 위해서 **Phy^S와 PhoB^C를 지닌 vector들(pEAPHY1과 pSH1C)**을 동시에 도입한 *E. coli* DH5a 재조합체 (pSH1C/PHY)를 구축하여 phytate 분해능을 조사한 결과 대조군에 비해서 phytate 분해에 의해 형성되는 투명대의 지름이 무려 **3 배이상 증가**되는 매우 고무적이고 **성공적인 결과를 획득**하였다.

㉤ Phy^S - $PhoB^C$ 를 동시에 지닌 *E. coli* DH5a에서 월등한 phytase 활성이 나타남을 확인하였기에 Phy^S - $PhoB^C$, Ppk^S - $PhoB^C$, Pqq^S - $PhoB^C$ 등을 구축하여 염류장해토양에서 불용성 인화합물의 가용화와 이를 세포내로 자화하는 능력이 배가된 재조합 미생물의 성공적인 실용성을 확신할 수 있었다. 더불어 *ushA*와 *phn* operon 유전자들도 super vector에 도입하여 활용할 경우 매우 강력한 유전자 재조합 미생물을 구축할 수 있을 것이다.

제 6 장 내염성 증강 진균의 개발

제1절 서론

염류장해 토양의 생물학적 복원과 작물의 생산성 증대를 위해 염류제거 활성 및 염류의 세포내 축적능이 뛰어난 환경조화형 염류제거용 미생물을 탐색 개발하고자 하였다.

이스트 *Saccharomyces cerevisiae*의 Hog1 유전자의 돌연변이를 통한 dominant activating 효모 돌연변이 균주를 생산하고, 생산된 균주를 통하여 알려진 정보를 염 저항성이 뛰어난 진균을 개발하고자 하였다. 진균은 일반 박테리아보다 상대적으로 높은 염농도하에서도 저항하여 세포가 성장할 수 있다. 이와 같은 고 염농도에 저항하는데 관련되는 시스템으로 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 Hog1 MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) 신호전달계를 들 수 있겠다. Hog1 MAPK 신호전달계는 효모에서 밝혀진 6 가지 MAPK 신호전달계 (Gustin *et al.*, 1998) 의 하나로서 높은 삼투압 상태에서 생존 성장하는데 필수적이어서 이 신호전달계의 성분단백질들의 유전자 (예로써 Hog1) 에 이상이 생긴 균주는 높은 염농도에서 세포가 성장할 수 없다. 그러나 Hog1 MAPK 신호전달계의 dominant active 돌연변이주는 상대적으로 높은 염농도에 저항하여 살 수 있다. 이와 같은 이유로 해서 간척지나 시설재배 토양 등에 서식하고 있는 진균류를 대상으로 Hog1 신호전달이 증폭되어있는 균주를 개발하고 그 특성을 연구하면 진균이 어떻게 높은 염농도에서 성장할 수 있는가 하는 고염농도 저항성에 대한 기작을 알 수 있고, 이를 이용하면 극히 높은 염농도에서 성장 생존할 수 있는 진균류를 개발하는 데 응용하고자 하였다. 또한 효모의 Hog1 MAPK 신호전달계의 성분단백질들과 유사한 진균의 유전자를 탐색하고 그 기능이 강화된 돌연변이주로 형질전환 (transformation)시켜 높은 염농도의 토양에서 뛰어난 성장률을 보이는 진균을 개발할 수 있고 이를 포장에 적용함으로써 토양개량 및 복원을 극대화 할 수 있다. 즉, 개발된 균주는 과도한 염류를 포함하는 토양에서 간극이 좁아지는 토양구조 악화의 문제점을 방지함으로써 높은 염농도에서 유용 작물이 생육할 수 있도록 도와 줄 수 있다는 가정하에 연구를 수행하였다.

제2절 국내외 기술개발 현황

진균류의 고염농도 저항성에 대한 연구는 무엇보다, 이스트 *Saccharomyces cerevisiae*에 서 가장 많이 연구가 되어있다. 이스트의 osmolarity resistance에 대한 신호전달계는 S나2/S나22/Ste11--> Pbs2--> Hog1으로 이어지는 신호전달계를 통하여 이루어지며, 유사한 신호전달계가 *S. pombe*, *Drosophila*, Mammal에 이르기 까지 다양한 진핵세포 생명체에서 그 작용기작이 잘 보존되어 있다(O'Rourke *et al.*, 2002). 최근의 연구는 이들 MAPK신호전달계에서 Pbs2가 scaffold protein의 역할을 수행함으로써, 이 신호전달계가 특이적으로 그리고 효과적으로 작동하게 해 주는 것으로 밝혀져 있다. Hog1 유전자가 knock out 된 이스트에서 Kss1 MAP kinase가 기능을 대신 수행 할 수 있음이 최근 제시되었으며, 이 결과는 osmo signal transduction 시스템이 세포의 생리조건변화에 따라서는 pheromone pathway와 cross-talk함을 제시하였으며, 신호전달이 매우 복잡함을 암시한다.

*Aspergillus ventii*와 *Aspergillus parasiticus halotolerant*는 fungi가 이집트에서 20% NaCl함량을 지닌 염농도가 높은 토양에서 분리되었으나 이에대한 구체적인 생화학-분자생물학적인 연구는 보고된 바 없다(Mahdy *et al.*, 1996). 최근의 연구들은 고염농도에 저항하고 proline을 축적시키는 식물을 개발하고 있으며, 이는 고염농도에 저항하는 식물개발에 추후 활용 될 수 있을 것이다 (Mergulhao *et al.*, 2002).

제3절 연구내용 및 결과

진균은 일반 박테리아보다 상대적으로 높은 염농도하에서 저항하여 세포성장을 할 수 있다. 이와 같이 고 염농도에 관여하는 효모시스템인 *Saccharomyces cerevisiae*의 Hog1 MAPK의 염저항성이 뛰어난 돌연변이 Hog1의 스크리닝이 끝나면 이 정보를 이용하여 간척지나 시설재배 토양 등에 서식하는 진균류의 염 저항성이 뛰어난 Hog1 유사신호 전달물질의 돌연변이체를 제조하는데 정보를 이용한다. 이와 같이 제조된 토양진균 Hog1이 염류 저항 기능이 강화되었는가는 Hog1이 결핍된 효모를 이용하여 기능성을 테스트하였다.

1. 이스트 Hog1 MAPK 유전자 크로닝

본 연구를 통하여 먼저 이스트 *Saccharomyces cerevisiae* 의 염 저항성에 관여하는 가장 중요한 유전자로 DNA chip 분석 방법으로도 밝혀진 Hog1 (Posas *et al.*, 2000)를 PCR 방법을 통하여 크로닝 하였으며, hog1 유전자가 결핍된 이스트를 제조하였다. 이스트 벡터에 크로닝한 이스트 Hog1 유전자를 화학적인 방법에 의해 random mutagenesis를 통하여 돌연변이를 유도하였으며 이를 hog1 유전자가 결핍된 이스트에 형질전환 하여 염 저항성이 증강된 Hog1 돌연변이 균주를 스크리닝했다. 돌연변이를 유도한 Hog1 플라스미드를 포함하는 염 저항성이 증강된 균주로부터 플라스미드를 수거하여 염기서열을 결정한 결과 몇몇의 돌연변이체들을 확보했다. 이스트 cDNA library로부터 기존에 알고 있는 primer 들을 디자인하여 염류 저항에 관련된 Hog1 유전자를 PCR 방법에 의해서 증폭시킨 후 이를 이스트 벡터에 크로닝 하여 Hog1 유전자를 포함하는 이스트 셔틀벡터를 제조하였다. Hog1의 기능이 증강된 돌연변이를 얻기 위해 이를 스크리닝 하는데 이용할 hog1 유전자가 결핍된 이스트 균주를 1차적으로 제조하였다. Hog1 기능이 증강된 돌연변이체를 얻기위해 먼저 Hydroxylamine 방법을 이용하여 random mutagenesis를 유도한뒤 그 플라스미드 들을 앞에서 제조한 hog1이 없는 이스트에 형질전환 한 후 염 저항성이 증강된 Hog1 돌연변이체를 염농도가 높은 배지플레이트 성장하는 것으로 선별했다. 염 저항성이 증강된 이스트 균주들로부터 플라스미드를 추출 한 후 Hog1 유전자의 전체염기서열을 결정하여 내염성에 관련되는 아미노산잔기 치환을 알아냈으며, 그 성격을 규명하였다.

Hog 1 유전자의 sub-cloning은 Promoter 부위를 포함하는 이스트 Hog1 유전자를 이스트의 genomic DNA library(Anraku Library; 하버드대학의 Fred Winston 박사로부터 얻음)로부터 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 통하여 증폭 하였으며, 이 유전자를 pRS316 벡터의 *Bam*H1-*Cla*I 제한 효소 자리에 sub-cloning 하였다. 이 경우 인위적으로 제한효소절단 부위를 인위적으로 oligonucleotide들에 디자인하였기 때문에 sub-cloning 된 유전자를 가지는 plasmid를 *Bam*H1과 *Cla*I 제한 효소들로 절단 할 수 있게 되어있다. 이와 같이 제조된 플라스미드(그림 1)를 pKC598로 명명하였으며 이를 이용하여 염류제거 활성이 증강된 돌연변이 Hog1 유전자를 스크리닝 하고자 하였다.

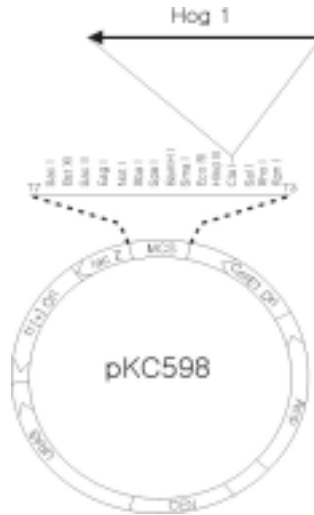


그림 1. Hog1 유전자 발현벡터 (*HOG1 CEN URA3*)

2. Hog1 유전자 돌연변이 유도

염 저항성 Hog1 유전자를 스크리닝은 hydroxylamine mutagenesis를 통한 화학적인 방법에 의해서 실시하였다. 먼저 CsCl 방법에 의해 정제된 pKC589 shuttle plasmid(*HOG1 CEN URA3*)를 30°C에서 0.5ml의 중화된 hydroxylamine 용액(0.44 N NaOH, 5 mM EDTA, 0.07g/ml hydroxylamine, Sigma-9876)으로 20 시간 배양하여 돌연변이를 유도하였다. DNA를 tRNA를 매개체로 하여서 1.2ml의 -20°C의 ethanol과 50 μ l의 sodium acetate를 이용하여 10 분간 dry ice에 방치하여 침전시켰다. 침전된 DNA를 ethanol로 세척한 뒤 실온에서 건조 시킨후 300 μ l의 증류수로 용해시킨다. DNA 용액을 30 초 동안 table top 원심분리기를 사용하여 원심분리 한 뒤 상등액을 깨끗한 튜브로 옮겨 놓는다. Control DNA의 경우에는 위에서 언급한 모든 과정을 반복하되, hydroxylamine 용액 대신에 TE를 사용하여 동시에 실험을 실시한다. 돌연변이된 DNA의 증폭을 위해 사용한 *Escherichia. coli* 균주(RX1486 Mod + (K12) *leub-600 trpc-9830 D lax74 strepA LALUK pyrF::Tn5 (KanR) hib-463*)은 Harvard Medical School의 K. Struhl 박사의 실험실에서 얻었다. Hydroxylamine이 처리된 DNA와 TE를 사용한 DNA 2 ul 와 10 μ l를 *E. coli*

KC8 에 형질전환 한 뒤 100 ug/ml 의 ampicillin을 포함하는 LB 플레이트에서 콜로니들을 선택하였다. 대략 100-500 개의 transformation 된 콜로니를 ampicillin을 포함하는 LB plate와 40mM의 tryptophan과 30mM의 아데닌을 포함하는 M9 플레이트로 복제시킨 뒤 자라나는 colony 숫자로 돌연변이율을 산정하였다. 보통 1% 정도의 돌연변이율을 최적조건으로 잡는다. 최적조건에서 hydroxylamine 돌연변이 처리된 DNA를 *E. coli* KC8 균주에 대량으로 형질전환 한다. 대략 50,000 개의 콜로니 숫자의 transformant 등을 혼합하여 100 μ g/ml의 ampicillin을 포함하는 LB로 배양 한 뒤 플라스미드를 준비하여 스크리닝에 이용하였다.

