

Glucose dehydrogenase 유전자의 *Aeromonas hydrophila* DA33으로의 도입에 따른 인산가용화 균주의 개량

박인혜 · 송옥렬 · 이용석 · 강위금¹ · 최시림² · 최용락*

동아대학교 생명공학과, ¹작물과학원 영남농업연구소, ²경상남도 농업자원관리원

Received May 6, 2008 / Accepted June 13, 2008

Improvement of the Phosphate Solubilization Microorganism by the Introduction of Glucose Dehydrogenase Gene into *Aeromonas hydrophila* DA33. In-Hye Park, Ok-Ryul Song, Yong-Seok Lee, Ui-Gum Kang¹, Si-Lim Choi² and Yong-Lark Choi*. Department of biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, Miryang 627-803, Korea, ²Agriculture Resources Management of Gyeongnam province, Miryang 627-914, Korea - *Aeromonas hydrophila* DA33 was isolated from cultivated soils as a bacteria having high abilities to solubilize inorganic phosphate. Glucose dehydrogenase gene (*gdh*) was cloned from *Escherichia coli*. The recombinant plasmid, pGHS containing glucose dehydrogenase gene was introduced into *A. hydrophila* DA33 in order to improve the activity of phosphate-solubilizing. The transformant harboring the *gdh* gene, *A. hydrophila* pGHS/DA33 increased enzyme activity. The strain also increased the gluconic acid generation that was effective for phosphate solubilization. It was possible that the strain containing pGHS produced higher solubilized phosphate with tri-calcium phosphate as the unique (P) source, in comparison with that of wild type without plasmid. These results suggest that the strain, *A. hydrophila* pGHS/DA33 is expected as effective biofertilizer for phosphate solubilization.

Key words : *Aeromonas hydrophila*, gluconic acid, glucose dehydrogenase gene, phosphate-solubilizing microorganism

서 론

토양 중에 존재하는 성분인 식물이 이용할 수 없는 tri-calcium phosphate 또는 hydroxy-apatite와 같은 불용성 인산을 가용화 시켜 주는 토양 미생물인 phosphate solubilization microorganism (PSM)에 대하여 오랫동안 농업 미생물 학자들과 미생물 생태학자들은 관심을 가지고 연구하여 왔다[7,8]. 토양 중에 존재하는 인산의 함량은 0.05%(w/v)를 차지하고 있으나, 식물이나 미생물이 이용할 수 있는 인산양은 그 중에서도 0.1%이다. 근래에는 화학비료의 과다사용과 토양오염에 의해 인산은 산성토양에서 철 및 알루미늄 이온과 알칼리성 토양에서 칼슘이온과 쉽게 결합한 킬레이트 형태로 불용화 되어 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산의 양을 증가되는 결과를 초래하였다. 이러한 난용성 인산염을 식물이나 미생물이 이용하기 쉬운 $H_2PO_4^-$ 나 HPO_4^{2-} 의 이온형태로 전환시켜주는 PSM으로 보고되어진 인산가용화 세균으로는 *Bacillus megaterium*, *B. polymyxa*, *Pseudomonas striata*, *Pseudomonas* sp. P118/89 등의 세균이 알려져 있으며[4,7,23], 곰팡이로는 *Penicillium simplicissimum*, *P. aurantiogriseum*, *P. bilaji*, *Aspergillus awamori*, *A. aculeatus*, *A. niger* 등이 있다 [5,6,14,18]. 이러한 미생물은 인산 자원의 재활용이란 특면에

서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있으며, 토양미생물을 이용한 친환경적이고 고부가 가치의 생물 비료 제재를 개발할 수 있다.

송 등[19,20]은 인산이 과다 시비된 경작지 토양에서 분리한 PSM인 *Aeromonas hydrophila* DA33, DA57 및 *Burkholderia* sp.의 인산 가용화가 유기산 생성에 따른 산도의 증가에 의한 것으로 보고하였다. 이러한 유기산의 일종인 gluconate는 일반적으로, 난용성 인산염의 가용화능이 높은 인산 가용화 균은 세포막의 periplasm에 존재하는 quinone계 효소에 의해 이뤄진다[3,9]. 세포막에는 glucose dehydrogenase, 2-ketogluconic acid dehydrogenase 및 2,5-ketogluconic acid dehydrogenase가 존재하며, 이들 효소들의 연속적인 기질 산화 반응으로 생성되는 전자계에 의해 킬레이트 상태의 난용성 인산염을 가용성 인산염으로 가용화하는 것으로 알려져 있다. 이 중에서도 glucose를 gluconic acid로 산화시키는 glucose dehydrogenase (GDH)가 직접 산화과정의 첫 단계이다[15]. GDH는 *Escherichia coli* [22], *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* [12], *Ewinia herbicola* [15] 등에서 연구 및 보고가 되어져 있다. 특히 *E. coli*의 GDH는 apo형태로 pyrroloquinoline quinone (PQQ)과 Mg^{2+} 을 cofactor로서 필요로 하는 것으로 알려져 있다[13].

