

최 종
연구보고서

토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환
미생물의 개발 및 실용화

Development and Strategy to Practical Use of Transgenic
Microorganisms with Enhanced Biocontrol Ability against
Soil-Borne Plant Pathogen

연구 기관
순천대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환미생물의 개발 및 실용화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 10 일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 박 서 기

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 정 영 룬

요 약 문

I. 제 목

토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환미생물의 개발 및 실용화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

토양전염성 식물병원균은 땅속의 뿌리, 괴경 또는 땅가 부분의 줄기 등을 침입하여 곡류, 채소, 화훼류 등 여러 종류의 작물에 막대한 피해를 가져온다. 이 병의 방제는 주로 합성 화학 살균제에 의존하고 있으나, 이는 생태계 파괴, 환경오염 및 인축에 대한 독성 문제가 있다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법의 하나로 길항 미생물을 이용한 생물학적 방제가 요구되고 있다. 따라서, 현재 몇몇 길항 미생물들이 생물농약으로 개발, 시판되고 있는데, 합성 살균제 비하여 방제효과가 낮고, 대상 병원균의 범위가 협소하며, 방제효과에 대한 확신이 부족하기 때문에 많이 이용되지 못하고 있는 실정이다. 이를 극복하기 위하여서는 I) 병원균 억제효과가 더 우수하고, II) 대상 병원균의 범위가 더 넓으며, III) 병원균이 없더라도 토양속에서 더 오랫동안 생존할 수 있는 길항미생물을 선발 혹은 개발하는 것이 필요하다.

토양속에서 오랫동안 생존할 수 있는 길항 미생물로는 chitin분해미생물이 적합하리라 생각된다. chitin분해미생물들은 chitin을 주요 영양원으로 하기 때문에 chitin의 첨가에 의해서 오랫동안 생존할 수 있으리라 생각된다. 그러나, chitin분해미생물들은 식물병원진균의 세포벽 주요 구성성분인 chitin을 분해하여 억제하기 때문에, 다른 항생물질을 생산하는 균주들보다도 병 억제력이 낮으리라 생각된다. 이 경우, 항생물질을 생산하는 균주에 chitin분해 유전자 (chitinase 유전자)를 도입, 발현시켜서 chitinase를 분비하게 한다면 병 억제력이 훨씬 더 증가 할 것이다. 우리는 또한 동일 균주에서, chitinase 생산능력이 높을수록 병 억제력이 더 증대된다는 것을 알 수 있었다. 따라서, chitinase의 특이적 활성이 높은 우수 유전자를 도입하고, 그 도입된 유

전자자가 잘 발현, 분비되도록 하는 것이 필요 할 것이다. 식물 병원균에 대한 억제력이 높은 균주의 선발 및 개발은 미생물농약의 개발에 가장 시급히 요구되는 과제중의 하나이고, 성공적인 생물적 방제를 위해서는 처리된 길항 미생물이 오랫동안 생존할 수 있는 환경을 마련해주는 것이 필요하다.

이 연구의 첫 번째 목적은 자연상태로부터 토양전염성 식물병원균에 대한 억제력이 높은 chitin분해미생물을 선발하거나, chitinase유전자를 미생물농약으로 개발, 시판되고 있는 균주에 도입, 발현시켜, 현재까지 보고된 균주들보다 더 우수한 병 억제력을 가진 균주를 선발 혹은 개발하는데 있다. 두 번째로는 chitinase유전자를 변형시켜서 기존의 chitinase 보다도 더 높은 활성을 나타낼 수 있는 유전자를 개발하는 데 있다. 세 번째는 선발 또는 개발된 균주를 실용화 혹은 산업화할 수 있는 체계를 확립하는데 있다.

III. 연구개발내용 및 범위

가. 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환 chitin분해미생물의 개발:

- 1) chitinase유전자를 *Trichoderma* spp.에 도입, 발현
- 2) chitinase유전자를 *Pseudomonas* sp.에 도입, 발현

나. chitinase활성이 증가된 유전자의 개발

- 1) chitinase유전자 domain의 구조 및 기능
- 2) cellulose-binding domain의 첨가에 의한 chitinase의 활성 증가
- 3) catalytic domain의 첨가에 의한 chitinase활성의 증가
- 4) site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 의 활성 증가

다. 토양전염성병 억제력이 우수한 chitin분해미생물의 실용화 :

- 1) chitin분해력을 지닌 길항미생물의 분리, 동정
- 2) 길항 미생물의 제제화에 의한 병 방제효과
- 3) 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에 의한 병 방제 효과
- 4) 양액재배작물의 병 방제 효과

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환 chitin분해미생물의 개발:

1) chitinase유전자를 *Trichoderma* spp.에 도입, 발현

Trichoderma harzianum P1은 현재 여러 식물 병의 생물적 방제원으로 이용되고 있다. 이 균주의 생물적 방제 능력을 높이기 위하여 *Chromobacterium* sp. 의 chitinase유전자 (*chi54*)를 *T. harzianum* 의 *NagI* promoter+signal sequence와 *ech42* promoter+signal sequence에 구축, 도입하였다. *NagI*에 구축된 *chi54*는 *T. harzianum*에서 발현되었지만 *ech42*에 구축된 *chi54*는 발현되지 않았다. 형질전환 *T. harzianum*은 TMM배지에서 배양 4일까지 모균주보다 더 높은 chitinase활성을 나타냈으나, 그 이후는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나, MRM배지에서는 모든 배양기간에 모균주보다 형질전환균주에서 더 높은 chitinase활성을 나타냈고, 특히, P1-5는 약 2배 더 높은 chitinase활성을 보여주었다. 형질전환균주의 염색체 DNA를 southern blot hybridization 하였을 경우, 형질전환균주인 P1-4와 P1-8에는 한 개의 *chi54*, P1-5에는 2개의 *chi54*가 들어 있는 것으로 분석되었다. SDS-PAGE에 의해서, 형질전환균주들은 모두 자신의 chitinase와 도입된 Chi54를 분비하였음을 알 수 있었다.

2) chitinase 유전자를 *Pseudomonas* spp.에 도입, 발현

Chromobacterium sp. chitinase유전자 (*chi54*) 를 *Pseudomonas* sp.의 형질전환용 벡터인 pML122에 구축, 길항세균인 *Pseudomonas putida*에 도입하였다. 형질전환 *P. putida*는 *chi54*를 지닌 *E. coli*에서보다 chitin분해력이 낮았지만 chitinase를 세포밖으로 분비하였고, *Rhizoctonia solani*와 *Pythium ultimum*의 균사 생장 억제력이 모균주에서 보다 더 컸다.

나. chitinase활성이 증가된 유전자의 개발

1) chitinase유전자 (*chi54*)의 구조 및 기능

Chromobacterium sp. chitinase유전자 (*chi54*) 는 N-말단쪽 부터 signal sequence, chitin-binding domain (ChBD), catalytic domain (CaTD) 으로 구성되어 있었는데, signal sequence는 *E. coli* 에서 chitinase의 분비에 중요한 역할을 하였고, ChBD는 insoluble chitin의 분해에 중요한 역할을 하였다. CatD의 β -strand들은 chitinase활성에 필수적이었고, 각 β -strand들에서 다른 chitinase들과 conserve되어 있는 아미노산들은 chitinase활성에 절대적으로 필요하였다. family 18 catalytic domain은 6번째 β -strand에 있는 아미노산에 따라 subfamily A (MxYD) 와 subfamily B (QxYN) 로 더 분류될 수 있었는데, Chi54는 subfamily A에 속했다. 이들 아미노산중에서, subfamily A의 Y (Chi54의 Tyr348) 는 chitinase활성에 필수적이 었다. 그러나, M과 D (Chi54의 Met346 과 Asp349) 가 Q와 N으로 대체되었을 경우에는 chitinase 활성이 감소되었을 뿐 chitinase활성에 필수적이지는 못하였다.

2) cellulose-binding domain의 첨가에 의한 chitinase의 활성 증가

Chromobacterium sp. chitinase유전자 (*chi54*) 의 chitin-binding domain은 bacterial chitinase에서 주로 발견되는 Type 3 (ChBD3) 로 분류되었다. ChBD3는 Group A와 B로 더 세분될 수 있었는데, Chi54는 Group A (ChBD3a) 로 분류되었 다. *chi54*에서 ChBD3a가 제거되었을 때, chitinase 활성은 크게 감소하였다. 그러나, ChBD3a가 *Cellulomonas fimi* endoglucanase A의 cellulose-binding domain family IIa (CBDIIa)로 대체되었을 경우에는 4-MU-(GlcNAc)₂, colloidal chitin 및 crystal chitin에 대한 chitinase활성과 chitin 및 cellulose에 대한 결합능력이 서로 비슷하였다. 한편, *chi54*의 앞쪽에 CBDIIa를 부착하였을 경우에는 chitinase활성 및 기질 결합 능 력이 증가되었다. 이들 결과는 chitinase에서 유래된 ChBD3a와 glucanase에서 유래된 CBDIIa의 기능은 서로 비슷하고 이들 두 domain이 결합되었을 경우에는 chitinase 활 성과 기질결합능력이 증가된다는 것을 암시한다.

3) catalytic domain의 첨가에 의한 chitinase활성의 변화

Trichoderma harzianum P1 chitinase유전자 (*Thr-chia*)의 catalytic domain (CatD)내에 있는 β -strand들은 *Chromobacterium* sp. chitinase유전자 (*chi54*)의 그것 들과 고도로 conserve하였지만, *Thr-chia*는 *chi54*에서와 같은 ChBD를 지니고 있지

않았다. *chi54*의 ChBD뒤에 *Thr-chia*의 CatD를 부착하였을 경우에는 CatD만으로 이루어진 *Thr-chia*의 chitinase보다 활성이 증가하였다. 그러나, *chi54*의 CatD뒤에 *Thr-chia*의 CatD를 부착하였을 경우에는 chitinase 활성이 오히려 감소하였다. 이들은 ChBD가 없는 *Thr-chia*에 ChBD를 부착하였을 경우에는 chitinase 활성이 증가되지만, 하나의 ChBD에 두 개의 CatD를 부착하였을 경우에는 chitinase 활성이 오히려 감소한다는 것을 나타낸다. 또한, *Thr-chia*는 *E. coli*에서 발현되지만 chitinase를 분비하지 못하였다. 그러나, 이 *Thr-chia*가 *chi54*의 signal sequence 및 ChBD뒤에 부착되었을 경우에는 chitinase가 분비되었다. 이것은 *chi54*의 signal sequence가 *E. coli*에서 외래 유전자의 발현산물을 분비할 수 있게 한다는 것을 암시한다.

4) site-directed mutagenesis에 의한 chitinase의 활성 증가

Chromobacterium sp. chitinase 유전자 (*chi54*)의 catalysis에 필수적인 아미노산을 구명하려는 실험에서, Thr218를 Ser (T218S)으로 대체하였을 경우에는 chitin 분해능력이 증가된다는 것을 발견하였다. 이 연구에서는 그의 증가 요인을 구명하기 위해서 실시되었다. *chi54*의 CatD는 family 18 catalytic domain의 subfamily A에 속했다. 32개의 subfamily A chitinase 중에서, *chi54*의 Thr218에 일치하는 아미노산은 22개의 chitinase에서 Thr, 5개 chitinase에서 Ser, 5개 chitinase에서 Ala으로 이루어져 있었다. 이렇게하여, *chi54*의 Thr218는 Ser (T218S), Ala(T218A), Asp(T218D) 및 Glu(T218E)로 대체되었다. 모균주는 배양 5일, T218S는 6일, T218A는 7일, T218D와 T218E는 9일 후에 최고의 활성을 나타냈다. 최고 배양일의 배양여액속에 들어 있는 chitinase 활성은 모균주에 비하여 T218S는 1.5배, T218A는 1/2배, T218D는 1/5배, 그리고 T218E는 1/3배 정도이었다. 정제된 동일 단백질농도의 chitinase 활성도 T218S는 모균주에 비하여 1.3배 더 높았다.

다. 토양전염성병 억제력이 우수한 chitin분해미생물의 실용화 :

1) chitin분해력을 지닌 길항미생물의 분리, 동정

모 잘록병균 *P. aphanidermatum*에 대한 균사 성장 억제 능력이 좋은 두 개의 균주를 선발하였다. 두 길항 미생물은 *in vitro*에서 *P. aphanidermatum*의 균사 성장 억제 뿐 아니라 유주자낭 형성, cyst germination도 억제하였다. 또한 다른 식물 병원

진균과 Gram negative와 positive 세균도 억제하였다. *In vivo*에서 방제효과는 YC4194가 더 좋았고, 두 균주를 함께 처리했을 때 한 균주만 처리했을 때보다 방제 효과가 감소하였다. 새로 분리한 YC4194와 YC4233 균주의 생리·생화학적, 분자생물학적 특성을 조사하여 동정한 결과 YC4194는 *Bacillus stearotheromophilus*와 98.7%, YC4233은 *Brevibacillus brevis*와 99.3%의 homology를 보였다.

2) 길항 미생물의 제제화에 의한 병 방제효과

YC4194를 제제화 하기 위하여 여러 가지 보조제를 이용한 결과 talc와 bentonite를 이용한 제제가 가장 좋은 방제효과를 보여주었다. YC4194를 제제화하여 화학살균제(dimethomorph, metalaxyl, ethaboxam)와 함께 처리하였을 경우 YC4194 제제만 처리했을 때와 비슷한 방제효과를 보였으나, ethaboxam과 함께 처리했을 때는 ethaboxam만 처리했을 때보다 높은 방제효과를 보였다. YC4194 제제를 pot 내에서 밀도 변화를 조사한 결과 처리 12일 후 10^7 cfu/g으로 초기 밀도(10^8 cfu/g)보다 줄어 들었고, 병원균을 함께 처리한 토양에서는 12일 후 10^8 cfu/g으로 초기 밀도가 그대로 유지가 되었다. YC4194 제제의 보관상 안전성을 알아보기 위하여 4 °C와 실온에서 보관하면서 밀도 변화를 기간별로 조사한 결과 실온보다 4 °C가 더 안정적이었으며, 4 °C의 경우 12주가 지난 후에도 10^7 cfu/g으로 유지가 되었다.

3) 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에 의한 병 방제 효과

chitin이 첨가된 상토에서 *T. harzianum* 은 배양 30일후에도 접종 당시의 밀도를 유지하였지만, *Chromobacterium* sp.는 접종이후에 밀도가 현저히 감소하였고 30일 후에는 건토 1g당 약 5×10^2 의 밀도를 나타냈다. chitin을 첨가한 상토에 길항미생물과 *Rhizoctonia solani*를 접종하고 고추와 가지를 이식하였을 경우, 무처리 포트에서는 80-85%의 발병주율, 형질전환 *T. harzianum* 에서는 3-5%, 야생형 *T. harzianum* 에서는 8-13%, 야생형 *Chromobacterium* sp. 는 36-48%의 발병주율을 나타냈다. chitin과 길항미생물을 첨가한 상토에 고추를 파종, 육묘한 다음 본답에 이식하였을 경우, 정식 90일후, 길항균 무처리에서는 18%, *T. harzianum* 을 처리하였을 경우에는 2%, *Chromobacterium* sp.를 처리하였을 경우에는 7% 가 위조, 고사하였다.

4) 양액재배작물의 병 방제 효과

chitin을 첨가한 양액재배용 배양토에서 *Trichoderma harzianum*의 밀도는 1/10의 chitin처리구에서 증가하였고, 1/100의 처리구에서는 처리하였을 경우의 밀도를 유지하는 경향이었으나, 1/1000처리구에서는 감소하는 경향이였다. 양액용 배양토에 chitin을 1/10로 처리하였을 경우에는 토마토 생육이 억제되었고, *Trichoderma harzianum*에 의한 시들음병 억제력도 1/10이나 1/1000의 키틴처리구 보다는 1/100 키틴처리구에서 더 우수하였다. *Chromobacterium* sp.는 토마토 배양액에서 생육하지 못하였지만, 몇가지 화합물을 첨가하였을 경우에는 생육하였다. 그러나, 상기의 배양액에 *Chromobacterium* .sp.를 처리하였을 경우 현저한 시들음병 방제효과를 보여주지 않았다.

2. 활용에 대한 건의

가. 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환 chitin분해미생물의 개발

Chromobacterium sp. chitinase유전자를 미생물농약으로 개발, 시판되고 있는 *Trichoderma harzianum* P1에 도입, 발현시켜 chitinase 생산능력은 물론 고추와 가지의 모잘록병 방제효과가 모균주보다 더 우수한 형질전환균주를 선발하였다. 앞으로 다른 식물병원균에 대한 방제효과를 더 검토할 계획이다. 또한, 이 연구에서 chitinase유전자는 저희팀에서 개발한 것이고, *Trichoderma harzianum* P1은 미국 코넬대학교의 Dr. Harmann, Promoter는 이태리 나폴리대학교의 Dr. Loritor에 의해서 개발된 것이기 때문에, 이들과 상의하여 특허 및 산업화등을 결정하려고 한다. 아울러, Dr. Loritor는 *Trichoderma harzianum* 에서 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 Promoter만 개발하였으나, 이번 연구에서는 외래 유전자를 발현 및 분비할 수 있는 Promoter + signal sequence를 개발하였다. 따라서, 앞으로 *Trichoderma harzianum* 에서 외래 유전자를 발현 및 분비할 수 있는 벡터를 개발하려고 한다

chitinase 유전자를 길항세균인 *Pseudomonas putida*에 도입, 발현시켜, *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium ultimum* 의 균사 성장 억제력이 모균주에서 보다 더 컸지만, 포장상태에서의 병방제효과가 크지 않았고, 유전적으로 안정하지 못하였기 때문에, 실용화는 고려되지 않고 있다.

나. chitinase활성이 증가된 유전자의 개발

Chromobacterium sp. chitinase유전자의 domain 구조와 기능이 구명되었다. 이는 family 18 chitinase의 domain 구조와 기능, 그리고, chitinase활성 및 특성을 변형시키기 위한 기초자료로 많이 활용될 수 있으리라 생각된다.

Chromobacterium sp. chitinase유전자 (*chi54*)에 *Cellulomonas fimi* endoglucanase A의 cellulose-binding domain을 부착하여 4-MU-(GlcNAc)₂, colloidal chitin 및 crystal chitin에 대한 chitinase활성을 증가시켰고, chitin 과 cellulose에 대한 결합능력을 증가시켰다. 또한, *chi54*의 Thr218이 Ser 으로 대체되었을 경우에는 *E. coli*에서의 chitinase생산능력 및 특이적 chitinase활성이 증가되었다. chitinase활성이 증가된 이들 유전자들은 효소의 산업적 생산에 이용될 수 있고, 생물적 방제능력을 높이기 위하여 다른 길항 미생물에 도입, 발현시키거나, 병 저항성 식물을 개발하기 위하여 다른 식물에 도입, 발현시키는데, 이용될 수 있으리라 생각된다. 특히, 이들 유전자를 벼에 도입, 발현시켜서 벼 잎집얼룩무늬병에 저항성인 벼를 개발해 보고 싶다. 현재 벼 잎집얼룩무늬병에 저항성인 품종은 알려져 있지 않기 때문에, 고전적인 육종 방법으로 저항성 품종을 개발하기 어려운 실정이다. 반면, chitinase는 여러 식물 병원균 중에서도 벼 잎집얼룩무늬병균인 *Rhizoctonia solani*를 특이적으로 더 잘 억제하기 때문에 성공가능성이 매우 높다.

*chi54*에 *Trichoderma harzianum* P1 chitinase유전자의 catalytic domain (*Thr-chia*) 을 부착하였을 경우에는 chitinase활성이 감소하였지만, *chi54*의 ChBD에 *Thr-chia*를 부착하였을 경우에는 chitinase활성이 증가되었다. 또한, *Thr-chia* 는 *E. coli*에서 발현된 chitinase를 분비하지 못하였는데, *chi54*의 signal sequence 및 ChBD 뒤에 부착되었을 경우에는 chitinase가 분비되었다. 이것은 *chi54*의 signal sequence 가 *E. coli*에서 외래 유전자의 발현산물을 분비할 수 있게 한다는 것을 암시한다. 따라서, *chi54*의 signal sequence 가 *E. coli*에서 다른 유전자의 발현산물도 분비할 수 있는가 등을 검토해 서 외래 유전자의 발현산물을 분비할 수 있는 벡터를 개발해 보고 싶다. 현재, *E. coli*에서 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 벡터들이 개발, 시판되고 있지만, 발현산물을 분비시킬 수 있는 벡터들은 개발되어 있지 않다.

다. 토양전염성병 억제력이 우수한 chitin분해미생물의 실용화 :

모 잘록병균 *P. aphanidermatum*의 균사 성장, 유주자낭 형성, cyst germination

에 대한 억제 능력이 좋은 *Bacillus stearotheromophilus*와 *Bacillus stearotheromophilus*를 선발하였다. 특히, *Bacillus stearotheromophilus* (YC4194)를 제제화하여 처리하였을 경우 우수한 방제효과를 보였고, 4 °C에 보관하였을 경우 안정적으로 유지되었다. 따라서, 이 균주는 앞으로 미생물농약으로의 개발 가능성이 있다.

chitin과 *Trichoderma harzianum* 혹은 *Chromobacterium* sp. 이 처리된 육묘용 상토에 고추를 과종, 육묘한 다음 본답에 이식하였을 경우, 우수한 방제효과를 보였다. 또한, 양액재배용 배양토에 chitin과 *Trichoderma harzianum*을 처리하였을 경우, 토마토 시들음병 방제효과가 우수하였다. 따라서, 이들 방법은 일반 농가에서 직접 이용할 수 있고, 토양전염성병 방제용 상토 및 배양토의 개발도 가능하리라 생각된다.

SUMMARY

I. Development of transgenic microorganism with enhanced biocontrol ability against soil-borne plant pathogen

1. Introduction and expression of chitinase gene into *Trichoderma* sp.

The filamentous fungus *Trichoderma harzianum* P1 is a potent mycoparasite, which is applied as a biocontrol agent against several plant pathogenic fungi. In order to enhance biocontrol ability of the isolate, the chitinase gene (*chi54*) of *Chromobacterium* sp. was constructed in *NagI* or *ech42* promoter containing signal sequence and introduced in *T. harzianum*. The *chi54* constructed in the *NagI* was expressed in *T. harzianum* but the *chi54* constructed in the *ech42* was not expressed. The transgenic *T. harzianum* produced more chitinase than the parental strain until 4 days cultivation, but there were no difference between them after that time in TMM media. In MRM media, however, the transgenic *T. harzianum* showed higher chitinase activity in all of culture period than do the parental strain. In particular, chitinase activity of P1-5 was about 2-fold higher than that of parental strain. Southern blot analysis showed that a *chi54* was inserted in chromosomal DNA of P1-4 and P1-8, and two *chi54* was inserted in chromosomal DNA of P1-5. SDS-PAGE analysis also showed that the transgenic *T. harzianum* produced its own chitinase and Chi54.

2. Introduction and expression of chitinase gene into *Pseudomonas* sp.

The chitinase gene (*chi54*) of *Chromobacterium* sp. was constructed in transgenic vector, pMM122, and introduced in the antagonistic bacterium, *Pseudomonas putida*. The transgenic *P. putida* secreted chitinase into cell outside, although its chitinolytic ability was lower than that of *E. coli* harboring *chi54*. The inhibitory ability of transgenic *P. putida* against growth of *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* was higher than that of parental strain.

II. Development of gene with excellent chitinase activity

1. Structure and function of chitinase gene

The chitinase gene (*chi54*) of *Chromobacterium* sp. was composed of a signal sequence, a chitin-binding domain (ChBD) and a family 18 catalytic domain (CatD). The signal sequence played an important role in secretion of chitinase in the recombinant *E. coli*. The ChBD was important for the degradation of insoluble chitin. The β -strands in the CatD were essential for chitinase activity. In the β -strands, highly conserved amino acids were essential for chitinase activity. The catalytic domain of family 18 chitinases was divided into subfamily A and B, and Chi54 was classified as subfamily A. The MxYD motif at the C-terminal ends of β -strands in the subfamily A was replaced by QxYN in the subfamily B. Among these amino acids, Y (Tyr348 of Chi54) was essential for chitinase activity, but M and D (Met346 and Asp349 of Chi54) not essential for chitinase activity. When the M and D were replaced with Q and N, their chitinase activity only decreased.

2. Enhancement of chitinase activity by attachment of cellulose-binding domain

The chitin-binding domain (ChBD) of *Chromobacterium* sp. chitinase gene (*chi54*) was classified as Type 3 (ChBD3), which has been generally found in bacterial chitinase. The ChBD3s were further divided into Group A and B, and Chi54 was classified as Group A (ChBD3a). Removal of ChBD3a in the *chi54* remarkably decreased the chitinase activity. However, their chitinase activities toward 4-MU-(GlcNAc)₂, colloidal chitin and crystal chitin, and binding affinities to both chitin and cellulose were similar with each other, when the ChBD3a was replaced by a family II cellulose-binding domain (CBDIIa) of endoglucanase A from *Cellulomonas fimi*. chitinase, When the CBDII was constructed in upstream of *chi54*, its chitinase activity and binding affinity increased. These results suggest that ChBD3a and CBDIIa have similar function and the chitinase activity and binding affinity are enhanced by double domain of ChBD3a and CBDIIa.

3. Changes of chitinase activity by attachment of catalytic domain

The β -strands in catalytic domain (CatD) of *Trichoderma harzianum* P1 chitinase gene (*Thr-chia*) were highly conserved with those of *Chromobacterium* sp. chitinase gene (*chi54*), but *Thr-chia* did not have a ChBD. When CatD of *Thr-chia* was constructed in downstream of ChBD of *chi54*, the chitinase activity increased as compared with that of *Thr-chia*. However, when CatD of *Thr-chia* was constructed in downstream of CatD of *chi54*, the chitinase activity decreased as compared with those of *Thr-chia*. and *chi54*. These results indicate that addition of a ChBD(*chi54*) in a CatD (*Thr-chia*) increases chitinase activity, but addition of a ChBD (*chi54*) in two CatDs of *chi54* and *Thr-chia* decrease chitinase activity. On the other hand, the *Thr-chia* was expressed but not secreted in *E. coli*. When the *Thr-chia* was constructed in downstream of signal sequence and ChBD of *chi54*, the chitinase was secreted. This indicates that signal sequence of *chi54* may secrete products of foreign gene in *E. coli*

4. Enhancement of chitinase activity by site-directed mutagenesis

In experiments to find amino acids essential for catalysis of *Chromobacterium* sp. chitinase gene (*chi54*), we found that replacement of Thr218 by Ser(T218S) increases activity of chitinase(Chi54). Present study was conducted to find factors involved in the enhanced activity. The catalytic domain (CatD) of *chi54* belong to subfamily A in a family 18 catalytic domain. The amino acid corresponding to Thr218 of *chi54* was Thr in 22 chitinases, Ser in 5 chitinases and Ala in 5 chitinases among 32 chitinases belong to subfamily A. Thus, Thr218 was replaced with Ser(T18S), Ala(T218A), Asp(T218D) and Glu(T218E). The highest chitinase activity was detected in supernatant cultured for 5 days in parental strain, 6 days in T218S, 7 days in T218A, 9 days in T218D and T218E. The chitinase activity in maximum culture period was about 1.5 fold in T218S, but 1/2 in T218A, 1/5 in T218D and 1/3in T218E, compared with that of parental strain. The activity of purified chitinase was also 1.3 fold higher in T218S than in parental strain.

III. Strategy to practical use of chitinolytic microorganisms with excellent biocontrol ability

1. Isolation and identification of antagonistic microorganisms.

Two bacterial strains YC4194 and YC4233 were selected for the control of *Pythium* damping-off of cucumber. Two bacterial strains inhibited germination of cysts and formation of zoosporangia of *Pythium aphanidermatum* *in vitro*. They also inhibited growth of other plant pathogenic fungi and some Gram negative and positive bacteria. *In vivo* activities of a biocontrol agent for the control of *Pythium* damping-off of cucumber was better in YC4194. When two bacterial strains were treated together, the biocontrol ability decreased. Two bacterial strains YC4194 and YC4233 was identified as *Bacillus stearothermophilus* and *Brevibacillus brevis*, respectively.

2. Biocontrol ability of antagonistic microorganism by formulation

Incorporation of a bentonite and talc based formulation (10^9 cfu/g) of strain YC4194 to the nursery soils (10g/L soil) resulted in a significant ($p=0.01$) reduction in the disease severity of cucumber damping-off after inoculation with *P. aphanidermatum*. The control efficacy of strain YC4194 formulation was not different from that of the fungicides, dimethomorph, metalaxyl, ethaboxam. When the cucumber plants were transplanted to the soil inoculated with *P. aphanidermatum* zoospores, the strain YC4194 maintained the high population density in rhizosphere soil upto 10^7 cfu/g.

3. Biocontrol ability of soils containing antagonistic microorganisms and chitin

In soil containing chitin, *Trichoderma harzianum* maintained high population density in 30 days after inoculation, but population density of *Chromobacterium*

sp. decreased upto 5×10^2 cfu/g. When the hot pepper and egg plants were transplanted to the soil containing chitin, antagonistic microorganisms and *Rhizoctonia solani*, diseased plant were 80–85% in antagonist nontreated pot, 3–5% in transgenic *T. harzianum*, 8–13% in *T. harzianum* and 36–48% in *Chromobacterium* sp. treated pot. When the hot pepper were grown in soil containing chitin and antagonistic microorganisms, and then transplanted in field, diseased plant were 18% in nontreatment, 2% in treatment of *T. harzianum* and 7% in treatment of *Chromobacterium* sp.

4. Biocontrol effect for plant grown by solid medium culture

When *Trichoderma harzianum* was inoculated in the solid medium containing chitin, the population density increased in treatment of 1/10 chitin, maintained in treatment of 1/100 chitin and decreased in treatment of 1/1000 chitin. However, growth of tomato was delayed in treatment of 1/10 chitin. The biocontrol ability of *Trichoderma harzianum* against wilt of tomato was better in treatment of 1/100 chitin than in 1/10 and 1/1000 chitin. *Chromobacterium* sp. was not grown in general liquid medium of tomato, but was grown by addition of some chemicals. However, the biocontrol effect of *Chromobacterium* sp against wilt of tomato was not observed, when the isolate was inoculated in the liquid medium.

CONTENTS

SUMMARY -----	13
CONTENTS -----	19
Chapter I. Introduction -----	23
Section 1. Scope and objective of research -----	23
Section 2. Necessity of research -----	25
Chapter II. Present situation of related techniques -----	27
Chapter III. Results of research -----	29
Section 1. Development of transgenic microorganism with excellent biocontrol ability against soil-borne plant pathogen -----	29
1. Introduction -----	29
2. Materials and methods -----	30
3. Results and discussions -----	37
1) Introduction and expression of chitinase gene into <i>Trichoderma</i> sp -----	37
2) Introduction and expression of chitinase gene into <i>Pseudomonas</i> sp. ----	47
4. Summary -----	50
Section 2. Development of gene with excellent chitinase activity -----	52
1. Introduction -----	52
2. Materials and methods -----	52
3. Results and discussions -----	58
1) Structure and function of chitinase gene -----	58

2) Enhancement of chitinase activity by attachment of cellulose-binding domain -----	69
3) Changes of chitinase activity by attachment of catalytic domain -----	75
4) Enhancement of chitinase activity by site-directed mutagenesis -----	81
4. Summary -----	89
Section 3. Strategy to practical use of chitinolytic microorganisms with excellent biocontrol ability -----	92
1. Introduction -----	92
2. Materials and methods -----	92
3. Results and discussions -----	99
1) Isolation and identification of antagonistic microorganisms -----	99
2) Biocontrol ability of antagonistic microorganism by formulation -----	109
3) Biocontrol ability of soils containing antagonistic microorganisms and chitin	115
4) Biocontrol effect for plant grown by solid medium culture -----	118
4. Summary -----	122
Chapter IV. Attainment of research objective and contribution to related fields -----	125
Chapter V. Plan for application of research results -----	129
Chapter VI. Information received at abroad -----	131
Chapter VII. References -----	133

목 차

제 출 문 -----	1
요 약 문 -----	3
SUMMARY -----	13
CONTENTS -----	19
제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	23
제 1 절 연구개발의 목적 및 범위 -----	23
제 2 절 연구개발의 필요성 -----	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	27
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	29
제 1 절. 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환 chitin분해미생물의 개발 -----	29
1. 서 설 -----	29
2. 연구수행내용 및 방법 -----	30
3. 연구결과 및 고찰 -----	37
가. chitinase유전자를 <i>Trichoderma</i> spp.에 도입, 발현 -----	37
나. chitinase유전자를 <i>Pseudomonas</i> sp.에 도입, 발현 -----	47
4. 결과 요약 -----	50

제 2 절. chitinase활성이 증가된 유전자의 개발 -----	52
1. 서 설 -----	52
2. 연구수행내용 및 방법 -----	52
3. 연구결과 및 고찰 -----	58
가. chitinase유전자 domain의 구조 및 기능 -----	58
나. cellulose-binding domain의 첨가에 의한 chitinase의 활성 증가 -----	69
다. catalytic domain의 첨가에 의한 chitinase활성의 증가 -----	75
라. site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 의 활성 증가 -----	81
4. 결과 요약 -----	89
제 3 절. 토양전염성병 억제력이 우수한 chitin분해미생물의 실용화 -----	92
1. 서 설 -----	92
2. 연구수행내용 및 방법 -----	92
3. 연구결과 및 고찰 -----	99
가. chitin분해력을 지닌 길항미생물의 분리, 동정 -----	99
나. 길항 미생물의 제제화에 의한 병 방제효과 -----	109
다. 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에 의한 병 방제 효과 -----	115
라. 양액재배작물의 병 방제 효과 -----	118
4. 결과 요약 -----	122
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	125
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	129
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	131
제 7 장 참고문헌 -----	133

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

chitinase유전자를 현재 미생물농약으로 개발, 시판되고 있는 길항미생물에 도입, 발현시켜서 모균주보다 병 방제효과 및 대상 병원균의 범위가 더 우수한 형질전환 길항 미생물을 개발하고, chitinase유전자를 변형시켜서 chitinase 활성 및 병억제력이 증대된 유전자를 개발하며, 육묘용상토나 양액재배의 배양토에 chitin과 chitin분해미생물을 첨가하여 시설하우스재배작물의 토양전염성병을 효과적으로 방제하는데 목적이 있다.

2. 연구개발의 범위

가. 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환 chitin분해미생물의 개발:

1) chitinase유전자를 *Trichoderma* spp.에 도입, 발현 : *Chromobacterium* sp. chitinase유전자 (*chi54*) 를 *T. harzianum*에서 유래한 *ech42* 와 *nag1* promoter 및 signal sequence에 구축, *Trichoderma harzianum* p1 에 형질전환시켜 생산된 chitinase의 활성 및 특성을 조사한다.

2) chitinase유전자를 *Pseudomonas* sp.에 도입, 발현 : *Pseudomonas* sp.에서 외래 유전자를 발현한 것으로 보고된 벡터 (pMEFE1) (19) 에 *chi54* 를 구축, *Pseudomonas putida* 에 형질전환시킨 후, 생산된 chitinase의 활성 및 병원균 억제력을 조사한다.

나. chitinase활성이 증가된 chitinase 유전자의 개발

1) chitinase유전자 domain의 구조 및 기능 : *chi54* 내에 존재하는 각 domain의

아미노산 서열을 다른 chitinase들과 비교, 분석하고, deletion mutagenesis에 의해서 그들의 기능을 조사하며, site-directed mutagenesis에 의해서 catalysis에 필수적인 아미노산을 조사, 분석한다.

2) cellulose-binding domain의 첨가에 의한 chitinase의 활성 증가 : *chi54*의 chitin-binding domain (ChBD)을 *Cellulomonas fimi* endoglucanase A의 cellulose-binding domain (CBD) 으로 대체하거나, 그 ChBD앞에 CBD를 부착하여 생산된 chitinase의 활성 및 기질 결합능력을 조사한다.

3) catalytic domain의 첨가에 의한 chitinase활성의 증가 : *chi54*의 ChBD뒤 혹은 catalytic domain (CatD) 뒤에 *Trichoderma harzianum* P1 chitinase유전자 (*Thr-chia*)의 CatD를 부착하여 생산된 chitinase의 활성을 조사한다.

4) site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 의 활성 증가 : *chi54*의 Thr218를 Ser, Ala, Asp 및 Glu 로 대체한 다음 생산된 chitinase의 활성을 조사한다.

다. 토양진염성병 억제력이 우수한 chitin분해미생물의 실용화

1) chitin분해력을 지닌 길항미생물의 분리, 동정 : 모 질록병균 *P. aphanidermatum*을 잘 억제할 수 있는 chitin분해미생물을 분리, 동정한다.