3. Hog1 유전자가 결핍된 이스트 균주 제조

염 저항성이 증가된 Hog1 유전자를 스크리닝 하기 위해 Hog1 유전자가 결핍된 이스트 균주를 제조하였다. 이 균주를 제조하기 위해 pJB1D라는 *hog1* 유전자를 deletion 시키는데 필요한 균주를 텍사스 대학의 Gustin 박사로부터 확보하였다. pJB1D 플라스미드를 *Cla*I과 *Sca* I 제한효소로 절단한뒤 EY957 (*MATa sst1D ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 Gal+*)균주(본 연구진 보유)에 형질전환 하였으며 이를 tryptophan이 결핍되어 있는 synthetic complet 배지플레이트 상에서 선택하여 확보했다.

4. 돌연변이 Hog1 유전자 스크리닝

Hog1 유전자의 돌연변이를 통한 dominant activating 효모 돌연변이 균주생산 및 성격규명을 위해 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

Hog1을 포함하는 효모 플라스미드(영양선택 marker를 가짐)를 시험관내에서 hydroxylamine을 처리하여 돌연변이를 유도한다. 이 경우 multiple mutation이 아닌 point mutation을 유도하기 위해 적당한 양의 hydroxylamine을 처리 한 뒤 Hog1이 결핍되어 있는 균주에 형질전환 시킨다. 돌연변이 Hog1 유전자를 포함하는 형질전환 균주 중에서 염농도 저항성이 뛰어난 균주를 선택한다. 이와 같은 실험을 통하여 염저항성이 뛰어난 형질전환 효모들이 찾아지면 이들로부터 돌연변이된 Hog1 유전자를 효모로부터 회수한 뒤 돌연변이의 특징을 DNA 염기서열 결정을 통해 알아낸다. 이와 같은 실험을 통해 Hog1 돌연변이 형태 중 Hog1의 기능을 증가시킬 수 있는 돌연변이 형태를 찾

아낼 수 있으며 이 정보를 추후 토양 진균 dominant activating 돌연변이 균주 제조에 이용한다.

Hog1 유전자가 결핍된 이스트 균주를 Li Acetate 방법으로 competent 세포를 준비 한 뒤 돌연변이를 유도한 pKC589 플라스미드로 형질전환 하였다. 형질전환된 세포를 uracil이 결핍되어 있는 synthetic complete 배지 상에서 선택한 후 transformant들을 wild-type의 이스트가 성장 할 수 없는 높은 염농도 (1.2 M NaCl)를 포함하는 synthetic complete 배지플레이트에서 성장 할 수 있는 균주를 선택하였다(그림 2). 그림 2 에서 보여주듯 몇 차례의 스크리닝 과정을 통하여 높은 염농도에 저항 할 수 있는 돌연변이 Hog1 유전자를 함유하는 플라스미드(*HOG1⁺⁺ CEN URA3*)를 포함하는 균주들을 얻을 수 있었다.

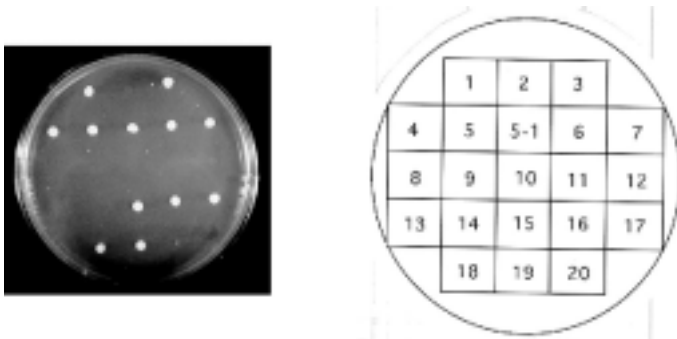


그림 2. 1.2 M 의 NaCl을 포함하는 uracil 이 결핍 되어있는 synthetic complete 배지 플레이트에서 성장할 수 있는 형질전환균주를 골라낸 것으로 그 예는 # 3, 4, 5, 5-1, 6, 7, 15, 16, 17, 18, 19 transformant들이다. # 20은 wild-type Hog1 유전자를 포함하는 pKC598 플라스미드를 형질전환 한 것이다.

5. 돌연변이체 확인 성격규명

위와 같은 실험을 통하여 염 저항성이 뛰어난 형질전환 효모들을 찾아 돌연변이 된 *HOG1⁺⁺* 유전자를 효모로부터 회수한 뒤 돌연변이의 특징을 DNA 염기서열 결정하였다. 이와 같은 실험을 통해 Hog1 돌연변이 형태 중 Hog1의 기능을 증가시킬 수 있는 돌연변이 형태를 찾아낼 수 있으며(그림 3), 그 성격을 규명하고 있으며 정보를 추후 토양 진균 dominant activating 돌연변이 균주 제조에 이용하고자 한다.

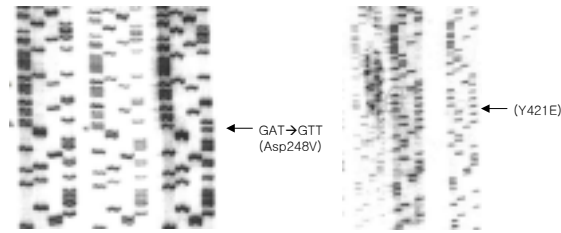


그림 3. 내염성이 증강된 *hog1* 돌연변이

6. 염 저항성이 증강된 Hog 1 유전자 염기서열 결정

Hog 유전자를 포함하는 pKC598(*HOG1 CEN URA3*) 벡터를 hydroxylamine을 처리하여 얻어진 돌연변이 플라스미드 library를 *hog1* 유전자가 결핍된 이스트 TM232(*MATa sst1D hog1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 Gal+*)에 형질 전환하였을 때 pKC598을 형질전환한 이스트 보다 염 저항성이 증강된 균주를 높은 염농도를 포함하는 YPD 배지에서 선택하였으며 이들 균주들의 염기서열을 결정하여 돌연변이의 성격을 규명하였다. 염기서열 결정을 통하여 point mutation 들을 가지고 있는 돌연변이 mutant들을 3개를 확보하였다(Table 1 참조).

Table 1. 돌연변이 nucleotide 및 아미노산변이

Hog1 Mutant	Amino acid change	Nucleotide change
Hog1M11	K65--> P65	ACA-->TCA
Hog1M21	T113--> S113	ACA-->TCA
Hog1M31	F89-->S89	TTT-->TCT

7. 돌연변이 Hog1에 의한 염 저항성

각각의 돌연변이 *hog1* 유전자를 가지는 이스트의 염 저항성을 나타낸 것으로 TM232 균주에 pKC598 혹은 돌연변이된 플라스미드(pHog1, pHog1M1, pHog1M2, pHog1M3)를 형질전환하여 uracil이 결핍된 배지플레이트(SC-Ura)에

서 형질전환 균주를 선택하였으며, 이 균주를 다른 농도의 NaCl을 포함하는 배지플레이트에 도말하여 세포성장을 관찰하였다. 그 결과 0.8 M의 NaCl을 포함하는 배지에서 세포성장기능이 wild-type Hog1을 가지는 이스트보다 뛰어난을 보여준다(그림 4).

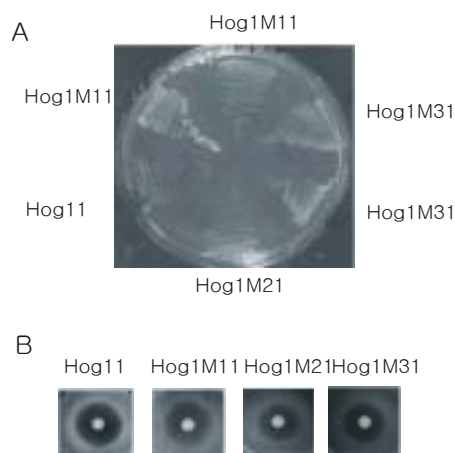


그림 4. A) 0.8 M 의 NaCl을 포함하는 uracil 이 결핍 되어있는 synthetic complete 배지 플레이트에서 wild-type 혹은 돌연변이 hog1(pHog1M, pHog1M2, pHog1M3)이 형질전환 세포의 성장도를 측정 한 그림이다. B) Hog1에 의한 osmolarity 저항에 대한 컨트롤로써, 세포주기 정지기능이 정상적인가를 보여주는 그림으로, 실험은 SC-ura plate 에 각각의 hog1 형질전환 균주 들을 성장시킨 후 alpha-factor가 묻어 있는 disk를 올려놓은 뒤 세포가 G1 세포주기 억제에 의해 성장이 억제되는가를 살펴본 것이다.

8. Osmostress에 따른 wild-type과 돌연변이 Hog1의 인산화

Hog1은 높은 osmotic stress가 증가됨에 따라 Hog1을 이용하는 MAPK 신호전달계가 활성화되어 염 저항성을 가지게 되는데, 이때 Hog1이 활성화되는데 이것은 Hog1의 tyrosine 잔기의 인산화로 예측 할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 osmotic stress에 의한 Hog1의 인산화가 돌연변이에 의해 변화가 있는지를 살펴보았다. 그림 5에서 보여주듯 Hog1 단백질의 tyrosine 잔기의 인산화가 osmo resistant mutant들에서 증가됨을 보여주고 있다.

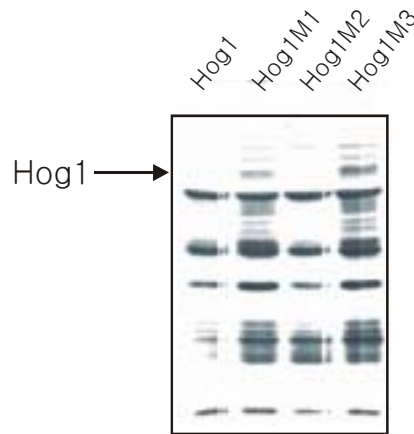


그림 5. Osmotic stress에 의한 각종 Hog1 돌연변이 균주에서의 단백질 인산화. 이스트 세포를 SC-U 배지에서 성장시킨 후 NaCl을 0.4 M 농도로 첨가하여 1시간이 경과 한 이후 세포를 수거하여 clude extract를 만들어 100 μ g 씩을 전기영동한 뒤 membrane으로 이동시킨 후 Hog1 항체로 immunoprecipitation 하고 P-Tyr항체로 Western blot을 실시한 결과다.

9. 높은 염농도 저항성 돌연변이 Hog1에서 단백질 인산화 증진

Hog1은 염저항에 가장 중요한 염저항 신호전달계의 주요성분 단백질로써 그것의 인산화는 Hog1 단백질의 활성도를 대변하며 그에 따라서 염저항성이 영향을 받는 것으로 잘 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 높은 염농도 하에서 Hog1의 인산화정도(활성화) 어떻게 변했는지를 알기 위해 높은 염농도에서 성장시킨 이스트 균주들을 수거한 후 32 P 동위원소가 표지된 vATP를 기질로 사용하여 인산화반응을 수행하였다(autophosphorylation 유도). 그 이후 Hog1 단백질을 Hog1 항체로써 immunoprecipitation 시킨 이후 이를 X-ray film에 감광하였다. 그 결과 Hog1의 인산화가 wild-type 보다 Hog1 M1 그리고 Hog1 M3 mutant 들에서 크게 증강되어 있는 것이 관찰되었다(그림 6).

이와 같은 결과는 Hog1 MAPK의 인산화가 Hog1 M1과 Hog1 M3 돌연변이체들의 염저항성과 밀접한 관계가 있음을 암시한다.

10. 염 저항성이 뛰어난 Hog1 mutant들의 2차 선별

Hog1의 돌연변이에 의한 염 저항성 증진과 높은 염농도 하에서 단백질인산화 증진과 더불어 glycerol response(Brewster *et al.*, 1993)을 살펴본 결과 염

저항성이 증진된 Hog1 M1과 Hog1 M3 돌연변이체에서 glycerol response 가 20-30% 상승됨이 보여졌다. 이 결과는 이들 돌연변이체 들이 삼투압 저항성이 향상 되었음을 보여주고 있다.