본 연구에서 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 고효율적인 균주의 개발을 위하여 *E. coli*로부터 glucose dehydrogenase 유전자를 분리하여, 난용성 인산염의 가용화

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7585, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : ylchoi@dau.ac.kr

우수 미생물인 *A. hydrophila* DA33에 glucose dehydrogenase를 도입시켜 난용성 인산염 가용화 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

Cloning을 위한 형질전환용의 숙주 세포로서 *E. coli* JM109를 사용하였다. 인산가용화 균주로서 기존에 보고되어진 *A. hydrophila* DA33 [19]를 사용하였다. 균주 배양은 주로 LB배지(Difco, USA)를 사용하였고, 인산화가용화능 측정을 위해 SM배지(sucrose 10 g, NH_4NO_3 0.27 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, yeast extract 0.1 g)를 사용하여, 37°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 필요에 따라서 배지 1ml 당 100 µg의 chloramphenicol 또는 ampicillin을 첨가하여 배양하였다.

Genome, plasmid DNA의 분리 및 glucose dehydrogenase 유전자의 cloning

E. coli W3110 genome DNA 분리는 Qiagen의 kit를 사용하여 분리 정제하였다. 배양된 균주를 집균하여 TE buffer (50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0)에 현탁하고, 액체 질소 또는 -80°C에서 30분간 동결 후 lysozyme 용액 4 ml을 가한 후 얼음에 45분간 방치한 다음, STEP solution (0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.4 M EDTA, 1 mg/ml proteinase K)을 8 ml첨가하여 50°C에서 1시간 동안 반응하였다. TE buffer 45 ml와 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 96 ml을 가하여 5분간 반전한 후 4,000× g에서 15분간 원심분리한다. 상층액에 3 M sodium acetate (pH 5.2) 9 ml와 에탄올 225 ml를 가하여 혼합 후 유리병으로 DNA를 감아서 회수하고, 80% 에탄올에 세정, 건조한 후 20 ml의 TE buffer에 용해한다. 다시 10 mg/ml RNaseA 10 ml를 가하여 37°C에서 30분간 반응한 후, phenol 처리 후 다시 유리병으로 회수를 반복 실시하여 비교적 높은 순도의 DNA를 정제하였다[16]. Sequencing 및 기타 유전자 재조합 실험을 위한 plasmid DNA 분리는 Promega사의 Wizard miniprep 정제 kit로 분리하여 준비하였다.

gdh 유전자를 PCR의 방법으로 클로닝 하고자 보고된 *E. coli*의 gdh 유전자[22] 염기서열을 이용하여 GDH1과 GDH2의 primer를 다음과 같이 작성하여 사용하였다.

GDH1: 5'-TAATGAATCGAAATGGTGTCTCTTTATGGC-3'

GDH2: 5'-ATAAGGCGTTCACGCCGGATCCGGCATGAACAACG-3'

PCR 반응은 Ex PCR kit를 사용하여 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 및 72°C에서 1분의 조건으로 30회 반복하였다. 증폭된 단편은 gel extraction kit를 사용하여 정제하였고, pGEM-T Easy vector에 cloning하였다. 얻어진 유전자를 *A.*

hydrophila DA33에 도입하고자 subcloning을 실시하였다. pGEM-T Easy vector에 cloning된 재조합체 pGGT를 *EcoRI*로 절단한 후, insert DNA 영역을 gel extraction kit로 정제하여 *EcoRI*의 제한효소로 절단된 pHSG398에 subcloning하여 재조합체인 pGHS를 획득하였다.

DNA의 1차 구조 해석

Cloning된 유전자의 구조적 확인을 위한 DNA 염기배열의 결정은 plasmid DNA를 분리하여 dideoxy chain termination [18] 방법으로 Pharmacia의 A.L.F DNA sequencer로 수행하였다. 결정된 염기배열로부터 구조적인 특성 및 상동성 해석은 NCBI의 data base와 비교하여 1차 구조 분석을 수행하였다.

Glucose dehydrogenase 유전자의 인산가용화 세균으로의 도입

Glucose dehydrogenase 유전자의 *A. hydrophila* DA33으로의 도입은 *E. coli* Pulser™ Transformation electroporator를 이용한 standard electroporation 방법을 이용하여 수행하였다[2]. *A. hydrophila* DA33은 ampicillin에 내성을 가지므로, chloramphenicol 내성 유전자를 가진 pHSG398 vector에 glucose dehydrogenase 유전자를 클로닝하여 획득한 재조합체인 *A. hydrophila* pGHS/DA33는 chloramphenicol이 첨가된 LB 고체 배지 상에서 선별되어졌다.

