

數種의 植物病原菌(흰비단病菌·菌核病菌 및 좁검은 균핵病菌)이 生産하는 加水分解酵素의 活性

趙白皓·金基淸*

Activities of the Hydrolytic Enzymes Produced by Plant Pathogenic Fungi, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Helminthosporium sigmoideum* var. *irregulare*.

B.H. Cho and K. Kim*

Abstract

Activities of various hydrolytic enzymes produced by three plant pathogenic fungi, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lieb.) deBary and *Helminthosporium sigmoideum* var. *irregulare* Crallery et Tullius, were measured. Activities and amounts of the enzymes in mycelia, cultural filtrates, and sclerotia (except of sclerotia of *H. sigmoideum* var. *irregulare*) were estimated at various pH levels in order to find out optimal pH for their enzymatic activities. Enzymes such as cellulase (Cx), invertase, xylanase, β -amylase, polymethylgalacturonase, polygalacturonase, phosphatase and protease were estimated. Culture solution for production of enzymes was prepared by adding of 10g, D-glucose, 1.3g NH_4NO_3 , 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 1.0g KH_2PO_4 into 1 liter of potato decoction plus 2ml of micro element solution consisting of 0.2mg Fe, 0.2mg Zn, and 0.1mg Mn as the sulphates into 1 liter of distilled water. All tested mycelia and cultural filtrates were obtained from the cultures incubated in previous solution for ten days at 25°C, and sclerotia were harvested from PDA plates of 3. days old. The crude enzyme solutions were prepared according to the method of Miyazaki et al¹⁷⁾.

Ten days after incubation, activities of Cx produced by *Scl. sclerotiorum* were higher than those of the other fungi, and each of Cx from three fungi showed different pH optima, such as *S. rolfsii* and *Scl. sclerotiorum* in acid side (around pH 3.0), *H. sigmoideum* var. *irregulare* in neutral side (around pH 6.3). Invertase activities of *S. rolfsii* were 20 times higher than those of the other fungi in all samples. All tested fungi, however, showed no significant difference between the enzymatic activities of their cultural filtrate and mycelia, and the activities in sclerotia of *S. rolfsii* and *Scl. sclerotiorum* were hardly recognized. There were multiple peaks on the xylanase activity curves of three fungi in terms of pH values. High activities of the xylanase were revealed in sclerotia of *S. rolfsii* and *Scl. sclerotiorum*, and in mycelia of *H. sigmoideum* var. *irregulare*. The highest activities of β -amylase were shown both in mycelia and cultural filtrate of *H. sigmoideum* var. *irregulare* among the tested fungi, and their optimal pH was 6.2 in both mycelia and cultural filtrate. In the *S. rolfsii* and *Scl. sclerotiorum*, however, the activities of cultural filtrates were higher than those of the other fungi, and optimal pH was 3.0 and 6.2 for cultural filtrate and both mycelia and sclerotia, respectively. Activities of PMG were high in cultural filtrates

*全南大學校 農科大學 園藝學科 (Dept. Hort. College of Agr. Chunnam Univ.)

of all tested fungi, especially in *Scl. sclerotiorum* and *H. sigmoideum* var. *irregularare*. Mycelia of them also showed the considerable activities. Optimal pH for enzymatic activities were variable with the kind of fungi or with the samples measured. The highest activities of PG were presented by mycelia of *S. rolfsii* and *Scl. sclerotiorum*. 9.1 $\mu\text{g}/\text{min}$. and 9.5 $\mu\text{g}/\text{min}$., respectively. Optimal pH for activity of PG in mycelia was around 4.5 in *S. rolfsii* and around 3.0 in *Scl. sclerotiorum*. Phosphatase of *S. rolfsii* and *Scl. sclerotiorum* was more active in acid side (optimal PH3.5) and that of *H. sigmoideum* var. *irregularare* showed one peak each in acid, neutral and alkaline side. But the highest peak was at pH 9.5. Protease of all tested fungi was more active at pH 10.0, especially that of the cultural filtrate of *H. sigmoideum* var. *irregularare*.