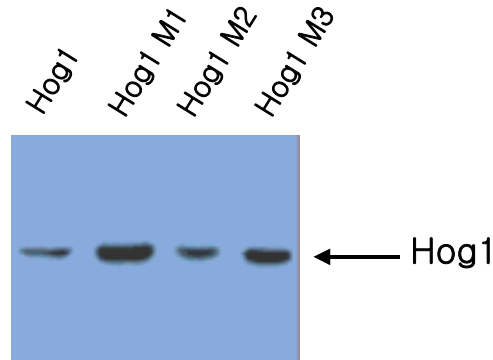


그림 6. 높은 염농도 자극에 의한 Hog1과 돌연변이체 들의 자가인산화.
 이스트 세포를 SC-U 배지에서 성장시킨 후 NaCl을 0.4 M 농도로 첨가하여 1 시간이 경과 한 이후 세포를 수거하여 clude extract를 만든 뒤, 50 μ g 씩의 단백질을 vATP를 포함하는 kinase 반응 용액에서 인산화 반응을 실시 한 이후, Hog1 항체로써 Hog1과 돌연변이 단백질을 immunoprecipitation 시켰다. 이후 단백질을 SDS PAGE로 분리한후 gel을 건조 시키고 X-ray film에 감광시킨 결과다.

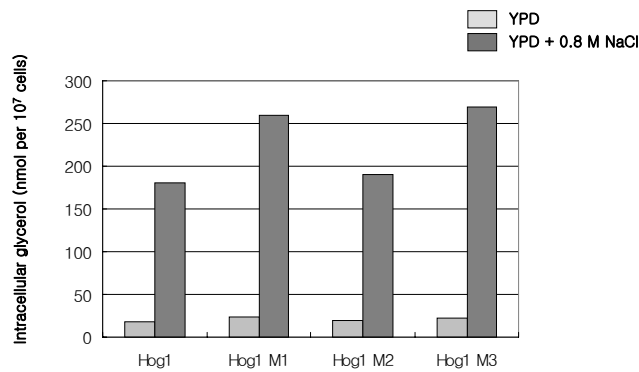


그림 7. 높은 삼투압 하에서 Hog1 M1과 Hog1 M3 돌연변이체의 glycerol 축적기능 향상.
 Wild-type Hog1과 돌연변이 Hog1(M1, M2, M3) 유전자들을 각각 형질전환 시킨 이스트(hog1 Δ)를 YPD 배지와 0.8 M NaCl 하에서 성장시킨 균주에 존재하는 내부 glycerol을 측정 한 결과이다.

11. 토양염류 제거를 위한 내염성 이스트의 성격규명

염저항이 증진된 Hog1 mutant들을 새로이 선별한 결과이다. Hog1을 포함하는 plasmid에 hydroxylamine을 처리하여 돌연변이된 plasmid들을 *E. coli*에서 증폭시킨 후 이를 Hog1이 제거된 이스트 균주에 transformation 시킨 후 높은 염농도(1M)에서 성장 할 수 있는지 여부를 밝힌 결과이다. 이 결과를 통해서 높은 염저항 성을 나타내는 신규가능성이 있는 새로운 Hog1 mutant들을 찾아냈다.

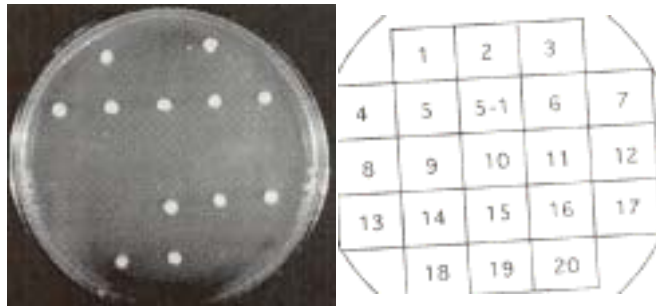


그림 8. 1M NaCl 농도에서 이스트 성장을 부여하는 Hog1 돌연변이체의 선별

Hydroxylamine mutagenesis에 의해 얻어진 Hog1 유전자의 성격을 분석한 결과 이들이 염 저항 능력이 증강되어 있음을 밝혔으며, 이스트 돌연변이체를 얻은 후 이들이 염 저항성이 우수함을 밝혔으며, 아직 성격 규명되지 않은 이들의 생화학 혹은 유전학적 성격을 더욱 규명하였다.

가. 염 저항성이 증강된 이스트 돌연변이체 Hog 1 확보

Parent strain; TM232 (*MATa sst1D hog1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 Gal+*)

돌연변이균주

- ① TM232 + pKC598-1 (*HOG1M11 CEN URA*)
- ② TM232 + pKC598-2 (*HOG1M21 CEN URA*)
- ③ TM232 + pKC598-3 (*HOG1M31 CEN URA*)
- ④ TM232 + pKC598-4 (*HOG1M52CEN URA*)
- ⑤ TM232 + pKC598-5 (*HOG1M85 CEN URA*)

표 2. 염저항성 향진 균주들연변이 nucleotide 및 아미노산변이

Hog1 Mutant	Amino acid change	Nucleotide change
<i>HOG1M11</i>	K65--> P65	ACA-->TCA
<i>HOG1M21</i>	T113--> S113	ACA-->TCA
<i>HOG1M31</i>	F89-->S89	TTT-->TCT
<i>HOG1M52</i>	D170-->A170	GAC-->GCC
<i>HOG1M85</i>	W332-->R332	TGG-->CGC

1) 신규 염저항성 Hog1의 확보

기존의 Hog1 돌연변이체를 제외한 2개의 새로운 염저항성이 뛰어난 Hog1 돌연변이체를 확보하였다. 이들은 기존의 균주와 비교하여 염저항성에서 뛰어난 것을 보여주었다(그림 9).

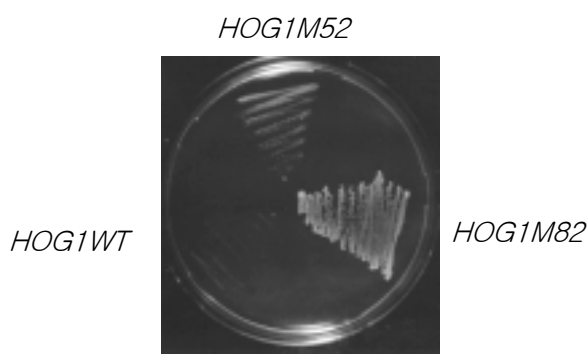


그림 9. Hog1 mutant들의 염저항성. 1M의 NaCl을 포함하는 YPD 배지에 1M의 NaCl을 첨가한 플레이트상에서 Wt 혹은 Hog1 돌연변이를 포함하는 (Hog1M52 혹은 Hog1M82)균주가 염에 저항하는 정도를 보여주는 그림임.

반면, osmo-signal transduction 과 무관한 pheromone signal transduction 의 두가지 생리적인 신호전달효과인 mating 과 G1 cell cycle arrest에 의한 세포성장억제 기능 (Halo assay로 prove함)은 정상적으로 이루어짐을 확인 하였다 (그림 10). 이와 같은 연구결과는 Hog1돌연변이 주들이 균주들의 염 저항에 관련되어있는 Hog1 MAP kinase신호전달계에 특이적으로 작용함을 보여주

는 결과이다.

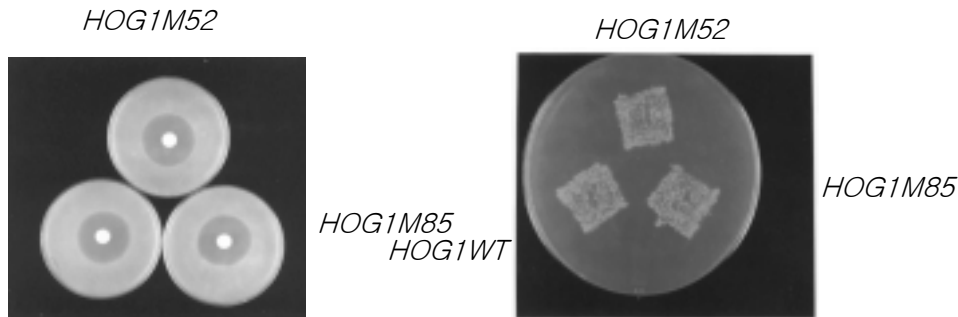


그림 10. 신규 분리된 Hog1 mutant 유전자를 가지고 있는 *S. cerevisiae* mutant들은 정상적인 pheromone 신호전달계를 유지시킨다. 좌측은 Halo assay로써 pheromone에 의해 세포성장이 중지되었을 때 halo가 형성됨을 보여주는 그림으로 Hog1M52, M85 mutant들도 pheromone 첨가시 정상적인 G1 cell cycle arrest가 일어남을 보여준다. 우측그림은 mating assay로써 mating partner yeast 균주와 mating 시킨후 mating을 유도하는 YNB 배지에 transfer 했을 경우 정상적으로 mating 함을 보여주는 그림이다.

2) 돌연변이 Hog1 에 의한 염 저항성은 resting 상태에서 Hog1의 인산화 정도가 증가됨에 기인한다.

Hog1 mutant 들의 과발현 한 균주가 이스트 내에서 발현되었을 때 염의 자극이 없는 상황에서 세포내에서 타겟 기질을 인산화 시킬 수 있는 효소 활성도를 측정한 결과 Hog1 mutant들(HOG1M21, HOG1M31, HOG1M52, HOG1M85)에서 활성도(ATF-1을 인산화시키는 정도로 알아냄)가 wild-type Hog1에 비해서 증가되어 있음을 발견하였다. 반면 ERK의 활성도를 보여주는 phospho-ERK 단백질들의 수준은 크게 변화되지 않음이 관찰되었다. 이와같은 결과는 염농도가 증진된 Hog1 돌연변이들은 대부분 염에 대한 신호전달 없이 Hog1의 활성도가 증가된 것이 염저항성의 원인임을 보여 주고 있다.

반면 유사 신호전달계의 MAP kinase인 ERK의 활성도를 phospho-ERK 항체를 이용한 Western blot 분석으로 밝힌 결과 Hog1 돌연변이에는 무관하게 항상성 있는 ERK 활성도를 보여주었다.

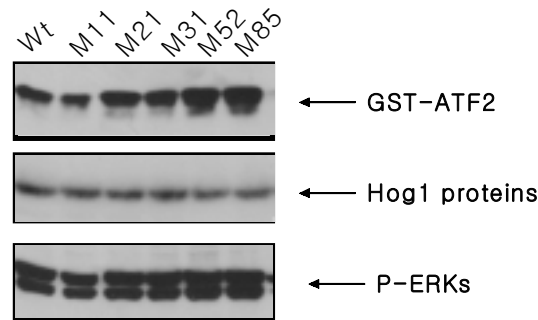


그림 11. 각종 Hog1 돌연변이유전자를 포함하는 플라스미드를 Hog1이 결핍된 균주에 transformation하여 영양마커로 선택한 뒤, 세포를 성장한 후 extract를 이용하여 kinase assay(윗 panel; Hog1을 면역침전한후 GST-ATF2를 기질로 첨가하여 반응을 시킨 후 gel에 걸어서 X-ray film에 노출한결과임), Hog1 혹은 p-ERK항체를 이용하여 Western blot을 실시한 그림이다(아래 2 panels).

3) 돌연변이 Hog1은 세포내에서 *in vivo* substrate들을 인산화 시키는 능력이 향상되어 있다.

염 저항성을 지니는 돌연변이 Hog1이 형질전환된 균주들을 성장시킨 후 이들을 세포추출액으로부터 면역 침전시킨 후 *in vivo* substrate를 인산화 시키는 정도를 gamma ³²P를 첨가한 kinase assay를 실시 한 결과, Hog1은 세포내에 존재하는 putative substrate들을 인산화시키며 돌연변이들이 이들 단백질들을 인산화시키는 정도가 높은 것을 발견하였다. 하지만 mutant들은 wild-type와 같은 기질들을 주로 인산화시키며, 차별적인 인산화는 크게 보이지 않았다.