Glucose dehydrogenase (GDH)의 측정

A. hydrophila pGHS/DA33의 배양액 속의 GDH 측정은 Matsushita 등[10,11]이 개발한 분광학적인 방법인 전자 수용체 phenazine methosulfate (PMS)와 2,6-dichlorophenol indophenol (DCIP)를 이용하여 25°C에서 측정하였다. LB배지에 균을 하룻밤 배양 후, 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 두 번 씻은 후, glucose 최소배지(1% glucose와 21 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8)에 5%(v/v)가 되게 접종하여 30°C, 160 rpm으로 수일간 배양하였다. 배양액을 6,000 rpm에서 5분간 실온에서 원심분리하여 취한 상등액을 조효소로서 사용하였다. 상등액을 반응액(0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, 10 mM DCIP, 3 mM PMS, 0.1 unit GDH, H₂O)에 혼합하여 25°C, 600 nm에서 DCIP의 감소 정도로 배양액 속의 gluconic acid 함량을 측정하였다. *A. hydrophila* pGHS/DA33로부터 생성된 gluconic acid의 함량은 *Pseudomonas* sp.로부터 정제된 gluconate dehydrogenase (GDH)를 0.1 unit으로 사용하여 측정하였다.

A. hydrophila pGHS/DA33의 유기산 gluconic acid 정량

Thiamine (20 µg/ml)과 tri-calcium phosphate (20 mg/

ml)를 함유한 GMS배지 50 ml의 LB배지에 하룻밤 배양한 *A. hydrophila* pGHS/DA33이 10%(v/v)가 되게 재접종 한 뒤 37°C, 24시간 동안 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액을 10,000 rpm, 10분간 실온에서 원심분리한 후, 상등액 0.5 ml를 0.2 µm Whatman membrane filter에 여과시켰다. 여과된 시료를 thermo hypersil C₁₈ column (250×4.6 mm)을 이용하여 high-performance liquid chromatography 분석을 하였다. 고정상은 50 mM sodium phosphate와 5 mM tetra-butyl-ammonium hydrogen sulfate, pH 6.5 (95%)에 acetonitrile (5%)를 첨가하여 0.25 ml/min의 속도로 흡광도 220 nm에서 분석하였다[20].

인산가용화능 측정

300 ml 삼각 flask에 각종 난용성인산염이 0.5% 첨가된 SM배지 100 ml에 전배양한 균주를 접종한 후, 160 rpm으로 필요한 시간동안 연속적으로 진탕배양하면서 배양액을 원심 분리하여 얻어낸 상등액 내의 유리인산 농도와 pH 변화를 일정시간마다 측정하였다. 균체배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 5분간 실온에서 원심분리 하여 얻어진 상등액을 조효소로서 사용하였다. 원심분리 후 상등액 10 µl에 멸균수 90 µl을 첨가하여 총 100 µl가 되도록 희석한 다음, phosphorus reagent (sigma) 900 µl를 혼합하여 15분간 실온에서 반응하였으며, 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

인산가용화 관련 gdh 유전자의 클로닝 및 구조 확인

E. coli K-12 W3110의 chromosomal DNA를 주형으로 GDH1 과 GDH2 primer를 이용하여 PCR product 2.4 kb의 증폭된 단편을 획득하였다. 구조해석을 통한 gdh 유전자를 확인하기 위하여, 증폭된 단편을 pGEM-T Easy vector에 cloning하여 재조합 plasmid인 pGGT를 획득하였다. 유전자의 구조해석 결과, *E. coli*의 gdh 유전자와 일치함을 확인 하였으며, 재조합 plasmid인 pGGT가 도입된 대장균에서 이 효소 유전자가 대량 발현됨을 확인하였다(data not shown). 송 등[19]이 분리한 인산가용화능이 우수한 세균인 *A. hydrophila* DA33으로의 도입을 위해 이 균주의 항생제 감수성을 조사한 결과 chloramphenicol에는 내성이 없었다. 재조합 plasmid, pGGT를 *EcoRI*으로 처리하여 insert 영역 2.4 kb를 정제한 다음, chloramphenicol에 내성을 가진 vector인 pHSG398을 *EcoRI*으로 처리하여 subcloning하였으며, 그 결과 얻어진 재조합체를 pGHS로 명명하였다(Fig. 1).