緒 言

植物의 病에 있어서 寄生細胞는 細胞內로 侵入하는 病原菌에 의해 傷處를 입거나 죽게 되는데 이러한 病理的인 變化는 擴散되어 들어오는 病原菌의 酵素나 毒素에 의하거나 이들의 協力作用에 의하여 일어난다^{12,14}. *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Bacterium aroidea* 등에 의해서 侵入된 植物體內에서 細胞膜 半透性的 喪失과 혹은 細胞의 死滅은 壞死斑點 形成에 앞서서 일어난다는 事實이 觀察되었고^{4, 12, 19, 20} 이러한 寄生組織의 變化는 大概 酵素에 의해 일어나며^{12, 21}, 그중에서도 특히 加水分解酵素가 植物體의 侵入過程 및 菌의 病原性에 關與한다는 事實은 오래전부터 言及되어 왔다. de Bary에 의하면 菌이 分泌하는 酵素는 侵入部位의 障害物을 分解하여 菌糸가 繼續 細胞內로 侵入하여 病이 進展되는 동안 組成을 軟化시키는데 活性을 나타낸다고 하였다²². 또 酵素는 植物體의 構成成分을 破壞하여 吸收하기 쉬운 小分子로 만든다. 그러나 菌이 生産하는 酵素가 直接 病의 發展에 어떠한 役割을 하는지는 아직 明確한 解答이 없다¹¹. 따라서 病原菌 및 寄主와의 病態生理的인 關係를 究明하기 爲하여 病原菌이 分泌하는 酵素들을 把握할 必要가 있다.

本實驗은 이러한 觀點에서 白絹病菌(*Sclerotium rolfsii*), 菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) 및 벼 小黑菌核病菌(*Helminthosporium sigmoideum* var. *irregularare*)이 分泌하는 몇가지 加水分解酵素를 檢討하였고 pH에 따른 이들의 活性의 變化를 測定하여 病原菌의 植物體 侵入機作과 病進展機作을 解析하는 基礎資料로서 提供코져 하였다.

材料 및 方法

1. 供試菌

1969年 全南農大 苗圃에서 分離한 白絹病菌(*Scerotium rolfsii* Sacc.)과 1975年 3月 全南羅州의 油菜에서

分離한 菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.) deBary) 및 1976年 10月 全南光州近郊의 벼에서 分離한 증검은 菌核병균(小黑菌核病菌(*Helminthosporium sigmoideum* var. *irregularare* Crallery et Tullis)을 供試하였다. 이들은 모두 分離後 Potato dextrose agar (PDA)에서 維持 培養된 것이다.

2. 酵素生成用培地

감자煎汁半合成培地로서, 감자煎汁 1000ml에 D-glucose 10g, NH_4NO_3 1.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KH_2PO_4 1.0g을 添加하였으며 微量要素로서 Fe 0.2mg Zn 0.2mg Mn 0.1mg을 黃酸鹽으로 1000ml에 溶解시킨 것 2ml를 添加한 것을 使用했다. 3菌株 모두 菌糸體와 培養濾液은 上記培地로 25°C에서 10日間 培養한 것을 使用하였고 菌核은 PDA에서 30日間 자란 것을 使用하였다.

3. 粗酵素液의 調製

宮崎등¹⁷의 方法에 準하였다. 菌核 및 菌糸體는 各各 一定量(乾物重 1g)을 秤量하여 乳鉢內에 담아 少量의 蒸溜水를 加하여 얼음 위에서 冷却시키면서 磨碎하고 이것을 2枚의 gauze로 걸러 濾過한 뒤 蒸溜水를 加하여 100ml로 定容, 遠沈(10,000g 20分) 했다. 上清을 市販셀로판紙에 싸서 흐르는 물이 하루밤 透析하여 透析內液을 粗酵素液으로 使用하였다.

培養濾液은 菌糸體를 除去하고 100ml로 定容하여 上記와 같이 遠心分離, 透析하여 粗酵素液으로 使用하였다.

4. 酵素活性의 測定

各 酵素活性의 測定은 宮崎등¹⁷이 使用한 方法을 약간 修正하여 實施했다.