4) Hog1 돌연변이 pheromone신호전달에 의해 단백질 분해가 감소되어 있다.

MAP kinase들을 서로 상대방의 신호에 의해서 corss-regulation될 수 있음을 보여주는 그림으로써 ERK와 유사한 FUS3 MAP kinase를 이용하는 pheromone 신호전달계가 작동되었을 시 Hog1 단백질의 stability가 감소하며 이와같은 단백질 degradation은 mutant hog1 특히 M85에서 현저하게 감소되어 있음을 보여주는 그림이다.

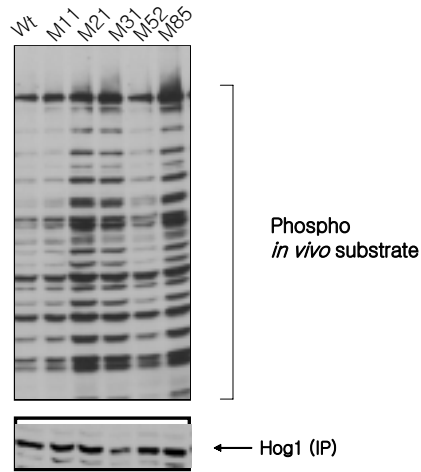


그림 12. Hog1 돌연변이 균주에서 *in vivo* 기질을 인산화 시키는 능력이 증가되어 있음을 보여주는 결과이다. Wt 혹은 돌연변이 Hog1 유전자를 *hog1*이 없는 균주에 형질전환시킨 후 이들 균주를 성장시킨 이후 세포 추출액을 준비하여, Hog1 항체로 면역침전을 실시한 후 γ ^{32}P ATP를 넣고 인산화 반응을 실시한 후 X-ray film에 노출시킨 결과이다.

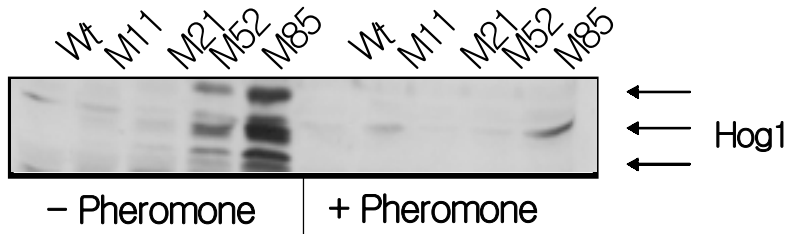


그림 13. Hog1 유전자가 결핍된 이스트에 Hog1 wt 혹은 mutant들을 각각 transfection 시킨 후 세포를 성장시키고 pheromone을 15분간 처리하여 후 세포추출액을 준비한 후 Hog1 항체를 이용하여 Western blot을 실시한 결과이다.

5) 염 저항성이 증가 되고 항상성 있게 Hog1이 활성화 되어 있는 돌연변이는 pbs mutant의 기능을 rescue한다.

PBS가 결핍된 균주는 그 자체가 osmoresistant 기능이 약화되어 있으나 염 저항성이 증가된 Hog1 돌연변이를 함께 형질전환 시켰을 시, 염저항 기능을 회복함을 보여주었다. 이와같은 결과는 Hog1이 PBS와 결합하여 기능을 수행함을 다시 한번 확인하여 주었으며, PBS의 기능 중 하나는 Hog1 신호전달계에서 Hog1이 높은 염 농도에 반응하여, 염 저항성을 유지하는데 중요한 기능을 수행함을 암시하고 있다.

6) 염 저항성이 증진된 진균 Hog1의 유전자 와 타 MAP kinase와의 아미노산 서열 비교분석

Hog1의 아미노산서열과 다른 MAP kinase아미노산 서열비교를 통하여, 염 저항에 관련되는 아미노산과 그 위치(별표)를 추정 할 수 있게 되었다. 이와 같은 서열비교결과는 추후 염 저항성이 증진된, 토양진균의 Hog1 유사유전자의 돌연변이체 제조에 이용 할 수 있다.

		1		50
hog1a_yeast	(1)	-----	MTTNEEFIR	TQIFGTVFEITNRYNDLNPVG
JNK1_human	(1)	-----	MSRSKRDNNFYSVE	IGDSTFTVLKRYQNLKPIG
P38_mouse	(1)	GSSHHHHHSSGLVPRGSHMSQERPTFYRQELNKT	IWEVPERYQNLSPVG	
P38_human	(1)	MAHHHHS-----	QERPTFYRQELNKT	IWEVPERYQNLSPVG
fus3_yeast	(1)	-----	MPKRI	VYNISSDFQLKSLLG
MPK2_xenopus	(1)	MSS-----	NQSYVFYRQELNKT	IWEVPERYQNLTPVG
MPK2-P1_drosophila	(1)	-----	MSVSI	TKKFKYKLDINRTEWEIPDIYQDLQPVG
KSS1_yeast	(1)	-----	MARTI	TFDIPSQYKLVDLIG
STY1_yeast	(1)	-----	MAEFIR	TQIFGTCFEITTRYDQLPIG
Consensus	(1)		FYR EI	KTIFEIP RYQ L PVG
		51	*	100
hog1a_yeast	(31)	MGAFGLVCSATD	TLTSGPVAIKKIMKPFSTAVLAKRTYRELKLLKHL	-RH
JNK1_human	(34)	SGAQGIVCAAYDA	ILERNVAIKKLSRPFQNGQTHAKRAYRELVLMKCV	-NH
P38_mouse	(51)	SGAYGSVCAAFD	TKTGHRVAVKKLSRPFQSIIHAKRTYRELRLKHM	-KH
P38_human	(38)	SGAYGSVCAAFD	TKTQLRVAVKKLSRPFQSIIHAKRTYRELRLKHM	-KH
fus3_yeast	(21)	EGAYGVCSATHKPTGE	IVAIKKIEP-FDKPLFALRTLREIKILKH	-FH
MPK2_xenopus	(33)	SGAYGSVCSA	FDTRTALRIAVKKLSRPFQSIIHAKRTYRELRLKHM	-KH
MPK2-P1_drosophila	(33)	SGAYGVVSKAVVRGT	TNNHVAIKKLARPFQSAVHAKRTYRELRLKHM	-DH
KSS1_yeast	(21)	EGAYGTVCSA	IHKPSGIVKVAIKKIQP-FSKKLFVTRTIREIKLLRYFHEH	
STY1_yeast	(28)	MGAFGLVCSAKD	QLTGNNVAVKKIMKPFSTPVLAKRTYRELKLLKHL	-RH
Consensus	(51)	SGAYG VCSA D TGL	VAIKKLSRPFQS IHAKRTYRELKLLKHM KH	
		101	*	150
hog1a_yeast	(80)	ENLI	ICLDIFLSP-----	LEDIYFVTELGTDLHRLQLTR-----PL
JNK1_human	(83)	KNII	GLLVFTPKS-----	LEEFQDVYIVMELMDANLCQVIGME-----L
P38_mouse	(100)	ENVIGLLDVFT	PARS-----	LEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCCQ-----KL
P38_human	(87)	ENVIGLLDVFT	PARS-----	LEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCCQ-----KL
fus3_yeast	(69)	ENIITIFNIGR	POSF-----	ENFNEVYIQELMQTDLHRVISTQ-----ML
MPK2_xenopus	(82)	ENVIGLLDV	FSPAKS-----	FEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCCQ-----KL
MPK2-P1_drosophila	(82)	ENVIGLLDIF	FHPANGSLENFQGVYLVTHLMGADLNNIIFRMQ-----HL	
KSS1_yeast	(70)	ENIIS	LDKVRPVS-----	DKLNAVYLVVELMETDLQVIVNQNQSGFSTL
STY1_yeast	(77)	ENIIS	LSDFIFISP-----	FEDIYFVTELLGTDLHRLQLTR-----PL
Consensus	(101)	ENIIGLLDIF	P S E FNDVYLVTELMGADLNNI I Q L	

그림 14. 이스트 Hog1의 아미노산 서열과 잘 알려진 MAPK들의 아미노산 서열을 Vector NTI Version 6.0.1 program(InforMax Inc., Bethesda, MD, U.S.A)을 이용하여 아미노산 서열 비교를 실시한 결과이다. 이스트 Hog1 유전자에서 염 저항성이 증진에 기여한 돌연변이 아미노산의 위치(표 2)를 별표로 표시하였다.

		151		200
hog1a_yeast	(117)	EKQFVQYFLYQILRGLKYVHSAGV	IHRDLKPSN	ILNENCOLKICDFGLA
JNK1_human	(124)	DHERMSYLLYQMLCGIKHLHSAGI	IHRDLKPSN	IVVKSQCTLKILDFGLA
P38_mouse	(142)	TDOHVQFLIYQILRGLKYIHSAD	IHRDLKPSN	LAVNEDCELKILDFGLA
P38_human	(129)	TDOHVQFLIYQILRGLKYIHSAD	IHRDLKPSN	LAVNEDCELKILDFGLA
fus3_yeast	(110)	SDDHIQYFIYQTLRAVKVLHGSNW	IHRDLKPSN	LLNSNCDLKVCDFLA
MPK2_xenopus	(124)	TDOHVQFLIYQILRGLKYIHSAGI	IHRDLKPSN	LAVNEDCELKILDFGLA
MPK2-P1_drosophila	(127)	SDDHVQFLVYQILRGLKYIHSAGV	IHRDLKPSN	IAVNEDCELRILDFGLA
KSS1_yeast	(116)	SDDHVQYFTYQILRALKSIHSAGV	IHRDLKPSN	LLNSNCDLKVCDFLA
STY1_yeast	(114)	ETQFIQYFLYQILRGLKVFHSAGV	IHRDLKPSN	ILNENCOLKICDFGLA
Consensus	(151)	SDDHVQYFLIYQILRGLKYIHSAGV	IHRDLKPSN	LLVNECDLKIILDFGLA
		201*		250
hog1a_yeast	(166)	RIGDQPMTG	-----YVSTRYYRAPE	IMLTWGKYDVEVDIWSA
JNK1_human	(174)	RTAGTSFMMTP	-----YVSTRYYRAPE	ILG-MGYKENVDLWSV
P38_mouse	(192)	RHTDDEMTG	-----YVATRWYRAPE	IMLNMMHYNQTVDIWSV
P38_human	(179)	RHTDDEMTG	-----YVATRWYRAPE	IMLNMMHYNQTVDIWSV
fus3_yeast	(160)	RIIDESAADNSEPTGQSSG	MTTEYVATRWYRAPE	WMLTSAKYSRAMDVWSC
MPK2_xenopus	(174)	RHTDDEMTG	-----YVATRWYRAPE	IMLNMMHYNQTVDIWSV
MPK2-P1_drosophila	(177)	RPTENEMTG	-----YVATRWYRAPE	IMLNMMHYDQTVDIWSV
KSS1_yeast	(166)	RCLASSDSDRETLVG	---FMTEYVATRWYRAPE	IMLTFQEYTTAMDVWSC
STY1_yeast	(164)	RIGDQPMTG	-----YVSTRYYRAPE	IMLTWGKYDVEVDIWSA
Consensus	(201)	R D MTG	-----YVATRWYRAPE	IML MM Y VDIWSV
		251		300
hog1a_yeast	(203)	GCIFAEMIEGKPLFPGRD	HVNQFSIIITDLLQSP	-PKDVINTICSENTLKF
JNK1_human	(212)	GCIMGEMVCHKILFPGRDY	IDQNNKVI	EQLGTP--CPEFMKKLGPTVRTY
P38_mouse	(229)	GCIMAELLTGRTLFPGTDH	IDQLKILRLVGTP	-GAELLKKISSESARNY
P38_human	(216)	GCIMAELLTGRTLFPGTDH	IDQLKILRLVGTP	-GAELLKKISSESARNY
fus3_yeast	(210)	GCILAELFLRRP	IFPGRDYRHGLLLIFGI	IGTPHSDNLRICIESPRAREY
MPK2_xenopus	(211)	GCIMAELLTGRTLFPGTDH	IDQLKILRLVGTP	-EPELLKISSEARNY
MPK2-P1_drosophila	(214)	GCIMAELLTRRTLFP	GRDHIHQLNLMEM	LGTP-PAEFLKISSESARSY
KSS1_yeast	(213)	GCILAEMVSGKPLFPGRDY	HHGLWILEVLGTP	-SFEDFNQIKSKRAKEY
STY1_yeast	(201)	GCIFAEMIEGKPLFPGRD	HVNQFSIITELLGTP	-PNEVIETICSKNTLRF
Consensus	(251)	GCIMAELITGR LFPGRDHI QL LILELLGTP		ELLKI SE AR Y
		301		350
hog1a_yeast	(252)	VTSLPHRDP	IPFSERFKT-----	VEPDAVDLLEKMLVFDPKKR
JNK1_human	(260)	VENRPKYAGYSFEKLF	PPDVLFPADSEHNK	LKASQARDLLSKMLVIDASKR
P38_mouse	(278)	IQSLAQMPKMN	FANVFIG-----	ANPLAVDLEKMLVLDSDKR