***A. hydrophila* DA33으로 gdh 유전자의 도입 및 발현**

본 연구그룹이 분리한 다수의 인산가용화 균주를 대두의 pot 실험으로 인산의 이용성 증대 시험을 한 결과, *A. hydrophila*

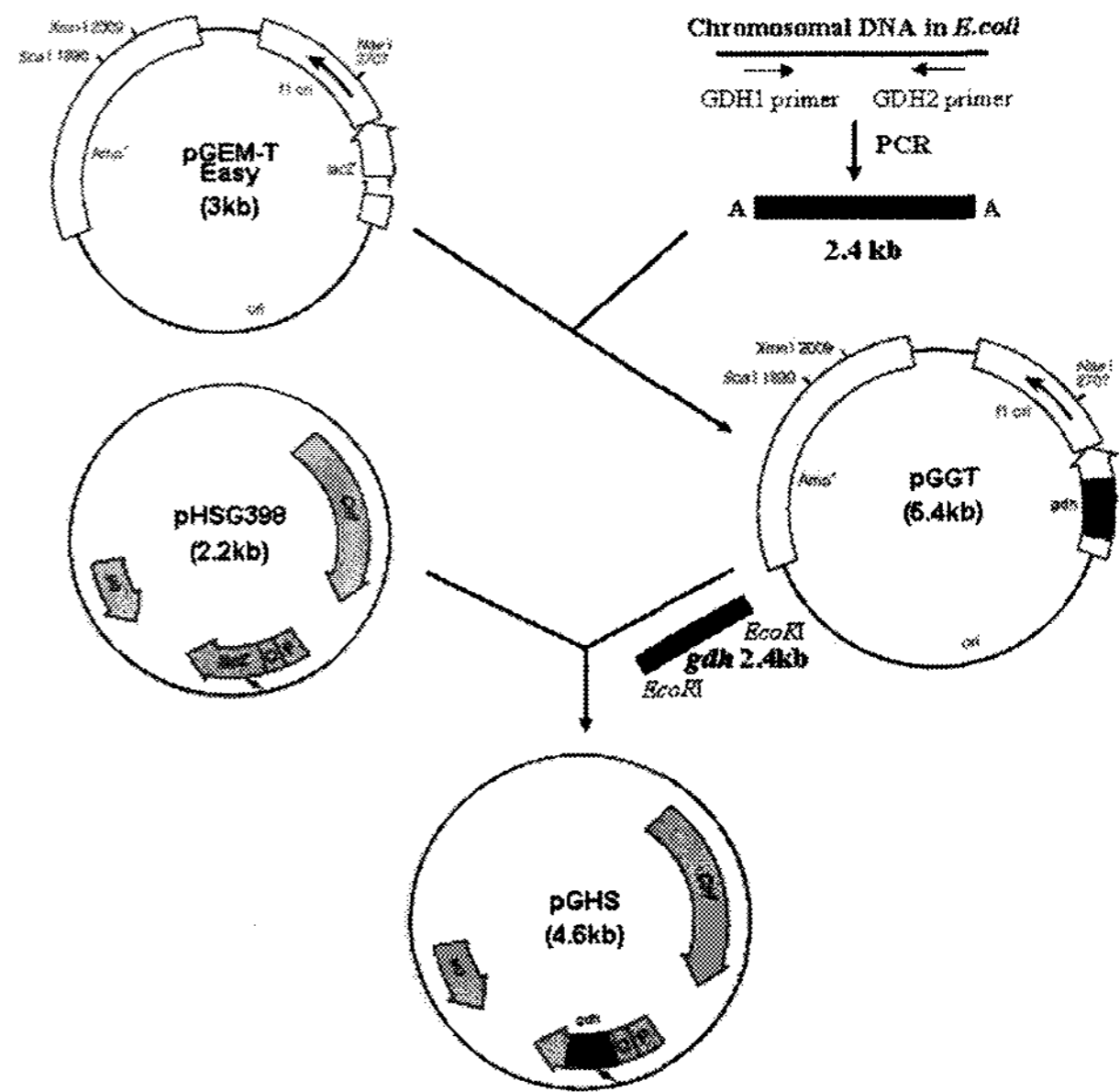


Fig. 1. Genetic construction of recombinant pGHS for the transfer of the gdh gene from *E. coli* using pHSG398 plasmid vector. The 2.4 kb DNA fragment of the gdh gene was inserted into pGEM-T Easy and pHSG398 plasmid vector (Amp^r: resistance to ampicillin, Cm^r: resistance to chloramphenicol).

DA33을 처리한 실험구의 생육이 가장 우수하여(data not shown), 이 균주를 분자육종하기로 하였다. pHSG398에 subcloning하여 획득된 재조합 plasmid인 pGHS를 *A. hydrophila* DA33에 eletroporation으로 도입하였다. Chloramphenicol 함유 배지에서 형질 전환된 콜로니를 선별한 뒤, plasmid의 도입여부를 확인하였다. 수세대의 계대배양을 거친 뒤에 플라스미드의 안정성을 확인하였다. 형질전환 균주인 pGHS/DA33은 tri-calcium phosphate의 인산염 배지에서 확인한 결과, wild type이나 vector인 pHSG가 도입된 균주보다 투명대가 선명하게 나타났다(Fig. 2). Methyl red가 0.01% 함유된 고체배지 상에서도 확연하게 붉은 색을 나타내었다(data not shown). Fig. 3은 야생형 균주 DA33과 가용화 관련 유전자를 도입한 *A. hydrophila* pGHS/DA33의 GDH 효소활성을 측정 비교한 결과이다. 가용화 관련 유전자를 도입한 형질전환 균주는 배양 2일째에 가장 증가된 GDH 효소활성을 보였으며, wild type보다 40% 이상의 높은 효소활성을 나타내었으나, 발현양은 크게 증가되지 않은 것으로 보아, 대량발현 조건의 확립을 위한 계속적 연구가 필요한 것으로 생각된다.