2) 길항 미생물의 제제화에 의한 병 방제효과 : *P. aphanidermatum* 에 길항력이 우수했던 *Bacillus stearothermophilus*를 제제화하여 병 방제효과 및 보관상 안정성등을 조사한다.

3) 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에 의한 병 방제 효과 : chitin과 *T. harzianum* 혹은 *Chromobacterium* sp.를 첨가한 상토에 고추를 파종, 육묘한 다음 본답에 이식하여 병 방제효과를 조사한다.

4) 양액재배작물의 병 방제 효과 : 양액재배용 배양토에 chitin 과 *Trichoderma*

harzianum 처리하고, 배양액에 chitin과 *Chromobacterium* .sp.를 처리하여 토마토 시들음병의 방제효과를 조사한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

chitinase는 식물병원진균의 세포벽 주요 구성성분인 chitin을 분해하여 식물병을 억제하는 효소로 알려져 있고, chitinase를 많이 분비하는 미생물은 병원균 억제력이 더 큰 것으로 알려져 있다. 이것은 chitinase유전자를 다른 길항미생물에 도입, 발현시켜 chitinase를 더 많이 분비하게 한다면, 병원균 억제력이 더 높아질 거라는 것을 암시한다. 또한, 여러 유전자중에서 chitinase 활성이 더 높은 유전자를 도입, 발현시킨다면 병 억제효과가 더 증가할 것이다. 병원균 억제력이 높은 균주의 개발은 미생물 농약의 개발에 가장 시급히 요구되는 과제중의 하나이다. 또한, 성공적인 방제를 위해서는 처리된 길항미생물이 오랫동안 생존할 수 있어야 하는데, 이 문제는 chitin의 첨가에 의해서 해결될 수 있으리라 생각된다. 따라서, 이번 연구는 토양전염성병의 성공적인 생물적 방제체계를 확립하기 위해서 반드시 필요한 과제중의 하나라고 생각된다.

2. 경제·산업적 측면

최근 미국 굴지의 농약회사들이 미생물농약 개발에 본격적인 투자를 하기 시작하였고, 일본의 농약회사들도 투자할 필요성을 느끼고 있다. 이것은 미생물농약에 대한 필요성이 점차 증대되고 상업화에 성공할 수 있는 가능성이 높아지고 있다는 것을 나타낸다. 미국의 시장조사회사에 의하면 2,000년 미국의 생물농약 판매고는 5억불 (농약전체의 11% 수준) 내지 10억불 정도가 될 것으로 예측하고 있고, 전세계적으로는 60억불 내지 70억불정도로 예상하고 있다. 따라서, 본 연구에서 개발된 우수한 형질 전환 균주들은 미생물농약으로 개발될 수 있고, chitinase유전자들은 다른 식물에 발현시켜 병저항성 품종 육종에 활용될 수 있으리라 생각된다. 한편, chitin과 chitin분해미생물을 첨가한 육묘용 상토나 배양토는 시설재배 작물의 토양전염성병 방제에 이용될 수 있으리라 생각된다.

3. 사회·문화적 측면

1960년대 이후 고도 성장기에 접어들면서 농업의 화학화(비료나 농약)가 강력히 추진되면서 급격한 식량증산에 기여한 공로는 누구나 인정할 것이다. 그러나 이러한 계속적인 화학농법은 환경오염과 식품의 안정성에 대한 문제가 대두되게 되었다. 따라서 일본, 미국, EC(유럽공동체)등에서는 환경보전과 식품의 안정성확보에 중점을 둔 새로운 공동체정책을 책정하였으며, 우리나라 농수산부에서도 농정 4대 방향중의 하나로 “지속적 농업과 환경보전”을 들고 있다. 더욱이, 현대병으로 불리어지고 있는 심장병이나 각종 암등이 식생활과 관계가 있다는 정보가 나옴에 따라 화학농법에 대한 비판의 소리가 더욱 높아져 가고 있다. 이제는 화학비료나 농약을 사용하지 않고 농업의 생산성을 유지할 수 있는 농사를 지어야만 할 시기에 와 있다.

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

제 1 절 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환주의 개발

1. chitinase유전자를 *Trichoderma* spp.에 도입, 발현

Haran등 (15) 은 *S. marcescens*의 chitinase유전자를 35S constitutive promoter에 구축, *T. harzianum*에 도입, 발현시켰고, Zeilinger등 (55) 은 *T. harzianum* chitinase유전자로부터 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 *ech42* 및 *nag1* promoter를 개발하였다. 35S promoter는 바이러스에서 유래되었기 때문에, 이번 연구에서는 *T. harzianum* 에서 유래된 *ech42* 및 *nag1* promoter를 이용하였고, 또한 발현된 chitinase를 분비시키기 위하여 signal sequence를 부착하여 형질전환시켰다.

2. chitinase유전자를 *Pseudomonas* sp.에 도입, 발현

*Serratia marcescens*의 chitinase유전자를 *E. coli*에 도입, 발현시켰을 경우 생물적 방제능력을 지니는 것으로 보고 (44) 된 이래, Sitrit등 (45) 은 알팔파뿌리혹세균인 *Rhizobium meliloti*에 도입, 발현시켜 *Rhizoctonia solani*를 억제하는 형질전환균주를 얻었다. 저희는 *Pseudomonas* spp.에서 외래 유전자를 발현시켰다는 pMEFE1 벡터 (19) 에 chitinase유전자를 구축, 현재 생물적방제원으로 이용되고 있는 *Pseudomonas* spp.에 도입, 발현시켜 모균주보다 더 높은 병억제력을 지닌 형질전환균주를 얻었다.

제 2 절 chitinase활성이 증가된 유전자의 개발

1. chitinase유전자 domain의 구조 및 기능

chitinase 유전자는 다양한 생물로부터 분리되어져 오고 있고(10, 46, 53, 58), 최근에는 이들 domain의 구조 및 기능을 구명하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 현재, 몇몇 chitinase에서 chitin-binding domain의 구조 및 기능 (57, 60, 63, 65), catalytic domain의 구조와 그에 관련된 주요 아미노산이 밝혀졌다 (61, 62, 66). 이번 연구에서는 *Chromobacterium* sp. chitinase유전자의 domain 구조와 기능을 를 기 보고된 chitinase들과 비교, 분석하고, 각 domain에 필수적인 아미노산등을 site-directed mutagenesis에 의하여 구명하였다.

2. cellulose-binding domain 의 첨가에 의한 chitinase의 활성 증가

chitin-binding domain (ChBD) 은 chitin에의 결합 뿐만 아니라 insoluble chitin의 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (65). Limon 등 (64) 은 catalytic domain만으로 이루어진 *T. harzianum* 의 chitinase유전자에 ChBD 혹은 cellulose-binding domain(CBD)을 결합시켰을 경우 기질 결합능력 및 chitinase활성이 증가되었다고 보고하였다. 저희 연구에서는 ChBD와 catalytic domain으로 이루어진 *Chromobacterium* sp. chitinase유전자 앞쪽에 CBD를 부착하여 기질 결합능력 및 chitinase활성을 증가시켰고, 또한 type 3 의 ChBD 와 family II의 CBD는 아미노산 서열이 서로 다르지만, 기질 결합능력 및 chitinase활성에 대한 그들의 기능이 비슷하다는 것을 밝혔다.

3. Site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 의 활성 증가

하나의 아미노산을 변경해서 chitinase활성이 증가되었다는 보고는 없다.

제 3 절 토양전염성병 억제력이 우수한 chitin분해미생물의 실용화

1. chitin분해력을 지닌 길항미생물의 분리, 동정 및 병억제 효과

chitin분해미생물들은 식물병원진균 세포벽의 주요 구성성분인 chitin을 분해하여 식물병을 억제하는 것으로 알려져 있다 (4, 12, 31, 32, 46, 48, 51). 특히, *T. harzianum*의 chitinase특성 및 생물적 방제에 대해서는 미국 Cornell대학교의 Harman group (6, 12, 13, 14, 16, 22-27, 43, 47) 에 의해서 많이 연구되었고, *Serratia marcescens*에 대해서는 이스라엘의 Chet group (4, 15, 22, 31, 45, 46) 과 미국 Advanced Genetic Sciences사의 Jones등, Monsanto사의 Fuchs등 (10) 에 의해서 많이 연구되었다. 국내에서는 본과제의 책임자들에 의해서 연구가 이루어져 오고 있고, 이번 연구에서 오이 모잘록병에 방제효과가 우수한 새로운 chitin분해미생물들을 분리하였다.

2. chitin과 chitin분해미생물이 첨가된 육묘용 상토 및 배양토에서의 토양전염성병 방제효과

토양에 chitin을 처리하여 토양전염성병을 방제했다는 보고가 있지만, 이번 연구에서 처럼 육묘용 상토나 양액재배의 배양토에 chitin과 chitin분해미생물을 처리하여 토양전염성병을 방제했다는 보고는 없다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환 chitin분해미생물의 개발

1. 서 설

식물병원진균 세포벽의 주요 구성성분인 chitin을 분해할 수 있는 chitinase 유전자를 다른 미생물에 도입, 발현시켜 병억제력이 증가하였다는 보고 (15, 45), 식물체에 도입, 발현시켜 병저항성을 나타냈다는 보고 (1, 3, 18, 41) 등이 계속 나오고 있다. 식물병원균의 억제에는 여러 종류의 항균물질 및 β -1,3-glucanase 등도 관여되는 것으로 알려져 있지만, 항균물질은 여러 유전자가 관여되어 합성되고, β -1,3-glucanase는 병억제력이 낮기 때문에, chitinase에 대한 연구가 상대적으로 더 많이 수행되어 지고 있다.

최근 저희는 많이 알려진 chitinase들 보다도 병억제력이 더 우수하고 (35), 지금까지 보고된 chitinase들 보다도 훨씬 더 염기성인 chitinase 유전자 (39) 를 *Chromobacterium* sp.으로부터 분리하였고, chitinase생산능력이 높을수록 병억제력이 더 증가한다는 것을 발견하였다 (38). 또한, 항균물질과 효소들이 상호 복합적으로 작용하였을 경우 (6, 24, 25) 나 특성이 다른 chitin분해효소들이 상호 복합적으로 작용하였을 경우 (22, 23) 에는 병억제력이 훨씬 더 증가 (협력작용) 하는 것으로 알려져 있다. 이것은 chitinase유전자를 항균물질이나 chitinase를 생산하는 다른 길항균에 도입, 발현시킨다면, 병억제력이 훨씬 더 증가할 수 있다는 것을 암시한다.

이 연구에서는 chitinase를 생산하는 *Trichoderma harzianum* 과 항균물질을 생산하는 *Pseudomonas putida* 에 chitinase유전자를 도입, 발현시켜서 기존의 균주보다 병억제력이 증가된 균주를 선발하려고 실시되었다.

2. 연구수행내용 및 방법

가. chitinase유전자를 *Trichoderma* spp.에 도입, 발현

chitinase유전자를 이태리 Naples 대학교의 Dr. Lorito가 개발한 형질전환용 벡터에 *ech42* promoter 및 signal sequence, *nag1* promoter 및 signal sequence와 chitinase유전자를 구축, *Trichoderma harzianum* 에 형질전환시켰다.

1) chitinase유전자를 *T. harzianum*의 형질전환용 벡터에 구축 : 형질전환용벡터 (pRLMEX30) 에 *T. harzianum* 의 프로모터 및 signal sequence와 chitinase유전자를 다음과 같이 구축하였다.

가) vector DNA의 조제 : pRLMEX 30 을 alkaline-lysis/PEG treatment법에 의해서 *E. coli* 로부터 분리 및 정제후, 제한효소로 처리하고 전기영동하여 원하는 플라스미드를 gel 로부터 추출하였다.

나) insert DNA의 조제 : chitinase유전자를 지니고 있는 플라스미드벡터 (pBKCHIA)는 alkaline-lysis/PEG treatment법, *T. harzianum* 의 염색체 DNA는 CTAB법에 의해서 분리, 정제후, 다음과 같이 PCR을 실시하여 제한효소 site을 만들었다.

(1) 프라이머 합성 : *T. harzianum*의 염색체 DNA로부터 제한효소 site을 포함한 *nag1*, *ech42* 프로모터 및 signal sequence와 pBKCHIA로부터 상응하는 제한효소 site을 포함한 chitinase유전자를 얻기 위한 프라이머는 다음과 같다.

(가) *nag1* 프로모터 및 signal sequence에 *XhoI* 과 *XbaI* site 포함 :

nagF: 5'-CCA CAG TCA GCA CTC GAG TGA TAT GGC CGT-3', *XhoI* site

nagR: 5'-CTT CTG GGG GAT TCT AGA CAG CGC ATT TGC-3', *XbaI* site

(나) chitinase유전자에 *XbaI* 과 *NsiI* site포함

chiaF1: 5'-AGA ATT GAG GAG TCT AGA ATG TCG AAA CTT TCG-3'

XbaI site, chitinase유전자의 프로모터 및 signal sequence 포함

chiaF2: 5'-AGC GCG GCG GCG TCT AGA GCG CCG GCC TGC AGC-3'

XbaI site, chitinase유전자의 mature protein부위만 포함

chiaR: 5'-ATA GCG GCT ATG CAT TTA CTT CAG CGG CGA-3', *Nsi*I site

(다) *ech42* 프로모터 및 signal sequence에 *Xho*I 과 *Nhe*I site포함

echF: 5'-ATG GTG AAG TGC TCG AGA GGA TAA CGG AGC-3', *Xho*I site

echR: 5'-GTT TGC GTA TCC GCT AGC TCT CTT CTC AAC-3', *Nhe*I site

(라) chitinase유전자에 *Nhe*I과 *Nsi*I site포함

chiaF1-1: 5'-AGA ATT GAG GAG GCT AGC ATG TCG AAA CTT TCG-3'

*Nhe*I site, chitinase유전자의 프로모터 및 signal sequence 포함

chiaF2-1: 5'-GCG GCG TTC GCC GCT AGC GCC TGC AGC GCG TGG-3'

*Nhe*I site, chitinase유전자의 mature protein만 포함,

chiaR: 5'-ATA GCG GCT ATG CAT TTA CTT CAG CGG CGA-3', *Nsi*I site

(2) PCR 실시 : chitinase유전자의 증폭은 94 ℃에서 5분동안 변성시킨 다음, 94 ℃에서 1분, 55 ℃에서 1.5분, 72 ℃에서 2분동안 35 cycle을 거친후 72 ℃에서 7분동안 두었고, 프로모터 및 signal sequence는 94 ℃에서 5분동안 변성시킨 다음, 94 ℃에서 1분, 53 ℃에서 1.5분, 72 ℃에서 3분동안 35 cycle을 거친후 72 ℃에서 7분동안 두었다.

(3) PCR산물의 정제 : PCR 산물은 UltraClean PCR Clean-Up DNA Purification Kit (Mo-Bio, USA)을 이용하여 정제하였다.

다) ligation 및 형질전환 : 정제된 PCR산물은 제한효소로 절단하여 벡터에 ligation 되었고 *E. coli* JM 109에 형질전환시켰다.

(1) *Nag*I 및 signal sequence에 chitinase유전자 구축: pRLMEX30 의 *ppk*1 부위 (*Xho*I 과 *Xba*I site)에 *Nag*I 프로모터 및 signal sequence를 ligation 및 형질전환시킨 다음, signal sequence의 *Xba*I site와 terminal sequence의 *Nsi*I site에 chitinase 유전자를 ligation 및 형질전환시켰다.

(2) *ech42* 프로모터 및 signal sequence에 chitinase 유전자 구축 : *ech42* 프로모터에는 *Xba*I site가 존재하였기 때문에, 증폭된 *ech42* 프로모터 및 signal sequence 와 chitinase 유전자를 *Nhe*I으로 절단, ligation시켜 PCR에 의해서 증폭한 다음, *Xho*I 과 *Nsi*I 으로 절단하여 pRLMEX30 의 *Xho*I 과 *Nsi*I site에 ligation 및 형질전환시켰다.

2) chitinase유전자를 *Trichoderma* spp.에 형질전환

가) 원형질체의 조제

(1) *Trichoderma*의 배양 : PDA 배지위에 cellophane disks를 올려놓고 포자현탁액 ($10^9/ml$)을 접종, 30 ℃에서 20-24시간 배양후 cellophane disks를 protoplast solution에 넣고 30 ℃에서 3시간 30분동안 두었다.

(2) 원형질체의 정제 : cellophane disks를 Solution A에 옮겨서 균사의 붕괴 및 원형질체의 방출을 위하여 서서히 pipetting하고 현탁액을 effendorf tube 내의 glass wool funnel을 통과 (약 50ml) 하여 swing-out rotor의 2000 rpm, 4 ℃에서 원심후, pellet (원형질체)에 Solution B 4ml를 넣고 현탁하여 현미경하에서 원형질체의 농도, 질 및 형태등을 조사하여 이용하였다.

Solution A : 100mM KH_2PO_4

1.2 M sorbitol

KOH를 이용하여 pH 5.6으로 조정 --> Autoclave

Solution B : 10 M Tris. HCl

50mM $CaCl_2$

1 M sorbitol

HCl을 이용하여 pH 7.5로 조정 --> Autoclave

Protoplasting solution : Novozyme 234 5mg을 Solution A 1ml에 용해 --> filter sterilization (0.2um)

나) *Trichoderma* sp. 에 형질전환 : Falcon tube (15ml) 에 protoplast suspension (10^7-10^8 protoplasts) 200ul, ligated DNA 5ug, pHAT@ 10ug 및 PEG buffer 50ul를 넣고, 얼음속에서 20분 정치후, PEG buffer 2ml를 첨가하고 상온에서 10분 두었다. 여기에 Solution B 4ml 첨가후 서서히 혼합하여 여러 농도를 overlay medium (49 ℃)의 4ml에 첨가후 간단히 흔들어 bottom medium위에 붓고, 30 ℃에서 3일 배양후 형질전환주를 선발하였다.

PEG buffer : 25% polyethylene glycol #6000
10mM Tris. HCl
50mM CaCl₂
HCl을 첨가하여 pH 7.5로 조종후 filter sterilization

Bottom medium : 39g PDA (1L 용)
1.2M sorbitol
Autoclave후 49 C로 식혀서 100ug/ul Hygromycin B를 첨가

Overlay medium : 39g PDA (1L 용)
1.2M sorbitol
Falcon tube(15ml)에 4ml씩 넣고 Autoclave후 49 C로 식
혀서 100ug/ul Hygromycin B를 첨가

다) 형질전환주의 선발 : 선발된 형질전환주는 새로운 PDA+hygromycin 100ppm배지에 옮겨서 포자를 형성시킨후, 포자현탁액을 만들어 선택배지 (PDA+hygromycin 100ppm 배지에 0.1% TritonX-100 100ul를 첨가하여 도말후 풍건) 도말, 단클로니를 PDA배지에 옮긴후 포자를 채취하여 다시 선택배지에 도말하였다. 안정한 형질전환주를 얻기 위해서 PDA배지와 선택배지에 3번 번갈아 가면서 계대 배양하였다.

3) 형질전환 *Trichoderma harzianum*의 chitinase생산능력

형질전환주를 hygromycin이 첨가된 PDA배지에서 28 C, 7일간 배양 후 형성된 포자현탁액 (10^8 /ml) 500ul를 MRM(Modified Richard's Medium)과 TMM(Trichoderma Mineral Media)의 50ml에 접종하였다. TMM배지는 증류수 1l에 lactose 5g, glucose 1g, (NH₄)₂SO₄ 5g, KH₂PO₄ 15g, stock salt solution 5ml, MgSO₄ 0.6g, CaCl₂ 0.6g을 첨가하고 pH 5.5를 조정한다. 다음, cellulose 10g을 첨가하였는데, stock solution은 증류수 500ml 에 FeSO₄ · 7H₂O 0.5g, MnSO₄ · H₂O 0.16g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.14g, CoCl₂ 0.2g을 포함하고 있다. MRM 배지는 850ml에 KNO₃ 10g, KH₂PO₄ 5g, MgSO₄ · 7H₂O 2.5g, FeCl₃ 2g, 1% insoluble polyvinylpyrrolidone와 150

ml의 V8 Juice(Campbell Soup CO. Camden, NJ)를 첨가하여 pH 6.0으로 조정 한 다음, crab shell chitin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 10g을 첨가하였다.

접종균주는 28 C, 200rpm에서 배양하여 매일 배양여액에 대한 chitinase활성을 측정하였다. chitinase활성 측정은 methylumbelliferyl β -D-N,N'-diacetylchitobioside 4-MU-(GlcNAc)₂ ; Sigma, USA] 와 colloidal chitin 을 기질로 이용하였다. 4-MU-(GlcNAc)₂을 이용하였을 경우에는 0.1mM의 기질과 20mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 에 용해된 효소액을 포함한 반응액 (0.1ml) 을 37°C 에서 10분간 반응시킨 후, 360nm의 excitation과 440nm의 emission (Bio-teck FLX-8000)에서 방출된 4-methylumbelliferone(4-Mu)의 양을 조사하였다. 기질로부터 효소 1 μ l 당 1 μ mole의 4-Mu를 방출하는데 필요한 효소의 양을 1 unit으로 하였다.. 배양여액의 단백질 농도는 protein assay kit (Bio-Rad)를 이용해서 측정하였다.

4) SDS-PAGE 후의 chitinase활성 검출

Discontinuous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법에 의해서 8% polyacrylamide gels에서 실시되었다. 효소액은 30%(W/V) sucrose, 250mM Tris-HCL(pH 6.8)에 5.0% (W/V) SDS, 0.02% (W/V) bromophenol blue와 동량으로 혼합되었고, 효소의 실활을 방지하기 위하여 2-merchatoethanol은 첨가되지 않고 boiling도 하지 않았다. 전기영동 후, Haran 등의 방법에 의해서 gel에 casein-EDTA를 첨가하여 효소에 결합되어 있는 SDS를 제거하고, 그 gel 위에 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside 를 함유한 1% agarose solution을 붓고, UV lamp하에서 형광색소를 나타내는 밴드를 조사하였다. silver nitrate염색에 의해서 나타난 단백질 밴드들의 분자량은 Silver Stain SDS-PAGE standards, low range(Bio-Rad)을 이용하여 추정하였고. 형광색소를 나타낸 밴드의 분자량 및 크기는 silver nitrate염색에 의한 밴드와 비교, 분석되었다.

5) Chitinase유전자의 도입여부 및 도입된 copy수

형질전환 *Trichoderma harzianum* 의 염색체 DNA를 분리하여 PCR에 의해서 프로모터, signal sequence 및 chitinase유전자를 지닌 형질전환주들을 선발하였다. 도입된 copy수는 Southern Blot Hybridization(ECL direct nucleic acid labelling and

detection systems kit)에 의해서 조사되었다. probe로 이용될 DNA는 PCR에 의해 증폭되어진 *chi54* chitinase gene을 이용되었는데, labelling은 5분간 boiling하여 DNA를 1가닥으로 변성시킨 다음 5분간 얼음에 방치하여 변성된 DNA를 고정시키고 probe solution, labelling solution을 첨가하여 37°C에서 10분 정치시켰다. 야생형 및 transgenic *T. harzianum*의 DNA는 *E.coRI*에 의해 절단, 전기영동 사진촬영 후 southern의 방법에 의해서 nitrocellulose membrane filter에 transfer 시켰다. 전이된 membrane은 80°C에서 건조시켜 DNA를 membrane에 완전 부착시키고, ECL의 방법에 의해 42°C에서 1시간 pre-hybridization과정과 overnight hybridization 시켰으며 membrane을 blot washing 과정을 거친 후 UV에서의 chemiluminescence 반응에 의해 DNA밴드를 검출하였다.

나. chitinase유전자를 *Pseudomonas* sp. 에 도입, 발현

Ishihara 등(19)의 플라스미드벡터 (pML122)에 *Chromobacterium* sp.의 chitinase유전자를 구축, *Pseudomonas putida*에 발현시켰다.

1) chitinase유전자를 형질전환용 벡터에 구축 : pML122의 제한효소 site에 chitinase유전자를 ligation시킨후 *E. coli*에 형질전환시키고 colony PCR에 의해서 chitinase유전자를 함유한 *E. coli*를 선발하였다.

가) vector DNA (pML122)의 조제 : alkaline-lysis/PEG treatment법에 의해서 *E. coli*로부터 플라스미드를 분리 및 정제하여 *HindIII*로 절단 및 calf intestine phosphatase를 처리, 전기영동후 gel로부터 추출하였다.

나) insert DNA (chitinase gene)의 조제 : chitinase유전자를 지니고 있는 플라스미드벡터 (pBKCHIA)를 alkaline-lysis/PEG treatment법에 의해서 분리, 정제후, 다음과 같이 PCR을 실시하여 제한효소 site을 만들었다.

(1) 프라이머 합성 : chitinase gene의 양쪽 끝에 *HindIII* site을 만들기 위한 primer는 다음과 같다

chiaF-1: 5'-CAC TAG TGG ATC ACT GAC AAG CTT GAG GAG GTC

CGA ATG-3', chitinase유전자의 프로모터 및 signal sequence 포함
chiaF-2: 5'-GCT GGC TTG TTG TTG AGC AAG CTT GCG GCG GCG
TTC GCC-3', chitinase유전자의 mature protein부위만 포함
chiaR-2: 5'-GCG TGA CGG GGG CAT CGA AAG CTT GCT GTT GTA
AGA ACC-3'

(2) PCR 실시 : 94 ℃에서 5분동안 변성시킨 다음, 94 ℃에서 1분, 55 ℃에서 1.5분, 72 ℃에서 2분동안 35 cycle을 거친후 72 ℃에서 7분동안 두었다.

(3) PCR산물의 정제 : PCR 산물은 UltraClean PCR Clean-Up DNA Purification Kit (Mo-Bio, USA)을 이용하여 정제하였다.

다) insert와 vector DNA의 ligation : 정제된 PCR산물은 *Hind*III 로 절단하여 *Hind*III 절단 및 calf intestine phosphatase를 처리된 벡터에 ligation시켰다.

라) ligation된 DNA를 *E. coli* JM109 에 형질전환 : ligation된 DNA를 *E. coli* JM109 에 형질전환시킨후 kanamycin함유 LB배지에서 형질전환균주를 선발하고, colony PCR에 의하여 insert DNA를 지닌 형질전환균주를 1차 선발하여 플라스미드 DNA를 *Hind*III로 절단, 전기영동후 insert DNA의 크기를 확인하였다.

마) 재조합 DNA를 *E. coli* S-17에 형질전환 : 형질전환 *E. coli* JM109로부터 플라스미드를 분리, 정제후, 상기에서와 동일한 방법으로 *E. coli* S-17에 형질전환시켰다.

바) *E. coli* S-17에 도입된 chitinase gene의 발현 확인 : 형질전환균주를 1/2LB + chitin 배지에 접종하여 halo zone (chitin분해) 형성여부를 확인하였다.

2) chitinase유전자를 *Pseudomonas putida* 에 도입

가) conjugation에 의한 도입 : *E. coli* S-17의 재조합 플라스미드를 *Pseudomonas putida* 에 도입하기 위하여 *P. putida* 는 LB+rifampicin 25ppm, *E. coli* S-17 은 LB+kanamycin 25ppm에서 하룻밤 배양되었다. 각각의 배양액은 1 : 2

로 혼합하여 원심분리에 의해서 농축하고, 농축액 10ul를 LB 배지에 접종, 풍건하였다. 접종된 LB 배지를 30 °C에서 8시간 배양후 콜로니를 멸균수에 현탁, LB + rif + km 배지에 도말, 형성된 콜로니의 특성을 조사하였다.

나) chitinase유전자의 도입여부 확인 : 형질전환 균주로 부터 DNA를 추출하여 PCR, Southern blot hybridization 방법을 이용하여 유전자의 도입여부를 조사하였다.

다. 형질전환균주가 생산하는 chitinase의 특성 및 항진균성

1) 배지위에서의 키틴 분해력

chitin을 함유한 1/2 LB배지위에 chitinase유전자를 지닌 *E. coli*를 접종후 28 °C, 4-5일간 배양하여 형성된 halo zone을 조사하였다.

2) 배지위에서의 항진균활성

토양전염성 병원균인 *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*의 균사 성장 억제 능력을 조사하였다. 즉 5일 배양한 병원균의 균사 절편 (직경 0.5cm) 을 Potato Dextrose Agar (PDA) 중앙에 접종하고, 가장자리의 4부위에 길항세균을 접종후 28 °C, 4-5일간 배양하여 세균과 병원균 균사의 사이에 형성된 억제대의 크기를 조사하였다.

3. 연구결과 및 고찰

가. chitinase 유전자를 *Trichoderma* spp.에 도입, 발현

1) 형질전환용 벡터에 프로모터, signal sequence 및 chitinase유전자의 구축

가) 플라스미드 및 염색체 DNA의 분리, 정제 및 확인 : chitinase유전자를 지니고 있는 플라스미드벡터 (pBK-chi54), *T. harzianum* 에서 외부 유전자를 발현할 수 있

는 플라스미드벡터 (pRLMEX30), 그리고 *T. harzianum*의 염색체 DNA를 분리, 정제하여 전기영동에 의해서 확인하였다(Fig. 1).

나) *T. harzianum*의 프로모터 및 signal sequence 의 증폭 : *T. harzianum*의 염색체 DNA로부터 *Nag1* 프로모터 및 signal sequence를 94 ℃에서 5분동안 변성시킨 다음, 94 ℃에서 1분, 53 ℃에서 1.5분, 72 ℃에서 3분동안 35 cycle을 거친후 72 ℃에서 7분동안 두었을 경우에 증폭되었고, 특히 template DNA를 잘 희석하였을 경우에만 증폭되었다 (Fig. 2).



Fig 1. Plasmid of pBKCHIA (A, B) and pRLMEX30 (C,D,E). and chromosomal DNA of *T. harzianum* (F).

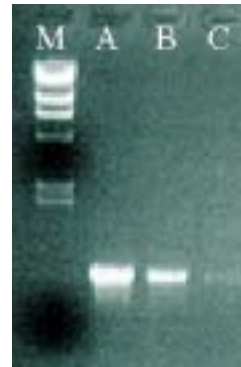


Fig 2. Nag1 of *T. harzianum* amplified by PCR

다) 형질전환용벡터 (pRLMEX30)에 *Nag1* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자의 구축

(1) 형질전환용 벡터 (pRLMEX30) 의 특성 : 형질전환용 벡터는 약 5.5 kb의 크기인데, *XhoI*과 *XbaI* 에 의해서 *Trichoderma reesei*의 cellulase 유전자 프로모터 (*ppki1*), 그 아래 쪽의 *XbaI*과 *NsiI* 사이에 hygromycin 저항성유전자(*shph*), 그리고 그 아래쪽의 *NsiI*과 *HindIII* 사이에 cellulase 유전자의 터미네이터(*tcbh2*) 가 들어 있다 (Fig. 3C). 이 벡터의 *ppki1* 부위에 *Trichoderma harzianum*의 *Nag 1* 및 signal sequence를 구축하고, *shph* 부위에 chitinase유전자를 구축하기 위하여 플라스미드를 분리, 정제후 (Fig. 3A), 제한효소로 절단 (Fig. 3B), 전기영동에 의하여 확인하였다.

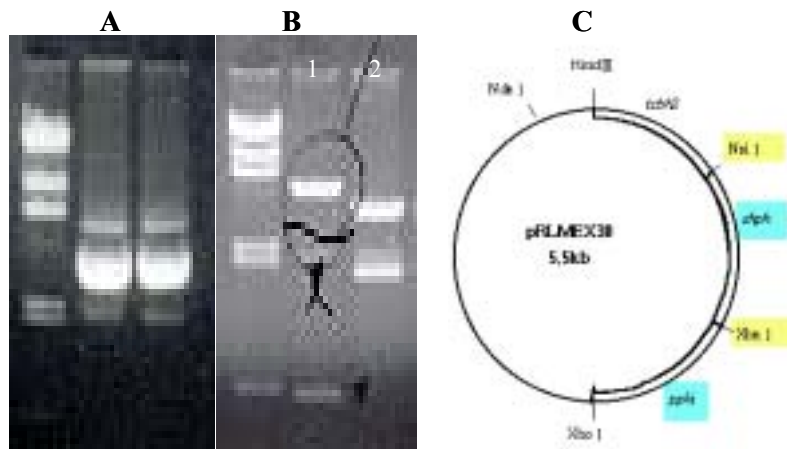


Fig. 3. Plasmid DNA (A), digested DNA (B) and restriction map (C) of transformation vector (pRLMEX30), B1; digested by *XhoI* and *XbaI*, B2; digested by *XhoI* and *NsiI*

(2) pRLMEX30 에 *NagI* 프로모터, signal sequence의 구축

pRLMEX30 의 *ppki1* 부위에 *NagI* 프로모터 및 signal sequence를 대체하기 위하여 분리, 정제된 pRLMEX30 의 플라스미드를 *XhoI*과 *XbaI*으로 절단, 전기영동 후 *ppki1*이 제거된 DNA만 gel로부터 추출하였고 (Fig. 4A), PCR에 의해서 증폭된 *NagI* 프로모터 및 signal sequence를 *XhoI*과 *XbaI* 으로 절단, 정제 (Fig. 4B) 하

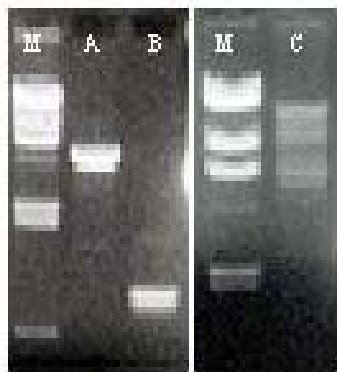


Fig 4. pRLMEX30 (A), Nag1+signal sequence (B) and ligation of A and B(C)

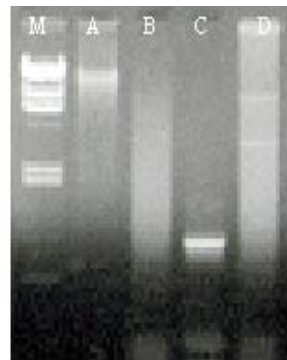


Fig. 5. Selection of pRLMEX30-1 containing Nag1+ signal sequence (C) by colony PCR

여 전기영동에 의해서 확인하였다. 제한효소로 절단된 pRLMEX30 과 *Nag1* 프로모터 및 signal sequence는 ligation하여 전기영동에 의해서 확인하고 (Fig. 4C), *E. coli* JM109에 형질전환시켰다.

프로모터 및 signal sequence가 삽입되었는가를 확인하기 위하여 *nagF*와 *nagR* 프라이머를 이용, colony PCR을 실시하였다. 그 결과 4개의 형질전환주중 1개의 *E. coli* (Fig. 5 C)에서 *Nag1* 프로모터 및 signal sequence 의 DNA가 검출되었다.

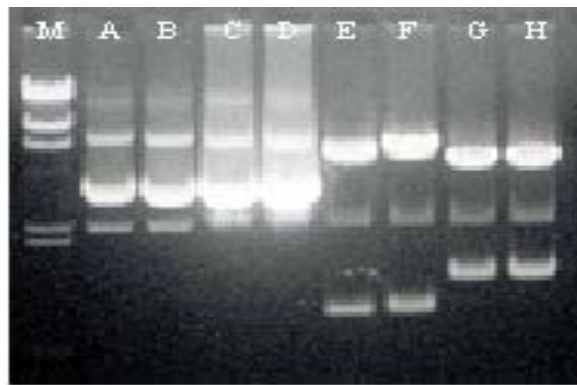


Fig. 6. pRLMEX30-1; pRLMEX30 containing *Nag1*+signal sequence (A, B, C, D), and its plasmid digested by *XhoI* and *XbaI* (E, F) and *XbaI* and *NsiI*(G, H).

선발된 형질전환 *E. coli* 에서 *Nag1* 프로모터 및 signal sequence가 pRLMEX 30 에 구축되었는가를 확인하기 위하여 플라스미드를 분리, 정제한후 (Fig. 6 A,B,C,D), *XhoI*과 *XbaI* (Fig. 6 E,F), *XbaI*과 *NsiI* (Fig. 6 G,H) 으로 절단, 전기영동하였다. 그 결과, *Nag1* 프로모터 및 signal sequence 가 pRLMEX 30 에 구축되어 있음을 알 수 있었다.