Cellulase (Cx)活性 :

基質로서 Carboxymethyl cellulose(CMC)를 使用하여 2.4% CMC 溶液 2.5ml에 緩衝液 2.5ml 및 粗酵素液 2ml를 加하여 30°C에서 24時間 反應시킨 後 1ml를 取하여 3,5-dinitrosalicylic acid法¹³으로 570nm에서 測定하여 還元力의 增加를 glucose로 算出하였다. 同時에 對照로서 100°C에서 10分間 粗酵素液을 處理하

여 효소를失活시킨液을使用하였다. 이것은 以下の各 효소에 있어서도 同一하다.

Invertase 活性 :

2% sucrose 液 4ml 와 粗酵素液 2ml, 緩衝液 2ml 를 混合하여 40°C 에서 1時間 反應시킨後 1ml 를 取하여 還元된 glucose 를 dinitrosalicylic acid 法으로 測定하였다.

Xylanase 活性 :

基質로서는 Xylen 을 使用했다. Xylen 2g 을 0.25M NaOH 液 10ml 에 溶解하여 蒸溜水로 5 倍稀釋하고 測定開始直前에 0.05M H₂SO₄ 로 中和하여 膨潤狀態인것을 使用하였다. 緩衝液으로 Xylen 液의 濃度를 1% 로 稀釋하여 이液 5ml 에 粗酵素液 0.5ml 를 加하여 30°C 에서 2時間 反應시킨후 1ml 를 取하여 dinitrosalicylic acid 法으로 遊離한 Xylose 를 測定하였다.

β-Amylase 活性 :

緩衝液 1.5ml, 0.2% soluble starch 1.5ml, 粗酵素液 1.0ml 를 混合하여 37°C 에서 30 分間 反應시켜 生成된 還元糖을 dinitrosalicylic acid 法으로 定量하여 glucose 로서 算出했다.

Pectinase 活性 :

Polymethylgalacturonase(PMG)의 活性은 基質 45ml (Pectin 5.3g 石炭酸 2g 食鹽 5.0g을 蒸溜水 1l 에 溶解)와 粗酵素液 5ml 를 混合한 것에서 測定했다. 이때 基質液과 粗酵素液은 各各 1N NaOH 와 1N H₂SO₄ 로 pH 를 調整한 것이다. 30°C 에서 24 時間 反應시킨 후 pH 의 變化를 測定하여 反應開始時의 pH 와 反應後의

pH 의 差를 活性度로 表示했다.

Polygalacturonase(PG)의 活性은 2% pectin 酸液 0.5 ml 와 緩衝液 1.05ml, 0.2M NaF 液 0.17ml 粗酵素液 0.55ml 를 混合하여 30°C 에서 2時間 反應시켰다. 反應後 0.1M 요오드液과 0.1M NaOH 液을 加하여 Willstätter-Schudel 法으로 生成한 還元糖을 定量하였다.

Phosphatase 活性 :

基質液(600μM *p*-nitrophenyl phosphate, 2Na) 0.25ml 와 緩衝液 0.25ml 및 粗酵素液 0.25ml 를 混合하여 30°C 에서 5 分間 反應시켰다. 反應後 2N NaOH 2ml 를 加하여 反應을 停止시킨 後 遊離된 *p*-nitrophenol 量을 420nm 에서 求했다. 對照는 NaOH 液을 加한 後 粗酵素液을 加한 것이다.

Protease 活性 :

2% milk casein 을 pH 6.5-pH 10.5 의 緩衝液에 溶解하여 이液 1ml 에 粗酵素液 2ml 를 加하여 20°C 에서 20 分 反應시켰다. 反應後 6% TCA 1ml 를 加하여 反應을 停止시키고 同時に 未分解 casein 을 凝固시켰다. 分解物을 3 倍 稀釋, Folin 試藥으로 比色 定量하여 牛血清 albumin 으로 換算하였다.