그림 14. 계속

P38_human	(285)	IQSLTQMPKMNFAVFIQ-----ANPLAVDLLEKMLVLDQDKR	
fus3_yeast	(280)	IKSLPMYPAAPLEKMFPR-----VNFKGIQLLQRMVLFDPAKR	
MPK2_xenopus	(280)	IQSLPYMPKMNFEVDFIQ-----ANPQAVDLEKMLVLDQDKR	
MPK2-P1_drosophila	(283)	IQSLPIMKQISFKNVFKN-----ANPLAIDLLEKMLELDAEKR	
KSS1_yeast	(282)	IANLPMRPPLPWETVMSKTD-----LNPDMIDLLEKMLGFDPDKR	
STY1_yeast	(250)	VQSLPGKEKVPFAEKFKN-----ADPDAIDLLEKMLVDFPRKR	
Consensus	(301)	IQSLP P M F VF ANP A I D L L E K M L V L D D K R	
351			
hog1a_yeast	(290)	ITAAALAHPYSAPIYHDPTEPVAQAK-FDMHFNDAD-----LP	400
JNK1_human	(310)	ISVDEALQHPYINWYDPSEAEAPPKIPDKQLDEREH-----T-	
P38_mouse	(316)	ITAAGALAHAYFAQYHDPDDEPVADP-YDGSFESRD-----LL	
P38_human	(303)	ITAAGALAHAYFAQYHDPDDEPVADP-YDGSFESRD-----LL	
fus3_yeast	(298)	ITAKEALEHPYLQTYHDPNDEPEGEP-IPPSFFEFD-----HYKEALT	
MPK2_xenopus	(298)	ITAAEALAHSYFAQYHDPDDEPIAEP-YDGSFESRE-----LD	
MPK2-P1_drosophila	(301)	ITAAEALSHPYLEKYAEPVVEQTSPP-YDHSFEQMD-----LP	
KSS1_yeast	(302)	ISAAEALRHPYLAMYHDPDDEPEYPPNLDDQEFWKLQNKIMRPEEEEEVP	
STY1_yeast	(288)	ISAAALAHNYLAPYHDPTEPVADEV-FDWSFGQND-----LP	
Consensus	(351)	ITAAEALAHPYLA YHDPDDEPVADP YD SFED D L	
401*			
hog1a_yeast	(328)	VDTWRVMMYSEILDFHKIQGSDGQIDISATFDGQVAAATAAAAGAGAGAG	450
JNK1_human	(340)	IEEWKELIYKEVMDLEERTKNGVIRQGPSPLAQVQQ-----	
P38_mouse	(353)	IDEWKSLTYDEVISFVPPPLDQEEMES-----	
P38_human	(340)	IDEWKSLTYDEVISFVPPPLDQEEMES-----	
fus3_yeast	(340)	TKDLKKLIMNEIFSE-----	
MPK2_xenopus	(335)	IEEWKRLTYEEVTCFVPPPLDQEEMES-----	
MPK2-P1_drosophila	(338)	VDKWKELIYKEVTNFKIPPSYAQVLKQVK-----	
KSS1_yeast	(352)	IEMIKQMLYDELAKTME-----	
STY1_yeast	(326)	VETRWVMMYSEVLSFHIMDNELQS-----	
Consensus	(401)	IDEWK L I Y E V I F M	
451			
hog1a_yeast	(378)	AQAVQLMAAASHNGAGTTGNCHSDIAGGNKYSQHVAAANDITDYGNGAIG	500
JNK1_human	(385)	-----	
P38_mouse	(380)	-----	
P38_human	(367)	-----	
fus3_yeast	(354)	-----	
MPK2_xenopus	(362)	-----	
MPK2-P1_drosophila	(367)	-----	
KSS1_yeast	(369)	-----	
STY1_yeast	(350)	-----	
Consensus	(451)	-----	
501			
hog1a_yeast	(428)	YANEFQQ-----	
JNK1_human	(385)	-----	
P38_mouse	(380)	-----	
P38_human	(367)	-----	
fus3_yeast	(354)	-----	
MPK2_xenopus	(362)	-----	
MPK2-P1_drosophila	(367)	-----	
KSS1_yeast	(369)	-----	
STY1_yeast	(350)	-----	
Consensus	(501)	-----	

그림 14. 계속

제4절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

염류장해 토양의 생물학적 복원과 작물의 생산성 증대를 위해 염류제거 활성 및 염류의 세포내 축적능이 뛰어난 환경조화형 염류제거용 토양진균을 개발하고자, 이스트 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 염 저항성이 증진된 돌연변이체들을 생산하고 성격규명 하였다. 결과로써, 1) 이스트 Hog1유전자를 클로닝 하였으며, 2)화학적인 방법에 의해 돌연변이를 유도한 후 염 저항성이 뛰어난 균주를 선별하였으며, 3) 선별된 균주로부터 Hog1 유전자를 recover하여 염기서열을 결정하여, 돌연변이 성격을 규명하였으며, 4) 위에서 언급한 각종 유전학적 생화학적 방법들을 이용하여 Hog1돌연변이의 성격을 규명한 결

과, 염 저항성이 증진의 원인은 돌연변이에 따른 Hog1의 활성화 증진에 의함을 밝혀냈다. 또한 pheromone 신호전달계에 의해서 Hog1의 stability가 조절되며 돌연변이 균주들은 stability가 증강됨을 밝혔다. 이는 다양한 Hog1과 ERK 신호전달계들이 서로 cross-talk을하여 신호전달계를 조절함을 암시한다. 또한, 이와 같은 Hog1돌연변이들은 pheromone에 의한 G1세포주기와 mating 능력에서는 wild-type과 크게 다르지 않음을 밝힘으로써, Hog1의 돌연변이는 osmolarity 신호전달계에만 특이성 있게 영향을 미침을 밝혔다.

이상과 같은 결과를 통하여, 본 세부과제에서는 염저항성이 항진된 Hog1의 돌연변이를 찾아 성격규명 하였으며, 이 결과는 염 저항성이 증진된, 토양진균의 Hog1유전자의 돌연변이 균주생성에 이용 할 수 있도록 그 기반을 구축하였다.

제5절 연구개발결과의 활용계획

Hog1과 유사한 염 저항성 MAPK를 가지는 토양미생물에서 Hog1 유사 유전자가 분리되면, 이에 본 연구를 통하여 개발된 돌연변이를 도입함으로써, 염 저항성이 크게 증강된 토양진균 개발에 이용한다.

제6절 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근의 연구는 Hog1 MAPK에 특이적으로 작용하여 Hog1의 활성화시키는 phosphatase 효소인 PTP3를 발견하였는데 이 효소는 Hog1의 cytosolic localization을 촉진하고, 효소활성도를 저해하는 것으로 밝혀졌다(Harrington *et al.*, 2002; Peuvél *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). 이와 같은 결과는 Hog1의 기능향상성 균주를 제조와 더불어 이 효소 유전자를 없애면 염 저항성이 한층 증강된 진균을 개발 할 수 있음을 암시한다 하겠다.

제 7 장 포장활성실험

제1절 서론

대부분의 시설재배 작물들은 과잉의 비료의 시용과 가축분뇨로 만들어진 유기질비료를 시용하기 때문에 염류가 과잉축적된 실정(이와 이, 1985)으로, 시설에 의한 강우차단과 고온에 의한 표면증발 및 작물의 왕성한 증산작용으로 인하여 토양용액 중에 용해되어 있는 염류들도 함께 이동되어 표층토에 염류과다 집적을 유발시킨다(육 등, 1993). 염류가 집적되면 삼투압이 높아져 뿌리로부터 양수분의 흡수가 저해되고 토양양분이 공급되지 않기 때문에 작물이 양분을 흡수이용 할 수 없게된다. 식물생장에 대한 염류장해 증상은 발아억제 및 지연, 묘의 삼투압 작용에 의한 고사, 정식묘의 뿌리활착 불량 등을 들 수 있다. 전기전도도 값이 증가할수록 작물의 발아가 지연되고 발아율도 감소되고, 작물의 종류에 따라 염류에 대한 내성이 다르다고 하였으며(최 등, 1989), 수량도 전기전도도가 증가할수록 감소한다고 보고되었다(유와 이, 1993).

이러한 배경하에 본 연구진에 의하여 탐색되어진 불용성 인산염 가용화 균주를 염류장해 토양에 도입하여 시설작물의 품질향상 및 생산성 증가의 기초자료를 얻고자 다음과 같은 방법으로 연구를 수행하였다.

제2절 포장활성실험

1. 작물의 발아율 변화양상

각각의 균주에 대한 작물의 발아율 변화양상을 알아보기 위하여 LB 배지에 서 over night culture하여, 0.85% saline으로 3번 washing한 후 멸균 증류수로 2번 washing하여 멸균 증류수에 현탁시킨 후 3개의 petridish에 wattman No 2 paper 2겹을 바닥에 깔은 후 각각의 균주들을 ml당 1×10^7 CFU가 되도록 처리(1일 배양시 균체량 : KSJ8, 4×10^7 CFU/ml; KSJ16, 9.6×10^7 CFU/ml; WP38, 2.22×10^7 CFU/ml; KL1114, 9.27×10^7 CFU/ml)하여 현탁액 5ml를 접종한 후 배추 종자를 한 plate에 30립씩을 상치하여 2일과 3일 후의 발아율을 조사하였으며, 대조군으로는 멸균 증류수를 사용하였다. 그 결과 대조군에 비하여 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 오히려 본 연구진에 의하여 탐색되어진 인산염가용화

균주를 처리하였을 때 대조구에 비하여 3일째 발아율이 동일하거나 KSJ16과 WP38의 경우 2%씩 발아율이 증가하는 것을 알 수 있었다(표 1. 참조). 이러한 결과로 본 연구진에 의하여 탐색되어진 불용성 인산염 가용화 균주들은 종자에 아무런 피해를 일으키지 않음을 알 수 있었다.

표 1. 배추의 발아율 변화양상

DW	KSJ8현탁액	KSJ16현탁액	WP38현탁액	KL1114현탁액
95.7	95.7	97.7	97.7	95.7

한편, 토양내 작물의 발아율을 살펴보기 위하여 시중에서 시판되고 있는 상토(홍농종묘)와 일반토양 및 장해토양에서의 발아율은 25홀 pot를 이용하여 각 홀에 2립씩 파종하여 시기별로 발아율을 관찰하였으며, 종자는 배추와 상추를 사용하였다. 그 결과 배추의 경우는 상토와 일반토양에서는 커다란 차이를 보이지 않았으나, 장해토양에서는 이들 토양에 비하여 발아율이 현저히 떨어짐을 알 수 있었으며, 상추의 경우는 상토에 비하여 일반토양 및 장해토양에서 발아율이 현저히 낮음을 알 수 있었다(표 2. 참조). 이러한 결과는 최 등(1989)의 작물별 종자에 따라 차이가 있는 결과와 유사하였다.