***A. hydrophila* pGHS/DA33의 유기산 생성**

지금까지 난용성 인산염의 가용화 기작은 정확하게 알려져 있지 않다. periplasm에서 pyrroloquinoline quinone (PQQ)을 생성하는 family에 의하여 유기산 생성이 증가된다

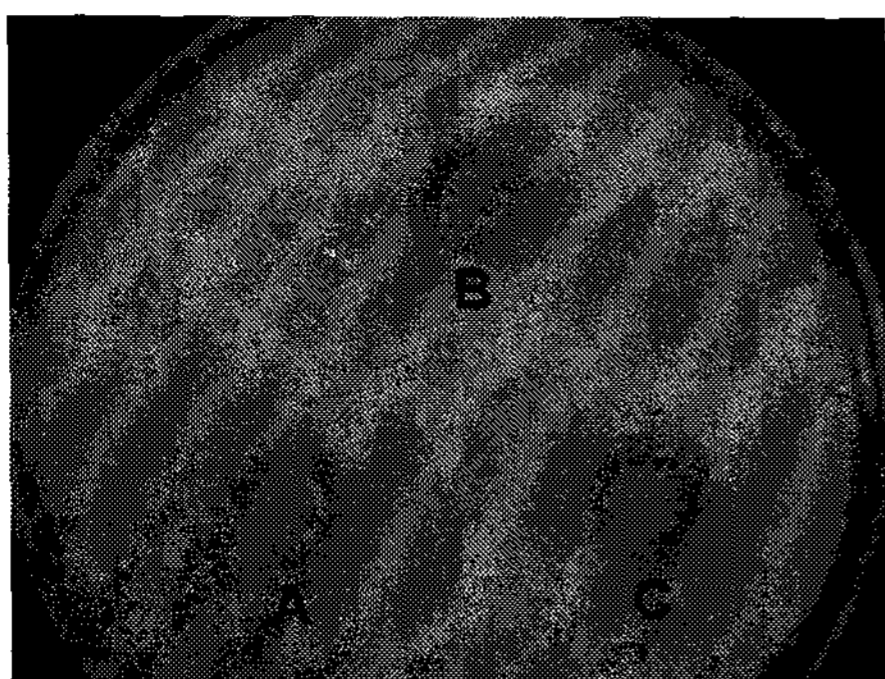


Fig. 2. Clear halos formation on medium containing tri-calcium phosphate as the sole P source by the bacterial culture. (A) *A. hydrophila* pHSG/DA33 containing pHSG, (B) *A. hydrophila* pGHS/DA33 containing pGHS with the *gdh* gene from *E. coli*, (C) *A. hydrophila* DA33.