5. 供試緩衝液의 調製

各 pH 에 對한 효소의 活性度曲線을 求하기 爲하여 使用된 緩衝液은 다음과 같다.

pH 2.0-pH 6.0: 0.2M CH₃COOH-CH₃COONa 緩衝液
 pH 6.0-pH 8.0: 0.2M KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 緩衝液
 pH 8.0-pH 9.0: 0.2M tris-aminomethane-HCl 緩衝液
 pH 9.0-pH 11.0: 0.2M Na₂CO₃-NaHCO₃ 緩衝液

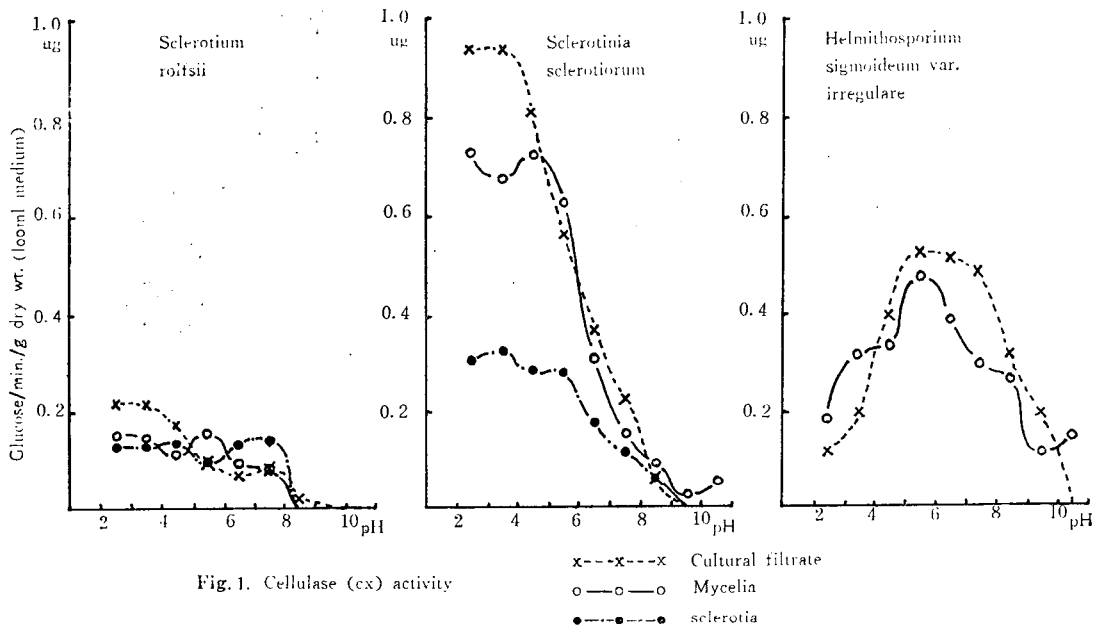


Fig. 1. Cellulase (cx) activity

x-x-x Cultural filtrate
 o-o-o Mycelia
 ●-●-● Sclerotia

以上 各 實驗 모두 3 回 反復으로 實施하였고 이를 平均하여 活性度로 表示하였다.

結果 및 考察

1. Cellulase (Cx) 活性

Fig.1에 나타난 바와 같이 各菌株別로 보면 흰비단病菌에서는 菌糸體, 菌核 培養濾液 모두 活性이 極히 낮았고 이들 間에 活性의 差가 거의 認定되지 않았으며 pH에 따른 活性의 變化는 多様했다. 그러나 菌核病菌은 다른 菌에 比하여 活性이 훨씬 높았는데 培養濾液菌, 菌糸體 菌核의 順으로 活性이 떨어졌으며 pH 2.0-4.0에서 모두 最高活性을 보였다. 또 瘡점은 균핵病菌(小黑菌核病菌)에서는 培養濾液內의 酵素活性이 菌糸體에서 보다 약간 높았으며 最適 pH는 5.5였다.

Cellulose 分解酵素로는 C₁과 C_x가 알려져 있고, 또 transglycosilation을 나타낸 것도 알려져 있다. C₁은 主로 木材褐色腐朽菌이나 土壤微生物인 Cellulolytic organism에 의해 生産되는 酵素로서 纖維 Cellulose의 polyhydroglucose 鎖를 加水分解하여 Cellulose 結晶構造를 破壞시켜 C_x가 作動하기 쉽도록 한다. C_x는 β-1,4 glucoside bond를 任意切斷하는 酵素로서 exo-type과 endo-type으로 區別되고 있다. 이들 兩酵素는 天然 cellulose에 相乘적으로 作用하며 單獨으로는 酵素作用이 微弱한 것으로 알려져 있다.