표 2. 토양에서의 작물의 발아율

(단위 : %)

토 양	배추							상추						
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일
상 토	0	12	76	88	92	96	96	0	8	80	100	100	100	100
일반토	0	16	80	96	100	100	100	0	0	12	12	44	44	44
장해토	0	0	8	32	32	32	32	0	0	8	16	20	20	20

2. 풋트실험

1차 및 2차 연도의 연구를 통하여 이미 확보해 놓은 불용성 인산염 가용화 균주들을 대상으로 염류장해 토양에서의 염류제거 능력을 실험실내에서 다양하게

수행한 후, 3차년도의 궁극적인 목표인 염류제거 유용균주의 체제화 완성 및 포장실험을 위해 대형포트, 온실실험을 통해 최적의 적용기법을 개발하고자 대전광역시 중구 목동 132-7 번지에 위치한 (주)에코바이오메드의 온실을 이용하였다.

1에서의 발아율의 결과를 토대로 각각의 종자(상추, 배추, 고추)를 상토에서 발아시킨 후 본 잎이 2장이 나왔을 때 장해토양에 정식하여 각각의 균주들을 ml당 10^7 CFU가 되도록 처리(KSJ8 : 4×10^7 CFU/ml, KSJ16 : 9.6×10^7 CFU/ml, WP38 : 2.22×10^7 CFU/ml, KL1114 : 9.27×10^7 CFU/ml)한 후 pot 실험을 수행하였다. 정식 후 불용성 인산염 가용화 균주를 접종하여 7일째에 성장률을 조사하였다. 그 결과 상추는 장해토양에 비하여 각각의 균주를 장해토양에 접종하였을 때 상대적으로 성장률이 양호하였으며, 특히 WP 38균주를 처리하였을 때 다른 균주에 비하여 우수함을 알 수 있었으며, 배추의 경우는 장해토양에 KL1114 균주를 접종하였을때에 효과가 가장 좋았으며, 고추는 장해토양에 KSJ8 균주를 처리하였을 때 다른 균주들에 비하여 양호하였다. 이러한 결과는 각각의 균주에 의한 효과가 작물별로 다를 수 있었다(그림 1).

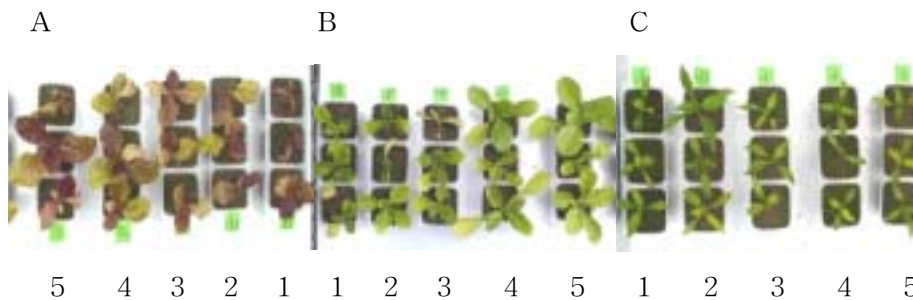


그림 1. 장해토양에 인산염가용화 균주 처리시 작물별 성장률 변화양상
A : 상추, B : 배추, C : 고추
1:장해토양, 2:장해토양+KSJ8, 3:장해토양+KSJ16, 4:장해토양+WP38, 5:장해토양+KL1114

장해토양에 부숙제와 각각의 균주를 혼합하였을 때에는 상추와 배추의 경우 KSJ8 균주를 처리하였을때에 가장 효과가 좋게 나타났으며, 고추에서는 커다란 차이를 발견할 수 없었다(그림 2).

다른 한편으로는, 장해토양에 가용화 균주들을 혼합하여 성장률을 비교한 결과 각각의 작물에서 모두 양호하였으며, 장해토양에 부숙제와 가용화 균주들

을 혼합하였을 때에는 균주들을 혼합하였을 때 보다 성장률이 좋았으며, 장해 토양에 부숙제와 질석 및 균주들을 혼합하였을 때에는 상추와 배추의 경우는 장해토양+부숙제+질석을 혼합하였을 때와 장해토양+부숙제+질석+균주들을 혼합 하였을 때 비슷한 양상을 보였으나, 고추의 경우는 장해토양+부숙제+질석+ 균주들을 혼합하였을 때 성장률이 훨씬 좋게 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 본 연구진에 의하여 탐색되어진 불용성 인산염 가용화 균주들과 부숙제 및 질석을 혼합하여 사용하면 훨씬 더 좋은 효과를 기대할 수 있으리라 판단된다(그림 3).

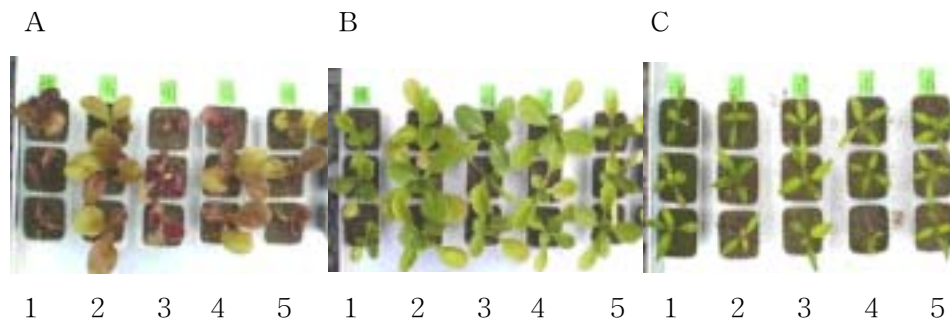


그림 2. 장해토양에 부숙제+인산염 가용화 균주처리시 작물별 성장을 변화양상

A : 상추, B : 배추, C : 고추

1:장해토양, 2:장해토양+부숙제+KKSJ8, 3:장해토양+부숙제+KKSJ16,

4:장해토양+부숙제+WP38, 5:장해토양+부숙제+KL1114

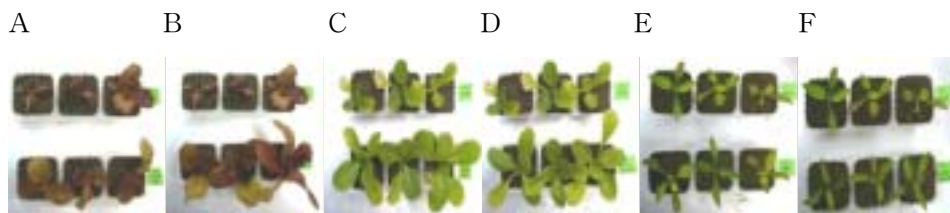


그림 3. 장해토양+균주혼합 및 장해토양+부숙제+균주혼합시 작물의 성장을 변화양상

A, B : 상추, C, D : 배추, E, F : 고추

A, C, E 상:장해토양, 하:장해토양+균주혼합,

B, D, F 상:장해토양, 하:장해토양+부숙제+균주혼합,

3. 온실활성실험

인산염가용화 균주를 장해토양에 처리하여 작물생육에 미치는 효과를 검증하기 위하여 2002년 6월 17일부터 7월 13일까지 대전광역시 중구 목동 132-7번지에 위치한 (주)에코바이오메드의 온실에서 수행하였다.

시험에 사용한 토양은 시설재배지의 염류장해토양(EC 10.88dS/m)을 사용하여 시험대상 작물은 배추와 상추를 공시하였으며, 별도의 시비는 하지 않았다. 인산염가용화 균주 처리 후 작물의 생육증진 효과를 측정하기 위하여 각각의 작물을 pot에서 받아서 키친 후 본 잎이 2장 나왔을 때 가로×세로×높이(650×450×480mm)의 포장에 정식하였다. 정식 후 인산염 가용화 균주와 본 연구자에 의하여 탐색 연구개발된 균주로써 항진균활성과 유기물분해능력, 농약내성 및 분해능 등 다양한 친환경적 기능을 갖추고 있는 KL 1114 균주들을 ml 당 10^7 CFU가 되도록 처리(KSJ8 : 4×10^7 CFU/ ml , KSJ16 : 9.6×10^7 CFU/ ml , KL1114 : 9.27×10^7 CFU/ ml)하여 배추의 경우 4회 분주하였으며, 상추는 3회 분주하였으며, 대조구는 시험기간 동안 수돗물을 처리하였다.

작물의 생육에 미치는 효과를 검증하기 위하여 배추는 정식 후 27일, 상추는 20일만에 수확하여 생체중(g), 뿌리무게(g), 엽수, 초장(cm), 엽면적(cm^2) 및 엽록소의 함량을 측정하였다.

생체중과 뿌리의 무게는 작물을 수확하여 뿌리에 붙어있는 흙을 완전히 제거하여 무게를 측정하였으며, 엽수는 떡잎은 제외하였고 길이 3cm 이하인 것들은 모두 합하여 한 장으로 계산하였다. 엽록소 및 엽면적은 엽록소측정기(SPAD-502, Minolta, Japan)와 자동엽면적측정기(Model: LI-3100, LI-COR Patent Pending, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

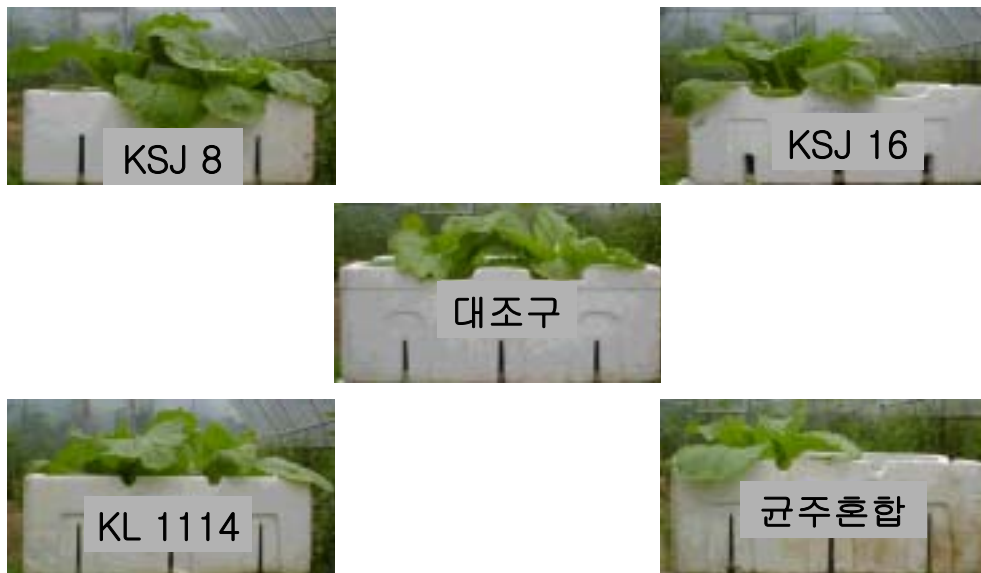
그 결과 배추는 인산염 가용화 균주 액상을 주 1회 50ml씩 4회 분주하였을 때의 생육효과는 표 3 및 그림 4와 같이 나타났다.

생체중은 대조구에 비하여 인산염 가용화 균주를 처리하였을 때 44.1% ~ 172.3%로 모두 효과가 있었으며, 특히 KSJ 16 균주를 처리시 가장 현저한 효과를 보여 172.3%의 증가율을 보였다. 엽수에 있어서도 KSJ 16 균주 처리구에서 58.8%의 증가율을 보였으며, 다음으로는 KSJ 8 균주 처리구에서 23.5%의 증가율을 보였다. 초장 및 엽면적에 있어서도 KSJ16 균주 처리구에서 가장 좋은 효과를 보였는데 초장은 23.1%, 엽면적은 144.5%의 증가율을 보여 대조구에

비하여 현저한 증가율을 보였으며, 뿌리무게에서는 KSJ 8 균주를 처리하였을 때 105%의 증가율을 보였다.

표 3. 장해토양내에 인산염 가용화 균주 처리시 배추의 생육에 미치는 영향

구분	생체중 (g)	뿌리무게 (g)	엽수 (장)	초장 (cm)	엽면적 (cm ²)	엽록소
대조구	189.35	2.20	17	32.5	2512.70	34.12
KSJ 8	338.24	4.52	21	38.5	4530.09	40.20
KSJ 16	515.59	4.29	27	40.0	6144.64	37.61
KL 1114	272.96	3.68	18	39.0	3845.81	40.65
균주혼합	306.81	3.32	19	36.5	4117.65	37.65



대조구 KSJ 8 KSJ 16 KL 1114 균주혼합
그림 4. 장해토양내에 인산염 가용화 균주 처리시 배추의 생육에 미치는 영향

다른한편으로 상추에서는 인산염 가용화 균주 액상을 주 1회 50ml씩 3회 분주하였을 때의 생육효과는 표 4 및 그림 5와 같이 나타났으며, 생체중, 뿌리무

계, 엽수, 초장 및 엽면적에 있어서 인산염 가용화 균주인 KSJ 8, KSJ 16 균주 처리구에서 모두 생육촉진 효과를 보였으나, 기능성 균주인 KL 1114 균주를 처리하였을시에는 대조구에 비하여 생육효과는 커다란 차이를 보이지 않았다.