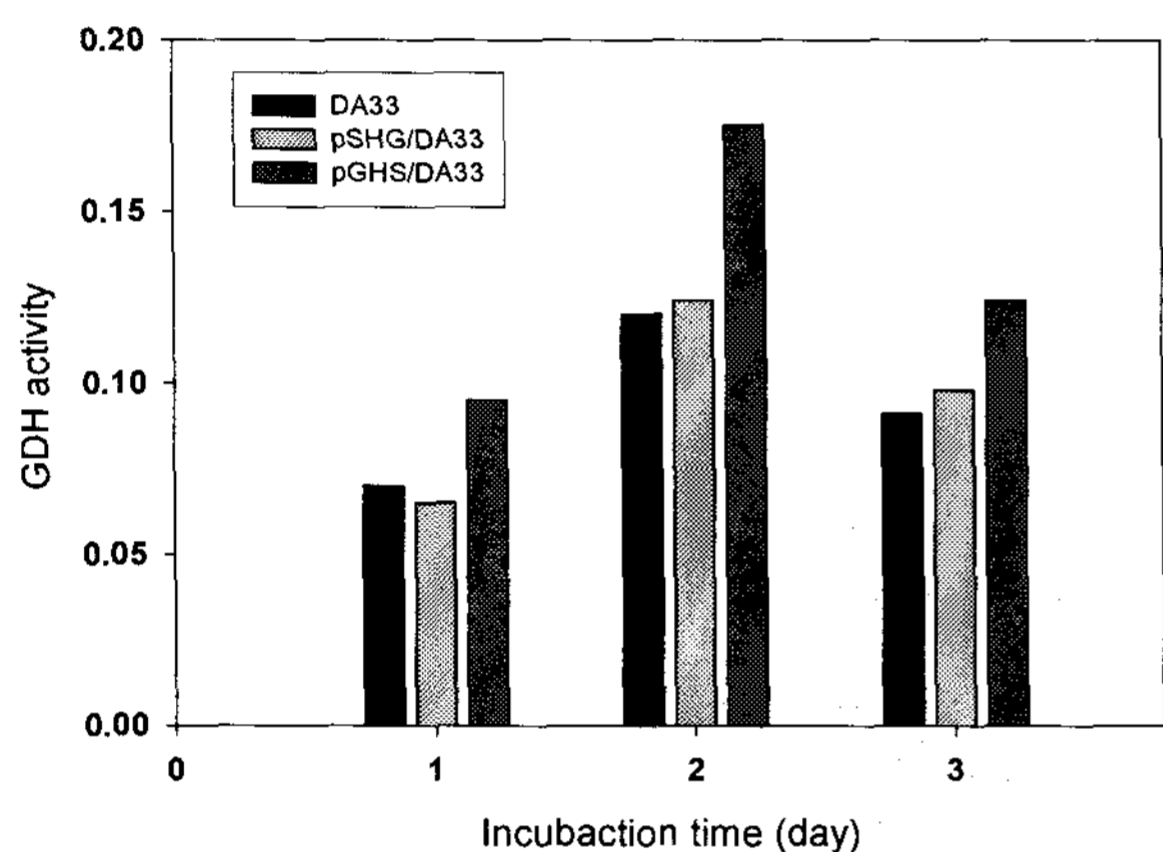


Fig. 3. Assay of GDH activity during the cultivation of *A. hydrophila* DA33 and *A. hydrophila* pGHS/DA33 containing recombinant plasmid with time courses. Bacteria were cultured in minimal medium containing 1% glucose and 10 mM potassium phosphate buffer at 30°C.

는 것이 보고되어져 있으며, 이것이 난용성 인산염의 가용화에 관여한다는 것이 알려져 있다[9]. PMS의 생육이 증대됨에 따라 유리인산의 방출량이 증가함에 따라 pH 저하가 나타나는데, 이는 유기산 생성에 의한 결과라고 알려져 있다. 이미 밝혀진 유기산에는 gluconic acid, citric acid 등이 있으며, 분리 균주 *A. hydrophila* DA33은 0.5% 난용성 인산염이 첨가된 배지에서 배양한 배양액 내에 gluconic acid의 생성이 증가되었다[19,20]. Gluconic acid의 생성이 glucose dehydrogenase (GDH)에 의해 생산되어 난용성 인산염의 가용화와 밀접한 관계를 가지고 있다고 밝혀졌으므로, GDH활성을 증대시키는 *A. hydrophila* pGHS/DA33에서의 유기산 생성을 경시적으로 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

Glucose dehydrogenase 유전자를 도입한 *A. hydrophila* pGHS/DA33 균주는 glucose가 첨가된 최소 배지에서 배양 2일째에 최대의 생성량을 보이다가 3일째 경과 시에는 약간