(3) pRLMEX30의 *Nag1* 프로모터 및 signal sequence에 chitinase유전자의 연결 : *Nag1* 프로모터 및 signal sequence가 구축된 플라스미드를 분리, 정제후, *XbaI*과 *NsiI*으로 절단하였다. 절단된 DNA를 전기영동후, *Nag1* 프로모터 및 signal sequence를 지니고 있는 DNA를 추출하였다 (Fig. 7A,B). 여기에 chitinase를 구축하기 위하여, PCR에 의해서 증폭된 chitinase유전자를 *XbaI*과 *NsiI*으로 절단, 정제하였다 (Fig. 7 E,F). 제한효소로 절단된 pRLMEX30 과 chitinase유전자를 ligation시

킨후, 전기영동에 의해서 확인하고(Fig. 8). *E. coli* JM109에 형질전환시켰다.



Fig. 7. pRLMEX30-1 extracted from gel after digestion with *Xba*I and *Nsi*I (A, B) and *chi54* digested by *Xba*I and *Nsi*I (E, F).

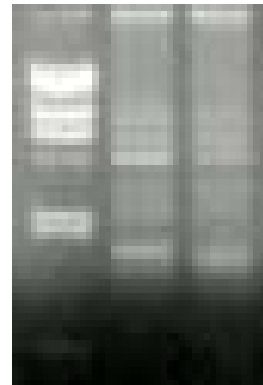


Fig. 8. Ligation of pRLMEX30-1 and chitinase gene

(4) *Nag1* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자의 구축 확인 : nagF와 chiaR 프라이머를 이용한 colony PCR에 의해서 pRLMEX 30 에 *Nag1* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자가 구축되어 있는 형질전환 *E. coli* 를 선발하였고, 플라스미드를 분리하여 제한효소로 절단, 전기영동에 의해서 *Nag1* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자가 구축되었는가를 확인하였다. Fig. 9 에서 보는 바와 같이 *Xho*I과 *Nsi*I 으로 절단하였을 경우 재조합 플라스미드의 insert DNA의 크기는 원래 존재한 insert DNA의 크기 보다 더 컸고, 그 크기는 *Nag1* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자를 포함한 크기와 동일하였다. *Xho*I과 *Nsi*I 으로 절단하였을 경우에도 insert DNA의 크기가 더 컸다. 이상의 결과에 의해서 *Nag1* 프로모터 및 signal sequence가 pRLMEX 30 에 구축되어 있음을 알 수 있었다.

라) 형질전환용벡터 (pRLMEX30 에) *ech42* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자의 구축 : *ech42* 프로모터에는 *Xba*I site가 존재하였기 때문에 상기에서와 동일한 방법으로 실시하지 못하고 *ech42* 프로모터, signal sequence와 chitinase 유전자

를 먼저 구축하고, 이 재조합 DNA를 pRLMEX 30 에 구축하였다

1) *ech42* 프로모터 및 signal sequence와 chitinase 유전자의 연결 : 증폭된 *ech42* 프로모터 및 signal sequence와 chitinase 유전자를 *NheI* 으로 절단한 다음, ligation시켰다. ligation된 DNA를 *echF*와 *chiaR*을 프라이머로 하여 PCR에 의해서 증폭하였다. 1차 PCR에서는 원하는 DNA가 관찰되지 않았으나 1차 산물을 다시 PCR하였을 경우에 원하는 DNA 밴드가 관찰되었고, 그 산물을 다시 PCR하였을 경우에는 ligation된 *ech42*와 chitinase유전자의 DNA를 대량 얻을 수 있었다 ((Fig. 10).

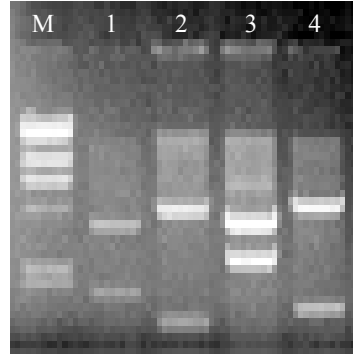


Fig. 9. Comparison of pRLMEX30 and pNCA-3. pRLMEX30 digested with *XhoI* and *NsiI* (1), *XbaI* and *NsiI* (2), and pNCA-3 digested with *XhoI* and *NsiI* (3), *XbaI* and *NsiI* (4). pNCA-3 indicates pRLMEX30 replaced *ppki* and *shph* site by *pNag* and *chi54*,

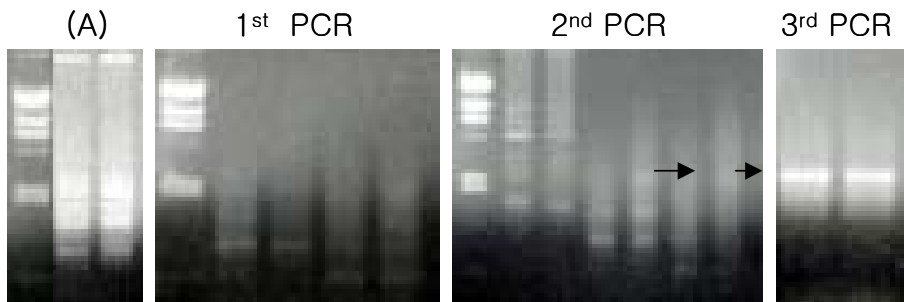


Fig. 10. Ligation of *Ech42* and *chi54* (A), and its amplication by PCR

2) *ech42* 프로모터, signal sequence 및 chitinase유전자를 pRLMEX30 에 구축 : pRLMEX30 를 분리, 정제하고 *XhoI*과 *NsiI*으로 절단, 전기영동후 원하는 벡터 DNA만 추출하였고 (Fig. 11 C), PCR에 의해서 증폭된 DNA (*ech42* 프로모터 및 signal sequence와 chitinase유전자) 를 *XhoI*과 *NsiI*으로 절단하였다 (Fig. 11 D). 벡

터와 insert DNA를 ligation시켜 *E. coli* JM109 에 형질전환시켰다.

3) *ech42* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자의 구축 확인 : colony PCR 에 의해서 형질전환 *E. coli* 의 pRLMEX 30 에 *ech42* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자가 구축되어 있는가를 확인하고, 이들을 포함하고 있을 것으로 판단된 형질전환 균주를 선발하였다. 선발된 형질전환 *E. coli* 로 부터 플라스미드를 분리하여 제한효소로 절단, 전기영동에 의해서 *ech42* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자가 구축되었는가를 확인하였다. Fig. 12 에서 보는 바와 같이 *Xho*I 과 *Nsi*I 으로 절단하였을 경우 재조합 플라스미드의 insert DNA 의 크기 (Fig. 12 A) 는 원래 존재한 insert DNA의 크기 (Fig. 12 B) 보다 더 컸고, 그 크기는 *ech42* 프로모터, signal sequence 및 chitinase 유전자를 포함한 크기와 동일하였다. 따라서, *ech42* 프로모터 및 signal sequence가 pRLMEX 30 에 구축되어 있을 것으로 생각되었다.

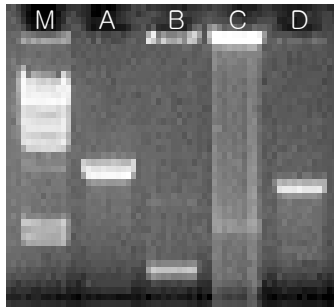


Fig. 11. Recombinant DNA of *ech42*+signal sequence+*chi54* (C) and pRLMEX30 extracted from gel (D)

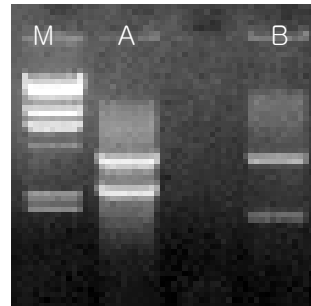


Fig. 12. Plasmid (A) of *ech42*+signal sequence+*chi54* constructed in pRLMEX30 (B) , which were digested by *Xho*I and *Nsi*I

나) 재조합 chitinase 유전자를 *Trichoderma* spp.에 형질전환

1) 형질전환주의 선발

*Trichoderma harzianum*의 원형질체에 재조합 DNA 및 pHAT@를 첨가하여 형질전환시킨후 hygromycin이 함유된 PDA배지에서 형질전환주들을 선발하였다. 형질전환주들은 포자를 형성시켜 단포자 분리를 하였고, PDA배지와 선택배지

(PDA+hygromycin 100ppm 배지에 0.1% TritonX-100 100ul를 첨가하여 도말후 풍건)에 번갈아 가면서 계대 배양하였는데, 대부분의 형질전환주들(Fig. 13 B)은 야생형 균주 (Fig. 13 A)보다 더 늦게 푸른색의 포자를 형성하였다.

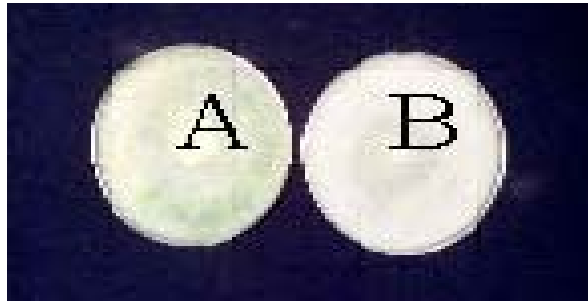


Fig. 13. Colony of *Trichoderma harzianum* (A) and transgenic *T. harzianum* (B) on PDA

2) chitinase유전자의 도입여부 및 도입된 copy수

형질전환 *Trichoderma harzianum*의 염색체 DNA를 분리하여 PCR에 의해서 프로모터, signal sequence 및 chitinase유전자를 지닌 형질전환주들을 선발하였다 (Fig. 14).

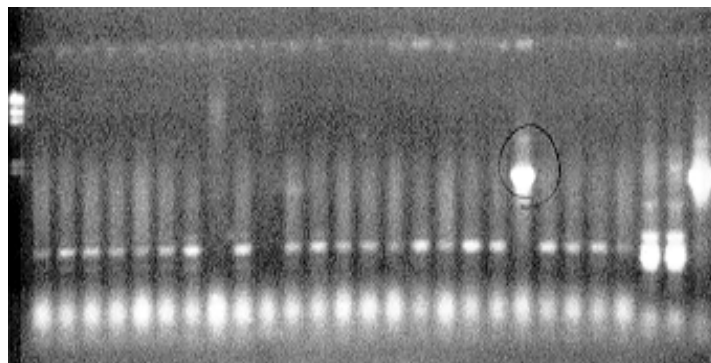


Fig. 14. Selection of transgenic *Trichoderma harzianum* containing *chi54* by PCR

PCR에 의해서 선발된 형질전환주들의 염색체 DNA를 분리하여 *EcoRI*으로 절단 후, *chi54*를 probe로 하여 southern blot hybridization을 실시하였다. 그 결과 (Fig. 15), 모균주인 *T. harzianum* P1에는 *chi54*가 전혀 검출되지 않고, 형질전환균주인 P1-4와 P1-8에는 한 개의 *chi54*, P1-5에는 2개의 *chi54*가 들어 있는 것으로 분석되었다.



Fig.15. Southern blot hybridization of *Trichoderma harzianum* (P1) and transgenic *T. harzianum* (P1-4, -5, -8)

3) 도입된 chitinase 유전자의 발현 여부 조사

모균주와 형질전환균주를 MRM와 TMM에서 배양후 그 배양여액의 chitinase activity를 조사하였다. *ech42*를 도입한 형질전환균주들은 TMM과 MRM배지 모두에서 모균주와 큰 차이를 나타내지 않았고, *Nag1*을 도입한 형질전환균주들은 TMM에서 큰차이를 나타냈다. TMM배지의 경우, 형질전환 *T. harzianum*은 배양 4일까지 모균주보다 더 높은 chitinase활성을 나타냈으나, 그 이후는 큰 차이를 나타내지 않았다. MRM배지의 경우, 모균주와 P1-4균주, P1-5균주는 배양 7일까지 계속 증가하였으나 p1-8은배양 3일째에 최고에 이르렀다가 그 이후 감소하는 경향이였다. 균주에 따른 chitinase활성은 p1보다 p1-4에서 더 높고, p1-4보다는 p1-5와 p1-8에서 더 높은 경향이였다. 특히, p1-5는 모균주보다 약 2배 더 높은 chitinase활성을 보여주었다 (Table 1).

모균주와 형질전환균주를 MRM배지에서 7일 배양 후, 그 배양여액을 SDS-PAGE에 의해서 분석한 결과 (Fig. 16), 모균주는 자신의 chitinase만 분비하였으나, 형질전환균주들은 모두 자신의 chitinase와 도입된 Chi54를 분비하였음을 알 수 있었다.

Table.1. Chitinase activity (U/ml) extra-cellular protein produced by transgenic *Trichoderma harzianum*

Culture period (day)	P1 ^a		P1-4		P1-5		P1-8	
	MRM ^b	TMM	MRM	TMM	MRM	TMM	MRM	TMM
1	50 ^c	25	54	31	59	29	53	35
2	111	29	90	45	167	69	139	53
3	218	113	396	102	432	484	577	239
4	149	202	256	382	454	482	507	430
5	285	927	386	869	905	555	1088	957
6	591	1000	696	932	1421	936	992	954
7	788	1017	859	969	1659	1005	749	1041

^aP1; *Trichoderma harzianum*, P1-4, -5, -8; transgenic *T. harzianum*, ^bMRM ; Modified Richard's Medium, TMM; Trichoderma Mineral Media
Chitinase activity (U/ml) toward ^c4-MU-chitobioside

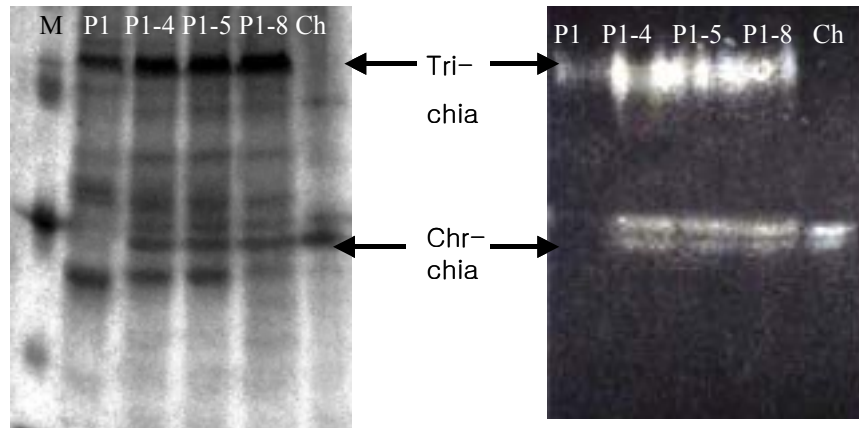


Fig. 16. Total protein (A) and chitinolytic band (B) of culture supernatants from
나 . *T. harzianum* (P1) and transgenic *T. harzianum* (P1-4, -5, -8)
 ch

itinase 유전자를 *Pseudomonas* spp.에 도입, 발현

1) 형질전환용 벡터에 chitinase 유전자의 구축

가) 형질전환용 벡터의 특성 및 확인

Pseudomonas spp.의 형질전환용 벡터인 pML122는 약 11kb의 크기로 일본의 Dr. Ogawa에 의해서 개발되었고, pMEFE1은 pML122에 ethylene 형성유전자가 구축된 플라스미드이다. 이들 벡터에는 gentamycin과 neomycin 내성 유전자가 들어 있고, *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* 및 *HindIII*의 cloning site을 갖고 있다 (Fig. 1 D). 플라스미드를 분리, 정제하여 (Fig. 1 A), *HindIII*로 절단후, 전기영동에 의하여 확인한 결과, pML122 (Fig. 1 B1)는 약 11kb, pMEFE1 (Fig. 1 B2)은 약 11kb와 1.3 kb 정도의 insert DNA (ethylene 형성유전자)를 포함하고 있었다.

나) pML122와 chitinase 유전자의 ligation 및 형질전환

분리, 정제된 pML122는 *HindIII* 및 calf intestine phosphatase로 처리, 전기영동후 gel로부터 추출하였다 (Fig. 2-1). chitinase 유전자는 PCR에 의해서 증폭한 다음, *HindIII*로 절단하여 전기영동후, gel로부터 추출하였다 (Fig. 2-2,3). 절단된

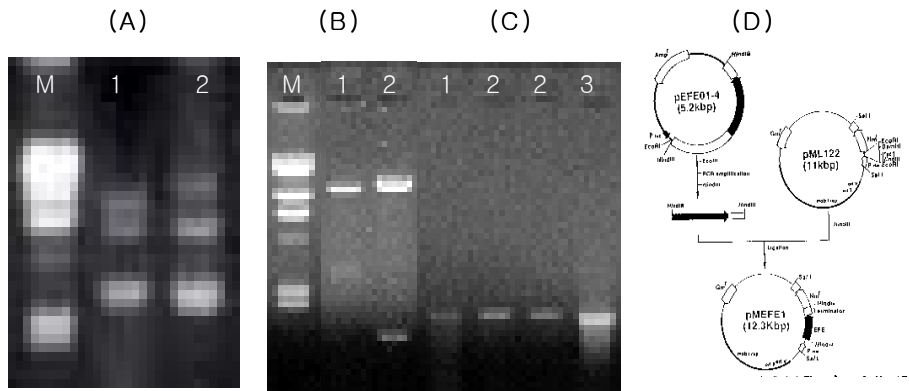


Fig. 1. Undigested DNA (A) and digested DNA (B) of pML 122(1) pMEFE1(2) and their physical map (D), and *chi54* amplified by PCR(C)

벡터와 chitinase유전자를 ligation하여 *E. coli* JM109 에 형질전환 시킨후 kanamycin을 함유한 LB배지에서 형질전환주를 선발하였다.

다) pML122 에 chitinase유전자 구축의 확인

colony PCR에 의하여 insert DNA를 지닌 형질전환균주를 선발하였고, 선발된 형질전환주로부터 플라스미드 DNA를 분리, 정제하여 전기영동후 insert DNA의 크기를 확인하였다 (Fig. 3).

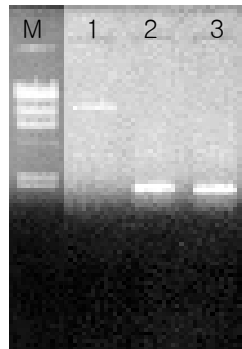


Fig. 2. pML122 (1) and *chi54* (2, 3) extracted from gel

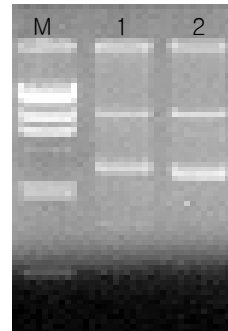


Fig. 3. pML122 containing *chi54* (1) and pML122 (2)

2) chitinase유전자를 *Pseudomonas putida* 에 도입

가) 재조합 DNA를 *E. coli* S-17 에 형질전환

형질전환 *E. coli* JM109 로부터 분리, 정제된 DNA를 상기에서와 동일한 방법으로 *E. coli* S-17 에 형질전환시킨후, colony PCR에 의해서 insert DNA를 지닌 형질전환주를 선발하였다.

나) *E. coli* S-17의 재조합 DNA를 *P. putida* 에 도입

E. coli S-17 은 LB+kanamycin 25ppm, *P. putida* 는 LB+rifampicin 25 ppm 에서 하룻밤 배양후, 1 : 2 의 농도로 혼합하여 원심분리에 의해서 농축하고, 농축액 10 ul를 LB 배지에 접종, 풍건하였다. 접종된 LB 배지를 30 ℃에서 8시간 배양후 콜로니를 멸균수에 현탁, LB + rif + km 배지에 도말하여 형성된 콜로니를 얻었다. 이들 콜로니들은 King's B + rif + km 배지에 접종하여 형광색소를 형성한 형질전환주를 선발하였다.

다) chitinase유전자의 도입여부 확인

형질전환균주들로부터 염색체DNA를 추출하여 PCR에 의해서 chitinase유전자를 지닌 균주를 선발하였고 (Fig. 4), Southern blot hybridization에 의해서 chitinase유전자의 도입여부를 조사하였다 (Fig. 5). Southern blot 분석 결과, 형질전환균주들은 각각 다른 위치의 염색체 DNA에 1-2 개의 chitinase유전자를 포함하고 있음을 알 수 있었다.

3) 형질전환 *P. putida* 의 chitinase 및 항진균 활성

가) 배지위에서의 chitinase활성

chitin을 함유한 1/2 LB배지위에서 chitinase유전자를 지닌 *P. putida* 가 clearing zone (chitin 분해력)을 형성하였다. 그러나, clearing zone의 크기가 chitinase유전자를 지닌 *E. coli* 에서 보다 더 작았다(Fig. 6)

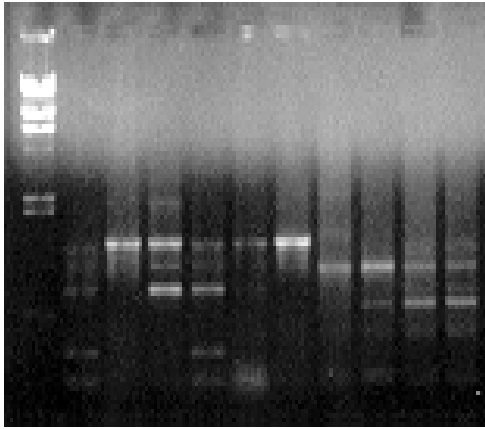


Fig. 4. Selection of *P. putida* harboring *chi54* by PCR

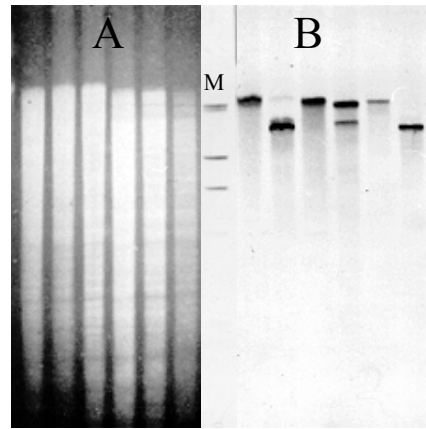


Fig. 5. Chromosomal DNA of transgenic *P. putida* (A) and their southern blot hybridization (B)

나) 배지위에서의 항진균활성

PDA위에서 토양전염성 병원균인 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium ultimum* 의 균사 성장 억제력 모두 야생형 *P. putida* 보다 chitinase유전자를 지닌 *P. putida* 에서 더 컸고, *E. coli* 는 억제하지 못하였다 (Fig. 7).

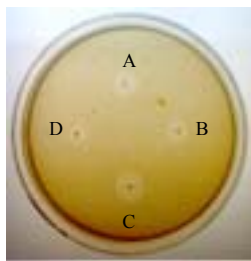


Fig. 6. Clearing zone formed by *P. putida* (B, D) and *E. coli* (A, C) harboring *chi54*

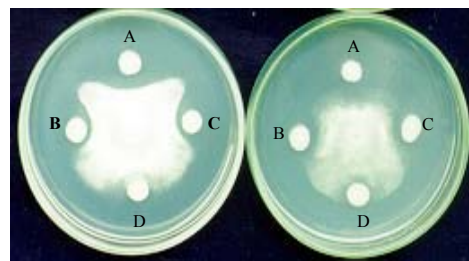


Fig. 7. Inhibition of *R. solani* (left) and *Py. ultimum* (right) by transgenic *P. putida* (A), parental *P. putida* (B, C) and *E. coli* (D) harboring *chi54*

4. 결과 요약

가. chitinase 유전자를 *Trichoderma* spp.에 도입, 발현

1) *Chromobacterium* sp. chitinase 유전자 (*chi54*) 를 *Trichoderma harzianum*의 *NagI* promoter+signal sequence와 *ech42* promoter+signal sequence에 구축, *Trichoderma harzianum*에 도입하였다.

2) *ech42*에 구축된 *chi54*는 *Trichoderma harzianum*에서 발현되지 않고, *NagI*에 구축된 *chi54*만 발현되었다.

3) TMM배지의 경우, 형질전환 *T. harzianum*은 배양 4일까지 모균주보다 더 높은 chitinase 활성을 나타냈으나, 그 이후는 큰 차이를 나타내지 않았다.

4) MRM배지의 경우, 모균주보다 형질전환균주에서 더 높은 chitinase 활성을 나타냈는데, 특히, p1-5는 모균주보다 약 2배 더 높은 chitinase 활성을 보여주었다.

5) Southern blot hybridization 에 의해서 형질전환균주인 P1-4와 P1-8에는 한 개의 *chi54*, P1-5에는 2개의 *chi54*가 들어 있는 것으로 분석되었다.

6) SDS-PAGE에 의해서, 형질전환균주들은 모두 자신의 chitinase와 도입된 Chi54를 분비하였음을 알 수 있었다.

나. chitinase 유전자를 *Pseudomonas* spp.에 도입, 발현

1) *Chromobacterium* sp. chitinase 유전자 (*chi54*) 를 *Pseudomonas* spp.의 형질전환용 벡터인 pML122에 구축, *Pseudomonas putida*에 도입하였을 경우에 발현되었다.

2) *chi54*를 지닌 *P. putida* 는 chitinase를 세포밖으로 분비했으나, *chi54*를 지닌 *E. coli*에서보다 chitin분해력이 낮았다.

3) *chi54*를 지닌 *P. putida* 는 모균주보다 *Rhizoctonia solani* 와 *Pythium ultimum* 의 균사 성장 억제력이 더 컸다.

제 2 절. chitinase활성이 증가된 유전자의 개발

1. 서 설

chitin분해미생물에 의한 식물병의 억제에서 chitinase생산능력 및 생산된 chitinase의 활성이 병억제력에 매우 중요한 것으로 알려져 있다 (38). 현재, 식물병 억제력을 증대시키기 위해서 chitinase유전자를 조작한 보고는 없으나, catalytic domain만으로 이루어진 *T. harzianum*의 chitinase유전자에 chitin-binding domain 혹은 cellulose-binding domain을 부착하여 기질 결합능력은 물론 chitinase활성이 증가되었다는 보고가 있다 (64).

이 연구에서는 *Chromobacterium* sp.의 chitinase유전자를 변형하여 chitinase활성을 증대시키는데 목표를 두었다. 좀 더 효과적이고 합리적인 가설을 설정하기 위하여 저회 유전자의 domain구조나 기능을 먼저 분석하였고, 이를 기초로 하여 cellulose-binding domain 혹은 catalytic domain의 부착, site-directed mutagenesis에 의하여 chitinase활성을 증대시켰으며, 변형된 유전자를 다른 미생물에 도입, 발현시켜 증대된 활성이 계속 유지되는가, 그리고 유전적으로 안정한가 등을 조사하였다.

2. 연구수행내용 및 방법

가. chitinase 유전자 domain의 구조

Chromobacterium sp. strain C-61 chitinase 유전자 domain들은 internet program에 의해서 분석되었다. signal sequence는 ExPASy Proteomics tools의 SignalP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), chitin-binding domain 과 catalytic domain은 SMART program 에 의해서 분석되었다.

나. Deletion mutagenesis

유전자 domain의 주요 부위는 ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stragene, USA)을 이용하여 PCR에 의해서 제거되었는데, 이용된

Deletion mutagenesis를 위한 primer

Deleted site ^a	Primer									
Signal Peptide	Forward	GCG	CCG	GCC	TGC	AGC	GCG	TG		
	Reverse	CAT	TCG	GAC	CTC	CTC	AAT	TC		
ChBD I (WSNAQT)	Forward	TAT	AAC	GGC	GGC	GAT	TAC	GC		
	Reverse	CGC	GCT	GCA	GGC	CGG	CGC	GG		
II (AKWWT)	Forward	CAG	AAC	AAT	CAG	CCG	GGC	GC		
	Reverse	GCG	CCA	GGT	CTT	GTT	GGC	GT		
III (PGADQW)	Forward	GGA	CCG	TGG	GAG	GAG	AGG	CC		
	Reverse	CTG	ATT	GTT	CTG	CGT	CCA	CC		
CatD B3 (ISLGGWTWSKNF)	Forward	GGC	AAG	TTC	GCC	GCC	ACC	GA		
	Reverse	CAG	CAC	TTT	CAG	CGA	GGG	AT		
B3 (GGWTWS)	Forward	AAG	AAT	TTC	GGC	AAG	TTC	GC		
	Reverse	CAG	CGA	AAT	CAG	CAC	TTT	CA		
B4 (FDGIDIDWE)	Forward	TAC	CCG	GGC	GGC	GGC	GGC	CT		
	Reverse	CAC	TCC	CTT	GGC	CGC	GCC	GG		
B7 (KLNVGIP)	Forward	TTC	TAT	GGA	CGC	GGC	TGG	GC		
	Reverse	GGT	CTT	GGG	CAC	GCC	GGC	CT		
B8 (GGVFSWSLDGD)	Forward	GAC	GCC	CAG	GGC	TCC	TTG	CT		
	Reverse	CAG	CTG	TTG	TTG	ACG	CAC	AT		

^aChBD; chitin-binding domain, CatD ; catalytic domain

primer는 다음 표와 같다, PCR은 94°C에서 4분 동안 1cycle을 거친후, 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 1분의 10 cycle을 거친후, template DNA를 절단하기 위한 *Dpn* I 과 extended bases를 제거하기 위한 Cloned Pfu DNA polymerase를 처리 후, T4 DNA ligase를 처리하여 형질전환시켰다.

다. Site-directed mutagenesis

catalytic domain에서 각 β -strand지역의 Target 아미노산들은 다음 표의 primer에 의해서 QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)을 이용하여 돌연변이 되었다. PCR은 Template DNA (chi54) 2 μ l, dNTP (25mM) 0.5 μ l, 10X buffer 2.5 μ l, S.D.W 18.5 μ l, pfu DNA polymerase 0.5 μ l, primer F·R (20 pmole) 각각 1 μ l를 PCR tube에 넣고, 95°C에서 30초, 55°C에서 1분, 68°C에서 12분을 16cycle을 거쳤고, 원하는 DNA의 밴드가 나오지 않았을 경우에는 cycle수를 늘려가면서 실시하였고, template DNA는 *Dpn* I 처리에 의해서 절단시킨 후, 형질전환시켰다.

라. chitinase유전자에 cellulose-binding domain의 첨가

Chromobacterium sp. strain C-61의 chitinase유전자를 cellulose-binding domain이 내재된 pET-36(+) 벡터(Novagen, USA)에 구축하기 위하여 Template DNA (Chi54) 2 μ l, dNTP (2.5mM) 4 μ l, 10X buffer 5 μ l, SDW 36.75 μ l, Taq polymerase 0.26 μ l, forward 와 reverse Primer 1 μ l 씩을 PCR용 tube에 넣고, 94°C에서 30초, 55°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건에서 35cycle 거친 후 마지막 72°C에서 7분 동안 PCR 하였다. Primer 는 Forward 5'-GAC GAC GAC AAG ATG TCG AAA CTT TCG TTG TCG GCG-3'와 Reverse 5'-GAG GAG AAG CCC GGT TTA CTT CAG CGG CGA TGC-3'를 이용하였다.

이렇게 나온 PCR 산물 14.5 μ l, 10x T4 DNA poly buffer 2 μ l, 25mM dATP 2 μ l, 100mM DTT 1 μ l, T4 DNA polymerase 0.4 μ l, SDW 10.6 μ l 을 effendorf tube 에 넣은 후 22°C 에서 30분, 75°C 에서 20분 반응을 시킨 후 pET-36 EK/LIC vector DNA 1 μ l, 상기 산물 2 μ l 를 섞고 22°C 에서 5분, 23mM EDTA 1 μ l 을 첨가하여 22°C에서 5분 Annealing 시켰다. Annealed DNA 1 μ l 를 Novablue singles 25 μ l 에 형질전환시켰다.

마. chitinase유전자에 catalytic domain의 첨가

Site-directed mutagenesis를 위한 primer

CatD Mutant		Primer	
$\beta 3$	S213E	Forward	CTGAAAGTGCTGATT GAA CTGGGCGGCTGGACC
		Reverse	GGTCCAGCCGCCAG TTCA ATCAGCACTTTTCAG
	G216E	Forward	CTGATTTTCGCTGGGC GAA TGGACCTGGTCGAAG
		Reverse	CTTCGACCAGGTCC ATTC GCCCAGCGAAATCAG
	W217E	Forward	TCGCTGGGCGGC GAA ACCTGGTCGAAG
		Reverse	CTTCGACCAGGT TTTC GCCCAGCCAGCGA
$\beta 4$	T218S	Forward	GGCGGCTGG AGC TGGTCGAAG
		Reverse	CTTCGACC AGCT CCAGCCGCC
	I268V	Forward	GTTCGACGGC GTG GACATCGAC
		Reverse	GTCGATGT CCAC GCCGTCGAAC
	I270V	Forward	GGCATCGAC CTC GACTGGGAATAC
		Reverse	GTATTCCCAGTC GACG TCGATGCC
$\beta 7$	D271W	Forward	CATCGACATC TGG TGGGAATACC
		Reverse	GGTATTCCCA CCAG ATGTCGATG
	E273W	Forward	GACATCGACTGG TGGT ACCCGGGCGGC
		Reverse	GCCGCCCGGGT ACC ACCAGTCGATGTC
	N401V	Forward	GACCAAGCTG GTG CTGGGCATC
		Reverse	GATGCCAC GAC CAGCTTGGTC
$\beta 8$	G403E	Forward	GCTGAACGT GAAA TCCCGTTCT
		Reverse	AGAACGGGAT TTCC ACGTTACAGC
	G492E	Forward	CAACAGCTGGGC GAA GTGTTTCAGCTGG
		Reverse	CCAGCTGAACACT TTTC GCCCAGCTGTTG
	V493M	Forward	CTGGGCGGG ATG TTCAGCTGGTC
		Reverse	GACCAGCTGAA CAT CCCGCCAG
$\beta 6$	W496E	Forward	GGTGTTCAGC GAA TCCCTTGGATG
		Reverse	CATCCAAGGAT TTTC GCTGAACACC
	S497E	Forward	GTTTCAGCTGG GAG TGGATGGCGA
		Reverse	TCGCCATCCA ACTC CCAGCTGAAC
	M346Q	Forward	GATCAATGTG CAG ACCTACGAC
		Reverse	GTCGTAGGT CTG CACATTTGATC
	Y348D	Forward	GTGATGACC GAC GACTTCAACG
		Reverse	CGTTGAAGTC GTC GGTTCATCAC
	D349N	Forward	GATGACCTACA ATT TCAACGGC
		Reverse	GCCGTTGAA ATT GTAGGTCATC
	D349W	Forward	GATGACCTACT TGG TTCACGGCG
		Reverse	CGCCGTTGAA CCAG TAGGTCATC

Chromobacterium sp. strain C-61의 chitinase유전자 (Chr-chia) 에 *Trichoderma harzianum* chitinase유전자 (Thr-chia) 의 catalytic domain부위를 구축하였다.

1) 벡터 DNA의 조제

가) Chr-chia의 ChBD 뒤에 catalytic domain의 구축 : Chr-chia를 BstEII과 ApaI, Asp700 과 ApaI 으로 절단후, gel로부터 Chr-chia의 ChBD까지를 포함하고 있는 벡터를 추출하였다.

나) Chr-chia의 catalytic domain 뒤에 catalytic domain의 구축 : Chr-chia를 BpiI 과 ApaI site으로 절단후, gel로부터 Chr-chia의 catalytic domain까지를 포함하고 있는 벡터를 추출하였다.

2) Insert DNA의 조제 : pET-27벡터에 구축된 Thr-chia (cDNA)로부터 PCR에 의해서 catalytic domain을 조제하였다.

가) Chr-chia의 ChBD 뒤에 구축하기 위한 catalytic domain의 조제 : BstEII site을 만들기 위한 primer (GCG TCG GAC ATC ACT CAG GTC ACC TAC TCG TTC ATG AAC), Asp700 site을 만들기 위한 primer (GTC TCT GGA GAT AAC GCG TTC TAT CAG AAG CAC TAT)와 ApaI site을 만들기 위한 primer1 (GTG TGT GAA ATG TTG GGC CCA TAG GGG AAG), primer2 (GAT GTT ATC ATA CGG GCC CTT GGG GTA GCT CAG)를 합성하여 PCR에 의해서 Thr-chia의 catalytic domain을 분리하고 PCR clean kit에 의해서 정제하여 BstEII와 ApaI, Asp700과 ApaI으로 절단 후 gel로부터 추출하였다.

나) Chr-chia의 catalytic domain 뒤에 구축하기 위한 catalytic domain의 조제 : BpiI site을 만들기 위한 primer I (CGT CTC TGT TGA GAA GAC AGC CAG TGG ATA CGC) 및 primer II (CGC CGA TTA TCA GAA GAC CTA TGA CGA CGA TTC), ApaI site을 만들기 위한 primer1 (GTG TGT GAA ATG TTG GGC CCA TAG GGG AAG), primer2 (GAT GTT ATC ATA CGG GCC CTT GGG GTA GCT CAG)를 합성하여 PCR에 의해서 Thr-chia의 catalytic domain을 분리하고 PCR clean kit에 의해서 정제하여 BpiI과 ApaI으로 절단 후 gel로부터 추출하였다. vector와 insert DNA를 ligation하여 형질전환시켰다.