植物病原菌의 Cellulase(C_x) 生産은 거의 모든 種類에서 確認되고 있는데 梶⁹⁾는 흰비단病菌의 C_x는 pH 3에서 最高活性을 나타냈다고 報告하였고 Lumsden¹⁵⁾

은 菌核病菌을 滅菌한 콩줄기에 培養한 結果 6日後에 C_x의 活性이 亦是 pH3에서 peak를 나타냈다는 報告는 本實驗의 結果와 잘 一致하고 있다.

Kelman et al¹⁰⁾과 Chan et al¹⁵⁾은 菌의 病原性과 cellulase의 生産能力과를 關聯시켜 病原性이 弱한 菌보다 cellulase의 活性이 높다고 하였으나 Lumsden¹⁵⁾은 菌核病菌의 C_x 活性은 發病後 12日에야 最大에 達하였다고 한다. 本實驗에서 菌核病菌이 다른 菌에 比해 顯著하게 活性이 높은 것은 다른 菌에 比해 病原性이 높기 때문은 아닌듯 하다. 그 理由는 흰비단病菌은 菌核病菌에 못지 않게 多犯性이며 강한 病原性을 가지고 있는 것으로 생각되지만 C_x의 活性은 아주 微微하기 때문이다. 勿論 基質에 따라 酵素生産能力도 달라지며 培養日數에 따라 酵素活性도 달라진다. 뿐만 아니라 *in vitro*에서의 酵素活性이 *in vivo*에서도 꼭 같이 適用된다고도 할 수 없다¹⁸⁾. 따라서, 本實驗의 結果만을 가지고 病性性을 論하기는 어려우며 앞으로 C₁ 酵素와 아울러 *in vivo*에서의 檢討가 要望된다.

菌株에 따라 C_x 活性의 最適 pH가 다른 菌株에 따라 性質이 다른 isoenzyme을 가지고 있는 것으로 믿어진다.

2. Invertase 活性

結果는 fig.2에 表示했다.

흰비단病菌과 菌核病菌이 生産하는 Invertase의 活性最適 pH는 3.5였고 2菌株 모두 菌核內의 酵素活性은 거의 認定되지 않았다. 瘡점은 균핵病菌에서는 菌糸體內 酵素의 活性이 培養濾液에서 보다는 약간 높았

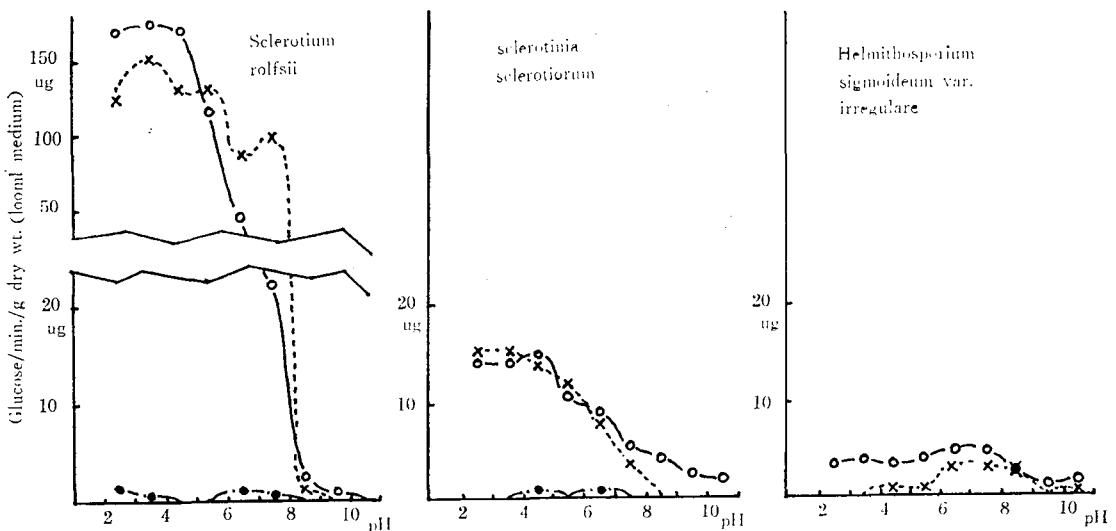


Fig. 2. Invertase activity
Legend refers to Fig. 1.