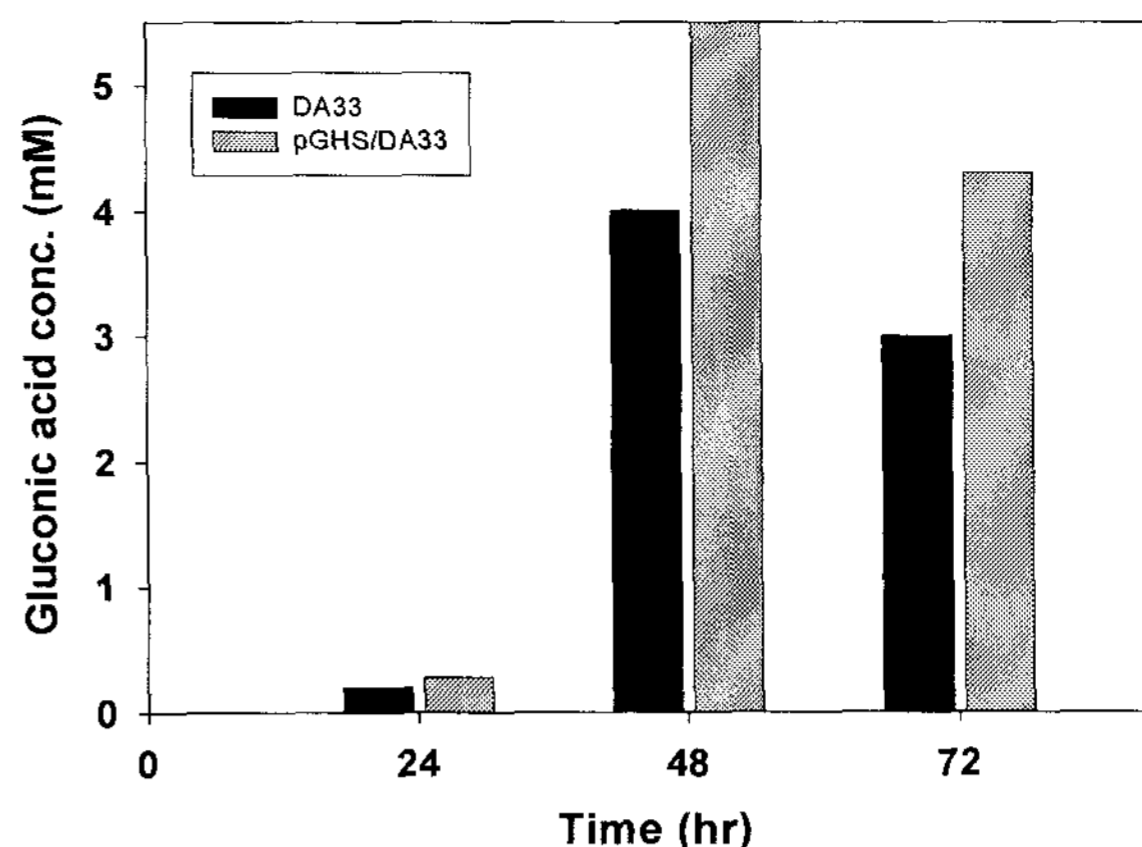


Fig. 4. Gluconic acid production during the cultivation of *A. hydrophila* DA33 and *A. hydrophila* pGHS/DA33 containing recombinant plasmid with time courses. Bacteria were cultured in minimal medium containing 10 mM potassium phosphate buffer pH 6.8, at 30°C.

감소하는 경향을 보였으며, 평균 5.6 mM의 gluconic acid를 생성하여 wild type 균주보다 약 1.4배의 생산 증가 현상을 보였다. 이 결과는 *E. herbicola* EH010의 균주에서의 gluconic acid 생성량과 비슷한 결과이나[9], 생육 조건 등이 일치하지 않으므로 정확한 효율을 비교하기에는 어려움이 있다. 따라서 효과 증대를 위해서는 인산염의 첨가에 따른 배양조건을 달리하는 추가적인 확인이 필요할 것으로 사료된다.

형질전환 균주 *A. hydrophila* pGHS/DA33의 가용화 효과

*E. coli*의 *gdh* 유전자를 도입한 균주의 GDH 활성을 실험한 결과 wild type 균주에 비해 약 40% 정도 높았다. 이는 도입한 *gdh* 유전자의 발현효율은 다소 미흡한 것이나 연속적인 효소의 생성 증가는 인산염 가용화 능력을 향상 시킬 것으로 사료된다. 분자 육종한 *A. hydrophila* DA 33의 난용성 인산염 가용화 특성은 배양학적 특성 실험에서 최적의 가용화 효과를 보여준 glucose 3% 농도로 첨가된 배지에서 조사하였다(Fig 5). 배양에 따른 인산염에서 가용화된 유리인산의

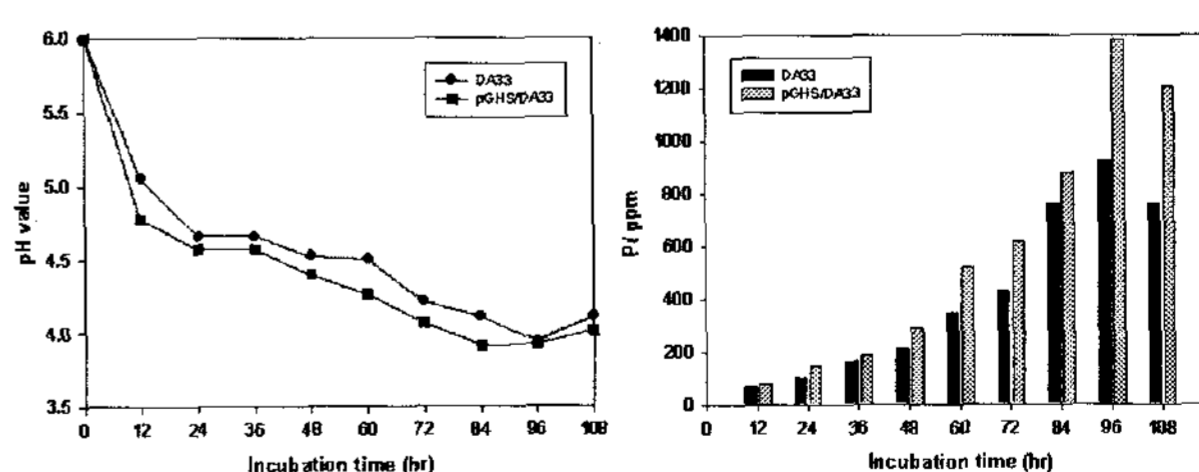


Fig. 5. Changes of free phosphate concentrations and pH values during the cultivation of *A. hydrophila* DA33 and *A. hydrophila* pGHS/DA33 containing pGHS. Bacteria were cultured in minimal medium containing 3% glucose and 0.5% tri-calcium phosphate at 37°C. (A) pH value, (B) free phosphate concentration.