바. 형질전환주의 선발 및 확인

처리된 PCR 산물 혹은 ligation 된 DNA를 competent cell에 첨가하고, 얼음에서 30분, 42℃에서 45초, 즉시 얼음에서 2분 담근 후, 42℃에 보존된 NZY broth 500 μ l 첨가하여 37℃에서 1시간(200~250rpm) 배양하였다. 배양액 100 μ l씩을 LB (km 50) plate에 도말한 후 37℃ 항온기에서 16시간 이상 배양하여 single colony를 선정하고, LB (km 50) plate에 다시 streaking 하여 plasmid를 추출한 다음 DNA 염기서열을 결정하여 돌연변이된 지역 및 아미노산과 ligation된 DNA를 확인하였다.

사. 형질전환주의 chitinase 생산 능력

1) 배지위에서의 chitin 분해 능력 : colloidal chitin을 함유한 1/2 LB배지위에 접종 후 28°C, 4-5일간 배양하여 형성된 halo zone을 조사하였다.

2) 세포질 및 배양여액의 chitinase 활성 :

가) crude enzyme 조제 : LB, TB 혹은 1/2 LB+chitin배지에서 배양 후, 원심분리에 의해서 배양액과 pellet (세포)를 얻어서 배양액과 세포질에서 추출된 단백질의 량과 chitinase 활성을 측정하였다. 세포질로부터의 효소 추출은 pET manual에 준하였다

나) chitinase 활성

1) 4-MU-(GlcNAc)₂ 에 대한 chitinase 활성 : Microplate에 pH5 buffer, 효소 및 기질 넣고, 37°C에서 10분, 30분 보준후, 360nm의 excitation과 440nm의 emission (Bio-teck FLX-8000)에서 방출된 4-methylumbelliferone(4-Mu)의 량을 조사하였다. 기질로부터 효소 1μl 당 1μmole의 4-Mu를 방출하는데 필요한 효소의 량을 1 unit으로 하였다.. 배양여액의 단백질 농도는 protein assay kit (Bio-Rad)를 이용해서 측정하였다.

2) Colloidal chitin, Cystal chitin 에 대한 chitinase 활성 : 각각의 effendorf tube에 pH5 buffer, 효소 및 colloidal chitin 혹은 cystal chitin을 넣어 37°C에서 1시간, 2시간 보준 후 100°C 에서 3분 Boiling 하고, 10,000rpm에서 5분 원심분리 하였다.. 상등액을 200μl 들어내서 color regent 260μl 담겨 있는 effendorf tube 에 첨가하여 13분 Boiling 후, 200μl씩 들어내어 420nm 에서 측정하였다. 이때 사용된 Standard로는 NAG 2.5mM, NAG 1.25mM, NAG 0.625mM, NAG 0.313mM, NAG 0.157mM, NAG 0.00mM 을 이용하였다.

아. Rotofor cell (Bio-Rad, USA)을 이용한 chitinase 정제

추출된 각각의 crude enzyme을 ammonium sulfate 으로 침전시켜, 투석후, ml당 2mg의 단백질 19ml에 ampholyte (40%, pH3-10) 을 1ml 첨가하여, 3000V, 200 mA, 12W (이 경우, 300-500v, 24-40mA 이면 좋다.)조건에서 5시간 정도 전기영동하였다. 전기 영동후, 각 fraction에 있는 단백질의 량 및 chitinase 활성을 측정하고, SDS-PAGE에 의해서 chitinase 밴드만 나타낸 fraction의 sample을 모아서 투석후, 이용하였다..

자. chitinase의 특성

1) 기질 결합 능력 : crystal chitin 혹은 cellulose(Avicel) 에 효소를 넣고 얼음에서 1시간동안 shaking 후, 13,000rpm에서 15분 원심분리 하여 상등액 (기질과 결합되지 않은 단백질의 양)의 단백질 농도를 측정하였다.

2) SDS-PAGE후의 chitinase 활성 : SDS-PAGE 후, Haran 등의 방법에 의해서 효소에 결합되어 있는 SDS를 제거하고, gel 위에 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside를 함유한 1% agarose solution을 붓고, UV lamp하에서 형광색소를 나타내는 밴드를 조사하였다.

차 chimeric 유전자를 *Trichoderma* spp.에 형질전환 : 이전 실험에서와 동일한 방법으로 실시되었다.

3. 연구결과 및 고찰

가. chitinase유전자 (*chi54*) domain의 구조 및 기능

1) domain의 구조

Chi54의 아미노산서열을 다른 chitinase들과 비교하였을 경우, N-말단 1-26 아미노산은 signal sequence, 30-74 아미노산은 chitin-binding domain (ChBD), 104-501 아미노산은 catalytic domain (CaTD) 으로 분석되었다.

가) chitin-binding domain (ChBD)

Chi54의 ChBD는 SMART program에서 type 3 (ChtBD3) 로 분류되었다. ChtBD3는 일반적으로 bacterial chitinases에서 보고되고, 최근 stWWst motif을 갖는 group A와 그 motif을 갖지 않는 group B로 더 분류되는 것으로 제안되었다. 이렇게 하여 우리는 Fig. 1 에서와 같이 ChBD3의 아미노산서열을 비교해 보았다. 그 결과, group A와 B에 포함시키기 어려운 다른 group (Group x) 이 존재할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이들중, Chi54의 ChtBD3 은 group A와 잘 일치하였고, 6개의 방향족 아미노산인 Trp33, Tyr39, Trp52, Trp56, Trp57, Trp71과 Gly42 및 Pro63이 완전히 conserve되어 있었다. 대부분의 chitinase는 하나 또는 둘의 ChBD를

갖고 있지만, 몇몇 chitinase는 ChBD를 갖지 않거나 PKD 혹은 CBD로 대체되어 있었다. 그리고, 하나의 ChBD는 N- 말단 혹은 C-말단에 위치하고, 두 개의 ChBD가 존재할 경우에는 N- 말단 과 C-말단, 혹은 그들 모두 한쪽 끝에 위치하는 경우도 있었다.

나) catalytic domain (CatD)

Chi54의 CatD는 SMART program에서 family 18 glycosyl hydrolase 로 분류되었다. family 18 glycosyl hydrolase protein들은 (B/A)₈ TIM-barrel의 β-strand들이 잘 conserve되어 있고, bacterial chitinase들은 B7 과 B8 사이에 extra domain을 갖는 subfamily A와 그것을 갖지 않는 subfamily B로 더 분류되는 것으로 보고되었다. 따라서, 우리는 각 β-strand 에 일치하는 아미노산들을 Fig. 2. 에서와 같이 비교해 보았다. 그 결과, subfamily A에 속한 chitinase들은 β7과 β8 사이에 82 -110 아미



FIG. 1. Sequence alignment of the putative ChBD of Chi54 and bacterial chitinases listed in Fig. 3. The sequences were aligned on the basis of CBD_{EGZ} and ChBD_{ChiA1} (row No.1). The gray backgrounds are amino acids well conserved in both of group A and B, and blue backgrounds conserved only in group A or B. The numbers at the left and right of each sequence represent the first and last residue positions in the chitinase, respectively. The row numbers are same as those in FIG. 3. The -1 and -2 in the same numbers indicate the first and second ChBD in the chitinase. The omitted numbers among row No.1-29 indicate that the ChBD are not present or are replaced into another domain.

노산이 포함되어 있었고, subfamily B는 31-50 아미노산이 포함되어 있었다. chitinase의 총 아미노산수는 subfamily A 에서 482 - 1215, subfamily B에서는 344 - 846으로 범위가 매우 다양하였지만, CaTD의 총 아미노산수는 subfamily A 에서

354 to 416, subfamily B 에서 272 - 305 로 범위가 좁았다. 이러한 현상은 짧은 chitinase이건 긴 chitinase이건 하나의 CatD만으로 이루어져 있고, 긴 chitinase들은 CaTD에 더불어 ChtBD, CBD, PKD, Fn3와 같은 다른 domain들이 포함되어 있었기 때문이었다. Chi54는 subfamily A 에 속했고, β 7과 β 8 사이에 90 아미노산이 포함되어 있었다. 아울러, subfamily A 에서 완전히 conserve한 아미노산들은 β 1의 Y (Trp109), β 2의 P (Phe141), β 3의 GGW (Gly 215, Gly216, Trp217), β 4의 DxDxE (Asp269, Asp271, Glu273), β 5의 A (Ala320), β 6의 MxYD (Met346, Tyr348, Asp349), β 7의 GxxxY (Gly404, Tyr408)와 β 8의 GxxxW (Tyr496, Trp496) 이었다. subfamily B의 경우에는 β 1의 G, β 2의 F, β 3의 GG, β 4의 GxDxDxE, β 5의 AP, β 6의 QxYN, β 7의 GxP과 β 8의 GxMxWxNWD이 완전히 conserve되어 있었다.

2) domain의 기능

Chi54의 signal sequence와 ChBD 및 CaTD의 주요 아미노산 부분을 deletion mutagenesis에 의하여 제거하고, *E. coli*에 형질전환시킨 후, chitinase의 생산 및 분비 여부를 조사하였다.

가) signal sequence의 기능

Chi54를 지닌 *E. coli*는 colloidal chitin을 포함한 1/2 LB plate에서 clearing zone을 형성하였지만 signal sequence가 제거되었을 경우에는 clearing zone을 형성하지 못하였다 (Fig. 3-1). 이것은 chitinase가 *E. coli*에서 분비되지 않는다는 것을 뜻한다. 따라서, signal sequence의 제거에 의해서 chitinase가 발현되지 않는 것인지, 발현은 되었지만 분비되지 않는 것인지를 알아보기 위하여 세포질 속의 chitinase 활성을 분석하여 보았다. Fig. 3-2와 Fig. 3-3 에서 보는 바와 같이 세포질에서 추출된 crude enzyme은 모균주에서와 비슷한 단백질 밴드 및 chitin분해 밴드를 보여주었다. 이것은 signal sequence가 제거되더라도 발현은 되었지만 분비되지 않는다는 것을 뜻한다. 한편, chitinase를 분비하지 못하는 *E. coli*는 LB plate위에서 정상적으로 생육하였지만 chitinase를 분비하는 *E. coli*는 정상적인 생육을 하지 못하였다. 이것은

Subfamily A												
	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$				
0.	536	104RHVGSYFAQMS	136FLNYAFQNV	209KVLISLGGWTV	265DGDIDWNEY	316YLTAIGS	341DWINVMTVD	399KLVNIPFYGR	491GGVFSWISLGD501			
1.	899	44YKIVGYPFSA	72HINYAFADI	156KTIISVGGWTV	197DGVLDWNEY	247LLTIASGA	272DWINIMTYD	330KLVLPVPPYGR	428GGAMFWELSGD433			
2.	832	51RKIVGYPFEWA	82HIQYSFAMV	148DLLISVGGWAG	189DGVLDIDFEY	247LLTAAVTA	271DFLSVMSYD	329KILMGIPIYTR	440GGALLVWVWMD450			
3.	831	50LRNVVYGDWS	81HLNFAFMDF	136KIGVSLGGWSK	177DFVLDWNEY	237ELSVLALPA	263DFANIMTYD	317KIVVGAAYTR	439GGMIAMMASQD449			
4.	880	181QRVIGYFQSWR	212HINYAFQHI	274KTLVSVGGWAE	328SVDIDWNEY	386QLTVAAFA	411DFVNMMSYD	475RINLGVPPYTR	623GGVMIVELAGD633			
5.	577	56YRNVGYPFAQWG	88HINYSPGNI	166KVMISLGGWTV	223DGDIDWNEY	274VVLISAFPLP	302DFGSIQGVYD	358QLGLGLAAYGR	445GGGMWELSGD455			
6.	1215	175YRVIVYIISWG	203HVNYAFLLD	243KVLISVGGWTL	284DGDIDWNEY	334LLTAATPA	359DSINIMTYD	417KITVGLPFIYSR	518GGVMIWEITAD528			
7.	700	298RVIGYFQVWG	330HINYAFQNV	408KVLISLGGWTV	460DGDIDWNEY	504LLTVAVGA	529DFINWTVYD	585KMLLGIQYGR	675GGAFVWVWVSGD685			
8.	665	246REVGSYFAQWG	278FINYAFQNI	360KLFISLGGWSW	417DGDIDWNEY	467LLTAAVGA	492DWINIMTYD	558KLLLGIPIYGR	642RGAFAVWVWVSGD652			
9.	633	221RQVGSYFQSGA	253FLNYAFQNI	328SPMISLGGWSW	383DGDIDWNEY	434KLTVAIGA	459DWINVMSYD	519KIVVGIPIYGR	609GGMFSWISLGD619			
10.	820	158RVTVGYPFVWEG	186HILYGFPII	265KILPSVGGWTL	306DGVLDWNEY	357ELTSVAIGA	382DYIFAMTYD	451KLVMGVAMYGR	563AGLFWWEIDAD573			
11.	865	158RVVGAYPVWEG	186HILYGFPII	267KILPSVGGWTL	308DGVLDWNEY	358ELTSVAISA	383DHIFLMSYD	436KIVVGAAMYGR	534GGLFWWEIDAD544			
12.	629	261KVLGYPFTNWG	293HINYAFQNV	354KVLWSFGGWTV	396DGDIDWNEY	436LTVAAVTA	464DWINVMTVD	518KLLLGIQYGR	604GGAFVWVWVSGD614			
13.	563	158RVVGSYPVWEG	186HILYGFPII	267KILPSVGGWTL	308DGVLDWNEY	358ELTSVAISA	383DHIFLMSYD	436KVVVGTAMYGR	534GGLFSWEIDAD544			
14.	491	46KKIIFAVWAGWA	70HINYSPALI	107KVLISVGGWGA	147DGVLDWNEY	197LLTIAGAG	222DWINIMTYD	267KLVIGVGAIFYGR	355GGIMFWVWVWVSGD365			
15.	482	33RRVIGYFAEWN	63HINYAFQKI	115KTLISVGGWTE	156DGVLDWNEY	206LLTAAPA	231DFINIMTYD	288KINWVSPYAA	380GGIMFWVWVWVSGD390			
16.	430	183FKIVGYPFWSQ	206HINYSELLP	242KVGIAISGGWNG	285DGVLDWNEY	320FLTAAVVA	344DFINIMTYD	380KTVLGVPPYGR	---			
17.	499	5KAVIGYFPIPT	46HINFSFLDI	89RIMFSIGSNYY	137DGVLDWNEY	180QLTIAGAG	207DYINIMTYD	284KIVVGVPPYGR	398GGVWVWVWVSGD408			
Subfamily B												
	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$				
18.	311	27GGTAYVWGGNG	53YVNIAPLNK	99KVMLSLGGGIG	146DGDIDWNEY	178YLTAAEQC	202DYVWVQFVYD	239KIFLGLAFAPE	276GGVWVWVWVSGD286			
19.	524	190KRLVIGYWHNFD	117VINVSFAEP	258KVLISMGANG	296DGDIDWNEY	343VLTAAPEP	379TLLHVQHYD	435QIAIVVPAEQG	486KGLMWSVWVSGD496			
20.	846	522HRVIGYWHNFD	550VIDIAPAEV	600VFLVSLGGABG	637DGLVLDWLES	673FLTAAPEH	711DILHVQLYD	766QVAIGLWVSGS	814AGVMTWVWVSGD824			
21.	729	35GVVGVWQWNC	69VINVSFMKV	114SVLLALGGADA	150DGLDIDLEQ	189LTTAAPEF	217DWINVQFVYD	272KLVVFLVSSID	310RGMVWVWVSGD320			
22.	596	283HALVIGYWHNFT	321NGAVSFVTD	351KVLVSLGGQNG	388DGVLDWLES	426YLSMAPEH	462DLTHVQHYD	519QVALGLWVSGS	567RGMVWVWVSGD577			
23.	535	229KQVIGYVHARL	257VINLSFAEP	305KVLISIGGQNG	342DGLDIDPEG	389MLTAAPEP	432SMLQVQDYN	487QIMIGIPANAN	---			
24.	492	43KVLVIGYWHNWK	79VINVSFMKT	119SVLIALGGADA	155DGLDIDLEQ	194MTAAPEF	222DFINPOYYN	278KVFVGLSNNND	316KGLMWSVWVSGD326			
25.	483	27KILMGFVWVWNC	63VVAVAFMKG	100AVLISLGGADA	136DGLDIDLEQ	175VLSMAPEF	203DFIAPPOYYN	263RLAIVGLSNNND	301KGLMWSVWVSGD311			
26.	480	25KILMGFVWVWNC	61VVAVAFMKG	98AVLISLGGADA	134DGLDIDLEQ	173VLSMAPEF	201DFIAPPOYYN	257KVFVGLSNNND	295KGLMWSVWVSGD305			
27.	571	281HAVTVQWQNF	208IIVAVAFADA	353KVLISVGGEGK	390DGVLDIDLEP	421LTTAAPEP	450TVMVWVQYYN	494QVGLGLPASTR	542RGMVWVWVSGD552			
28.	610	277HALVIGYVHASF	305VIDLAFGEP	353KVLISIGGQNG	390DGLDIDPEG	437VLTAAPEP	481TLLHVQDYN	537QVAIVVWVWVSGD594	---			
29.	360	34KLVIGYWHNFD	61VINVSFGET	101KVLVSLGGQNG	138DGDIDWLES	184LLSMAPEP	220TYIHWQHYD	276QVMIWVWVWVSGD328	328RGLMWSVWVSGD338			

FIG. 2. Sequence alignment of the putative catalytic domain of Chi54 and family 18 chitinaases. The sequences were aligned on the basis of the strands $\beta 1$ - $\beta 8$ of ChiB from *S. marcescens* (row. 17), in which red letters indicate the -1 subsites and green letters indicate the +1 subsites. The gray backgrounds are amino acids well conserved in both of subfamily A and B, and the blue conserved only in subfamily A or B. The numbers next to the row numbers represent total amino acids of the protein. The numbers at the left of each sequence represent the residue positions in the protein. Row: 0, Chi54 of *Chromobacterium* sp.; 1, ChiA1 (M57601) of *B. circulans*; 2, ChiA (Q9ZNLO) of *C. parapatricum*; 3, ChiB (O50076) of *C. parapatricum*; 4, ChiA(Q9RMB8) of *Arthrobacter* sp.; 5, ChiB(Q9RE16) of *Arthrobacter* sp.; 6, Pk-chiA (Q9UWR7) of *P. kodakaraensis*; 7, Chi (O30678) of *S. maltophilia*; 8, Chi 69 of *J. lividum*; 9, Chi67(Q9RCG5) of *D. chitinasigens*; 10, ChiA (CHIA ALTSO) of *Alteromonas* sp.; 11, Chi92 (Q9F9Q8) of *A. hydrophila*; 12, ChiC (Q9L8G0) of *S. peucetius*; 13, ChiA(CHIA SERMA) of *S. marcescens*; 14, ChiC (P94289) of *B. circulans*; 15, Chi (Q59326) of *C. thermocellum*; 16, ChiC(O50590) of *Alteromonas* sp.; 17, ChiB(CHIB SERMA) of *S. marcescens*; 18, Hevamine(P23472) of *H. brasiliensis*; 19, ChiD (P27050) of *B. circulans*; 20, ChiA(Q9ZFP7) of *V. cholerae*; 21, ChiA(P96168) of *V. harveyi*; 22, ChiA(Q9Z493) of *Xanthomonas* sp.; 23, ChiIII(Q5914) of *Aeromonas* sp.; 24, ChiA(Q9CE95) of *L. lactis*; 25, ChiC(Q911H5) of *P. aeruginosa*; 26, ChiC(Q9WDX3) of *S. marcescens*; 27, ChiA(Q59924) of *S. lividans*; 28, ChiB(Q9S5K1) of *S. coelicolor*; 29, Chi36 (Q93QD3) of *B. cereus*.

Chi54의 signal sequence가 *E. coli*에서 chitinase를 분비하는데, 중요한 역할을 하지만, 그것이 정상적으로 일어나고 있지는 않다는 것을 나타낸다.

나) chitin-binding domain의 기능

ChD의 주요 아미노산 부위와 역할을 구명하기 위하여, WSNQQT (Chi54-C), AKWWT (Chi54-D), PGADQW (Chi54-E)가 제거된 돌연변이주들을 얻었다. 모든 돌연변이주들은 colloidal chitin을 포함한 1/2 LB plate에서 모균주보다 훨씬 더 작은 clearing zone을 형성하였다 (Fig. 3-1). 그러나, 4-Mu-(GlcNAc)2 에 대한 배양여액의 chitinase 활성은 SDS-PAGE후의 gel에서 모균주와 돌연변이주간에 구별하기 어려웠다. 따라서, 정제된 chitinase를 가지고, soluble 및 insoluble chitin 에 대한 chitinase활성을 비교해 보았다. colloidal 과 crystal chitin에 대한 chitinase 활성은 모균주에 비하여 돌연변이주들 (Chi54-C, Chi54-D, Chi54-E) 에서 감소하였으나,

4-Mu-(GlcNAc)₂ 에 대한 활성은 차이가 없었다. 이것은 ChBD가 insoluble chitin의 분해에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

다) catalytic domain의 기능

Fig. 2 에서 보는바와 같이, *Alteromonas* sp. 0-7의 ChiC 와 *Aeromonas* sp.의 ChiA는 B8의 지역이 결실되어 있는 것으로 분석되었다. 따라서, CaTD의 각 β -strand지역이 catalysis에 절대적으로 필요한지의 여부를 판단하기 위하여, β 3 지역 (ISLGGWTWSKNF, Chi54-F) 및 (GGWTWS, Chi54-G), β 4 (FDGIDIDWE, Chi54-H), β 7 (KLVNGIP, Chi54-I), β 8 (LGGVFSWSLDGD, Chi54-J) 지역이 제거된 돌연변이주들을 선발하였다. 모든 돌연변이주들은 colloidal chitin을 포함한 1/2 LB plate에서 clearing zone을 형성하지 못하였다 (Fig. 3-1). 그들의 세포질로부터 추출된 단백질을 전기영동하였을 때, 모균주에서와 비슷한 단백질 밴드를 나타냈지만 (Fig. 3-2), chitinase활성은 나타내지 않았다 (Fig. 3-3). 이것은 Chi54에서 CaTD의 각 β -strand지역이 catalysis에 절대적으로 필요하다는 것을 나타낸다.

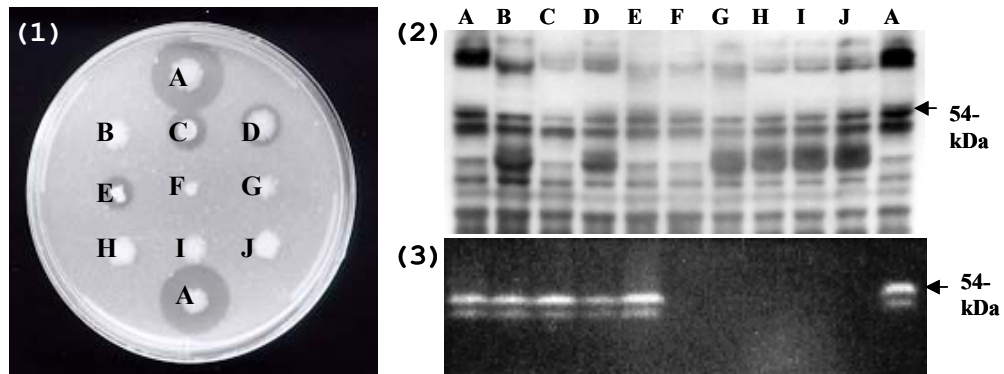


FIG. 3. Clearing zones of colloidal chitin (1) by *E. coli* harboring genes of Chi54 and mutants, and total protein (2) and chitinolytic protein (3) of their cytoplasmic fractions. A; wild-type (Chi54), B; deletion of signal sequence (Chi54-B), C, D and E; deletion of major sites of ChBD (Chi54-C, -D and -E), F and G; deletion of β 3-region (Chi54-F and -G), H, I and J; deletion of β 4 (Chi54-H), β 7 (Chi54-I) and β 8 (Chi54-J), respectively.

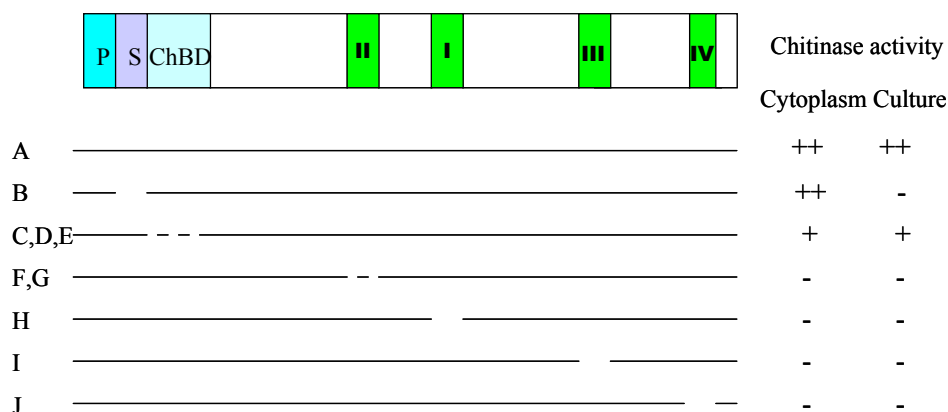


Fig. 4. Structure and function of domains of a *Chromobacterium* sp. chitinase gene.

P; promoter, S; signal sequence, ChBD; chitin-binding domain, I, II, III and IV; β 3, β 4, β 7 and β 8 region of catalytic domain

지금까지 분석된 Chi54 domain의 구조 및 기능에 대한 결론을 Fig. 4에 나타냈다. Chi54의 N-말단부터 promoter, signal sequence, chitin-binding domain 및 catalytic domain에 존재하였는데, signal sequence는 *E. coli*에서 chitinase의 분비에 중요한 역할을 하고, chitin-binding domain은 insoluble chitin의 분해, catalytic domain의 각 β -strand지역은 catalysis에 절대적으로 필요하다는 결론을 얻었다

나. catalytic domain에 필수적인 아미노산

상기에서 CaTD의 각 β -strand지역은 Chi54의 catalysis에 절대적이라는 것이 구명되었기 때문에, 이 연구에서는 각 β -strand지역에서 catalysis에 필수적인 아미노산을 구명하기 위하여 실시되었다. 따라서, 각 β -strand에서 다른 chitinase들과 완전히 conserve한 아미노산과 conserve되어 있지 않은 아미노산들을 Table 1에서와 같이 선정하여 돌연변이시킨 후, chitinase 생산여부를 조사하였다.

다른 chitinase들과 conserve한 아미노산들, 즉, β 3의 S213, G216, W217, β 4의 D271, E273, β 7의 G403, β 8의 G492, S497이 변이 되었을 경우에는 colloidal chitin을 포함한 1/2 LB plate에서 clearing

Table 1. Amino acids of Chi54 replaced by s strain name

β -strand	Amino acid site	Original amino acid
β 3	S213	Ser (TCG)
	G216	Gly (GGC)
	W217	Trp (TGG)
	T218	Thr (ACC)
β 4	I268	Ile (ATC)
	I270	Ile (ATC)
	D271	Asp (GAC)
	E273	Glu (GAA)
β 7	N401	Asn (AAC)
	G403	Gly (GGC)
β 8	G492	Gly (GGG)
	V493	Val (GTG)
	W496	Trp (TGG)
	S497	Ser (TCC)

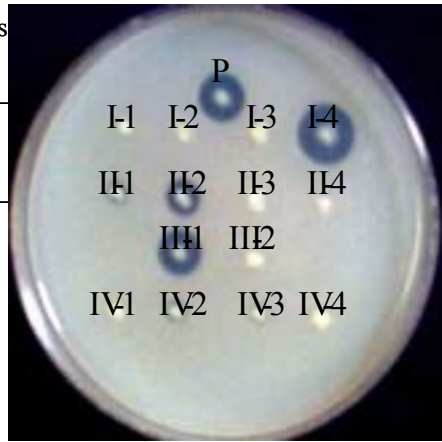


Fig. 5. Chitinolytic ability of *E. coli* harboring Chi54 and mutated Chi54 (I-IV-4) on chitin agar plates

^a The amino acids were replaced using QuikChange site-directed mutagenesis kit and identified by DNA sequencing

zone을 형성하지 못하였다. 반면, conserve되어 있지 않은 β 3의 T218, β 4의 I268, I270, β 7의 N401, β 8의 V493, W496들이 변이 되었을 경우에는 clearing zone을 형성하였다. 그러나, clearing zone의 크기가 T218은 모균주에 비하여 더 크고, N401은 비슷하였으나, I268, I270, V493, W496들은 더 작았다 (Fig. 5).

모균주와 돌연변이주들을 1/2 LB+chitin에서 37°C, 5일 동안 배양후, 그 배양여액에 있는 단백질 농도와 chitinase활성을 비교해 보았다 (Table. 2). 그 결과, clearing zone을 형성하지 못한 S213, G216, W217, D271, E273, G403, G492, S497등의 배양여액에서는 chitinase활성이 검출되지 않고, 단백질농도도 낮은 경향이였다. 반면, clearing zone을 형성한 돌연변이주들의 배양여액 속에 있는 chitinase활성은 clearing zone의 크기와 비슷하고 T218은 모균주에 비하여 더 높고, N401은 비슷하였으며, I268, I270, V493, W496들은 더 낮았다. clearing zone을 형성하지 못한 돌연변이주들은 세포질로부터 추출된 단백질에서도 chitinase활성을 나타내지 않았다. 그러나, clearing zone을 형성한 돌연변이주들은 세포질로부터 추출된 단백질에서 높은

chitinase활성을 나타냈다.

Table 2. Protein concentration and chitinase activity of cytoplasmic fraction and culture supernatant from *E. coli* harboring the *chi54* and the mutagenized *chi54*

Strain	Cytoplasmic fraction ^a		Culture supernatant ^b	
	Protein (mg/ml)	Chitinase (U/ml)	Protein (mg/ml)	Chitinase (U/ml)
Chia	0.452	0.379	0.742	0.353
I-1	0.608	-	0.344	-
I-2	0.651	-	0.385	-
I-3	0.670	-	0.312	-
I-4	0.595	1.092	0.765	0.586
II-1	0.677	0.523	0.268	0.142
II-2	0.483	1.024	0.604	0.272
II-3	0.595	-	0.364	-
II-4	0.561	-	0.279	-
III-1	0.410	0.352	0.760	0.337
III-2	0.673	-	0.494	-
IV-1	0.793	-	0.484	-
IV-2	0.302	0.728	0.373	0.060
IV-3	0.367	0.628	0.453	0.057
IV-4	0.478	-	0.295	-

^aCytoplasmic fraction was extracted from cells cultured for 1 day in TB broth

^b Culture supernatant was obtained from cells for 5 days in ½ LB+chitin broth

다. family 18 catalytic domain을 subfamily A와 B로 분류

bacterial chitinase들은 subfamily A에서 β7 과 β8 사이에 extra domain을 갖

는 것 이외에, $\beta 6$ 의 C-말단지역에 존재하는 MxYD motif이 subfamily B에서는 QxYN로 대체되어 있었다. 이 연구에서는 bacterial chitinase이외에, 다양한 자원으로부터 얻어진 family 18 chitinases를 subfamily A와 B로 분류하여 보았다. 조사된 99 chitinases중에서 subfamily A에 포함될 수 있는 chitinase는 60, subfamily B에 포함될 수 있는 chitinases는 35, 그리고 두 subfamily에 포함되기 어려운 chitinases가 4 존재하였다. 이들중, Archaea, Virus, Nematoda, Insecta, Entamoeba, Crustacea로부터의 chitinases들은 모두 subfamily A에만 포함되었지만, Bacteria, Fungi, Plant로부터의 chitinases들은 subfamily A와 B에 포함되었다. 그러나, bacterial chitinases들의 대부분은 subfamily A에 포함되었고, Plant chitinases들의 대부분은 subfamily B에 포함되었다 (Fig. 6).

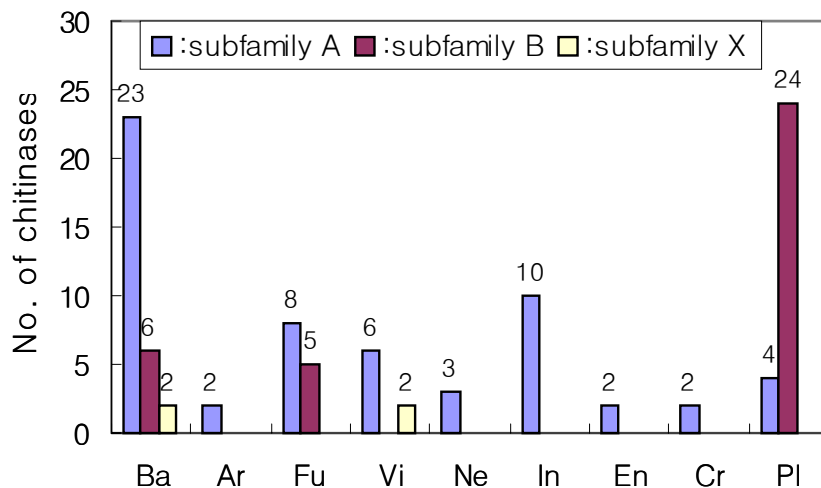


Fig. 6. Number of chitinases belong to subfamily A, B and X of family 18 catalytic domain. Ba; bacteria, Ar; archaea, Fu; fungi, Vi; viruses, Ne; nematoda, In; insecta, En; entamoeba, Cr; crustacea, Pl; plants.