저만 他 2 菌에 比하여 極히 낮은 活性을 나타냈다. 흰 비단病菌이나 菌核病菌의 酵素活性最適 pH가 3.5인 데 反하여 좁검은 균핵病菌에서는 pH 7.0에서 약간 높은 活性을 나타냈다.

以上の 結果로 미루어 보아 흰 비단病菌과 菌核病菌이 生産하는 invertase는 活性에는 差異가 있지만 pH에 따른 變化의 傾向이 거의 비슷한 것으로 보아 同一한 酵素를 가지고 있는 것으로 생각된다. 그러나 좁검은 균핵病菌은 이와는 다른 iso enzyme을 가지고 있는 것으로 믿어진다.

Tanaka⁹⁾는 벼깨씨무늬病에서 invertase는 細胞內酵素의 活性이 細胞外酵素의 活性보다 높았음을 報告하였는데 不完全世代的 屬이 같은 좁검은균핵病菌에서도 비슷한 結果를 나타냈다. 또 宮崎¹⁷⁾은 벼흰빛잎

마름病의 罹病初期의 앞에서 直接還元糖量이 增加하는 것을 本酵素와 關聯시켜 活性을 測定한 結果 最適 pH가 4라고 하였는데 活性度曲線의 傾向이 흰 비단病菌 및 菌核病菌과 비슷한 것으로 보아 이들이 生産하는 Invertase는 거의 같은 性質을 띄고 있는 것으로 생각 된다.

3. Xylanase 活性

Fig.3에서 보는 바와같이 3 菌種 모두 培養濾液, 菌糸體 및 菌核의 pH에 따른 活性의 變化가 매우 多樣하게 나타났다. 흰 비단病菌에서는 모두 pH 2.5, 6.5 10.0附近에서 各各 peak를 나타냈으며, 菌核의 酵素活性이 가장 높았고, 다음이 菌糸體, 培養濾液의 順이었다. 한편 菌核病菌에서도 菌核內酵素活性이 가장 높았으나, 흰 비단病菌과는 달리 pH 2.5와 9.5에서만

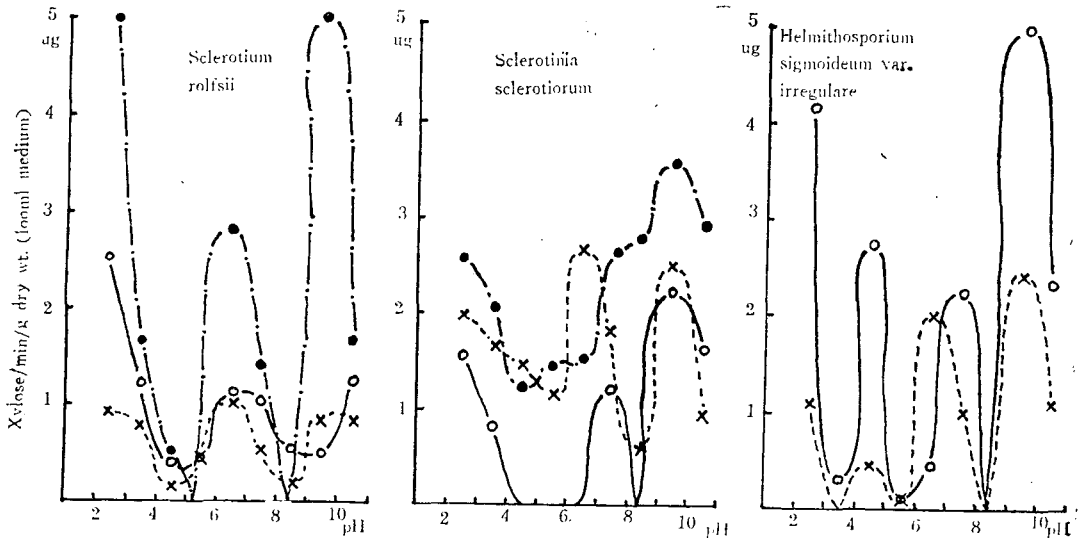


Fig. 3. Xylanase activity

Legend refers to Fig. 1.

peak가 나타났고 培養濾液이나 菌糸體에서는 흰 비단病菌과 마찬가지로 pH 2.5, 7.0附近, 9.5에서 各各 peak가 나타났다. 좁검은균핵病菌에서는 菌糸體內酵素活性이 培養濾液의 그것보다 높았고 모두 pH 2.5, 4.5, 7.0附近, 9.5 4 個所에서 peak가 나타났다.