생체중에 있어서의 인산염가용화 균주인 KSJ 8 균주와 KSJ 16 균주를 처리하였을 때에 대조구에 비하여 약 119 ~ 430% 이상의 증가율을 보였으며, 뿌리무게는 104 ~ 232%의 증가율을 보였으며, 엽수에 있어서도 23 ~ 61% 이상의 증가율을 보이고 있다. 또한 초장은 46.7 ~ 64.9%, 엽면적은 105.4 ~ 398.1%로 월등한 효과를 보이고 있다.

표 4. 장해토양내에 인산염 가용화 균주 처리시 상추의 생육에 미치는 영향

구분	생체중 (g)	뿌리무게 (g)	엽수 (장)	초장 (cm)	엽면적 (cm ²)	엽록소
대조구	17.38	2.47	13	13.7	428.70	31.44
KSJ 8	92.23	8.20	21	22.6	2135.43	27.21
KSJ 16	38.07	5.04	16	20.1	880.72	31.17
KL 1114	17.35	2.95	13	15.3	439.50	30.57
균주혼합	29.86	3.77	16	17.2	787.65	28.77

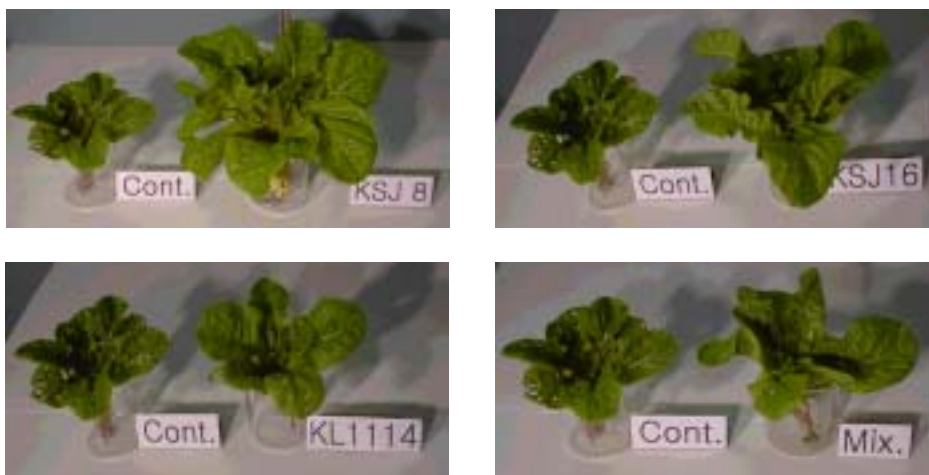


그림 5. 장해토양내에 인산염 가용화 균주 처리시 상추의 생육에 미치는 영향

식물양분의 필수 원소인 인산이 작물에 이용되기 위해서는 유효태가 되어야 하는데 인산질 비료가 시용되면 토양내에 존재하는 칼슘, 알루미늄, 마그네슘 및 철 이온과 화학결합을 하여 불용성 형태로 쉽게 전환되어 유효태 인산은 난용성 인산염이 되어 식물이 이용할 수 없게 되나 본 연구진에 의하여 탐색되어진 균주를 장해토양에 처리하였을 때 작물이 이용할 수 없는 토양 중의 난용성 인산염을 가용화시켜 작물이 쉽게 이용할 수 있게 함으로써 식물의 생장을 촉진시키는 효과를 확인 할 수 있었다.

* KSJ 8 균주와 KSJ 16 균주는 국제특허균주로 등록하였으며, 국내특허로 출원하였다.			
국제특허균주 등록번호	<i>Leclecia adecarboxylata</i> KSJ 8	KCTC	10388BP
	<i>Enterobacter intermedius</i> KSJ 16	KCTC	10387BP
특허출원번호	<i>Leclecia adecarboxylata</i> KSJ 8	10-2002-0078452	
	<i>Enterobacter intermedius</i> KSJ 16	10-2002-0078453	

제 8 장 연구개발 결과 및 활용계획

제1절 연구결과의 기대효과

본 과제의 연구결과를 잘 활용할 경우 다음과 같은 기대효과를 충족시킬 수 있다.

1. 기술적 측면

- 균주탐색, 활성검색, 제제기술, 염류장해토양 환경요인 분석기술 등이 선진국 수준으로 올라간다.
- 염류장해 제거 및 복원기술에 대한 세계적, 독창적 선도가기술이 확립된다.
===> 외국으로의 기술 이전 가능한 신기술이 개발된다.
- 염류장해에 대한 생물학적인 환경친화형 복원모델 시스템이 구축된다.
- 환경친화형 염류장해 제거 미생물 균주 및 유전공학적 변형 균주 (GMO 균주)를 이용한 미생물 제제의 개발이 가능해진다.

- 토양의 복원 및 정화에 대한 신기술을 확보하게 되어 작물생산성 증대가 가능해진다.
- 부작용 없는 생물청정제로서의 환경친화형 염류제거 미생물 제제를 확보하게 된다.
- 내염성 작물개발을 위한 형질전환 식물 (transgenic plant) 제조용 기반기술 제공(Hog1연구결과)이 가능해진다.
- 방사선을 응용한 탈염, 탈인, 가용성이 증가된 고효율 미생물 유도기술이 확보된다.
- 국내 기능성 미생물 자원의 확보 및 유전공학적 개량 기술의 증대를 가져온다.
- 국내의 기술개발로 인한 염류장해토양 개선에 관련된 신기술의 축적되었기 때문에 지속적인 환경친화적 염류장해 개선 및 작물 생산성 향상용 미생물 제제의 제품이 탄생된다.

- 국내 관련 산업 기술의 상승효과가 있게 된다.
- 내염성 유도관련 단백질의 개발에 대한 기초지식을 제공하게 된다.
- 극한 환경에서의 미생물의 생리 생화학적 반응기작 규명에 응용할 수 있게 된다.
- 인 (phosphate) 대사에 관련된 미생물의 분자생물학적 메카니즘의 규명에 활용할 수 있게 된다.
- 미생물 제제의 고정화 기반 기술 확립에 일조할 수 있게 된다.
- 외국의 기술 의존도 및 선진국에서의 기술 종속 관계에서 탈피한다.

2. 경제산업적 측면

- 국내에 염류집적으로 인해 작물 소출에 영향을 받고 있는 경작지에 적용함으로써 작물의 생산이 증대되고 토양의 비옥도가 증가되어 지속적인 경작이 가능케 된다. 이를 통해 또한 소농이 위주로 되어 있는 농민의 소득 증대에 크게 기여할 수 있을 뿐만 아니라 농민의 보건향상에도 기여할 수 있게 된다.
- 염류집적지의 염제거에 대한 고효율성의 환경친화형 **염류장해 환경 복원제 제로**의 적용은 국내 농경지의 토양보호는 물론 연작·윤작을 가능케 함으로써 작물의 생산성을 높일 수 있게 된다.
- 다양한 기능성 미생물 제제와 혼용하여 보다 우수한 기능을 지닌 **염류장해 환경 복원제제를 생산할 수 있어** 하우스토양 뿐 만 아니라 서해안의 간척지 등에 적용이 가능해, 간척지 조성후의 쌀 농사의 시점이 빨라지는 동시에 기능성 미생물 제제의 작용으로 토지의 영양물질 순환이 빨라져 궁극적으로는 쌀 생산의 증산에 부가적인 도움을 준다. 따라서 간척지에서의 쌀의 조기 생산 및 증산은 국내의 주 식량자원인 쌀의 자급자족을 지속적으로 가능케해 세계 국가에서 식량자원을 안보화하는 현 시점에서 산업적으로 이익을 담당할 수 있게 된다.
- 특허가 종료되는 20년간 세계 시장에서 독점적으로 판매가 가능하여 기술 로얄티 수입이 예상되며 또한 관련 국내 중소기업에 제조권 및 판매권을 이양하여 고용의 창출과 중소기업의 안정된 발전을 기대할 수 있게 된다.
- 국제경쟁력을 갖춘 신제품의 지속적인 창출로 지속적인 외화 획득에 기여

할 수 있게 된다.

- 자원이 없는 우리나라의 입장에서 **염류장해 환경 복원제제 개발과제**는 고부가치성 기술집약형 기술의 총화이다. 따라서 지속적인 연구 개발을 통해서만 신제품이 창출되기 때문에 고급 연구인력의 참여가 필수적이다. 즉, 만성적인 고급인력의 적체를 해소하는데 기여할 수 있게 된다.
- 부작용 없는 생물 청정기술의 확보로 관련 산업 및 환경에 적용하여 국내 환경 오염 예방과 복원에 이용할 수 있다. 이를 통하여 산업화와 도시화로 인한 국내의 토양 환경 개선에 기여할 수 있게 된다.
- **염류장해 환경 복원제제** 개발의 성공으로, 부가적으로 이미 본 연구진이 개발에 성공하여 일부 상품화된 토양부숙제와 미생물농약을 함께 사용했을 때, 부영양화 되어 있는 농경지의 많은 영양염을 효과적으로 분해·제거하여 토양으로부터 유래하는 수계오염원을 원천적으로 차단하여 국내의 수생환경 보호와 개선에 일조할 수 있게 된다.

제2절 활용방안

본 연구로부터 얻어진 결과들에 대하여 구체화된 활용계획을 요약하면 다음과 같다.

- ① 본 연구로부터 탐색, 분리된 16종의 인산염 가용화 및 내염성/호염성 균주들은 **염류장해토양 환경개선용 bioremediator**와 **biofertilizer**로 생산개발에 이용될 것이다(특히, 인산염 가용화 균주들은 국내특허를 출원하였으며 참여기업인 (주)에코바이오메드에 의해 염류장해토양 개선용 미생물제제로 2003년 8월경에 생산시판될 예정임: 상품명 ‘염류닥터’).
- ② 8종의 인산염 가용화 균주들은 기존의 생화학적 동정방법(API, Biolog kit 등)으로는 60% 이하의 판정으로 명확한 동정이 불가능하였으나 최신의 분자유전학적 동정기법을 이용하여 99.9%이상의 정확도로 아래와 같이 분류되었다
 - ★KSJ8 (*Leclercia adecarboxylata*) ★KSJ16 (*Enterobacter intermedius*)
 - ★KSJ11 (*Pseudomonas putida*) ★WP38 (*Enterobacter asburiae*)
 - KSJ3 (*Acinetobacter calcoaceticus*) ·WP20 (*Acinetobacter calcoaceticus*)
 - WP41 (*Acinetobacter* sp.) ·WP42 (*Acinetobacter* sp.)

이중 ★ 표시된 4종류의 균주들은 국내외적으로 인산염 가용성이 있음을 본 연구를 통해 최초로 밝힌 것으로 본 균주들을 이용한 염류장해토양 개선용 미생물제제는 국외로 수출하여도 경쟁력이 있는 제품임을 기대할 수 있다.