이들 중에서 주요 chitinase의 $\beta 4$ 와 $\beta 6$ 지역에 있는 아미노산을 Fig. 7.에서와 같이 나열해 보았다. 그 결과, subfamily A와 B 모두의 chitinase에서 $\beta 4$ 의 E와 $\beta 6$ 의 Y는 완전히 conserve되어 있었다. 한편, subfamily A의 모든 chitinase는 $\beta 6$ 의 M, D가 완전히 conserve되어 있으나, subfamily B의 경우에는 그 위치에 Q, N이 완

전히 conserve 되어 있었다.

subfamily A와 B 모두에 conserve 되어 있는 아미노산과 subfamily A에만 conserve되어 있는 아미노산들이 catalysis에 어떠한 역할을 하는가를 조사하기 위하여, E는 W (E273W), Y는 D (Y348D), 그리고 M과 D는 Q (M346Q)와 N (D348N),

Origin	EMBL	$\beta 4$	$\beta 6$	$\beta 4$	$\beta 6$
		<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> W Q D N W </div>			
SUBFAMILY A					
Bacteria	Chi54	265	FDGIDIDWE	341	DWINLMTYD
	P11797	136	FDGVDIDWE	207	DYINLMTYD
	P32823	305	YDGVLDIDWE	382	DYIFAMTYD
	Q59326	155	FDGVDIDWE	231	DFINIMTYD
	Q48373	416	FDGIDIDWE	492	DWINLMTYD
	Q43919	307	FDGVDIDWE	383	DHIFLMSYD
	Q9WX42	315	YDGVLDIDWE	394	DYIFAMTYD
	Q9RC65	382	FDGIDIDWE	459	DWINVMSYD
	Q9KED7	191	FDGVVDVWE	267	DWINIMTYD
Archaea	Q9HR84	291	FDGLDIDWE	367	DFLNVMTYD
Fungi	P32470	163	FDGIDIDWE	232	DYINLMAVD
	P48827	163	FDGIDIDWE	232	DYINLMAVD
	O59928	164	FDGIDVDWE	233	DYINLMAVD
	Q9HEQ7	247	LDGIDIDWE	316	DFWNLMAYD
Virus	P41684	297	FDGVDIDWE	374	DKIFLMSYD
	O91465	305	FDGVDIDWE	382	DYIFVMNYD
	Q9WFU7	308	FDGIDIDWE	399	DKIFVMSYD
Nematoda	Q11174	169	FDGIDIDWE	240	DFILLMSYD
	Q25615	139	FDGFDFDWE	206	DLLSLMSYD
Insecta	P36362	138	FDGLDLDWE	208	DAIHVMSYD
	Q9W5U3	256	FDGLDLDWE	327	SWISVMAYD
	O01935	150	FDGLDLDWE	216	DSMHIMCYD
	Q97403	142	FDGFEDDWE	210	DMINVMVYD
	Q9GV05	139	FDGLDLDWE	209	DAIHVMSYD
Entamoeba	P90546	266	LDGIDIDWE	339	DWINLMTYD
Crustacea	P91773	264	FDGLDLDWE	334	DWIAVMTYD
Plant	Q43576	132	FHGLDLDWE	201	DWINLMAVD
SUBFAMILY B					
Bacteria	Q9ZFP7	636	FDGLVDLDE	711	DILHVOLYN
	P27050	295	FNGLDIDLE	379	TLLHVOHYN
Fungi	P29029	149	VDGFDFDIE	207	DFAFIOFYN
	D87895	167	VDGFDFDIE	226	DFWVVOFYN
Plant	Q9ZSR4	143	LDGIDFDIE	200	DYIFVOFYN
	Q9S9F7	119	LDGIDFDIE	176	DFVWVOFYN
	P23472	145	LDGIDFDIE	202	DYVWVOFYN
	Q9SP41	146	LDGIDFDIE	203	DYVWVOFYN
	Q43098	144	LDGVDFDIE	200	DYVWVOFYN
	P36908	142	LDGIDFDIE	196	DYVWVOFYN
	Q9XF93	144	LDGVDFDIE	202	DNVWVOFYN
	P17541	145	LDGVDFDIE	197	DSVWVOFYN
	P29024	144	LDGVDFDIE	202	DIVWVOFYN
	P07254	307	FDGVDIDWE	383	DHIFLMSYD
	P20533	196	FDGVLDLWE	272	DWINIMTYD
	O50076	176	MDFVLDLWE	263	DFANIMTYD
	O30678	459	FDGIDIDWE	529	DFINVMTYD
	P97034	307	FDGVDIDWE	383	DHIFLMSYD
	Q48494	196	FDGVLDLWE	272	DWINIMTYD
	Q9RMB8	327	FSGVDIDYE	411	DFVNMSYD
	Q9L5D5	307	FDGVDIDWE	383	DYIFLMSYD
	Q9EY44	345	FDGIDVDWE	406	SWIMPMTYD
	Q9UWR7	283	LDGIDIDWE	359	DSINIMTYD
	P54196	162	FDGIDIDWE	232	DFWNLMAYD
	O43111	164	FDGIDVDWE	235	DYINLMAVD
	Q92270	145	LDGLDIDWE	216	DLFYLMAYD
	Q9HEQ6	143	FDGVDIDWE	203	TFWNLMCYD
	O10621	306	FDGIDIDWE	383	DKIFVMSYD
	Q9YMQ7	299	FDGLVDVWE	376	DRIFLMSYD
	P29030	140	FDGFDLDWE	207	DLLFLMSYD
	O17411	136	FDGFDLDWE	206	DAIHCMTYD
	P91731	139	FDGLDLDWE	209	DAIHVMSYD
	Q23737	137	FDGFDFDWE	203	DFINLMTYD
	Q9GV44	139	FDGLDLDWE	209	DAIHVMSYD
	P90547	272	LDGIDIDWE	346	DWINLMTYD
	Q9Y0D4	157	FDGLDLDWE	227	DAIHLMTYD
	O81862	132	FHGLDLDWE	201	DWVNLMAVD
	Q9Z493	387	FDGVDIDLE	462	DLIHVOFYN
	P96168	149	FDGLDIDLE	217	DWINPOFYN
	P54197	167	VDGFDFDIE	226	DFIFIOFYN
	Q9SQI0	139	LDGADFDFIE	192	DFVWVOFYN
	P29061	143	LDGIDFDIE	199	DYVWVOFYN
	P51614	144	LDGIDFDIE	204	DYVWVOFYN
	Q9XHC3	140	LDGIDFDIE	196	DYVWVOFYN
	Q9SXM5	144	LDGIDFDIE	200	DYVWVOFYN
	O49876	140	LDGIDFDIE	196	DYVWVOFYN
	O22080	145	LDGVDFDIE	204	DSVWVOFYN
	P36910	143	LDGIDFDIE	200	DYVWVOFYN
	Q41401	141	LDGIDFDIE	198	DYVVOFYN

Fig. 7. Alignment of the 4th and 6th β -strand regions composing the catalytic (β/α)₈ barrel domains of some family 18 chitinases and target amino acids for site-directed mutagenesis in a *Chromobacterium* sp. chitinase 54 (Chi54). The family 18 chitinases were obtained from the protein data bank and literature. The highly conserved amino acids in both of subfamily A and B are indicated by a gray backgrounds. The blue and green backgrounds are conserved only in subfamily A and B, respectively.

W (D348W)로 돌연변이시켰다. Fig. 8에서 보는바와 같이, 모균주 (Chi54)는 colloidal chitin을 포함한 1/2 LB plate에서 clearing zone을 크게 형성하였지만, 돌연변이주인 E273W, Y348D, D348W들은 전혀 형성하지 못하고, M346Q와 D348N은 아주 작게 형성하였다. 이것은 돌연변이주들이 chitinase를 세포밖으로 거의 분비하지

않았다는 것을 나타낸다.

이렇게하여, 모균주와 돌연변이주들의 세포내에 있는 단백질과 배양여액에 있는 단백질을 전기영동하여 보았다. 그 결과, 세포내에서는 clearing zone을 전혀 생성하지 못한 돌연변이주 (E273W, Y348D, D348W) 나 작게 형성한 돌연변이주(M346Q와 D348N)들 모두, 모균주(Chi54)에서와 비슷한 단백질 밴드를 나타냈다 (Fig. 9A). 반면, 배양여액의 경우, clearing zone을 작게 형성한 돌연변이주는 모균주에서와 비슷한 단백질밴드를 보여주었지만, clearing zone을 전혀 생성하지 못한 돌연변이주들은 그 밴드를 나타내지 않았다 (Fig. 9 C). 모균주에서와 비슷한 밴드가 전기영동상에서 chitinase 활성을 지닌가를 조사하여 보았는데, clearing zone을 전혀 생성하지 못한 돌연변이주들은 chitinase활성을 전혀 갖지 않았고, clearing zone을 작게 형성한 돌연변이주는 chitinase활성을 나타냈다. 그러나, M346Q의 chitinase활성은 D348N와 모균주에 비하여 낮다는 것을 알 수 있었다.

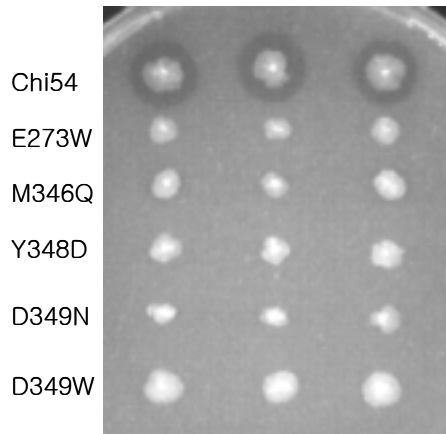


Fig. 8. Clear zones formed by a wild-type (Chi54) and mutants (E273W, M346Q, Y348D, D349N, D349W) on 1/2 LB plates containing colloidal chitin

모균주와 돌연변이주들을 1/2 LB+chitin배지에서 5일 동안 배양시킨 후, 배양여액을 ammonium sulfate으로 침전시켜, 동일 단백질 농도에서 4-MU-(GlcNAc)₂, colloidal chitin, crystal chitin에 대한 chitinase활성을 조사하였다. 그 결과, clearing zone을 전혀 생성하지 못한 돌연변이주 (E273W, Y348D, D348W) 들은 모든 기질에 대하여 chitinase활성을 나타내지 않았고, clearing zone을 작게 형성한 돌연변이주들 (M346Q, D349N)은 chitinase활성을 나타냈다. 그러나, 4-MU-(GlcNAc)₂에 대하여 D349N은 모균주에 비하여 약 1/2의 활성을 나타냈으나, M346Q는 1/40의 활성을 나타내고, colloidal chitin과 crystal chitin에 대해서는 D349N가 1/100의 활성, M346Q

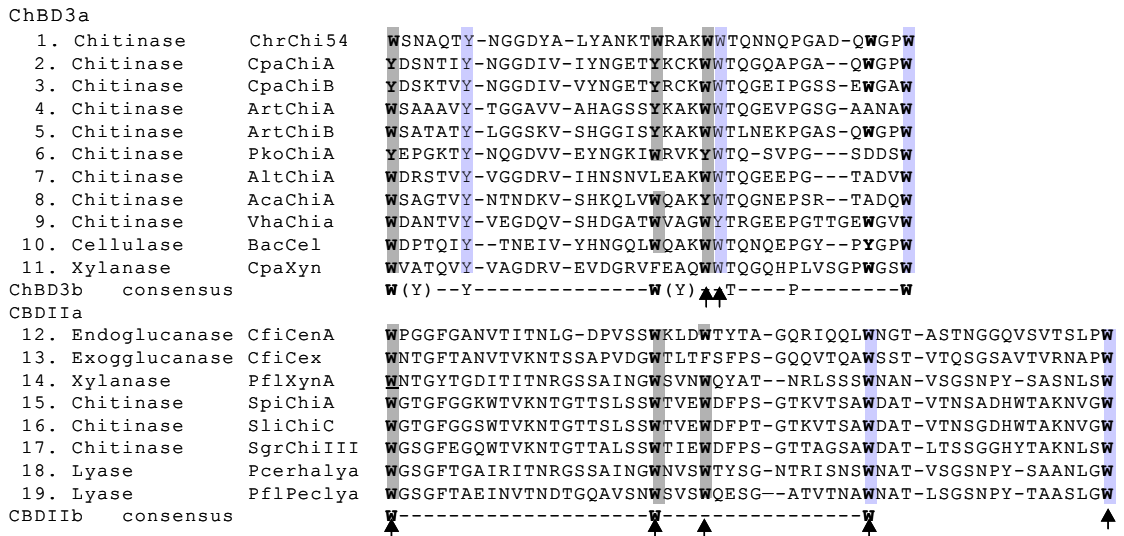


Fig. 1. Comparison of ChBD3 with CBDII. The arrows indicate the tryptophan residues shown to be essential for substrate-binding. The gray backgrounds are aromatic amino acids well conserved in both of ChBD3a and CBDIIa, and blue backgrounds conserved only in ChBD3a or CBDIIa. Row: 1, *Chromobacterium* sp; 2, *C. paraputrificum* (Q9ZNLO); 3, *C. paraputrificum* (O50076); 4, *Arthrobacter* sp. (Q9RMB8); 5, *Arthrobacter* sp.(Q9RE16); 6, *P. kodakaraensis* (Q9UWR7); 7, *Alteromonas* sp. (CHIA ALTSO); 8, *A. caviae* (Q43919); 9, *V. harveyi* (P96168); 10, *Bacillus* sp. (M14781); 11, *C. pachnodae* (AF120157); 12, *C. fimi*; 13, *C. fimi*; 14, *P. fluorescens* subsp. *cellulosa*; 15, *S. plicatus*; 16, *S. lividans*; 17, *S. griseus*; 18, *P. fluorescens* subsp. *cellulosa*; 19, *P. fluorescens* subsp. *cellulosa*.

결합능력과 chitinase활성의 증가여부를 조사하였다.

1) ChBD3a와 CBDII의 아미노산 서열 비교

SMARTdata bank에 있는 ChBD3a는 40-60 아미노산으로 이루어져 있고, CBDIIa는 90-110 아미노산으로 이루어져 있었다. 우리는 이들 domain중에서 중요지역만 Fig. 1. 에서처럼 비교해 보았다. ChBD3a에서 6개의 방향족 아미노산인, W(Y), Y, W(Y), W(Y)W(Y), W가 conserve되어 있었고, CBDIIa에서는 5개의 방향족 아미노산인, W, W, W, W, W가 conserve되어 있었다. 이들 아미노산중에서 3개의 방향족 아미노산이 ChBD3a와 CBDIIa 모두에 conserve되어 있었지만, 그 나머지 방향족 아미노산은 서로 conserve되어 있지 않았다. 현재, ChBD3a의 3차원구조는 보고되지 않았지만, ChBD3a 에 포함될 것으로 제시된 *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase Z (CBDEgz) 의 구조는 보고되었고, CBDIIa에 속한 *Cellulomonas fimi*

endoglucanase A (CBDCenA) 와 endoglucanase (CBDCex)의 3차원 구조도 보고되었다. 3차원 구조도 ChBD3a와 CBDIIa 사이에는 서로 상이 한 것으로 분석되었다. 반면, ChBD3a는 chitinase이외에 cellulase와 xylanase에서 발견되고, 거꾸로 CBDIIa는 cellulase (endoglucanase)와 xylanase이외에 chitinase에서도 발견되었다. 따라서, 우리는 ChBD3a와 CBDIIa의 구조는 서로 다르지만, 비슷한 기능을 가지고 있을 것으로 생각되었다.

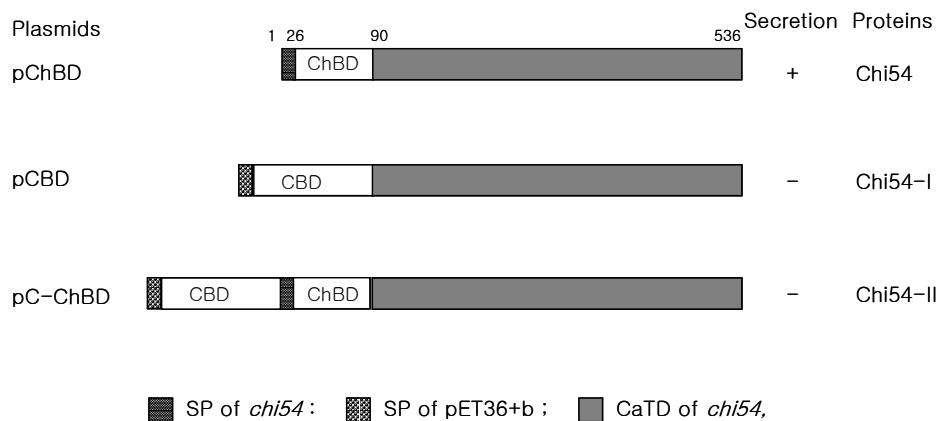


Fig. 2. Domain structures of wild type (Chi54) and derivative recombinant proteins (Chi54-I, Chi54-II) used in this study. The pCBD and pC-ChBD were obtained by ligation of CBD in pET36+b with pCaTD and pChBD, respectively. The numbers refer to the positions of amino acids. Abbreviations: SP, signal peptide; ChBD, chitin-binding domain; CBD, cellulose-binding domain; CaTD, catalytic domain.

2) Chi54의 ChBD3a에 CBDIIa의 대체 및 첨가

Fig. 2에서 처럼, pBK-CMV 벡터에 구축된 Chi54 유전자 (*chi54*)는 N-말단쪽부터 signal sequence, ChBD, catalytic domain (CatD)로 이루어져 있다. 이 plasmid를 pCHBD, 단백질을 Chi54로 명명하였다. CBDIIa로는 pET-36(+) 벡터에 구축된 *Cellulomonas fimi* endoglucanase A의 CBD(CBDCenA)를 이용하였다. 즉 pET-36(+) 벡터의 CBD뒤에 Chi54의 CatD를 구축하여, ChBD를 CBD로 대체하고, plasmid를 pCBD, 단백질을 Chi54-I로 명명하였다. CBD와 ChBD의 double domain은 pET-36(+) 벡터의 CBD뒤에 Chi54의 ChBD와 CatD를 구축하여 만들어 졌는데, 이

plasmid를 PC-CBD, 단백질을 Chi54-II로 명명하였다.

3) 형질전환 *E. coli*의 chitinase생산 능력

재조합된 plasmid들을 *E. coli*에 형질전환시켰을 경우, Chi54는 배양여액으로 분비되었으나, Chi54-I과 Chi54-II는 분비되지 못하고 세포질 속에 존재하였다. 따라서 형질전환 균주들을 LB와 TB에서 3시간 배양 후, IPTG를 첨가하고 1시간에서 5시간까지 더 배양 후, cytoplasm, periplasm 및 배양여액에 있는 단백질 농도와 chitinase활성을 조사하였다. 그 결과, LB 보다는 TB배지, 그리고 cytoplasm에서 높은 chitinase활성을 나타냈는데, IPTG의 첨가는 큰 영향을 미치지 못하였다.

따라서, TB배지에 접종하고 37 C에서 배양하여 cytoplasm내의 chitinase활성을 조사하였는데, 모균주 (Chi54) 와 재조합 균주 (Chi54-I 과 Chi54-II) 모두 배양 24시간째에 가장 높은 활성을 나타내고, 그 이후에는 활성이 오히려 감소하였다 (Fig. 3).

4) chitinase의 분리, 정제 및 특성

TB배지에서 배양 24시간 후, cytoplasm으로부터 효소를 추출, ammonium sulfate으로 농축 및 투석 후, Rotofor cell (Bio-Rad, USA)에서 정제하여 SDS-PAGE를 하였다. 그 결과 (Fig. 4), ChBD를 지닌 chitinase (Chi54)는 약 54-kDa, CBD를 지닌 chitinase (Chi54-I)는 57-kDa, ChBD와 CBD를 지닌 chitinase (Chi54-II)는 60-kDa의 분자량을 나타냈고, 그들 모두 chitin분해 활성을 나타냈다. 이들은 모두 염기서열에 의해서 환산된 분자량과 거의 일치하였다. 한편, 53-kDa의 분자량을 지닌 chitinase가 모든 조합에서 나타났는데, 이들은 생산된 chitinase의 특정지역이 분해되어 나온 것으로 생각된다.

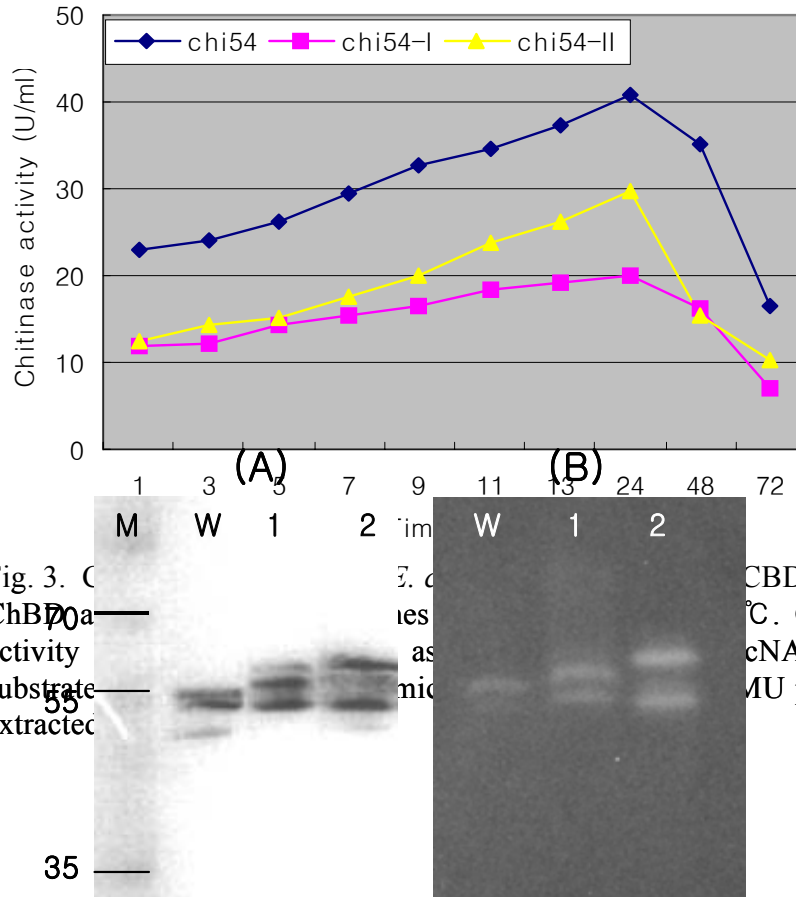


Fig. 3. Chitinase activity of Chi54, Chi54-I, and Chi54-II. The activity was measured using 4-MU-(GlcNAc)₂ as a substrate. The activity was expressed as U/ml of extract. (A) Chitinase activity (U/ml) over time. (B) SDS-PAGE analysis of Chi54 (W), Chi54-I (1), and Chi54-II (2) showing their chitinolytic bands. Molecular weight markers are indicated on the left.

Fig. 4. Protein (A) of Chi54 (W), Chi54-I (1) and Chi54-II (2), and their chitinolytic bands (B)

5) chitinase 활성 및 기질 결합 능력의 비교

4-MU-(GlcNAc)₂, colloidal chitin 및 crystal chitin에 대한 정제된 chitinase들의 활성을 비교하였다. 여기에서 Chi54의 활성을 100으로 하였을 경우, Chi54-I의 활성은 93-96%로서 Chi54와 비슷한 경향을 나타냈고, Chi54-II의 활성은 136-157로서 Chi54보다 1.5 배정도 더 높았다 (Table 1),

한편, 기질인 chitin과 cellulose에 대한 결합능력을 비교하기 위해서 Chi54의 cytoplasm으로부터 추출된 단백질을 기질에 결합시킨 후, 결합되지 않은 단백질과

결합된 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 (Fig. 5A), chitinase 만 기질에 결합하고 다른 단백질들은 결합되지 않는다는 것을 알 수 있었다. 특히, Chi54는 cellulose보다 chitin에 더 잘 결합할 것처럼 보였다.

따라서, 이들의 양적 결합능력을 보기 위해서, 정제된 Chi54, Chi54-I, Chi54-II와 대조구로 BSA를 chitin과 cellulose에 결합시킨 후, 결합되지 않은 단백질 농도를 조사하였다. 그 결과(Fig. 5B), Chi54와 Chi54-I 모두 chitin과 cellulose에 결합하고, 그 결합능력은 Chi54와 Chi54-I, 그리고 chitin과 cellulose 사이에 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편, Chi54-II는 Chi54와 Chi54-I 보다 chitin과 cellulose모두에 더 잘 결합하는 것으로 나타났다.

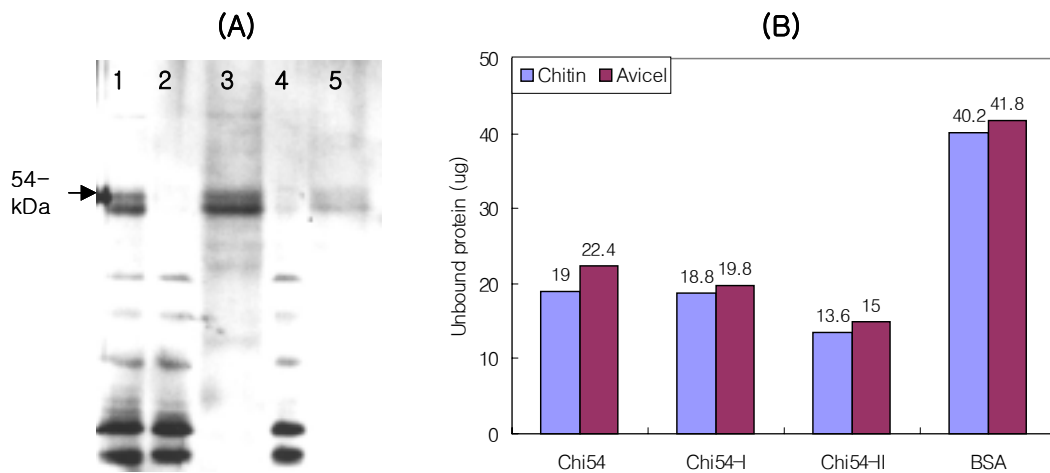


Fig. 5. Binding capacity of Chi54, Chi54-I and Chi54-II toward crystal chitin and cellulose (Avicel). (A) qualitative binding of crude Chi54, lane 1; proteins from cytoplasm, 2 and 3; proteins unbound and bound in chitin, respectively, 4 and 5; proteins unbound and bound in cellulose, respectively. (B) quantitative binding of purified Chi54, Chi54-I and Chi54-II. The purified protein (50 μ g) was incubated with chitin or cellulose of 12.5mg for 1h on ice, and then the amount of protein in the supernatant (unbound protein) is shown.

Table 1. Relative activity of purified Chi54 and recombinant proteins.

Chitinase	Relative activity		
	4-MU	colloidal	crystal
Chi54	100.0	100.0	100.0
Chi54-I	95.9	93.3	96.2
Chi54-II	145.5	169.5	151.5

다. catalytic domain의 첨가에 의한 chitinase활성의 증가 여부

상기의 결과에서, 하나의 substrate-binding domain보다 두 개의 domain이 결합되었을 경우 기질 결합 능력과 chitinase활성이 더 증가된다는 결론을 얻었다. 따라서, 이 연구에서는 하나의 substrate-binding domain에 두 개의 catalytic domain이 있을 경우에는 어떤 현상이 일어날 것인가를 알아보기 위하여, *Chromobacterium* sp. strain C-61의 chitinase유전자 (*Chr-chia*) 에 *Trichoderma harzianum* chitinase 유전자 (*Thr-chia*) 의 catalytic domain (CatD)부위를 구축하여 chitinase활성의 증가 여부를 조사하였다.

1) *Chr-chia* 와 *Thr-chia* 의 비교

Chromobacterium sp. chitinase 유전자 (*Chr-chia*)를 pBK-CMV에 구축하여 *E. coli*에 형질전환시켰을 경우에는 chitinase를 세포밖으로 분비하였으나, *Trichoderma harzianum* 의 chitinase유전자 (*Thr-chia*) 를 pET27b(+) 에 구축하여 *E. coli*에서 형질전환시켰을 경우에는 chitinase가 periplasm에 존재하였다. 한편 이들의 domain을 분석하였을 경우, *Thr-chia* 에는 chitin-binding domain이 존재하지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1).

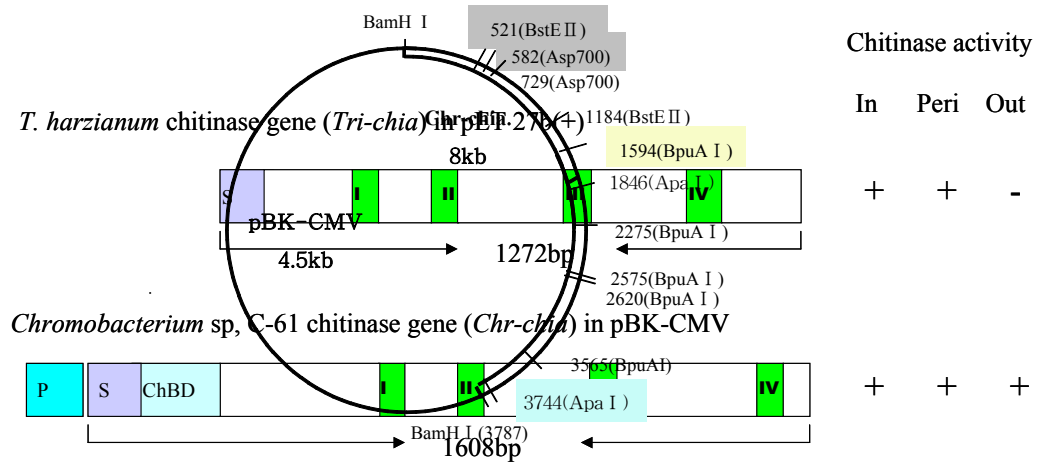


Fig. 1. Domains of *T. harzianum* and *Chromobacterium* sp. C-61 chitinase gene constructed in pBK-CMV
 P; promoter, S; signal sequence, ChBD; chitin-binding domain, I, II, III and IV; active site I, II, III and IV in the catalytic domain.

2) *Thr-chia* 의 catalytic domain을 구축하기 위한 벡터의 특성

*Chrchia*의 ChBD와 CatD의 B3-strand 사이에 있는 3종류의 DNA단편 (108-135 amino acids, 108-167 amino acids, 108-197 amino acids)중, 108-135의 아미노산이 제거되었을 경우에는 chitinase활성에 변화를 나타내지 않았다. 또한, B8-strand 뒤에 있는 *BpuAI* site (1594 bps) 이후의 DNA 단편이 제거되었을 경우에도 chitinase활성에 변화를 나타내지 않았다. 한편, *Chr-chia*에는 521과 1184bp에 *BstEII* site, 582와 729bp에 *Asp700* site, 1594, 2275, 2575, 2620, 3565bp에 *BpuAI* site, 1846과 3744bp에 *ApaI* site 가 있었다 (Fig. 1).

3) 벡터와 insert DNA의 조제

*Chrchia*의 ChBD 뒤에 catalytic domain을 구축하기 위한 벡터는 *BstEII* 과 *ApaI*, *Asp700* 과 *ApaI* 으로 절단 후, gel로부터 추출하였고, *Chrchia*의 catalytic domain 뒤에 catalytic domain을 구축하기 위한 벡터는 *BpuAI*과 *ApaI* 으로 절단 후, gel로부터 추출하여 이용하였다. 한편, pET-27벡터에 구축된 *Thr-chia* (cDNA)로부터 PCR에 의해서 catalytic domain을 분리하였는데, *Chrchia*의ChBD 뒤에 구축하기 위한 catalytic domain은 5' 말단에 *BstEII* site을 만들기 위한 primer와 *Asp700* site을 만들기 위한 primer, 그리고 3'말단에 *ApaI* site을 만들기 위한 primer1 및 primer2 를 합성하여 PCR에 의해서 분리하고 PCR clean kit에 의해서 정제하여 *BstEII*와 *ApaI*, *Asp700*과 *ApaI* 으로 절단 후 gel로부터 추출하였다. 또한 *Chrchia*의 catalytic domain 뒤에 구축하기 위한 catalytic domain은 5'말단에 *BpuAI* site을 만들기 위한 primer I 및 primer II, 그리고 3' 말단에 *ApaI* site을 만들기 위한 primer1 및 primer2 를 합성하여 PCR에 의해서 *Thr-chia*의 catalytic domain을 분리하고 PCR clean kit에 의해서 정제하여 *BpuAI*과 *ApaI*으로 절단 후 gel로부터 추출하여 이용하였다 (Fig. 3).

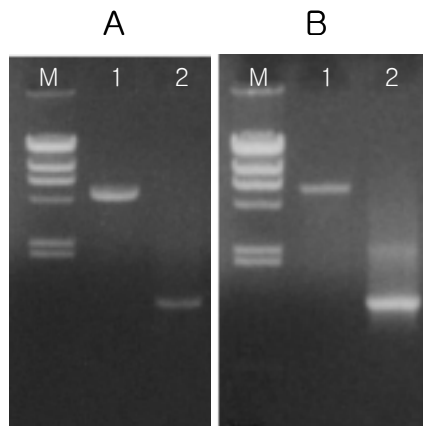


Fig. 3. Vector and insert DNA digested with *BstEII* and *ApaI* (A), *BpuAI* and *ApaI* (B). A1; pBK-CMV harboring signal sequence and ChBD of *Chr-chia*, A2; catalytic domain of *Tri-chia* amplified by PCR, B1; pBK-CMV harboring signal sequence, ChBD and catalytic domain of *Chr-chia*, B2; catalytic domain of *Tri-chia* amplified by PCR.

4) 형질전환 *E. coli*의 선발 및 catalytic domain의 도입 확인

gel로부터 추출된 vector DNA와 insert DNA를 ligation하여 *E. coli* (XL1Blue)에 형질전환시킨후 kanamycin이 첨가된 LB배지에서 선발하고, colony PCR에 의해서 *Chr-chia*의 catalytic domain을 함유한 균주를 선발하였다 (Fig. 4A). 선발된 균주들부터 플라스미드를 분리, 정제하여 제한효소로 절단, 전기영동에 의해서 *Chr-chia*에 *Thr-chia*의 catalytic domain이 도입되었음을 확인하였다(Fig. 4B).

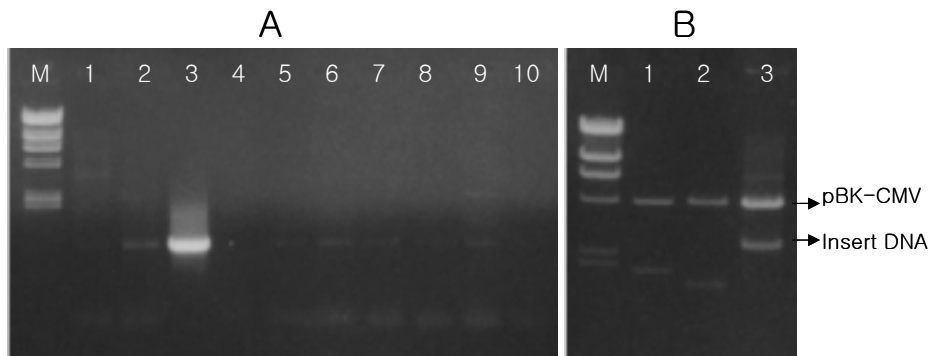


Fig. 4. Selection of the positive transformants (lane 3) by colony PCR (A) and identification of the insert DNA by physical restriction map (B). B1; an intact *Chr-chia* in pBK-CMV, B2; a chimeric gene consisting of signal sequence, ChBD of *Chr-chia* and catalytic domain of *Tri-chia* in pBK-CMV, B3; a chimeric gene consisting of signal sequence, ChBD, catalytic domain of *Chr-chia* and catalytic domain of *Tri-chia* in pBK-CMV.

5) 형질전환 *E. coli*의 chitinase생산

균주들을 TB에서 1일 배양하여 cytoplasm으로부터의 효소와 1/2 LB+colloidal chitin에서 5일 배양 후, 그 배양여액의 chitinase활성을 조사하였다. 그 결과 (Table 1). *Chr-chia*의 ChBD뒤에 *Thr-chia*의 catalytic domain이 구축되었을 경우 (ChBD+cata)에는 *Chr-chia* 에서와 비슷한 활성을 나타냈지만. *Chr-chia*의 catalytic domain뒤에 *Thr-chia*의 catalytic domain이 구축되었을 경우(cata+cata)에는 chitinase 활성이 오히려 감소하였다.

Table 1. Protein concentration and chitinase activity of cytoplasmic fraction and culture supernatant from *E. coli* harboring *Chr-chia* and chimeric gene

Gene ^c	Cytoplasmic fraction ^a		Culture supernatant ^b	
	Protein (mg/ml)	Chitinase (U/ml)	Protein (mg/ml)	Chitinase (U/ml)
<i>Chr-chia</i>	4.98	163	0.392	356
ChBD+CaTA	4.32	157	0.435	337
CaTA+CaTA	4.08	35	0.376	-

^a Cytoplasmic fraction was extracted from cells cultured for 1day in TB broth

^b Culture supernatant was obtained from cells cultured for 5 days in 1/2 LB+chitin broth

^c *Chr-chia*; parental chitinase gene of *Chromobacterium* sp., ChBD+CaTA; ChBD of *Chr-chia* and catalytic domain of *Trichoderma harzianum* chitinase gene (*Tri-chia*); CaTA+CaTA; parental *Chr-chia* and catalytic domain of *Tri-chia*

6) 형
질 전 환
E. coli
가 생산

한 chitinase의 활성 및 특성

형질전환 *E. coli*가 생산한 chimeric chitinase 의 염기서열에 의한 예상된 분자량과 pI값을 계산한 결과 (Table 2), *Chromobacterium* sp. 의 chitinase (*Chr-chia*) 는 약 55 kDa의 분자량과 8.54의 pI값, 그리고 *Trichoderma harzianum*의 chitinase (*Thr-chia*) 는 약 43 kDa의 분자량과 4.91의 pI값을 나타낼 것으로 계산되었고, 실험에서도 비슷한 값을 나타냈다. 이에 반하여 *Chr-chia*의 ChBD뒤에 *Thr-chia*의 catalytic domain을 구축하였을 경우에는 약 53 kDa의 분자량과 5.06의 pI값, 그리고 *Chr-chia*의 catalytic domain뒤에 *Thr-chia*의 catalytic domain을 구축하였을 경우에는 약 95 kDa의 분자량과 5.48의 pI값을 나타낼 것으로 계산되었다. 이들의 분자량을 확인하기 위하여, SDS-PAGE를 실시 (Fig. 5) 하였는데, 비슷한 크기의 분자량을 보여주었다.