생산량은 wild type인 *A. hydrophila* DA33이 배양 4일째에 약 960 ppm인 반면에 *gdh* 유전자가 도입된 *A. hydrophila* pGHS/DA33는 1,380 ppm을 가용화 시켰다. 인산염 가용화가 일어날 경우에 동반되는 pH의 감소현상은 wild type이나 형질전환 균주에 있어서 커다란 차이점을 볼 수는 없었다. 이는 4일 정도의 배양시간에 약 1.4배 이상의 인산 가용화 효과를 보여준 것이므로, 실질적인 식물재배 및 토양환경에서는 보다 장기적인 이용이 이루어지므로 더 높은 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

생물비료의 개발을 위하여 분리된 난용성 인산염의 가용화능이 우수한 균주인 *Aeromonas hydrophila* DA33의 분자육종을 위해 인산가용화 관련 유전자를 도입하였다. *E. coli*의 *gdh* 유전자를 도입한 *A. hydrophila* DA33은 GDH 활성이 증가하여 유전자가 발현됨을 확인하였으며, wild type에 비해 GDH 활성이 약 40% 정도 높게 나타났으며, 이는 도입된 *gdh* 유전자의 발현에 의한 것으로 보여 진다. 이 균주는 인산가용화에 기여하는 유기산인 gluconate의 생성도 증가하였다. *A. hydrophila* DA33의 wild type과 *gdh* 유전자를 도입한 *A. hydrophila* pGHS/DA33의 난용성 인산염 가용화능을 실험한 결과, *gdh* 유전자를 도입한 균주의 인산 가용화능이 약 1.4배 정도의 효과를 보였다. 지금까지의 결과로 비춰볼 때 앞으로 생물 비료로서의 *A. hydrophila* DA33 이용 가능성을 나타내며, 분자육종균 *A. hydrophila* pGHS/DA33은 생물 비료로서의 효율성을 가질 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 동아대학교의 교내연구비 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

1. Asea, P. E. A., R. M. N. Kucey and J. W. B. Stewart. 1998. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 459-464.
2. Ausubel, F. M. 1992. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. Green/Wiley, New York.
3. Biville, F., E. Turlin and F. Gasser. 1991. Mutants of *Escherichia coli* producing pyrroloquinoline quinone. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1775-1781.
4. Dubey, S. K. and S. D. Billore. 1992. Phosphate solubilizing microorganism (PSM) as inoculant their role in augmenting crop productivity India-A review. *Crop. Res. Hisar.* **5**, 11-17.
5. Kang, S. C. and M. C. Choi. 1999. Solid culture of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1-7.
6. Kucey, R. M. N. 1988. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Can. J. Soil Sci.* **68**, 261-270.
7. Illmer, P., A. Barbato and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly-soluble AlPO₄ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 265-270.
8. Illmer, P. and F. Schinner. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphate-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 257-262.
9. Liu, S. T., L. Y. Lee, C. Y. Tai, C. H. Hung, Y. S. Chang, J. M. Wolfram, R. Rogers and A. H. Goldstein. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J. Bacteriol.* **174**, 5814-5819.
10. Matsushita, K., J. C. Arents, R. Bader, M. Yamada, O. Adachi and P. W. Potma. 1997. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* **143**, 3149-3156.
11. Matsushita, K., E. Shinagawa and M. Ameyama. 1982. D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate yielding, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**, 187-193.
12. Matsushita, K., E. Shinagawa, O. Adachi and M. Ameyama. 1978. Membrane-bound D-gluconate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* **85**, 1173-1181.
13. Olsthoorn, A. J. J. and J. A. Duine. 1996. Production, characterization, and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (Soluble Type; EC 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **336**, 42-47.
14. Raj, J., D. J. Bagyaraj and A. Manjunath. 1981. Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza and a phosphate-dissolving bacterium on plant growth and 32P uptake. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 105-108.
15. Rodriguez, H., T. Gonzalez and G. Selman. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotechnol.* **84**, 155.
16. Sambrook, J. and D. W. Russell. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
17. Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
18. Sayer, J. A., S. L. Raggett and G. M. Gadd. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: Development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Res.* **99**, 987-991.
19. Song, O. R., S. J. Lee, M. W. Lee, S. L. Choi, S. Y. Chung, Y. G. Lee and Y. L. Choi. 2001. Isolation and phos-

- phate-solubilizing characteristics of PSM, *Aeromonas hydrophyla* DA33. *J. Life Sci.* **11**, 69-73.
20. Song, O. R., S. J. Lee, S. H. Kim, S. Y. Chung, I. H. Cha and Y. L. Choi. 2001. Isolation and cultural characteristics of a phosphate solubilization bacterium, *Aeromonas hydrophyla* DA57. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 251-256.
 21. Varsha, N., T. Jugnu and H. H. Patel. 1993. Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus awamori*. *Ind. J. Exp. Biol.* **31**, 747-749.
 22. Yamada, M., S. Asaoka, H. Milton, J. R. Saier and Y. Yamada. 1993. Characterization of the *gcd* gene from *Escherichia coli* K-12 W3110 and regulation of its expression. *J. Bacteriol.* **175**, 568.
 23. Young, C. C. 1990. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical-tropical soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **36**, 225.