- ③ 본 연구에서 발굴한 인산염 가용화 균주들을 제제화하여 염류장해토양에서 작물재배에 활용한 **포장활성시험에서 대조군에 비해 작물의 생체중 증가율이 무려 1.7배에서 4.3배에 이르는 등 작물생산성이 증가된 결과**와 염류장해토양의 물리화학적 환경요인이 개선된 결과(**토양의 전기전도도가 11이상에서 6이하로 낮아지는 등**)로 판단하건데 **국내외적으로 염류장해토양 개선을 위한 연구분야에서 독보적인 기술력을 확보한 것으로 이 기술력을 기업화할 경우 향후 10 여년 이상 이 분야에서 독보적인 판매우위를 차지할 것으로 예측되며 또한 국내외 기업으로부터 고액의 기술료를 받을 수 있을 것으로 예측된다.**
- ④ 또한, 방사선을 이용하여 인산염 가용화능을 배가시킨 5종의 균주들 [**KSJ8(2균주), KSJ11(1균주), KSJ16(2균주)**]은 제제화하거나 인산염 가용성의 메카니즘을 보다 상세히 연구하는 데에 활용할 수 있어서 보다 유용성이 개선된 미생물제제의 개발이 기대된다.
- ⑤ 본 연구를 통해 확보한 세균인산대사 조절 유전자들 (*pho regulon* 유전자들)과 인산염 분해 유전자들(*ushA*, *pqqE*, *phy*, *ppk*)은 이 분야의 기초학문 연구에 활용되어 선도적인 역할을 할 수 있게 될 것이다. 특히, ***Enterobacter aerogenes*의 C-P lyase인 *phn operon*의 구조를 세계최초로 규명한 결과는** 세계적 저명학술지에 게재할 것으로 이 분야의 국내 연구역량을 높이는데 일조할 수 있다.
- ⑥ 본 연구에서 개발된 **super expression vector (pEAAP)**는 인산 결핍환경에서 유전자를 과발현할 수 있는 특징을 지닌 것으로 특허권을 취하는 한편 본 연구진은 국내외 연구자들과 산업체 발전을 꾀하고자 한국미생물학회지에 게재하였다(**한국미생물학회지, 2002. 38(4):318-321**).
- ⑦ 본 연구에서 개발된 5개의 신규 발현벡터들[pEAAP, pEAPHY1 (**Phy^S**), pEAPHY31 (**Phy^S+Hig tag**), pEAPPK (**Ppk^S**), pEAPQQE (**PqqE^S**)]과 **항시활성형 PhoB^C**를 제공하는 5개의 신규 벡터들[pSH1C (*phoB* 발현, high copy number vector), pSH2C, pSH3C, pSH4C, pSH5C]은 인산염 가용성을 지닌 **다양한 재조합체(GMO)**를 구축하여 상업적 목적으로 활용할 수 있을 뿐만 아니라 세균의 인산대사 메카니즘을 연구하는 기초 학문적 수준에서의 재료로 폭 넓게 활용될 수 있다.

- ⑧ 이미 본 연구를 통해 구축된 재조합체들{pSH3C/PPK (**Ppk^S-PhoB^C**, DH5a), pSH3C/PQQE (**PqqE^S-PhoB^C**, DH5a), pSH1C/PHY1 (**Phy^S-PhoB^C**, DH5a)} 중 **Phy^S-PhoB^C**는 **phytase 활성이 3.5배에 달하는 효율을 나타내어 그 유용성이 입증되었다.** 그러나, host가 *E. coli*인 때문에 상업화에 제한이 있어 본 연구에서 개발된 인산염 가용화 균주에 도입하고자 기반 연구를 수행하였다. 앞으로 참여기업인 (주)에코바이오메드와 공동으로 이에 관한 **연구과제를 제안하여** 염류장해토양 개선을 위한 유용한 GMO 균주를 상업적으로 생산할 수 있도록 계획하고 있다.
- ⑨ 본 연구에서는 유용토양진균의 염류내성을 증강시켜 염류장해토양에서 생존하여 토양의 공극을 넓히거나 유용 효소를 분비하는 등 작물의 성장에 도움을 줄 수 있도록 함으로서 염류장해토양을 개선하고자 목적하였다. 이를 달성하고자 토양 진균의 하나인 **yeast의 내염성 조절 인자인 Hog1 MAPK를 확보**하고 이를 변형하여 내염성이 보다 증강되도록 하는 **5종류의 변이 유전자[M11 (K65P), M21 (T113S), M32 (F89S), M52 (D170A), M85 (W332R)]**와 이를 도입한 5종류의 재조합 yeast를 개발하여 그 특징과 유용성을 확인하였다. 이러한 결과는 **국내외적으로 최초로 얻어진 성과**로서 확보한 Hog1 MAPK 변이유전자를 유용 토양진균에 도입하거나 혹은 유상 유전자를 토양진균으로부터 확보하여 유사한 변이를 줌으로서 기초 및 응용 연구에 활용될 수 있으며 이를 이용한 상업적 염류장해토양 개선용 진균제제를 개발할 수 있게 되었다.
- ⑩ 본 연구결과는 이미 연구 3년차 연구중 중간시기부터 마무리되는 시기까지 (2002년 7월부터 12월까지) 4차례에 걸쳐 전국의 농업관련 과학자와 교육자를 대상으로 교육, 홍보하였다[수출농산물 연구센터(2002.7.24, 100여명 교육), 경남농업기술원 (2002.10.18, 100여명 교육), 충남농업기술원 (2002.11.19, 350여명 교육), 제주농업기술원 (2002.12.10, 100여명 교육)]. 염류장해토양의 미생물학적 복원 및 생체인산비료의 개념에 대한 본 연구결과를 실질적인 친환경적 접근방법으로 제시하여 찬사를 받았다. 이에 그치지 않고 계속해서 농업관련 종사자를 대상으로 본 연구결과를 교육함으로써 시설재배지와 같은 특화된 농지의 개선과 보존에 관한 기술의 전수와 친환경농법의 효율적 접근방법을 제공하고자 한다.
- ⑪ 요컨데, 본 연구로부터 환경친화형 염류장해토양 개선용 bioremediating agents인 다양한 미생물제제가 개발되었기 때문에 기술이 국내기업에 이양되고 제품이 생산되어 국내 염류장해토양의 활용성을 극대화하여 국내 토양의 보호는 물론 작물의 생산성을 제고시킬 뿐만 아니라 세계시장에 수출되

어 외화획득에 기여하여 국가 경제에 이바지하게 될 것이다. 또한 기반기술과 경험의 축적은 본 연구에서 개발된 염류장해토양 개선용 미생물제제에 국한되지 않고 지속적인 신소재 및 신 미생물제제 개발에 이용됨으로써 신제품(GMO 활용제품 등)의 지속적인 창출이 가능하다.

제 9 장 참고문헌

- 강항원, 강위금, 정연태. 1993. 농업논문집. 35(1):308-314.
- 서장선, 송요성, 김광식. 1995. 한국토양비료학회지. 28(3):270-277.
- 신원교, 박중춘. 1988. 농연보. 22(1):209-222.
- 유인수, 이춘수. 1993. 한국토양비료학회 심포지움. 99-120.
- 육창수, 김재정, 홍순달, 강보구. 1993. 한국토양비료학회지. 26:172-180.
- 이상은, 이강만. 1985. 농업시험연구보고서(농기연). 318-329.
- 정구복, 유인수, 김복영. 1994. 한국토양비료학회지. 27(1):33-40.
- 정덕영, 이도경, 김필주. 1997. 대산논총. 5:117-130.
- 토양환경보전법. 1999. 환경부.
- 최승락, 이춘희, 이한생, 신원교, 이추식. 1989. 농시논문집. 31(1):56-62.
- Allen, M.P., K.B. Zumbrennen and W.R. McCleary. 2001. J. Bacteriol. 183(3):2204-2211.
- Brewster, J.L., T. de Valoir, N.D. Dwyer, E. Winter and M.C. Gustin. 1993. Science. 259:1760-1763.
- Burja, A.M., P. Tamagnini, M.T. Bustard and P.C. Wright. 2001. FEMS Microbiol. Lett. 202(2):195- 203.
- Charteris, W.P., P.M. Kelly, L. Morelli and J.K. Collins. 2001. J. Basic Microbiol. 41(5):245-251.
- De Vries, E.J., J.A.J. Breeuwer, G. Jacobs and C. Mellema. 2001. J. Invertebrate Pathol. 77:120-128.
- Drancourt M, C. Bollet, A. Carlouz, R. Martelin, J.P. Gayral and D. Raoult. 2000. J. Clin. Microbiol. 38(10):3623-3630.
- Ernst, S.A. 1975. J. Cell. Biol. 66:584-608.
- Fredricks, D.N. and D.A. Relman. 1996. Clin. Microbiol. Rev. 9:18-33.
- Garcia-Arata M.I., P. Gerner-Smidt, F. Baquero and A. Ibrahim. 1997. Res. Microbiol. 148(9):777-784.
- Goosen, N., H.P. Horsman, R.G. Huinen, A. de Groot and P. van de Putte.

1989. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 56(1):85-91.
- Gustin, M.C., J. Albertyn, M. Alexander and K. Davenport. 1998. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264-1300.
- Harmsen, D., C. Singer, J. Rothganger, T. Tonjum, G.S. De Hoog, H. Shan, J. Albert and M. Frosch. 2001. *J. Clin. Microbiol.* 38(3):936-942.
- Harrington, R.J., M.J. Gutch, M.O. Hengartner, N.K. Tonks and A.D. Chisholm. 2002. *Development*. 129:2141-2153.
- Ivanova, E.P., O.I. Nedashkovskaya, J. Chun, A.M. Lysenko, G.M. Frolova, V.I. Svetashev, M.V. Vysotskii and R.R. Colwell. 2001. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 51(6):1987-1995.
- Jozefowicz, C.J. and D. O'Foighil. 1998. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10(3):426-435.
- Kharsany A.B., A.A. Hoosen, P. Kiepiela, R. Kirby and A.W. Sturm. 1999. *J. Med. Microbiol.* 48(9):841-847.
- Koeleman J.G.M., J. Stoof, D.J. Biesmans, P.H.M. Savelkoul and C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls. 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36(9):2522-2529.
- Konigsson, M.H., B. Pettersson and K.-E. Johansson. 2001. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 51:1389-1393.
- La Scola, B., P.-E. Fournier, P. Brouque and D. Raoult. 2001. *J. Clin. Microbiol.* 39(5):1707-1709.
- Liu, S.T., L.Y. Lee, C.Y. Tai, C.H. Hung, Y.S. Chang, J.H. Wolfram, R. Rogers and A.H. Goldstein. 1992. *J. Bacteriol.* 174(18):5814-5819.
- Mahdy, H.M., H.H. El-Sheikh, M.S. Ahmed and B.M. Refaat. 1996. *Acta Microbiol. Pol.* 45:55-65.
- Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, D. Dymock and W.G. Wade. 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2):795-799.
- Mengel, K. 1985. *J. Environ. Qual.* 8:42-48.
- Mergulhao, A.C., H.A. Burity, J.N. Tabosa, M.B. Figueiredo and M.L. Da Silva. 2002. *Rev. Argent. Microbiol.* 34:77-82.

- Misof, B., C.L. Anderson and H. Hadrys. 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15(1):5-14.
- Nemec A., T. De Baere, I. Tjernberg, M. Vaneechoutte, T.J.K. van der Reijden and L. Dijkshoorn. 2001. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 51:1891-1899.
- O'Rourke, S.M., I. Herskowitz, and E.K. O'Shea. 2002. *Trends Genet.* 18:405-12.
- Persing, D.H., T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White(ed.). 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Pettersson B., A. Kodjo, M. Ronaghi, M. Uhlen and T. Tonjum. 1998. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:75-89.
- Peuvel, I., P. Peyret, G. Metenier, C.P. Vivares and F. Delbac. 2002. *Mol Biochem Parasitol.* 122:69-80.
- Posas, F., J.R Chambers and J. Ariono. 2000. *J. Biol. Chem.* 275:17249-17255.
- Rowry, O.M., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Shah, H.N., S.E. Gharbia and M.D. Collins. 1997. *Rev. Med. Microbiol.* 8:103-110.
- Sharma, P.K., A.K. Sinha and T.N. Chaudhary. 1985. *Soil Sci.* 140:256-262
- Stillman, J.H. and C.A. Reeb. 2001. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19(2):236-245.
- Tang, U-W., N.M. Ellis, M.K. Hopkins, D.H. Smith, D.E. Dodge and D.H. Persing. 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36(12) : 3674-3679.
- Winkler, A., C. Arkind, C.P. Mattison, A. Burkholder, K. Knoche and I. Ota. 2002. *Eukaryot Cell.* 1:163-173.
- Zundel, C.J., D.C. Capener and W.R. McCleary. 1998. *FEBS Lett.* 441(2):242-246.