Table 2. Putative molecular weight and pI value of chimeric chitinase gene

Gene ^{ab}	Mw ^b	pI ^b
Chr-chia	54974.12	8.54
ChBD+CaTA	53120.72	5.11
CaTA+CaTA	95145.48	5.48
Tri-chia	42744.26	4.91

^aChr-chia; parental chitinase gene of *Chromobacterium* sp., ChBD+CaTA; ChBD of Chr-chia and catalytic domain of Tri-chia, CaTA+ CaTA; catalytic domain of Chr-chia and catalytic domain of Tri-chia, Tri-chia; parental chitinase gene of *T. harzianum*

^bCalculated by computer program

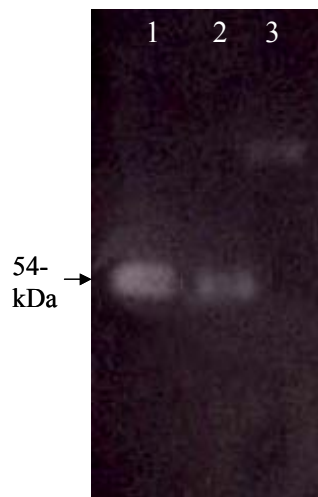


Fig. 5. Chitinolytic bands of cytoplasmic fraction or culture supernatant from *E. coli* harboring *Chr-chia* and chimeric gene. 1;Chr-chia, 2; ChBD+CaTA, 3; CaTA+CaTA, 1 and 2; crude enzyme extracted from supernatants cultured for 5 days in 1/2 LB+ chitin, 3; crude enzyme extracted from cells cultured for 1day in TB broth

라. Site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 의 활성 증가

Chi54의 catalysis에 필수적인 아미노산을 구명하는 과정에서, catalytic domain $\beta 3$ 지역의 Thr (T218) 을 Ser로 대체 함으로서 chitinase활성이 증가됨을 발견하였다. 따라서, 이 연구에서는 그 원인을 구명하기 위하여, 1) family 18 catalytic domain에서 Thr (T218) 에 일치하는 아미노산을 비교, 분석하고, 2) Thr (T218)을 일치하는 아미노산들로 돌연변이시킨 후, 3) 배양기간에 따른 chitinase의 생산능력과 4) 정제된 chitinase의 활성을 비교하였다.

1) family 18 catalytic domain에서 돌연변이 될 아미노산의 비교, 분석

Chi54의 T218에 일치하는 아미노산을 subfamily A에 속한 여러 chitinase들과

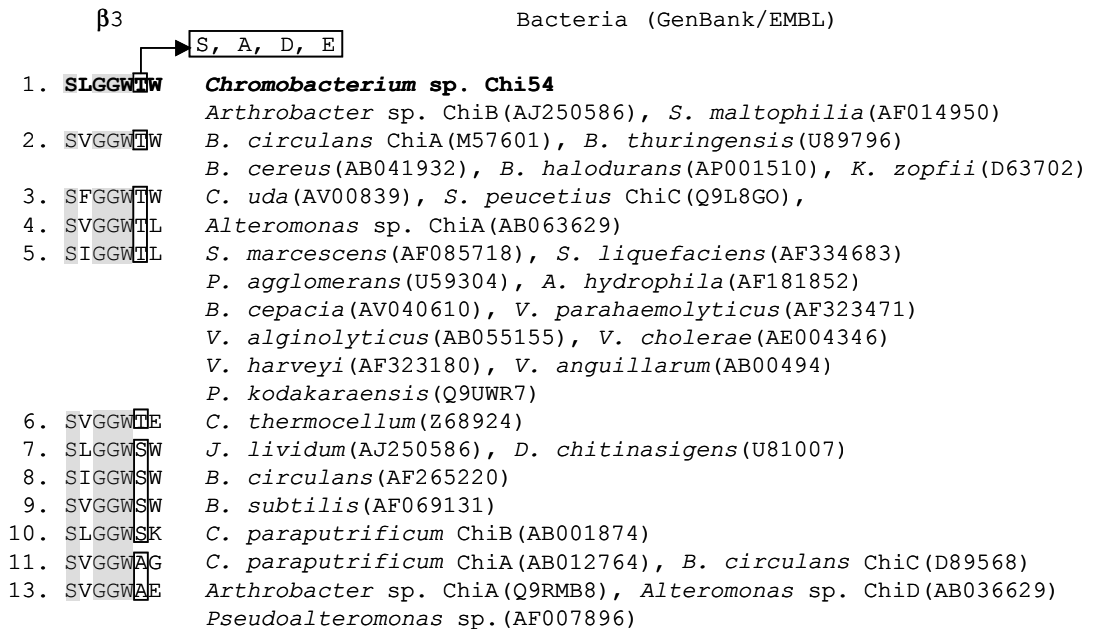


Fig. 1. Target amino acid for site-directed mutagenesis in a *Chromobacterium* sp. chitinase 54 (Chi54) and its comparison with those of other chitinases. The sequences are C-terminal regions of $\beta 3$ -strands in catalytic domains

비교, 분석하여 본 결과 (Fig. 1), 32개의 chitinase중에서, 대부분의 chitinase 는 Thr (22개) 로 이루어져 있었고, 일부의 chitinase는 Ser (5개) 혹은 Ala (5개)로 이루어져 있었다. 한편, subfamily B에 속한 일부 chitinase에서는 Asp 혹은 Glu로 이루어져 있었다.

2) Site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 생산능력의 변화

Chi54의 T218을 Ser (T218S), Ala (T218A), Asp (T218D) 및 Glu (T218E)로 대체하였을 경우, T218S는 colloidal chitin을 함유한 1/2 LB 배지에서 모균주 (Chi54)에 비하여 더 큰 clearing zone을 형성하였다. 반면, T218A의 clearing zone은 모균주에 비하여 더 작고, T218E, T218D의 순서로 더 작았다 (Fig. 2A).

배양기간에 따른 모균주와 돌연변이주들의 chitinase 생산능력을 비교해보기 위해서, 1/2 LB+chitin배지에서 37 C 배양하여 매일 배양여액의 chitinase 활성을 측정하였다. 그 결과, T218S는 배양 5일후에 최고의 chitinase활성을 나타내고, 7일 이후에 감소하였는데, 모균주는 6일에 최고의 활성을 나타내고, 그 이후 감소하는 경향이있다. 한편, T218A는 7일후, T218D와 T218E는 9일에 최고의 활성을 나타냈고 이후 10일까지 크게 감소하지 않았다 (Fig. 2B).

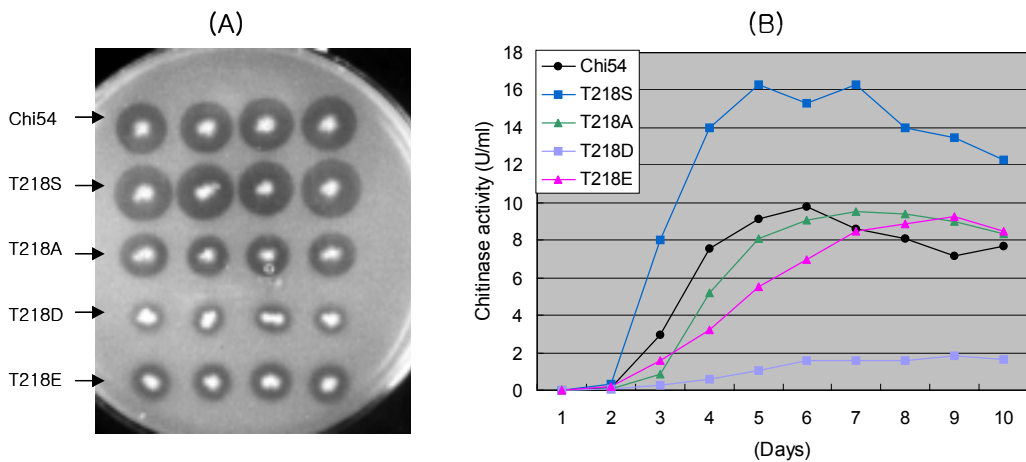


Fig. 2. Clear zones (A) and chitinase production (B) by wild-type (Chi54) and mutants (T218-S,A,D,E). After cultured for various days at 37°C in 1/2 LB+chitin, chitinase activity of the culture supernatants was assayed using 4-MU-(GlcNAc)₂ and was expressed as micromoles of liberated 4-MU per ml of culture supernatant per minute.

각 균주에서 최고의 chitinase활성을 나타낸 배양여액의 단백질 농도와 chitinase 활성을 비교해 본 결과, 단백질 농도는 모균주와 돌연변이주들 간에 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나, chitinase활성은 모균주에 비하여 T218S에서는 약 2배 더 높고, T218A와 T218E에서는 비슷하였으며, T218D에서는 1/5 정도 더 낮았다 (Fig. 3A). 이들 배양여액을 SDS-PAGE에 의해서 분석해 본 결과, 돌연변이주들 모두 모균주

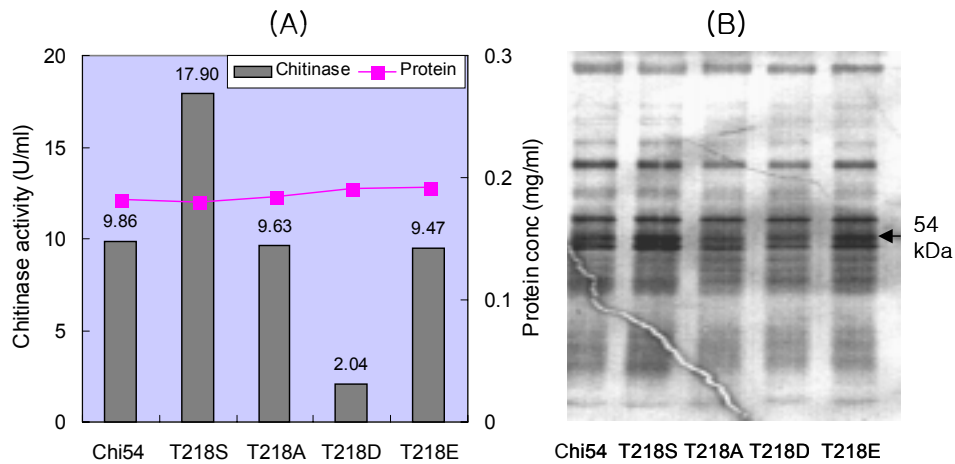


Fig. 3. Protein concentration and chitinase activity (A) in the culture supernatant of wild-type (Chi54) and mutants (T218-S,A,D,E) in dates of maximum chitinase production, and their SDS-PAGE (B).

에서와 비슷한 chitinase 밴드를 나타냈다 (Fig. 3B).

3) chitinase의 분리, 정제 및 활성화

각 균주를 대량 배양하여 최고의 chitinase활성을 나타낸 배양일의 여액을 ammonium sulfate으로 침전, 투석시킨 후, Rotofor cell을 이용하여 정제하였다. 그 결과, Rotofor cell의 18-20 fraction에는 순수한 chitinase만 존재하였다 (Fig. 4).

18-20 fraction의 단백질을 모아서 투석한 후, 동일 단백질농도를 SDS-PAGE에서 분석한 결과, Fig 5A, B에서와 같이 chitinase활성을 나타내는 두 밴드만 검출되었다

분리, 정제된 동일 농도의 chitinase에 대한 활성을 4-MU(GlcNAc)₂, colloidal chitin 및 crystal chitin에서 조사한 결과, T218S는 모균주에 비하여 4-MU(GlcNAc)₂에서는 약 1.4배, colloidal chitin 과 crystal chitin 에서는 약 1.6배 더 높았다. 반면, T218A, T218D 및 T218E 의 chitinase활성은 모 균주에 비하여 더 낮았다 (Table 1).

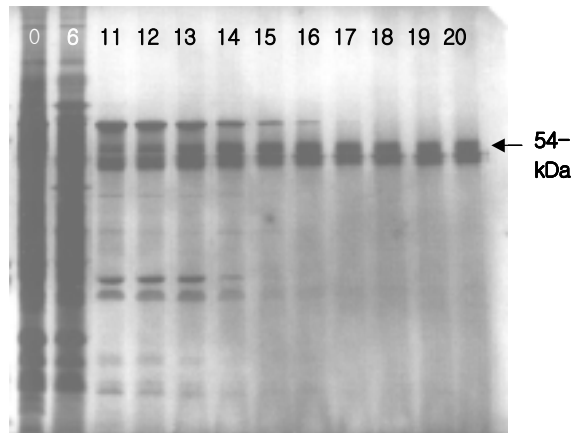


Fig. 4. One-step purification of chitinases using Rotofor cell . 0; original protein, 6-20; fraction numbers of Rotofor cell . This reveals that purified chitinase can be obtained in 18-20 fractions.

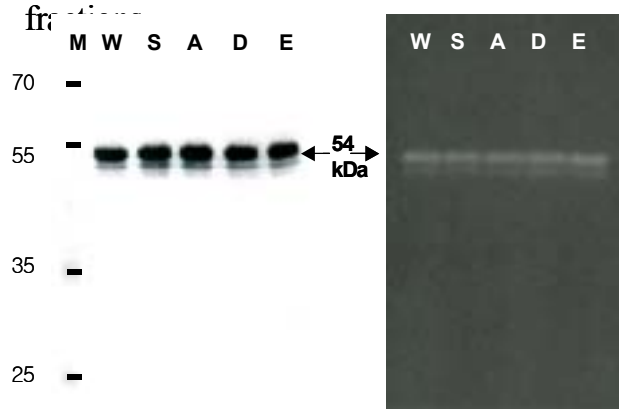


Fig. 5. Purified chitinases (A) and chitinolytic activity (B) of wild-type (W) and mutants(S;T218S, A;T218A, D; T218D, E; T218E).

이들의 chitinase활성을 더 자세히 분석하기 위하여 4-MU(GlcNAc)₂에서의 kinetic parameter를 조사하여 본 결과 (Table 2), T218S는 모균주에 비하여 Km값은 비슷하였으나, Kcat값이 더 높아져, Kcat/Km에 대한 상대활성이 약 1.3배 더 높

았다. 한편, T218A, T218D 및 T218E 의 Km 및 Kcat 값은 다양한 양상을 나타냈는데, 상대 활성이 모균주에 비하여 낮았다.

Table 1. Relative activities of purified chitinases from wilg-type and mutants toward various chitinous substrates

Chitinase	4-Mu-(GlcNAc) ₂	Colloidal chitin	Crystal chitin
Chi54	100.0	100.0	100.0
T218S	136.4	156.6	156.6
T218A	63.5	60.2	94.1
T218D	52.0	48.5	86.5
T218E	67.0	51.8	87.4

Table2. Kinetic parameters of wild-type and mutants protein.

	Km(mM)	Kcat	Kcat/Km	relative Kcat/Km
Chi54	3.50	7.5	2.14	100.0
T218S	3.33	9.3	2.79	130.4
T218A	2.63	4.3	1.63	76.2
T218D	2.50	3.4	1.36	63.6
T218E	4.26	8.0	1.88	87.9

a/ Km= x10⁻¹, Kcat= x10⁻²

마. chimeric chitnase 유전자를 *Trichoderma harzianum*에 도입, 발현

2년 차 연구의 당초계획은 병 억제력이 증가된 chitinase유전자를

*Pseudomonas fluorescens*에 도입, 발현시키고자 하였으나, TOL 벡터에 구축된 *Thr-chia*가 *P. fluorescens*에서 발현되지 않았다, 이에 반하여 *T. harzianum*의 *Nag1* 프로모터와 signal sequence에 구축된 *Chr-chia*는 *T. harzianum*에서 발현 및 분비됨은 물론 병억제력이 증가되었다. 따라서, cellulose-binding domain이 첨가된 *Chr-chia*와 *Thr-chia*의 catalytic domain이 첨가된 *Chr-chia*를 *T. harzianum*에 도입, 발현시키는 실험을 하였다.

1) chimeric 유전자를 *Trichoderma* 형질전환용벡터에 구축

가) chimeric 유전자를 구축하기 위한 벡터의 조제 : 1년 차 연구에서 pRLMEX30의 *ppki*부위에 *Trichoderma harzianum*의 *Nag1* 프로모터와 signal sequence (*pNag*), *shgh*부위에 *Chromobacterium* sp. chitinase gene (*Chr-chia*)을 구축하고 pNCA3으로 명명하였다 (Fig. 1). 따라서 이 연구에서는 pNCA3을 분리, 정제 후, *Xba*I과 *Nsi*I으로 절단, 전기영동 후, *Chr-chia*를 제거하여 vector로 이용하였다 (Fig. 2A).

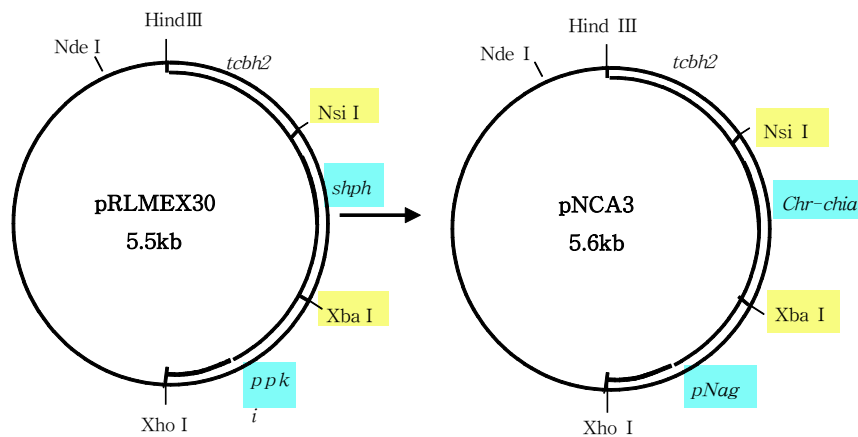


Fig. 1. pNCA3 ; construction of *Nag1* promoter and *Chr-chia* from pRLMEX30



Fig. 2. Vector and insert DNA extracted from gel after digesting with *Xba* I and *Nsi* I. A; deletion of *Chr-chia* from pNCA3. B; ChBD of *Chr-chia*+catalytic domain of *Thr-chia*, C; catalytic domain of *Chr-chia*+catalytic domain of *Thr-chia*



Fig. 3. Insert DNA (ChBD of *Chr-chia*+catalytic domain of *Thr-chia*) detected by colony PCR

나) chimeric 유전자의 조제 : cellulose-binding domain이 첨가된 *Chr-chia*

(Fig. 2B)와 catalytic domain이 첨가된 *Chr-chia* (Fig. 2 C)의 5' 말단에 *Xba*I site을 만들기 위한 primer와 3'말단에 *Nsi*I site을 만들기 위한 primer를 합성하여 PCR에 의해서 분리하고 PCR clean kit에 의해서 정제하여 두 효소로 절단 후 gel로부터 추출하였다.

다) chimeric 유전자의 구축 확인 : vector와 insert DNA를 ligation시키고, *E. coli* JM109에 형질전환시킨후, colony PCR에 의해서 chimeric 유전자의 삽입을 확인하고 (Fig. 3), 형질전환 *E. coli*로부터 플라스미드를 분리, 정제하여 제한효소로 절단 후 insert DNA의 크기에 의한 chimeric 유전자의 삽입을 확인하였다

2) 재조합 chimeric유전자를 *Trichoderma* spp.에 형질전환

가) 형질전환주의 선발 : *Trichoderma harzianum*의 원형질체에 재조합 DNA 및 pHAT@를 첨가하여 형질전환시킨후 hygromycin이 함유된 PDA배지에서 형질전환주들을 선발하였다. 형질전환주들은 포자를 형성시켜 단포자 분리를 하였고, PDA배지와 선택배지 (PDA+hygromycin 100ppm 배지에 0.1% TritonX-100 100ul를 첨가하여 도말후 풍건)에 번갈아 가면서 계대 배양하였다.

나) 형질전환주의 chitinase생산능력 : *Trichoderma harzianum*에서 chitinase생산

에 주로 이용되고 있는 Modified Richard's Medium (MRM)과 Trichoderma Mineral Media(TMM)배지에 형질전환주들의 포자현탁액을 접종, 배양하여, 매일 배양여액의 chitinase활성을 측정 한 결과 (Table 1), 형질전환균주들은 모두 모균주 보다 더 높은 chitinase활성을 나타냈다. 그러나, ChBD+cata가 도입된 p2-1 과 cata+cata가 도입된 p2-2 모두 *Chr-chia*가 도입된 p1-5보다 더 높은 chitinase활성을 나타내지 못하였다.

Table 1. Chitinase activity of extra-cellar protein produced by transgenic *T. harzianum*

Culture period(days)	p1		p1-5		p2-1		p2-2	
	MRM	TMM	MRM	TMM	MRM	TMM	MRM	TMM
1	0.190	0.089	0.177	0.092	0.107	0.063	0.125	0.079
2	0.291	0.157	0.335	0.145	0.233	0.148	0.245	0.121
3	0.386	0.255	0.891	0.704	0.657	0.668	0.779	0.586
4	0.305	0.464	0.808	0.965	0.808	0.955	0.763	0.852
5	0.485	0.977	0.906	0.865	0.898	0.655	0.878	0.757
6	0.491	1.050	1.296	0.932	1.121	0.918	0.973	0.946
7	0.588	1.067	1.359	1.070	1.259	1.104	1.041	1.023

P1; *Trichoderma harzianum*, p1-5; *T. harzianum* carrying *Chr-chia*, p2-1; *T. harzianum* carrying ChBD+cata, p2-2; *T. harzianum* carrying cata+cata

바. 형질전환미생물의 유전적 안정성 평가

1) 배지에서 계대배양 횟수에 따른 안정성 :

도입된 유전자의 안정성을 평가하기 위하여 형질전환 *Trichoderma harzianum*은 hygromycin 100ppm이 함유된 PDA, *Pseudomonas putida*.는 rifampicin 25ppm과 kanamycin 50ppm이 함유된 King's B배지에서 성장 후, 항생물질을 함유하지 않은 배지에서 계대배양하였다. 계대배양 후, 항생물질이 함유되지 않은 배지에 도말하여 형성된 *T. harzianum*의 포자와 *P. putida*.의 colony를 항생물질이 첨가된 배지에 무작위로 500균주씩 접종하여 성장하지 못한 균주의 수를 조사한 결과 (Table 1), *T. harzianum* 은 10회 계대배양에서 1.4%, 15회 계대배양에서 3.2%, *P. putida*. 는 10회 계대배양에서 9.2%, 15회 계대배양에서 16.6%가 변이되었

다.

Table 1. Population of transgenic microorganisms changed in antibiotic resistance according to culture times

Culture times	Density	
	<i>T. harzianum</i>	<i>P. putida</i>
0	0 (0 %)	0 (0 %)
5	4 (0.8)	14 (2.8)
10	7 (1.4)	46 (9.2)
15	16 (3.2)	83 (16.6)

2) 도입 유전자의 결실여부를 확인하기 위한 PCR 실시

계대배양 후, 항생물질 첨가배지에서 성장하지 못한 균주의 염색체 DNA에 chitinase 유전자의 N-말단과 C-말단에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 형질전환 *T. harzianum*과 *P. putida* 모두 도입된 chitinase 유전자가 검출되지 않았다. 따라서, 항생물질 첨가배지에서 성장하지 못한 형질전환균주들은 chitinase 유전자가 결실된 것으로 생각되었다.

3) 도입 유전자가 결실된 균주들의 chitinase 활성

도입 유전자가 결실된 형질전환 *T. harzianum*은 MRM과 TMM배지 모두에서 모균주에서와 비슷한 chitinase 활성이 검출되었고, 도입 유전자가 결실된 *P. putida*는 모균주에서처럼 chitin 분해능력을 갖지 못하였다.

4. 결과 요약

가. chitinase유전자 (*chi54*)의 구조 및 기능

1) *Chromobacterium* sp. chitinase유전자 (*chi54*) 은 N-말단쪽 부터 signal sequence, chitin-binding domain (ChBD), catalytic domain (CaTD) 으로 구성되어 있다.

2) Signal sequence는 *E. coli* 에서 chitinase의 분비에 중요하였다.

3) Chitin-binding domain은 insoluble chitin의 분해에 중요하였다.

4) Catalytic domain의 β -strand들은 chitinase활성에 필수적이었다.

5) 각 β -strand들에서 다른 chitinase들과 conserve되어 있는 아미노산들은 chitinase활성에 절대적으로 필요하고 conserve되어 있지 않은 아미노산들은 대체된 아미노산에 따라 다양 chitinase활성을 나타냈다.

6) family 18 catalytic domain은 6번째 β -strand에 있는 아미노산에 따라 subfamily A (MxYD) 와 subfamily B (QxYN) 로 더 분류될 수 있었다.

7) Subfamily A의 Y (Chi54의 Tyr348) 는 chitinase활성에 필수적이었다.

8) Subfamily A의 M과 D (Chi54의 Met346 과 Asp349) 가 Q와 N으로 대체되었을 경우에는 chitinase 활성이 감소되었다.

나. cellulose-binding domain의 첨가에 의한 chitinase의 활성 증가

1) *Chromobacterium* sp. strain C-61 chitinase의 ChBD3와 *Cellulomonas fimi* endoglucanase A의 CBDIIa는 4-MU-(GlcNAc)₂, colloidal chitin 및 crystal chitin에 대한 chitinase활성과 chitin 및 cellulose에 대한 결합능력에서 비슷하였다.

2) ChBD3와 CBDIIa의 double domain은 single domain보다 chitinase활성 및 기질 결합 능력이 증가되었다.

다. catalytic domain의 첨가에 의한 chitinase활성의 증가 여부

1) *Thr-chia*의 catalytic domain내에 분포하는 β -strand들은 *Chr-chia*의 그것들과 고도로 conserve하지만, *Thr-chia*내에는 *Chr-chia*에서와 같은 ChBD가 존재하지 않았다.

2) *Chr-chia*에 *Thr-chia*의 catalytic domain을 결합시켰을 경우 chitinase활성이 증가할 것이라는 가설은 성립되지 않았지만, *Thr-chia*의 catalytic domain에 *Chr-chia*의 ChBD가 결합하였을 경우, *Thr-chia*의 chitinase활성이 더 증가하였다. 즉, ChBD가 없는 *Thr-chia*에 ChBD를 부착함으로써, chitinase활성을 증가할 수 있다는 결론을 얻었다.

3) *Chr-chia*의 프로모터, signal sequence 및 ChBD 뒤에 *Thr-chia*를 부착하였을 경우, *E. coli*에서 *Thr-chia*의 chitinase를 분비하였다.

라. Site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 의 활성 증가

1) *Chromobacterium* sp. chitinase유전자의 Thr218를 Ser (T218S) 으로 대체하였을 경우에는 chitin 분해능력이 증가되었지만, Ala(T218A), Asp(T218D) 및 Glu(T218E) 로 대체되었을 경우에는 감소되었다.

2) 32개의 subfamily A chitinase 중에서, *chi54* 의 Thr218에 일치하는 아미노산은 22개의 chitinase에서 Thr, 5개 chitinase에서 Ser, 5개 chitinase에서 Ala 으로 이루어져 있었다.

3) 모균주는 배양 5일, T218S는 6일, T218A는 7일, T218D와 T218E는 9일 후에 최고의 활성을 나타냈다.

4) 최고 배양일의 배양여액속에 들어 있는 chitinase 활성은 모균주에 비하여 T218S는 1.5배, T218A는 1/2배, T218D는 1/5배, 그리고 T218E는 1/3배 정도이었다.

5) 정제된 동일 단백질농도의 chitinase활성도 T218S는 모균주에 비하여 1.3배 더 높았다..

제 3 절. 토양전염성병에 대한 chitin분해미생물의 실용화

1. 서 설

식물 병원진균 중 토양 전염 병원균은 땅속의 뿌리, 괴경 또는 땅가 부분의 줄기 등을 침입하여 곡류, 채소, 화훼류 등 여러 종류의 작물에 광범위하게 병을 일으켜 많은 피해를 가져온다. 그 대표적인 병원균으로 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Sclerotonia* spp., *Verticillium* spp. 등이 있다. 이 병의 방제는 주로 합성 화학 살균제에 의존하고 있으나, 이는 생태계 파괴, 환경오염 문제 및 인축 독성 문제가 있고 동시에 약제 저항성 발생으로 방제 효과가 낮아지고 있다는 문제점이 있다(25). 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법의 하나로 길항 미생물을 이용한 생물학적 방제 연구가 최근 국내외에서 많이 이루어지고 있다. 이러한 미생물이 제품화되어 있지만 사용 중 방제효과의 변이가 많아 제품에 따라서는 방제효과를 높일 수 있는 방법을 계속 연구하고 있는 경우도 있다. 특히 토양 처리 후 길항 미생물의 밀도 유지가 중요한 관건으로 생각되어지고 있다.

저희는 이미 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotonia* spp.에 길항하는 chitin분해미생물을 분리, 보유하고 있지만, *Pythium* spp.와 *Phytophthora* spp.에 길항하는 미생물은 보유하고 있지 않다. *Pythium* spp.와 *Phytophthora* spp.는 난균문에 속하며 균사는 잘 발달되어 있지만, 세포벽에 chitin이 함유되어 있지 않은 것이 다른 식물병원균과 크게 다르다. 따라서, 이 연구에서는 난균류에 길항하는 chitin분해미생물을 분리하고, 이들 미생물과 저희들이 이미 보유하고 있는 미생물들을 실용화 할 수 있는 방안을 모색하였다.

2. 연구수행내용 및 방법

가. 길항미생물의 분리, 동정

1) 사용 병원균

오이 모 잘록병균 *Pythium aphanidermatum*은 경상대학교 농생물학과에서 분리하여 보관 중인 균주를 분양 받아 V8 agar 배지(V8 juice 100 mL, CaCO₃ 1 g, agar 18 g, D.W. 900 mL)에 배양하면서 사용하였다. 높은 병원성을 유지하기 위하여 발병된

줄기를 채취하여 병원균을 재분리하여 사용하였다. 멸균된 칼로 이병된 부위를 적당한 크기로 잘라 1% NaClO 용액에 1분간 침지한 후 ethanol에 살짝 담귀 표면 살균한 다음 Whatman paper(No.2)에 올려 ethanol을 말리고 ampicillin과 tetracyclin을 각각 50 ppm 함유한 V8 agar 배지에 올려 30 °C에서 3일간 배양하여 자란 균사를 광학현미경 아래에서 관찰하고 전형적인 *P. aphanidermatum*의 균사 형태임을 확인한 후 분리하여 보관하며 사용하였다.

2) 길항미생물의 분리

P. aphanidermatum 에 길항력이 있는 미생물을 분리하기 위하여 본 연구실에서 경상남도 일대의 여러 곳에서 토양으로부터 분리하여 보관중인 미생물과 새롭게 채취한 토양시료에서 분리된 미생물을 사용하였다. 보관 중인 미생물은 0.1 Tryptic Soy Agar(TSA, TSB 3 g, agar 18 g, D.W. 1 L)에 분주하여 배지 전면에 골고루 편 후 30 °C 항온기에서 3일간 배양하여 single colony를 분리하여 사용하였다. 새롭게 채취한 토양 시료는 5 g을 멸균 증류수 45 mL과 혼합하여 30 °C에서 30분간 진탕한 후 토양한천희석평판법으로 적절하게 희석하여 희석액 0.1 mL를 0.1 TSA 배지에 분주하여 배지 전면에 골고루 편 후 30 °C 항온기에서 3일 동안 배양하여 single colony를 순수 분리하였다. 순수 분리된 세균의 길항력 조사는 병원균과 대치 배양 방법에 의해 수행되었고, 길항력이 검정된 세균은 TSA 사면 배지에 옮겨 4 °C에 보관하였다.

3) Chitin 분해력 검정

병원균의 생장을 억제하고 성장 속도가 빠른 균주를 1차 선발하여 basal medium(MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, ZnSO₄ 0.001 g, MnCl₂ 0.001 g, K₂HPO₄ 0.7 g, KH₂PO₄ 0.3 g, pH 7.0, Agar 15 g, D.W. 1 L)에 swollen chitin 0.1%(w/v)가 혼합된 colloidal chitin배지를 만들어 길항 미생물에 의한 clear zone 형성 유무로 분해력을 검정하였다(9, 43, 67).

4) 길항 미생물의 antimicrobial spectrum

Pythium ultimum, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium cepivorum* 등 5개의 곰팡이와 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,

Erwinia carotovora, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter pyrinus* 등 7개의 세균에 대한 억제 test를 하였다. 곰팡이는 0.1 TSA 배지 중앙에 균사 disc를 놓고 양쪽에 길항 미생물을 loading 한 paper disc를 올려서 길항력을 조사하였다. 세균은 0.5 TSB 배지에서 overnight 시킨 후 0.1 TSA 배지에 $10^2 \sim 10^3$ 으로 희석하여 100 μ l를 spreading하였다. Spreading 한 배지 위에 길항 미생물을 loading 한 paper disc를 올려 배양한 후 disc에서 억제된 clear zone까지의 거리를 측정하였다.

5) 길항미생물의 유주자낭 형성 억제

V8 agar 배지에 배양한 *P. aphanidermatum*을 수술용 칼로 약 8 mm 크기의 균사절편을 만들어 5개씩 빈 petri dish에 나누고 살균수를 첨가한 후 28 °C 형광등 아래에서 유주자낭 형성을 유도하였다. 길항 미생물의 작용을 알아보기 위해 0.5 TSB 배지에 3일간 배양한 길항 미생물을 0.1 M $MgSO_4$ solution에 현탁시키고 10^8 cfu/mL이 되도록 하여 현탁액 3 mL을 살균수와 함께 처리하였다. 그리고, 상등액은 현탁액과 같은 방법으로 3 mL을 처리하여 유주자낭 형성을 유도하였고, 2시간 간격으로 24시간 관찰하였다. 형성 비율은 살균수 처리 24시간 후를 100으로 하여 결정하였다.

6) 길항미생물의 Cyst germination 억제

유주자낭이 다량으로 형성된 균사 조각에서 유주자낭을 분리하여 4 °C에서 1시간 가량 저온처리하고 실온으로 옮겨 1시간 후 유출된 유주자는 4겹의 거즈로 거른 후 vortexing을 통해 유주자에 부착된 편모를 탈락시켰다. Cyst 현탁액(10^4 spores/mL)은 유리 slide에 세균 현탁액(10^8 cfu/mL), 상등액과 동일 양으로 처리하였고, 발아를 촉진하기 위하여 영양분으로 glucose 100 ppm을 첨가하기도 했다. 30 °C에서 습도가 유지되도록 하여 배양하였으며, 2시간 간격으로 발아율을 관찰하였다.

7) 길항 미생물의 동정

가) 생리학적 특성조사

분리된 길항세균의 동정에 필요한 형태학적, 생리화학적 실험은 'Method for

General Bacteriology' 와 'Chemical Methods in Prokaryotic Systematics' (19)에 있는 방법으로 수행하였다. 중요 생리·생화학적 특성 50개 항목을 조사하기 위해 API CH50 kit(BioMerieux, Inc.)를 사용하였다.

나) 분자생물학적 특성조사

길항세균의 chromosomal DNA를 추출하여 2개의 oligonucleotide primer, 5'-GTGGCAGACGGGTGAGTAAC-3'과 5'-CCCCTACGG CTACCTTGTTAC=3'을 이용하여 16S rDNA 유전자를 PCR로 증폭시켜 얻었다. 이때 denaturation, annealing 그리고 extension 온도는 92 °C, 58 °C 그리고 72 °C로 하였다. 이 product는 autosequence를 통해 sequencing 하였다.

나. 길항 미생물의 제제화에 의한 병 방제효과

1) 길항 미생물의 배양과 균체수확

분리된 길항 미생물 중 배양기내에서 길항력이 좋은 YC4194와 YC4233 균주를 선발하여 제제화에 사용하였다. 각 길항 미생물을 0.5 TSB 50 mL에 접종하여 30 °C에서 24시간 동안 진탕 배양한 것을 seed culture로 사용하였고 본 배양은 2 L Erlenmeyer flask에서 0.5 TSB 500 mL에서 30 °C, 3일간 진탕 배양(180 rpm)하였다. 배양액은 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 가라앉은 균체를 수확하였다.

2) 제제화 방법

수확된 균체를 10 mL 멸균 증류수와 진탕시킨 후 bentonite, talc, zeolite 4 g과 균체를 잘 섞은 후 넓은 유리 plate에 얇게 깔아 30 °C에서 3일간 건조시켰다. 그 후 막자 사발을 이용하여 곱게 갈아 4°C에 보관하며 사용하였다. 이때 제제 1 g당 균 밀도는 10^9 집락수(colony forming unit)정도였다.

3) 병원균 접종원의 조제

앞에서와 같은 방법으로 유주자낭을 형성시킨 후 거즈로 걸러 1×10^5 개 유주자낭/mL이 되도록 하여 접종원으로 사용하였다.

4) 병원균 접종 및 방제효과

모 잘록병 방제효과는 실내 식물 생육상 실험에서 기주 식물로 오이(신젠타종묘(주), 청미삼척)를 이용하였다. 1×10^5 개/mL의 *P. aphanidermatum* 유주자낭을 시중에서 판매되는 원예용 상토(주식회사서울농자재) 1 L에 100 mL씩 접종하고 polyvinyl bag 내에서 잘 섞어 30 °C에서 2일간 둔 후 75 mm 사각 플라스틱 pot에 파종하여 10일간 재배하였다. 이 때 상토가 마르지 않도록 계속해서 물을 주었다. 길항 미생물은 병원균 접종 시 상토 1 L에 10 g을 넣어 접종하였다. 발병 정도는 발아 비율과 발아된 식물의 감염비율로 조사하였으며, 방제가는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Control value(\%)} = [1 - (\text{처리구의 발병률} / \text{무처리구의 발병률})] \times 100$$

가) 두 길항 미생물의 상호작용

YC4194와 YC4233 두 길항 미생물의 synergistic 효과를 알아보기 위해 길항 미생물을 각각 상토 1 L에 10 g 씩 넣어 잘 섞은 후 30 °C에서 2일간 둔 후 오이를 파종하여 방제효과를 검증하였다.

나) 화학 살균제와의 방제효과 비교

YC4194와 병원균을 섞은 상토에 오이를 파종한 직후 화학 살균제 dimethomorph(주식회사 동방아그로), metalaxyl(주식회사 경농), ethaboxam(주식회사 미성)을 생산자의 사용 추천 농도에 맞게 희석하여 pot에 각각 5 mL씩 분주하였다. 30 °C 온실에서 10일 동안 재배하여 방제효과를 검증하였다.

5) 근권 토양의 길항균 밀도 변화

오이를 파종한 후 0, 3, 6, 9, 12, 15일 동안 재배 후 오리 뿌리와 근처에 있는 흙을 조심스럽게 30 °C에서 30분간 진탕한 후 토양한천희석평판법으로 희석하여 희석액 0.1 mL을 swollen chitin 배지 전면에서 깔고루 spreading 했다. 30 °C에서 3일 동안 배양한 후 clear zone이 형성된 colony를 count하여 대조구와 밀도를 비교하였다.

6) 제제화 후 YC4194의 밀도 측정

Talc와 bentonite를 이용하여 제제화 한 YC4194는 상온과 4 °C 냉장 보관하면서, 0, 1, 2, 4, 8, 12주 간격으로 밀도를 측정하였다. 배지는 swollen chitin 배지를 사용하여 30 °C에서 3일 동안 배양한 후 clear zone이 형성된 colony를 count하였다.

다. 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에서의 병 방제 효과

1) 상토에 접종할 *Trichoderma* 및 *Chromobacterium* 배지의 선발

가) *Trichoderma* 배지의 선발 : 곶보리 10g, crush된 곶보리 10g, 쌀보리 10g에 native chitin 10g 씩을 혼합하여 포자현탁액 (10^4 /ml) 10ml씩을 접종후, 28 C에 보존하여 매일, 균사생장과 포자형성 정도를 달판 조사하였다.

나) *Chromobacterium* 배지의 선발 : 곶보리 10g, crush된 곶보리 10g, 쌀보리 10g에 native chitin 10g 씩을 혼합하여 세균배양액 (10^8 cell/ml) 10ml를 접종후, 28 C에 보존하여 매일 ampicillin이 첨가된 NA배지에서 희석평판법에 의한 세균의 밀도를 조사하였다.

2) chitin이 첨가된 상토에서 길항미생물의 생존 능력

가) *Trichoderma*의 생존 능력 : 상토 10g에 chitin 1g을 혼합하여 상기의 배양배지 1g을 접종후, 상온에 보존하여 PDA에서 희석평판법에 의한 균의 밀도를 조사하였다.

나) *Chromobacterium*의 생존 능력 : 상토 10g에 chitin 1g, 상기의 5일 배양배지 1g을 첨가 후, 상온에 보존하여 매일 ampicillin이 첨가된 NA배지에서 희석평판법에 의한 세균의 밀도를 조사하였다.

3) 콧트상태에서 토양전염성병원균의 억제효과

가) 병원균 접종원의 조제 : *R. solani*를 PDA에서 7일간 배양후, waring blender로 잘게 마쇄하여 오토밀-토양배지(오토밀 10g + 토양 90g)에 접종하고 28 C에서

10일간 배양 후, 배양토 및 균사를 잘게 부수어 체 (0.5mm) 로 걸른 다음 멸균토양에 10% 혼합하여 접종원으로 하였다

나) 유묘에 병원균 및 길항균의 처리 : 10%의 chitin을 포함하고 있는 상토에 배양된 길항미생물 (10:1, g/g)를 처리하여 비닐하우스에서 1개월 동안 보존후 병원균 접종원 1g을 혼합, 포트에 담고 고추 및 가지 유묘를 이식하였다.

다) 병 억제효과 조사 : 비닐하우스에서 보존하면서 모잘록병 이병주를 매일 조사하였다.

4) 포장상태에서 토양전염성병해의 방제효과

가) 상토에 chitin 및 길항미생물의 처리 : 상토에 10%의 chitin과 10%의 길항미생물 배양토를 혼합하여 육묘용 포트에 담고 고추를 파종, 비닐하우스에서 재배하였다.

나) 본답에 이식 및 병 방제효과 : 30일 육묘된 고추를 고추 연작하우스에 이식하여 1주일 간격으로 위조, 고사된 이병주를 조사하였다.

라. 양액재배작물의 병 방제 효과

1) chitin이 첨가된 배양토에서 길항 곰팡이의 생존능력 및 병 방제 효과

가) 길항 곰팡이 및 시들음병균의 배양 : *Trichoderma* sp. 의 포자현탁액 (10^4 /ml) 10ml를 보리배지 (키틴10g, 생보리10g, 멸균수 10ml) 에 접종후, 28 C에서 2주 배양하였고, *Fusarium oxysporium*은 오토밀배지 (건조상토 180g, 오토밀 20g) 에 접종 후, 28 C에서 2주 배양하였다.

나) chitin을 처리한 배양토에서 길항곰팡이 및 시들음병균의 생육 : 배양된 균주를 키틴이 1/10, 1/100 및 1/1000로 혼합된 배양토에 1/100씩 접종 후, 비닐하우스에 보존하여 5일 간격으로 희석평판법에 의하여 밀도를 조사하였다.

다) chitin을 처리한 배양토에서 시들음병 방제효과 : 키틴이 1/10, 1/100 및 1/1000로 혼합된 배양토에 길항곰팡이와 시들음병균을 접종 후, 토마토 묘를 이식, 농가관행재배법에 의하여 재배하면서 시들음병의 발생을 1개월 간격으로 조사하였

다.

2) 배양액에서의 길항세균 생존능력 및 병방제효과

가) 길항세균의 생육을 위한 배양액의 선발 : colloidal chitin을 처리한 토마토 배양액에서 길항세균인 *Chromobacterium* strain C-61이 생육하지 못하였기 때문에, 길항세균이 생육할 수 있는 배양액을 선발하기 위하여 배양액 1L당 colloidal chitin, 0.5g, ZnSO₄ 7H₂O, 0.5mg; NaMoO₄ 2H₂O, 1.5mg; Fe citrate, 1.0mg; CaCl₂, 10mg을 기본으로 첨가하고 몇가지 화합물을 농도별로 첨가하여 세균의 생육밀도를 조사하였다.

나) 시들음병 방제효과 : 키틴을 배양토에 1/100 로 혼합한 후, 토마토를 이식하고, NB배지에서 하룻밤 배양한 *Chromobacterium* strain C-61을 상기의 배양액에 1/10000 의 비로 접종 후, 일반 농가관행에 의하여 양액재배하면서 1개월 간격으로 시들음병의 발생정도를 조사하였다

3. 연구결과 및 고찰

가. 길항미생물의 분리, 동정

1) chitin분해력을 지닌 길항 미생물의 선발

본 실험실에서 토양에서 분리한 10⁶~10⁸ cfu/g 토양 정도의 세균 집락 중 균주를 순수 분리하였고, 600 여개의 균주들 중 0.1 TSA와 PDA 배지에서 *P. aphani dermatum*과 대치 배양하여 억제 정도가 우수한 균주들을 선발하였다(Table 1). 이 균주들의 chitin 분해력 검증 후(Table 2), 억제 정도가 우수하고 chitin 분해력도 좋은 YC4194와 YC4233을 최종 선발하였다.

Table 1. Inhibitory activity of antagonistic bacteria isolated from various soils

and composts against *Pythium aphanidermatum*.

Isolate	locality	Inhibition zone(mm) ^a	
		0.1 TSA	PDA
#4194	Kimhae	6	4
#4195	"	4	4
#4196	"	4	4
#4197	"	4~5	4
#4233	Hadong	3	3
#4263	"	3~5	2
#4308	Sanchung	3	2
#4392	"	2	-
#4393	"	2	-
#4394	"	2	-
#4395	"	2	-
#4399	"	3	-
#4427	Chinju	8	2
#4428	"	6	2
#4450	"	4	3
#4451	"	4	-
#4471	Sanchung	4	-
#4472	"	5	4
#4478	"	4	3
#4484	"	5	2
#4485	"	5	2
#4486	"	4	4

a The mycelial growth inhibition was determined by the paired bioassay on 0.1 TSA and PDA 1~2 days inoculation at 30 °C.

- No inhibition.

Table 2. Chitinolytic activity of antagonistic bacteria isolated from various soils

against *Pythium aphanidermatum*.

Isolate	Locality	Chitinolytic activity
#4194	Kimhae	+++
#4196	"	++
#4197	"	++
#4233	Hadong	++
#4263	"	+
#4308	Sanchung	-
#4427	Chinju	-
#4428	"	-
#4484	Sanchung	+++

- Negative, + Mild, ++ Medium, +++ Strong.

2) 길항 미생물의 antimicrobial spectrum

선발된 균주 YC4194와 YC4233은 곰팡이의 경우 *Sclerotium cepivorum*을 제외한 나머지 4개의 곰팡이에 대해서 모두 억제효과를 보였으며 *Botrytis cinerea*는 다른 곰팡이에 비해 억제효과가 떨어졌다. 세균의 경우 역시 대부분 억제효과가 나타났다. 특히, YC4233은 Gram negative 뿐만 아니라 positive 세균에 대해서도 억제효과가 매우 좋았다(Table 3).

3) YC4194와 YC4233에 의한 병원균의 억제

가) 유주자낭 형성의 억제

*In vitro*에서 *P. aphanidermatum*의 유주자낭 형성 억제는 살균수만 처리한 경우 2시간 후부터 형성되기 시작하여 8시간 후에는 유주자낭의 90% 이상 형성된 반면 YC4194, YC4233과 YC4194 상등액을 처리한 petri dish에서는 24시간이 지나도 거의 형성되지 못하였다(Fig. 1, 2).

Table 3. Antimicrobial spectrum of two strains.

Test microorganism	Inhibition zone(mm) ^a	
	YC4194	YC4233
Fungi		
<i>Pythium ultimum</i>	4	2
<i>Rhizoctonia solani</i>	6	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	9	3
<i>Botrytis cinerea</i>	+	1
<i>Sclerotium cepivorum</i>	-	-
Bacteria		
<i>Escherichia coli</i>	2~3	5
<i>Bacillus subtilis</i>	4~5	6
<i>Erwinia carotovora</i>	4	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	5
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	7~8
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	5
<i>Enterobacter pyrinus</i>	1	3

a The mycelial growth inhibition was determined by the paired bioassay on 0.1 TSA and PDA 1~2 days inoculation at 30 °C.

+ Slight inhibition, - No inhibition.

나) Cyst germination의 억제

*P. aphani dermatum*의 cyst 발아 억제도 유주자낭 형성 억제와 유사하였다. 살균수만 처리한 대조구에서는 2시간 후 약 60%, 6시간 후에는 90% 이상 발아되었으나 YC4194와 YC4233을 직접 처리한 곳과 YC4194 상등액을 처리한 곳에서는 12시간이 지나도 5% 내외로 발아가 현저하게 억제되었다. YC4194와 glucose 100 ppm을 함께 처리한 곳에서 2시간 후 약 20%가 발아되었지만 그 후 시간이 지나도 더 이상 발아되지 않았다(Fig. 3, 4). 발아에 필요한 영양분이 있어도 크게 영향을 주지 못하는 것으로 볼 때 항생물질과 같은 물질에 의한 발아 억제임을 유추할 수 있었다.

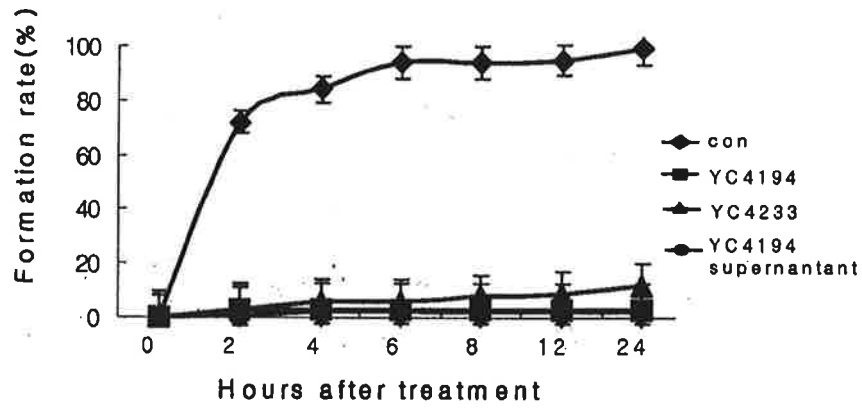


Fig.1. Effect of inoculation of strains on the formation of zoosporangia of *P. aphanidermatum*.

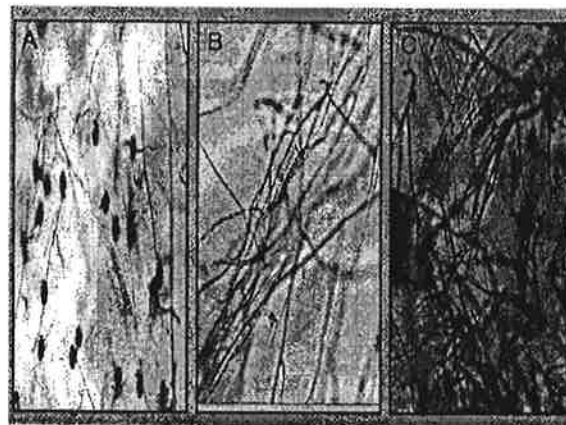


Fig. 2. Effect of YC4194 and YC4233 inoculation on the zoosporangia formation of *P. aphanidermatum*. A: Untreated control, B: YC4194, C: YC4233

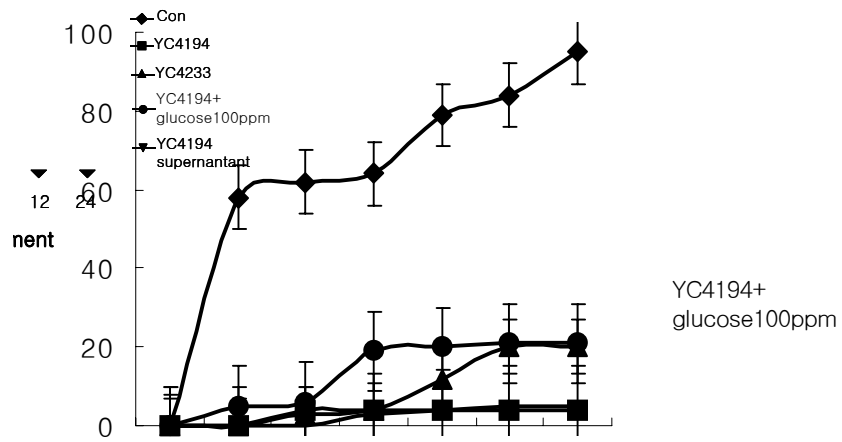


Fig. 3. Effect of inoculation of YC4194 and YC4233 on the germination of cyst of *P. aphanidermatum*.

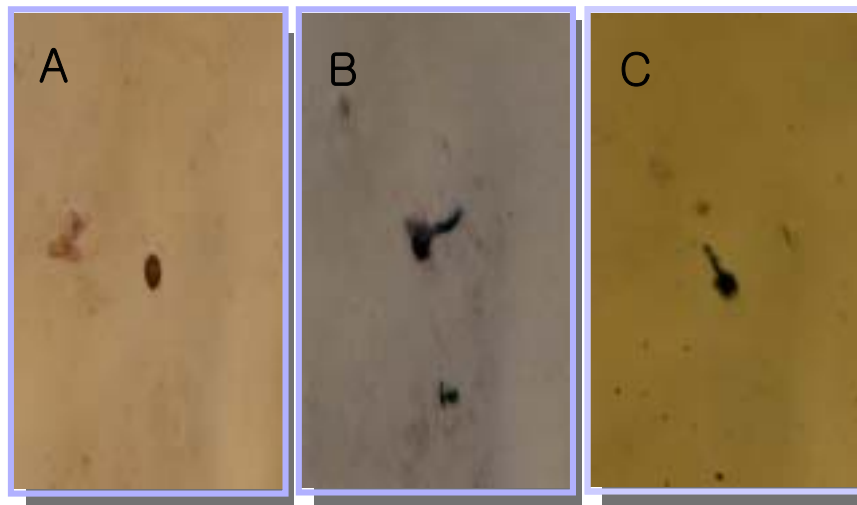


Fig. 4. Effect of YC4194 and YC4233 on the cyst germination of *P. aphanidermatum*. A: Untreated control, B: YC4194, C: YC4233.

4) 길항 미생물의 동정

가) 선발된 길항 미생물의 생리학적 특성

길항 미생물 strain YC4194와 YC4233은 Gram positive, 간균 형태로 여러 가지 생화학적 실험과 API CH50 kit를 이용하여 49종류의 생리·생화학적 특성을 조사하였다. 그 결과 strain YC4194는 *Bacillus stearotheromophilus*와 98.7%, strain YC4233은 *Brevibacillus brevis*와 99.3%의 homology를 보였다(Table 4, 5).

나) YC4194의 16S rDNA 유전자 염기서열 결정

생리학적 실험과 함께 16S rDNA 유전자의 염기서열 결정 또한 수행하였는데, 그 결과가 Figure 11와 같았다. 16S rDNA 유전자 중 일부분만 sequencing 되어 생리학적 특성에 비해 정확한 homology 비교는 어려웠다.

Table 4. Morphological and biochemical characteristics of antagonistic bacterial strains. + Positive response, - Negative response.

Characteristics	YC4194	YC4233
Cell shape	rod	rod
Gram stain	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Anaerobic growth	-	-
urea	+	-
PHA accumulation	-	-
Gelatin	+	+

Table 5. Carbohydrate utilization by bacterial strains.

Substrate	Reaction ^a	
	YC4194	YC4233
Glycerol	-	+
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	-	-
Ribose	-	-
D-Xylose	+	-
L-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β-Methyl-D-xyloside	-	-
Galactose	+	-
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	-
D-Mannose	-	-
L-Sorbose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	+	-
Mannitol	-	+
Sorbitol	-	-
D-Turanose	-	-

a Responses 48 hours after inoculation at 37 °C. Tests were carried out using API CH50 identification system.

+ Positive response, - Negative response.

Table 5. (Continue)

Substrate	Reaction ^a	
	YC4194	YC4233
α -Methyl-D-mannoside	-	-
α -Methyl-D-glucoside	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	-
Amygdalin	-	-
Arbutin	-	-
Esculin	+	-
Salicin	-	-
Cellobiose	-	-
Maltose	+	-
Lactose	-	-
Melibiose	-	-
Sucrose	+	-
Trehalose	+	-
Inulin	-	-
Melezitose	-	-
D-Raffinose	-	-
Starch	+	-
Glycogen	+	-
Xylitol	-	-
β -Gentiobiose	-	-

^a Responses 48 hours after inoculation at 37 °C. Tests were carried out using API CH50 identification system.

+ Positive response, - Negative response.

Table 5. (Continue)

Substrate	Reaction ^a	
	YC4194	YC4233
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Gluconate	-	-
2 keto-gluconate	-	-
5 keto-gluconate	+	-

a Responses 48 hours after inoculation at 37 °C. Tests were carried out using API CH50 identification system.

+ Positive response, - Negative response.

AGGTTAGGGCNACCCTNGCCCTGTAAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTA
GCTAAGACCGGATAAGTGATTCTCTTGCATGAGAGGATCAAGAAACACGGG
GCAACCTGTGGCTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCGTGGAGAGTAAC
TGCTCTGCGAATGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGCGCGCGCAGGCGGCCGCTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCGAGGCTCAACC
TCGGTTCGCACTGGAAACTGGGTGGTTGAGTGCAGGANAGGAAAGCGGAAT

TCCACGTGTANCGGTGAAATGCGTANAGATGTGGAGGAACACCANTGGCGA
 AGGCGGCTTTCTGGCCTGTAAGTACGCTGANGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTACNNCTGGGGATGAAACTNAAAGGAATTGNCNNGGGNNCTTC
 CCCC AATCTCTACCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTTGCGGTTACCCACCGA
 CTTCGGGTGTTGTAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCG
 GGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCAATTCCGACTT
 CATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTCTTAGGA
 TTGGCTCCATCTCGCGACTTCGCTTCCCGTTGTACCGGCCATTGTAGTACGT
 GTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC
 TCCGGTTTGTACCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAAC
 TAAGTTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
 GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCCTCTGTCCCGAAGGCCTGCCCT
 ATCTCTAGGACATTCAGAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATACTCCACTGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCC
 TTTGAGTTTCACTCTTGCAGCGTACTCCCCANGCGGAGTGCTTATTGTGTT
 TACTTCGGCACCAANGGTATCGAAACCCCTAACACCTANCACTCATCGTTTA
 CGGCGTGGACTACCANGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACNCTTTCNCGC
 CTCANCGTCAGTGGACTACCANGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACNCTT
 CNCG

Fig. 11. Nucleotide sequence of 16S rDNA gene of bacterial strain YC4194.

나. 길항 미생물의 제제화에 의한 병 방제효과

1) 두 길항균의 상호작용

두 길항 미생물을 제제화하여 상토에 병원균과 같이 섞어 오이를 파종하고 10일 동안 키워 방제효과를 조사한 결과 YC4194만 처리된 경우 방제가가 43%인 반면 YC4233과 같이 처리한 pot에서는 방제가가 22%로 오히려 낮아졌다. 이것은 두 미생물을 함께 섞어 사용하는 것이 부적합함을 보여주었다(Figure 5).

2) 길항균 제제의 방제효과

제제 종류별로 talc, zeolite, bentonite, talc+zeolite, talc+ bentonite, zeolite+bentonite로 만들어 병원균과 함께 섞어 오이를 과중하여 방제효과를 관찰하였다. 그 결과 talc, zeolite, bentonite는 45~55%의 방제가를 보인 반면, 두 보조제를 섞어서 사용한 talc+zeolite, talc+ bentonite, zeolite+bentonite는 58~70%의 방제가를 보였다. 그러나, 제제 종류별로 유의성 있는 차이를 보이지는 않았다(Fig. 6).

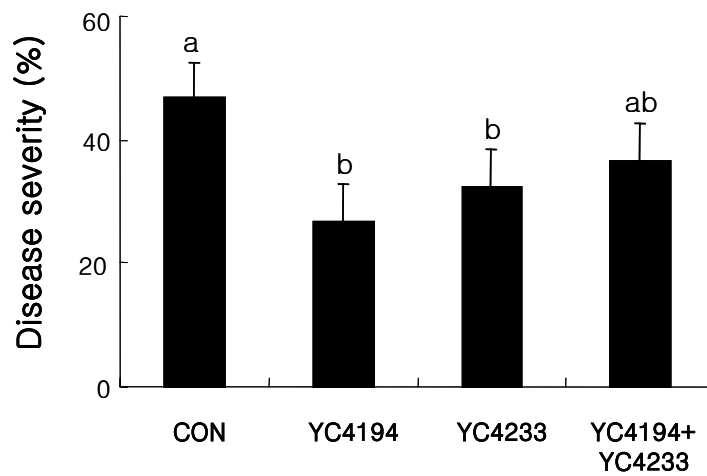


Fig. 5. Effect of mixing YC4194 and YC4233 on suppression of Pythium damping-off of cucumber. Means followed by the same letter are not different significantly different as determined by Duncan's multiple range tests($p=0.01$).

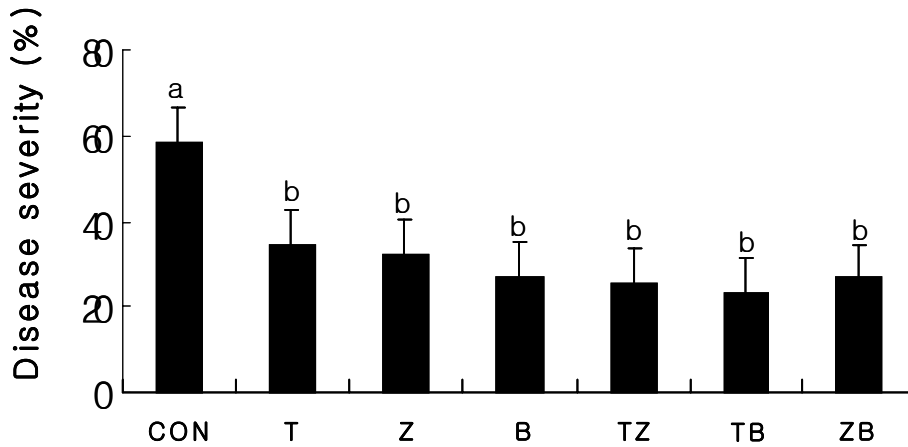


Fig. 6. Effect of formulation components on the severity of Pythium damping-off of cucumber. CON; untreated control, T; talc plus antagonist (10 g/L soil), Z; zeolite plus antagonist(10 g/L soil), B; bentonite plus antagonist (10 g/L soil), TZ; talc plus zeolite plus antagonist(10 g/L soil), TB; talc plus bentonite plus antagonist(10 g/L soil), ZB; zeolite plus bentonite plus antagonist (10 g/L soil). Means followed by the same letter are not different significantly different as determined by Duncan's multiple range tests($p=0.01$).

3) 제제 양에 따른 방제효과

Talc+bentonite를 이용해 제제화를 한 YC4194를 상토 1 L에 각각 5, 10, 20, 30 g을 병원균과 섞어 오이를 파종하여 발병 억제효과를 관찰하였다. 상토 1 L에 제제 5 g을 처리했을 때는 32%의 방제효과를 보였고, 10 g을 처리했을 때 방제효과가 50%로 나타났다. 그러나, 그 이상을 처리했을 때는 10 g을 처리했을 때와 비슷한 방제효과가 나타났다(Figure 7).

4) 화학 살균제와의 효과 비교

길항 미생물 제제를 상토 1 L에 10 g을 병원균과 함께 처리한 후 오이를 파종하고 화학 살균제인 dimethomorph, metalaxyl, ethaboxam을 분주하여 발병 억제효과를 관

찰하였다(Fig. 8). 길항 미생물 제제만 처리했을 때 59%의 방제가를 보였고, 화학살균제도 이와 비슷한 방제가를(50~62%) 나타내었다. 화학 살균제와 함께 처리했을 경우도 비슷한 방제가를 보였으나 2 가지 동시 처리에 의한 상승효과는 없었다. 그러나, ethaboxam의 경우 strain YC4194와 함께 처리되었을 때(64%), 단독으로 작용하는 것(50%)보다 더 높은 방제가를 보였으나 유의성 있는 차이는 없었다.

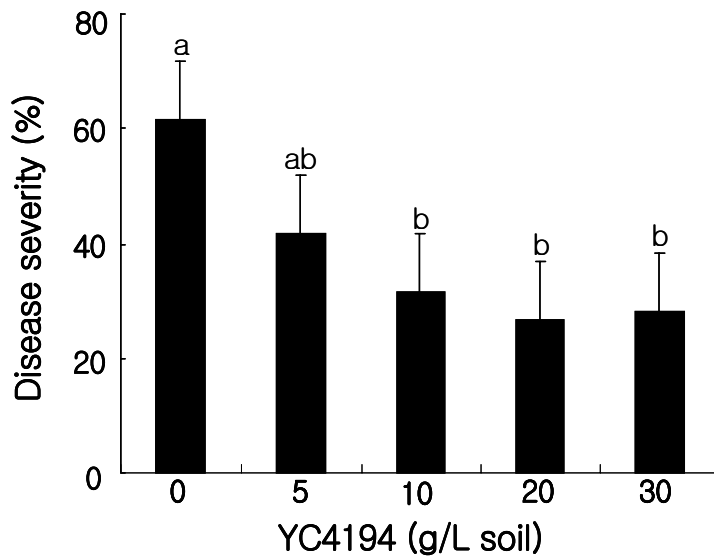


Fig. 7. Relationship between formulation density of YC4194 and Pythium damping-off of cucumber. Means followed by the same letter are not different significantly different as determined by Duncan's multiple range tests($p=0.01$)

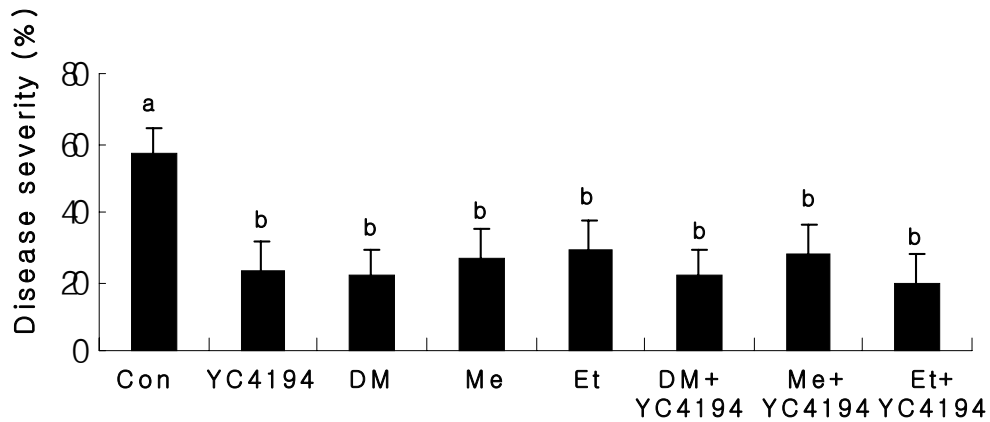


Fig. 8. Comparison of the control efficacy of YC4194 and commercial fungicides against *Pythium* damping-off of cucumber. Con; untreated control, DM; dimethomorph, Me; metalaxyl, Et; ethaboxam. Means followed by the same letter are not different significantly different as determined by Duncan's multiple range tests($p=0.01$).

5) YC4194의 밀도변화

가) 근권에서의 밀도변화

오이를 파종한 후 3일 간격으로 근권의 상태를 채취하여 밀도조사를 하였다(Fig. 9). 길항균 제제만 처리한 곳에서는 9일 후 10^8 cfu/g으로 유지되던 것이 12일 후 10^7 cfu/g으로 줄어들었고, 15일째는 10^6 cfu/g으로까지 그 밀도가 줄었다. 반면, 병원균을 함께 처리한 곳에서는 12일까지 10^8 cfu/g으로 유지되었으며 15일이 지난 후 10^7 cfu/g으로 줄어들었다. 이것은 병원균 처리 시 기주 식물에서의 영양분 누출에 의해 길항 미생물의 밀도가 높게 유지되는 것으로 생각되었다. 본 밀도 조사 및 발병 억제 실험은 상토에서 수행되었으므로 향후 미생물 제제로서의 개발 가능성을 보다 확실히 알기 위해 포장에서의 실험을 수행할 필요가 있다.

나) 제제화 후 밀도변화

Talc+bentonite를 이용하여 만든 제제는 상온과 4 °C에 보관하면서 12주 동안 밀도 변화를 기간별로 조사하였다. 4 °C에 보관한 제제는 Figure 10에서와 같이 12주가 되면 10^7 cfu/g로 유지되었고, 상온에서 보관한 제제는 12주가 지나면 10^5 cfu/g로 감소하였다. 이것으로 볼 때 제제화 된 strain YC4194는 2주 정도는 상온에서 보관 가능하지만 4 °C에 보관해야 되는 제제 형태임을 알 수 있었다.

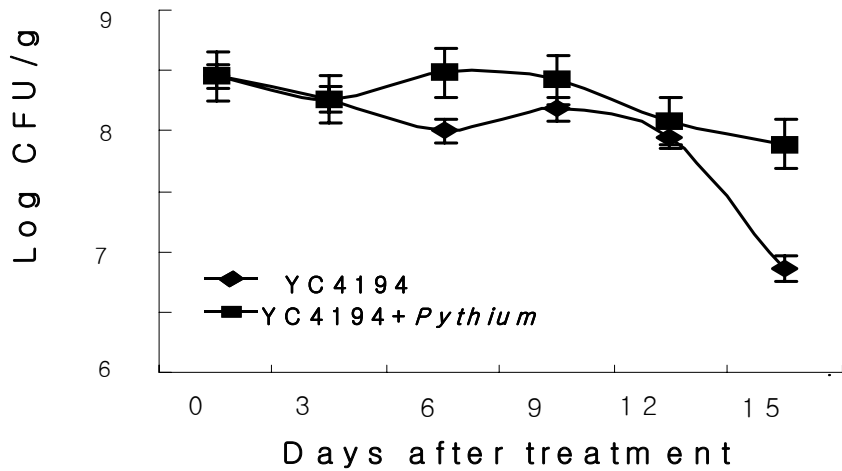


Fig. 9. Population change of YC4194 in cucumber roots with presence or absence of *P. aphanidermatum*.

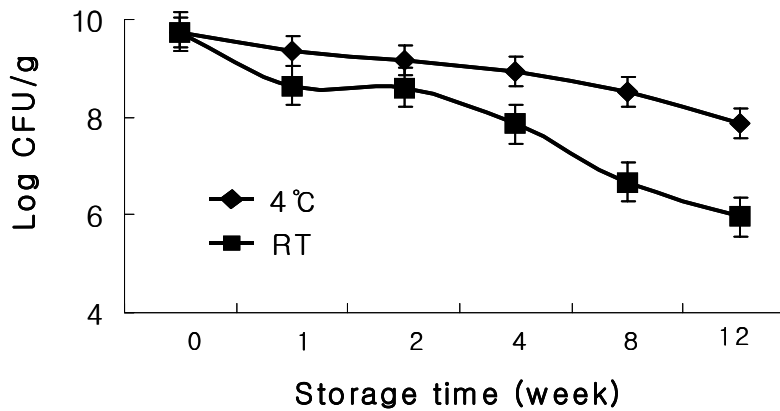


Fig. 10. Changes in population densities of YC4194 at the room temperature and 4 °C. The population is determined using a dilution plate method.

다. 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에서의 병 방제 효과

토양전염성병 억제력이 우수한 *Trichoderma harzianum*, *Chromobacterium* sp. strain C-61과 1년 차 연구에서 얻어진 형질전환 *Trichoderma harzianum* 균주를 chitin을 처리한 육묘용 상토에 접종한 후 길항미생물의 생존능력, 포트 및 포장상태에서의 병방제효과를 조사하였다.

1) 육묘용 상토에서의 길항미생물 생존능력

가) 상토에 접종할 *Trichoderma* 및 *Chromobacterium*배지의 선발 : native chitin에 겉보리, crush된 겉보리, 쌀보리를 동량 혼합 후, *Trichoderma harzianum*과 형질전환 *Trichoderma harzianum*의 포자현탁액을 접종하였을 경우, 균사생장은 겉보리, crush된 겉보리, 쌀보리의 순으로 우수하였고, 포자형성은 쌀보리에서 훨씬 더 우수하였다. 한편, *Chromobacterium* sp. strain C-61은 crush된 겉보리에서 훨씬 더 잘 성장하였고 배양 3일 후 접종시의 농도보다 100배 정도 증가하여 7일 까지 비슷

한 밀도를 유지하였다.

나) chitin이 첨가된 상토에서 *Trichoderma* 및 *Chromobacterium*의 생존 능력 : 10%의 chitin을 함유한 상토에 쌀보리배지에서 15일간 배양된 *Trichoderma* spp. 과 crush된 겉보리에서 5일간 배양된 *Chromobacterium* sp.을 1g 씩 혼합하여 균의 밀도를 조사한 결과 (Table 1), *T. harzianum* 은 접종후 5일까지는 균의 밀도가 감소하다가 7일 이후부터 증가하여 30일후에도 접종 당시의 밀도를 유지하고 있었고, 형질전환 *T. harzianum* 의 경우에도 비슷한 경향을 나타냈다. 한편 *Chromobacterium* sp. strain C-61은 접종이후에 접종 당시의 밀도 (건토 1g당 약 3×10^5) 보다 현저히 감소하였고 30일 후에는 건토 1g당 약 5×10^2 의 밀도를 나타냈다.

Table 1. Population of *Trichoderma* spp. and *Chromobacterium* sp. in Soils containing chitin according to culture period

Culture period (days)	<i>Trichoderma</i> (CFUx10 ¹ /g soil)	Tr <i>Tichoderma</i>	<i>Chromobacterium</i> (CFUx10 ³ /g soil)
0	28	25	317
1	15	13	16
3	4	7	2
5	9	11	34
7	23	19	26
10	54	48	14
20	31	35	8
30	25	22	5

Trichoderma ; *Trichoderma harzianum*, Tr*Tichoderma*; transgenic *Trichoderma harzianum*, *Chromobacterium*; *Chromobacterium* sp. strain C-61

2) 포트상태에서 토양전염성병원균의 억제효과

10%의 chitin을 포함하고 있는 상토에 배양된 길항미생물을 처리하여 1개월 동안 보존후 배양된 *Rhizoctonia solani*를 접종하고 고추와 가지 유묘를 이식한 결과 (Fig. 2), 길항균을 처리하지 않은 포트에서는 약 80-85%의 발병주율을 나타낸 반면, 형질전환 *T. harzianum* 에서는 약 3-5%, 야생형 *T. harzianum* 에서는 8-13%, 야생형 *Chromobacterium* sp. strain C-61 에서는 36-48%의 발병주율을 나타냈다. 따라서, 병 억제효과는 가지와 고추 모두에서 *Chromobacterium* sp. strain C-61 보다는 *T. harzianum*, 그리고 야생형 *T. harzianum* 보다는 형질전환 *T. harzianum* 가 더 우수하였다.



Fig. 1. Suppression of damping-off of eggplant (above) and hotpepper (below) by antagonistic strains. A; transgenic *Trichoderma harzianum*, B; *Trichoderma harzianum*, C; *Chromobacterium* sp. strain C-61, D; non antagonist, E; non pathogen

3) 포장상태에서 토양전염성병해의 방제효과

10%의 chitin과 길항미생물 배양토를 포함하고 있는 상토를 육묘용 포트에 담

고 고추를 파종, 비닐하우스에서 육묘한 다음 고추 연작하우스에 이식한 결과 (Table 2), 정식 90일후, 길항균을 처리하지 않은 고추에서는 18%가 위조, 고사하였으나, *Chromobacterium* sp. strain C-61을 처리하였을 경우에는 7%, *T. harzianum* 을 처리하였을 경우에는 2% 가 위조, 고사하였다. 이 실험에서 형질전환 *T. harzianum* 에 대해서는 환경문제 때문에 실시하지 않았다.

Table 2. Effect of *Trichoderma* sp. and *Chromobacterium* sp. on suppression of wilt disease in hotpepper vinyl house

Treated Strain	Diseased plant (%) after		
	30 days	60 days	90 days
Trichoderma	0	0	2
Chromobacterium	0	2	7
Non-treatment	3	8	18

라. 양액재배작물의 병 방제 효과

1) 길항곰팡이에 의한 배양토에서의 병방제효과

가) chitin을 처리한 배양토에서 길항곰팡이 및 시들음병균의 생육 : 키틴이 부피비로 1/10, 1/100 및 1/1000로 혼합된 배양토에 보리배지 (키틴10g, 생보리10g, 멸균수 10ml) 에서 배양된 *Trichoderma harzianum*와 오토밀배지 (건조상토 180g, 오토밀 20g)에서 배양된 *Fusarium oxysporium* 을 1/100씩 혼합 후, 각 선택배지에서 균주의 밀도를 조사하였다. 그 결과 (Table 1), 길항곰팡이인 *Trichoderma harzianum* 의 경우 1/10의 chitin처리구에서는 5일후 급격히 증가하고 그 이후 증가된 밀도를 유지하였고, 1/100의 처리구에서는 처리하였을 경우의 밀도를 유지하는 경향이었으

나, 1/1000처리구에서는 밀도가 감소하는 경향이였다. 한편, 시들음병균인 *Fusarium oxysporium* 의 경우 처리했을 당시의 밀도보다 계속 감소하였는데, 그 감소정도는 1/10, 1/100, 1,1000의 순서로 우수하였다.

Table 1. Population density of *T. harzianum* and *F. oxysporium* in soils containing chitin

Chitin/Soil (V/V)	Treated days	Density ($\times 10^2$ CFU/g)	
		<i>T.harzianum</i>	<i>F.oxysporium</i>
1/10	0	2.7	4.5
	5	5.9	3.3
	10	6.2	1.9
	15	6.1	0.8
	20	5.8	0.2
1/100	0	3.3	3.9
	5	3.5	3.0
	10	4.1	2.5
	15	3.9	1.4
	20	3.7	0.7
1/1000	0	2.8	4.2
	5	2.0	3.5
	10	2.2	2.9
	15	1.9	1.8
	20	1.7	1.4

나) chitin을 처리한 배양토에서 시들음병 방제효과 : 키틴을 배양토에 1/10, 1/100 및 1/1000로 혼합한후, 보리배지 (키틴10g, 생보리10g, 멸균수 10ml) 에서 배양된 *Trichoderma harzianum*와 오토밀배지 (건조상토 180g, 오토밀 20g)에서 배양된 *Fusarium oxysporium* 을 1/100씩 혼합 후, 토마토를 이식하여 일반 농가관행에 의하여 양액재배하였을 경우, 1/10의 chitin처리구에서는 토마토 생육이 억제되었다. 한편, 길항균을 처리하였을 경우에는 시들음병 발생이 억제되었는데, 1/10이나 1/1000의 키틴처리구 보다는 1/100 키틴처리구에서 방제효과가 더 우수하였다 (Table 2)

Table 2. Effect of *T. harzianum* on suppression of wilt disease in tomato vinyl house

Chitin/Soil (V/V)	Diseased plant (%) after		
	30 days	60 days	90 days
1/10	2.5	8.3	15.5
1/100	0	4.3	10.9
1/1000	3.2	12.5	23.2
Non-treatment	8.7	24.5	32.7

Table 3. Preparation of nutrient solution for growth of *Chromobacterium* strain C-61

Chemicals	NsI	NsII	NsIII	NsIV
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0g	1.5	0.75	0.30
K ₂ HPO ₄	3.0g	1.5	0.75	0.30
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g	0.1	0.05	0.02
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.4g	0.2	0.10	0.04

Ns; nutrient solution

2) 배양액에서 증식한 길항세균의 병방제효과

가) 길항세균의 생육을 위한 배양액의 선발 : NB배지에서 하룻밤 배양한 *Chromobacterium* strain C-61을 상기의 배양액에 1/10000 의 비로 접종후 밀도를 조사한 결과(Table 4), 배양액 I과 배양액 II에서는 초기 1-2일 배양에서 급격히 증가하였다가 감소하는 경향이었고, 배양액 III에서는 배양당시의 밀도를 계속 유지하는 경향이었으며, 배양액 IV에서는 생육하지 못하였다.

나) 시들음병 방제효과 : 키틴을 배양토에 1/100 로 혼합한 후, 토마토를 이식하고, NB배지에서 하룻밤 배양한 *Chromobacterium* strain C-61을 상기의 배양액에 1/10000 의 비로 접종 후, 일반 농가관행에 의하여 양액재배하였다. 그 결과 (Table 5), 초기에는 길항균의 처리에 의해서 병억제 효과를 보여 주었으나, 정식 90일 후에는 무처리구와 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 4. Growth of *Chromobacterium* sp. strain C-61 according to nutrient solution

Incubated days	Density (Log_{10} CFU/ml)			
	NsI	NsII	NsIII	NsIV
0	4.3	4.7	4.5	4.3
1	8.5	7.0	4.9	2.7
2	7.4	8.2	5.4	2.2
5	6.6	7.9	5.1	1.0
10	4.6	5.3	4.7	1.5
15	3.7	4.2	4.8	0.9
20	2.3	2.8	3.9	0.2

Ns; Nutrient solution

Table 5. Effect of *Chromobacterium* sp. strain C-61 on suppression of wilt disease in tomato vinyl house

Nutrient solution	Diseased plant (%) after		
	30 days	60 days	90 days
Ns I	0.8	9.3	25.5
Ns II	1.5	14.3	24.9
Ns III	2.2	15.5	25.2
Non-treatment	4.5	18.5	26.5

4. 결과 요약

가. 길항미생물의 분리, 동정

1) 600여 종의 세균 중에서 모 잘록병균 *P. aphanidermatum*에 대한 균사 생장 억제 능력이 좋은 두 개의 균주를 선발하였다. 두 길항 미생물은 *in vitro*에서 *P. aphanidermatum*의 균사 생장 억제 뿐 아니라 유주자낭 형성, cyst germination도 억제하였다. 또한 다른 식물 병원 진균과 Gram negative와 positive 세균도 억제하였다.

2) *In vivo*에서 두 균주를 함께 처리했을 때 한 균주만 처리했을 때보다 방제 효과가 감소하였기 때문에 효과가 더 좋은 YC4194를 이용하여 계속 실험을 수행하였다. YC4194를 제제화 하기 위하여 여러 가지 보조제를 이용한 결과 talc와 bentonite를 이용한 제제가 효과가 가장 좋아 최종 보조제로 선택하였다.

3) 새로 분리한 YC4194와 YC4233 균주의 생리·생화학적, 분자생물학적 특성을

조사하여 동정한 결과 YC4194는 *Bacillus stearotheromophilus*와 98.7%, YC4233은 *Brevibacillus brevis*와 99.3%의 homology를 보였다.

나. 길항 미생물의 제제화에 의한 병 방제효과

1) YC4194 제제를 화학살균제(dimethomorph, metalaxyl, ethaboxam)와 함께 처리하였을 경우 YC4194 제제만 처리했을 때와 비슷한 방제효과를 보였으나, ethaboxam과 함께 처리했을 때는 ethaboxam만 처리했을 때보다 높은 방제효과를 보였다.

2) YC4194 제제를 pot 내에서 밀도 변화를 조사한 결과 처리 12일 후 10^7 cfu/g으로 초기 밀도(10^8 cfu/g)보다 줄어들었고, 병원균을 함께 처리한 토양에서는 12일 후 10^8 cfu/g으로 초기 밀도가 그대로 유지가 되었다. YC4194 제제의 보관상 안전성을 알아보기 위하여 4 ℃와 실온에서 보관하면서 밀도 변화를 기간별로 조사한 결과 실온보다 4 ℃가 더 안정적이었으며, 4 ℃의 경우 12주가 지난 후에도 10^7 cfu/g으로 유지가 되었다.

다. 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에서의 병 방제 효과

1) *Trichoderma harzianum*의 균사생장은 겉보리, crush된 겉보리, 쌀보리의 순으로 우수하였고, 포자형성은 쌀보리에서 훨씬 더 우수하였다. 한편, *Chromobacterium* sp. strain C-61은 crush된 겉보리에서 훨씬 더 잘 성장하였다.

2) chitin이 첨가된 상토에서 *T. harzianum*은 배양 30일후에도 접종 당시의 밀도를 유지하고 있었지만, *Chromobacterium* sp. strain C-61은 접종이후에 접종 당시의 밀도 (건토 1g당 약 3×10^5) 보다 현저히 감소하였고 30일 후에는 건토 1g당 약 5×10^2 의 밀도를 나타냈다.

3) chitin을 포함하고 있는 상토에 길항미생물과 *Rhizoctonia solani*를 접종하고 고추와 가지 유묘를 이식하였을 경우, 무처리 포트에서는 80-85%의 발병주율, 형질 전환 *T. harzianum*에서는 3-5%, 야생형 *T. harzianum*에서는 8-13%, 야생형 *Chromobacterium* sp. strain C-61에서는 36-48%의 발병주율을 나타냈다.

4) 10%의 chitin과 길항미생물을 포함하고 있는 상토에 고추를 파종, 육묘한 다음 본답에 이식하였을 경우, 정식 90일후, 길항균 무처리에서는 18%, *T. harzianum*을 처리하였을 경우에는 2%, *Chromobacterium* sp. strain C-61을 처리하였을 경우에는 7%가 위조, 고사하였다.

라. 양액재배작물의 병 방제 효과

1) chitin을 처리한 양액재배용 배양토에서 *Trichoderma harzianum*은 1/10의 chitin처리구에서 5일후 급격히 증가하고 그 이후 증가된 밀도를 유지하였고. 1/100의 처리구에서는 처리하였을 경우의 밀도를 유지하는 경향이었으나, 1/1000처리구에서는 밀도가 감소하는 경향이였다. 한편, 시들음병균인 *Fusarium oxysporium* 의 경우 1/10, 1/100, 1/1000 chitin 처리구의 순서로 밀도가 감소하였다.

2) 양액용 배양토에 chitin을 1/10로 처리하였을 경우에는 토마토 생육이 억제되었고, *Trichoderma harzianum*에 의한 시들음병 억제력도 1/10이나 1/1000의 키틴처리구 보다는 1/100 키틴처리구에서 더 우수하였다.

3) 길항세균인 *Chromobacterium* strain C-61은 토마토 배양액에서 생육하지 못하였지만, 배양액 1L당 colloidal chitin, 0.5g, ZnSO₄ 7H₂O, 0.5mg; NaMoO₄ 2H₂O, 1.5mg; Fe citrate, 1.0mg; CaCl₂, 10mg과 몇가지 화합물을 첨가하였을 경우에는 생육하였다. .

4) 길항세균인 *Chromobacterium* strain C-61을 배양액에 처리하였을 경우에는 시들음병 방제효과가 크지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 1년 차 연구목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구목표

Chromobacterium sp. chitinase유전자 (*chi54*) 를 길항 미생물인 *Trichoderma harzianum* p1 과 *Pseudomonas putida* 에 도입, 발현시켜서 모균주보다 병 방제효과 및 대상 병원균의 범위가 더 우수한 형질전환 길항 미생물을 개발한다.

2. 목표의 달성도

*chi54*를 *T. harzianum* p1에 도입, 자신의 chitinase와 도입된 *chi54* 의 chitinase 를 생산하는 형질전환균주를 선발하였고, 모균주보다 약 2배 높은 chitinase를 생산하였다. 또한, *chi54*를 *Pseudomonas putida* 에 도입, chitin분해력을 지니고, 병원균억제력이 증가된 형질전환균주를 선발하였다. (한국식물병리학회 발표).

3. 기술발전에의 기여도

Zeilinger등 (55) 은 *T. harzianum*에서 외래 유전자를 발현할 수 있는 *ech42* 및 *nag1* promoter를 개발하였지만, 발현산물이 분비되지는 못하였다. 이번 연구에서는 이들 promoter에 signal sequence를 부착하여 *T. harzianum*에서 발현된 chitinase가 분비되었다. *T. harzianum*에서 외래 유전자를 발현, 분비시킨 보고는 이번이 처음이다.

제 2 절. 2년 차 연구목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구목표

가. *Chromobacterium* sp. chitinase유전자 (*chi54*) 에 cellulose-binding domain 혹은 catalytic domain을 첨가하여 chitinase 활성이 증가된 유전자를 개발한다.

나. 육묘용상토에 chitin과 chitin분해미생물을 첨가하여 시설하우스재배작물의 토양전염성병을 방제한다.

2. 목표의 달성도

가. *chi54* 에 cellulose-binding domain을 첨가하였을 경우, chitinase 활성 및 기질 결합능력이 증가하였으나 catalytic domain을 첨가하였을 경우에는 활성이 오히려 감소하였다. 이번 연구에서는 이외에도 *chi54* 의 domain 구조 및 기능을 구명하였고, site-directed mutagenesis에 의해서 chitinase활성이 증가된 유전자를 선발하였다.(한국식물병리학회 발표 4건, AEM 논문 투고 1건, 미국 특허 출원 1건).

나. chitin과 *T. harzianum* 혹은 *Chromobacterium* sp.를 첨가한 상토에 고추를 파종, 육묘한 다음 본답에 이식하였을 경우 병 방제효과가 매우 우수하였다. 이외에도 모 잘록병균 *P. aphanidermatum*을 잘 억제할 수 있는 chitin분해미생물들을 선발하였다.(한국식물병리학회 발표)

3. 기술발전예의 기여도

가 chitinase유전자 domain의 구조 및 기능 : 최근, 몇몇 chitinase에서 chitin-binding domain의 구조 및 기능, catalytic domain의 구조와 그에 관련된 주요 아미노산이 밝혀지고 있다. 이번 연구에서는 *Chromobacterium* sp. chitinase유전자 (*chi54*)의 domain 구조와 기능, 그리고 그들에 필수적인 아미노산등을 구명하여 기 보고된 chitinase들과 비교, 분석되었다. 이번 연구에서 제시된 signal sequence, chitin-binding domain, catalytic domain의 구조와 그에 관련된 아미노산들, 그리고 그들의 기능은 앞으로 chitinase유전자 domain의 구조 및 기능 연구에 중요한 기초자료가 되리라 생각된다.

나. cellulose-binding domain의 첨가에 의한 chitinase의 활성 증가 : type3의 chitin-binding domain (ChBD)중에서 groupA에 속한 ChBD (CBD3a)는 chitin과 cellulose에 결합하는 것으로 보고되었고, family II의 cellulose-binding domain(CBD)중에서 groupA에 속한 CBD (CBDIIa)도 chitin과 cellulose에 결합하는 것으로 보고되었다. 그러나, 이번 연구에서처럼 CBD3a지역에 CBDIIa를 대체하여 chitinase활성과 기질결합능력에 대한 그들의 기능이 동일하다고 증명한 보고는 없다. 또한, ChBD와 catalytic domain으로 이루어진 chitinase유전자 앞쪽에 CBD를 부착하여 기질 결합능

력 및 chitinase활성이 증가되었다는 보고도 이번이 세계 최초이다. 이러한 결과는 앞으로 ChBD 와 CBD의 진화론적인 관계는 물론, chitinase와 cellulase의 관계를 구명하는데 중요한 자료가 되리라 생각되고, 유전자변형에 의해서 chitinase활성을 증가시키기 위한 연구에도 많은 도움이 되리라 생각된다.

다. catalytic domain의 첨가에 의한 chitinase활성의 증가 : *chi54*에 *T. harzianum* chitinase의 catalytic domain (CatD) 을 부착하였을 경우에는 chitinase활성이 감소하였다. 그러나, *chi54*의 ChBD에 *Thr-chia*를 부착하였을 경우에는 *E. coli*에서 발현된 chitinase가 분비되었고, 그 chitinase활성이 증가되었다. 최근 (2001년), *T. harzianum*의 chitinase유전자에 ChBD 혹은 cellulose-binding domain(CBD)을 결합시켰을 경우 chitinase활성이 증가되었다고 보고되었는데 (64), 이 연구에서처럼 chitinase가 분비되지는 못하였다.

라. site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 의 활성 증가 : 하나의 아미노산을 변경해서 chitinase활성이 증가되었다는 보고는 없다. 저희도 그럴 가능성에 대한 가설을 세우지 않았고, 이번 연구계획서에도 그런 실험은 계획되지 않았었다. 그러나, catalysis에 필수적인 아미노산을 분석하는 과정에서, *Chromobacterium* sp. chitinase 유전자의 Thr218을 Ser로 변경하였을 경우, chitin분해능력이 더 증가한다는 사실을 발견하였다. chitinase활성은 정제된 동일 단백질 농도에서도 더 높았다. 이러한 결과는 유전자 변형에 의한 chitinase활성의 증가, 그리고 catalysis 기작을 구명하는데 중요한 자료가 되리라 생각된다.

마. 길항 미생물과 chitin을 첨가한 상토에 의한 병 방제 효과 : 토양에 chitin을 처리하면 식물병이 방제된다는 보고는 있으나 이번 연구에서처럼 chitin과 길항미생물을 첨가한 상토에 의해서 식물병이 방제되었다는 보고는 없다. 앞으로 시설하우스의 토양전염성방제 전략을 수립하는데 많이 이용될 수 있으리라 생각된다.

4) 양액재배작물의 병 방제 효과 : 양액재배용 배양토에 chitin 과 *Trichoderma harzianum* 처리하고, 배양액에 chitin과 *Chromobacterium* .sp.를 처리하여 토마토 시들음병의 방제효과를 조사한다.

제 3 절. 3년 차 연구목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구 목표

양액재배용 배양토에 chitin 과 *Trichoderma harzianum*, 배양액에 chitin과 *Chromobacterium .sp.*를 처리하여 토마토 시들음병을 방제한다.

2. 목표의 달성도

chitin 과 *Trichoderma harzianum*을 처리한 배양토에서는 시들음병 방제효과가 컸으나, chitin과 *Chromobacterium .sp.*를 처리한 배양액에서는 방제효과가 인정되지 않았다. 이외에 *Bacillus stearotheromophilus*를 제제화하여 처리하였을 경우 오이 모잘록병에 대한 방제효과가 인정되었다.

3. 기술발전예의 기여도

앞으로 양액재배작물의 토양전염성방제에 이용될 수 있으리리 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 토양전염성병 억제력이 증가된 형질전환 chitin분해 미생물의 개발

1. chitinase생산능력이 증가된 형질전환 *Trichoderma harzianum*

다른 식물병원균에 대한 방제효과를 더 검토할 계획이다. 이 연구에서 chitinase 유전자는 저희팀에서 개발한 것이지만, *Trichoderma harzianum* P1은 미국 코넬대학교의 Dr. Harmann, promoter는 이태리 나폴리대학교의 Dr. Loritor에 의해서 개발된 것이기 때문에, 이들과 상의하여 특허 및 산업화등을 결정하려고 한다.

2. *Trichoderma harzianum*에서 외래 유전자를 발현, 분비할 수 있는 promoter 및 signal sequence

Trichoderma harzianum 에서 외래 유전자를 발현 및 분비할 수 있는 벡터를 개발하려고 한다.

제 2 절 chitinase활성이 증가된 chitinase 유전자의 개발

1. chitinase유전자 domain의 구조 및 기능

chitin-binding domain과 catalytic domain 단백질의 3차원구조를 분석하여, 각 domain의 기능을 단백질 수준에서 분석, 구명해 보고 싶다.

2. cellulose-binding domain의 첨가 및 site-directed mutagenesis에 의해서 chitinase 활성이 증가된 유전자

이들 유전자들은 효소의 산업적 생산에 이용될 수 있고, 생물적 방제능력을 높이기 위하여 다른 길항 미생물에 도입, 발현시키거나, 병 저항성 식물을 개발하기 위하여 다른 식물에 도입, 발현시키는데, 이용될 수 있으리라 생각된다. 특히, 이들 유전자를 벼에 도입, 발현시켜서 벼 잎집얼룩무늬병에 저항성인 벼를 개발해 보고 싶다. 현재 벼 잎집얼룩무늬병에 저항성인 품종은 알려져 있지 않기 때문에, 고전적인 육종

방법으로 저항성 품종을 개발하기 어려운 실정이다. 반면, chitinase는 여러 식물 병원균 중에서도 벼 잎집얼룩무늬병균인 *Rhizoctonia solani*를 특이적으로 더 잘 억제하기 때문에 성공가능성이 매우 높다.

3. *E. coli*에서 외래 유전자의 발현산물을 분비시킨 *chi54*의 signal sequence

*chi54*의 signal sequence가 *E. coli*에서 다른 유전자의 발현산물도 분비할 수 있는가 등을 검토해서 외래 유전자의 발현산물을 분비할 수 있는 벡터를 개발해 보고 싶다. 현재, *E. coli*에서 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 벡터들이 개발, 시판되고 있지만, 발현산물을 분비시킬 수 있는 벡터들은 개발되어 있지 않다.

제 3 절 토양전염성병 억제력이 우수한 chitin분해미생물의 실용화

1. 오이 모잘록병 방제효과가 우수한 길항미생물

다른 토양전염성병에 대한 방제효과를 더 검토하여 미생물농약으로 개발하려고 한다.

2. chitin과 chitin분해미생물을 첨가하여 토양전염성병을 방제할 수 있는 육묘용 상토

이들 공정을 육묘업자에 의뢰하여 포장상태에서 1년 더 검토 후, 산업화 여부를 결정하려고 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

미국 코넬대학교의 Dr. Harmann은 *Trichoderma harzianum* P1을 여러 토양전염성병에 대한 미생물농약으로 개발, 시판하고 있고, 이태리 나폴리대학교의 Dr. Loritor 는 *T. harzianum* P1의 길항 기작을 분자생물학적 측면에서 구명하고 있다. 본 연구과제 책임자는 chitinase유전자를 *T. harzianum* 에 도입, 발현시키기 위한 promoter를 분양 받고, 형질전환기술을 습득하기 위하여 2000년 2월, 한달 동안 이태리 나폴리대학교의 Dr. Loritor 실험실에서 연수를 하였다.

Pseudomonas spp.에서 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 pMEFE1 벡터는 일본 구마모토 소조대학교의 Dr. Ogawa에 의해서 개발되었다. 따라서, chitinase유전자를 *Pseudomonas putida*에 도입, 발현시키기 위하여 2000년 7월 한달 동안 Dr. Ogawa의 실험실에서 연수를 하였다.

제 7 장 참고문헌

1. Bolar, J., Aldwinckle, H., Norelli, J. and Harman, G. E. 1998. Insertion of genes from *Trichoderma harzianum* strain P1 to produce apple lines resistant to scab (*Venturia inaequalis*). Proc. of the International Plant Pathology Congress, Endingburh, UK.
2. Broadway, R. M. Williams, D. L., Kain, W.C., Harman, G. E., Lorito, M., and Labeda, D. P. 1995. Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus*. Lett. Appl. Microbiol. 20:271-276.
3. Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J., Broglie, R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science(Washington D C). 254(5035) : 1194-1197
4. Chet, I., A. Ordentlich, R. Shapira, and A. Oppenheim. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. Plant and Soil 129:85-92.
5. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microroganisms for biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 31:53-80
6. DiPietro, A., M. Lorito, C. K. Hayes, R. M. Broadway, and G. E. Harman. 1993. Endochitinase form *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. Phytopathology. 83:308-313.
7. Draborg, H., Kaupinen, S., Dalboge, H., and Christgau, S. 1995. Molecular cloning and expression in *S. cerevisiae* of two exochitinases from *Trichoderma harzianum*. Biochemistry and Molecular Biology International. 36(4) : 781-791
8. Draborg, H., Christgau, S., Halkier, T., Rasmussen, G., Dalboge, H., and Kaupinen, S. 1996. Secretion of an enzymatically active *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet. 29 : 404-409

9. Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:75-91
10. Fuchs, R. L, Mcpherson, S. A. and Drahos, D. J. 1986. Cloning of *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 504-509
11. Gal, S. W. 1992. *Purification and characterization of chitinase isozymes and cloning of a gene for 58 kD from Serratia marcescens KCTC 2172.* Doctor's thesis, Gyeongsang National University
12. Harman, G. E. Talor, A. G. and Stasz, T. E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Dis.* 73:631-637
13. Harman, G. E., C. K. Hayes, M. Lorito, R. M. Broadway, A. Dipietro, C. Peterbauer, and A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83:313-318.
14. Harman, G. E. Jin, X., Stasz, T. E. Peruzzotti, G., Leopold, A. C. Taylor, A. G. 1991. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological control.* 1:23-28
15. Haran, S., Schickler, H., Pe'er, S., Logemann, S., Oppenheim, A., and Cet, I. 1993. Increased constitutive chitinase activity in transformed *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control.* 3:101-108
16. Hayes, C. K., Klemsdal, S., Lorito, M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Nakas, J. P., Tronsmo, A., and Harman, G. E. 1994. Isolation and sequence of an endochitinase gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene* 135:143-148.
17. Herrera-Estrella, A., Glodman, G. H. and Van Montagu, M. 1990. High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molec. Microbiol.* 4:839-843
18. Howie, W., Joe, L., Newbiggin, E. Suslow, T., Dunsmuir, P. 1994. Transgenic tobacco plants which express the chia gene from *Serratia marcescens* have enhanced tolerance to *Rhizoctonia solani*. *Transgenic Research.* 3(2) : 90-98

19. Ishihara, K., Matsuoka, M., Ogawa, T., Fukuda, H. 1996. Ethylene production using a broad-host range plasmid on *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas putida*. J. Ferment. Bioeng.82(5) : 509-511
20. Joshi, S., Kozlowski, M., Selvaraj, G., Iyer, V. N. and Davies, R. W. 1988. Cloning of the genes of the chitin utilization regulon of *Serratia liquefaciens*. J. Bacteriol. 170:2984-2988
21. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685
22. Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., and Dipietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology 83:302-307.
23. Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L., and Harman, G. E. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β glucosidase and an *N*-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84:398-405.
24. Lorito, M., Hayes, C. K., Woo, S. L. Di Pietro, A., and Harman, G. E. 1993. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma Harzianum* and *Enterobacter cloacae*. Phytopathology 73:721-728.
25. Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K., and Harman, G. E. 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. Microbiology 140:623-629.
26. Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. Pages 73- 99 in Harman, G. E. and Kubicek, C. P., (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis, London.
27. Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Fillipone, E. Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci., USA

- 95:7860-7865.
28. Maniatis T, Fritisch E.F, Sambrook J (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 1.38-1.39
 29. Margolles-Clark, E., Harman, G. E., and Pentilla, M. 1996. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* using *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 62 :2152-2155
 30. Margolles-Clark, E., Harman, G. E., Hayes, C. K., and Pentilla, M. 1996. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *T. reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2145-2151
 31. Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. 1987. Rhizosphere colonization by *Serratia marcescens* for the control of *Sclerotium rolfsii*. Soil Biol. Biochem. 19(6): 747-751.
 32. Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marceacens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 78:84-88
 33. Park, S. K., and K. C. Kim. 1994. Isolation and characterization of Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Rhizoctonia solani*. Korean J. Plant Pathol. 10:39-46
 34. Park, S. K. and J. G. Yoo. 1995. Isolation and identification of chitinolytic bacteria from soil. J. Agric. Sci. Res. Sunchon Nat'1 Univ. 9:95-102
 35. Park, S. K., H. Y. Lee, and J. W. Huh. 1995. Production and some properties of chitinolytic enzymes by antagonistic bacteria. Korean J. plant Pathol. 11:258-264.
 36. Park, S. K., H. Y. Lee, and K. C. Kim. 1995. Antagonistic effect of chitinolytic bacteria on soilborne plant pathogens. Korean J. Plant Pathol. 11:47-52.
 37. Park, S. K., H. Y. Lee, and K. C. Kim. 1995. Role of chitinase produced by *Chromobacterium violaceum* in the suppression of *Rhizoctonia* damping-off. korean J. Plant Pathol. 11:304-311.
 38. Park, S. K, Y. R. Chung and H. C. Chung. 1998. Enzymatic characteristics of Tn5 insertion mutants of *Chromobacterium violaceum* reduced in chitinolytic and antifungal ability. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).

39. Park S. K. and G. E. Harmann. 1998. Cloning, sequencing and expression of a *Chromobacterium violaceum* endochitinase gene in *Escherichia coli*. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).
40. Park, S. K. and G. E. Harmann. 1998. Production of a *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Escherichia coli*. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).
41. Punja, Z. K., Raharjo, S. H. T. 1996. Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. Plant Disease. 80(9) : 999-1005
42. Roffey, P. E. and J. W. Pemberton. 1990. Cloning and expression of an *Aeromonas hydrophila* chitinase genes in *Escherichia coli*. Current Microbiology 21:329-337
43. Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y-L, Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F. Harman, G. E., and Kubicek, C. K. 1994. Molecular mechanism involved in mycoparasitism by *Trichoderma harzianum* : co-induction and synergism of hydrolytic enzymes and peptabiol antibiotics. Appl. Environ. Microbiol. 12:4364-4370.
44. Shapira, R., A. Ordentlich, I. chet, and A. B. Oppenheim. 1989. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. Phytopathology 79:1246-1249.
45. Sitrit, Y., Barak, Z., Kapulnik, Y., Oppenheim, A. B. and Chet, I. 1993. Expression of *Serratia marcescens* chitinase gene in *Rhizobium meliloti* during symbiosis on alfalfa roots. Molec. Plant-Microbe Interact. 6:293-298
46. Sitrit, Y., C. E. Vorgias, I. Chet, and A. B. Oppenheim. 1995. Cloning and primary structure of the chiA gene from *Aeromonas caviae*. J. bacteriol. 177:4187-4189
47. Sivan, A., Stasz, T. E. Hemmat, M., Hayes, C. K. and Harman, G. E. 1992. Transformation of *Trichoderma* spp. with plasmids conferring hygromycin B resistance. Mycologia 84:687-694
48. Sneh, B. 1981. Use of Rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *diantbi* in carnation. Phytopath. Z. 100:251-256

49. Terakawa, T., Takaya, N., Horiuchi, H., Koike, M., Takagi, M. 1997. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*. 16(7) : 439-443
50. Trudel, K., and A. Asselin. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178:362-366.
51. Tweddell, R. J., S. H. Jabaji-Hare, and P. Charest. M. 1994. Production of chitinases and β -1,3-glucanases by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:489-495
52. Watanabe, T., Suzuki, K., Oyanagi, W., Ohnishi, K. and Tanaka, H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* 172:4017-4022
53. Watanabe. T., K. Suzuki, W. Oyanagi, K. Ohnishi, and H. Tanaka. 1990. Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 265:15659-15665.
54. Woo, S. L., B. Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C. P., Del Sorbo, G., and Lorito, M. 1999. Disruption of *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* strain P1. *Molec. Plant Microbe Interact.* (in press).
55. Zeilinger, S., Galhaup, C., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M., Woo, S. L. and Kubicek, C. P. Use of the green protein as a reporter system reveals *Trichoderma harzianum ech42* gene expression as a very early, precontact event of mycoparasitic interaction (In submit)
56. Ikariyama, Y., Nishiguchi, S., Koyama, T., Kobatake, E., Aizawa, M., Tsuda, M., Nakazawa, T. 1997. Fiber-optic-based biomonitoring of benzene derivatives by recombinant *E. coli* bearing luciferase gene-fused TOL-plasmid immobilized on the fiber optic end. *Anal. Chem.* 69 (13) : 65-72
57. Brun, E., Moriaud, F., Gans, P., Blackledge, M. J., Barras, F., and Marion, D. 1997. Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z. secreted by *Erwinia chrysanthemi*. *Biochemistry* 36: 16074-16086

58. Chen, J. P., Nagayama, F., and Chang M. C. 1991. Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57 : 2426-2428
59. Henrissat, B. 1999. Classification of chitinases modules, p. 137 - 156, *In* P. Jolles and R. A. A. Muzzarelli (ed.), *Chitin and chitinases*, Birkhauser Verlag, Basel.
60. Hashimoto, M., T.Ikegami, S.Seino, N.Ohuh, H.Fukada, J.Sugiyama, M.Shirakawa, and T.Watanabe. 2000. Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriol.* 182(11) : 3045-3054.
61. Hasimoto, M., Honda, Y., Nikaidou, N., Fukamizo, T. and Watanabe, T. 2000. Site-directed mutagenesis of Asp280 suggests substrate-assisted catalysis of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 89(1):100-102
62. Huang, X., Zhang, H., Zen, K.-C., Muthukrishnan, S. and Kramer, K.-J. 2000. Homology modeling of the insect chitinase catalytic domain-oligosaccharide complex and the role of a putative active site tryptophan in catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 30(2):107-117
63. Ikegami, T., T. Okada, M.Hashimoto, S.Seino, T.Watanabe, and M. Shirakawa, 2000. Solution structure of the chitin-binding domain of *bacillus circulans* WL-12 Chitinase A1. *J Biol. Chem.* 275(18):13654-13661.2.
64. Limon, M.C., Margolles-Clark, E., Benitez, T., Penttila, M. 2001 Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Tichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters.* 198:57-63
65. Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., and Ohmiya, K. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* 179(23) : 7306-73147.
66. Papanikolaou, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C.-E., Oppenheim, A.-B. and

- Petratos, K. 2001. High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry*. 40(38):11338-11343
67. Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. 1998. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Microbiology* 144:2647-26548.
68. Tanaka, T., S.Fujiwara, S.Nishikori, T.Fukui, M.Takagi, and T.Imanaka. 1999. A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12): 5338-5344.
69. Tomas, C.-J., Gooday, G.-W., King, L.-A. and Possee, R.-D. 2000. Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chiA gene. *J Gen Virol*. 81(5):1403-1411
70. Tsujibo, H., Orikoshi, H., Tanno, H., Fujimoto, K., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y. and Inamori, Y. 1993. Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Altermonas* sp. strain O-7. *J. Bacteriol*. 175 (1), 176-1819.
71. Tsujibo, H., Orikoshi, H., Shiotani, K., Hayashi, M., Umeda, J., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y., and Inamori, Y. 1998. Characterization of chitinase C from a marine bacterium, *Altermonas* sp. strain O-7, and its corresponding gene and domain structure. *Appl. Environ. Microbiol*. 64(2) : 472-47810.
72. Van Aalten, D.-M.-F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.-G., and Eijsink, V.-G.-H. 2001. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc. Natl. Acad. Sic. USA*. 98(16):8979-8984
73. Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S., Tanaka, H. 1994. The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. *J. Bacteriol*. 176 : 4465-447211