Xylanase는 Hemicellulose를 分解하는 酵素의 1種으로서 Xylan을 分解하는 酵素에는 Xylanase(Xylano-hydrolase)와 1,3-Xylanase(3-Xylano-hydrolase)가 있으며 前者는 細菌에서는 exo-type, 糸狀病에서는 exo와 endo-type이 있다¹⁸⁾. 植物病原菌으로서 Xylanase를 分泌하는 것으로 알려진 것은 *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Gloeosporium Helminthosporium*, *Pyricul-*

aria, *Stemphylium* 등이, *Phytophthora*, *Sclerotinia*의 各屬에서 Arabanase를 分泌하며 *Puccinia graminis var. tritici*는 Galactomanan을 分解하여 還元糖을 生成한다⁹⁾. 또 梶⁹⁾는 Yoshihara 등이 *Sclerotium rolfsii*에서 Xylanase의 活性을 認定했다고 記述하고 있는가 하면 Hancock⁷⁾는 菌核病菌에 依해 感染된 해라라기 組織內에서 Araban 및 Galactan은 甚히 分解되었지만 Xylan은 거의 分解되지 않았다고 하였다. 이 結果에 依하면 菌核病菌이 Xylanase를 生産하지 않음을 提示하고 있으나 Hancock의 實驗과는 다른 *in vitro*에서의 測定이기는 하지만 本實驗에 供試한 *Sclerotium sclerotiorum*에서는 明白한 Xylanase 活性을 表示하였음을 注日되

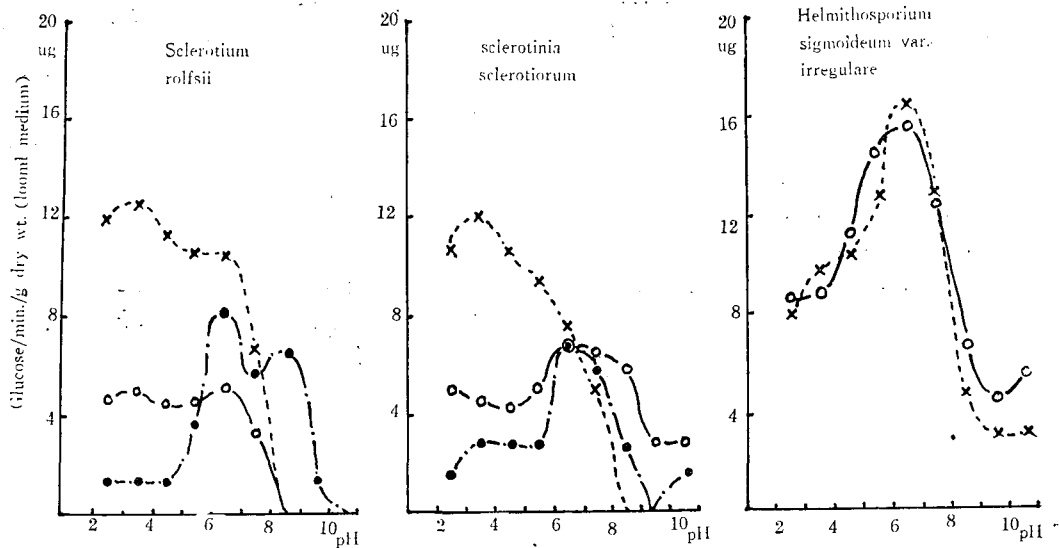


Fig. 4. β -Amylase activity
Legend refers to Fig. 1.

는 사실이다. 한편 pH에 따른 활성도 곡선의 다양성으로 보아서도 Xylanase에는 여러 iso enzyme이 존재한다는 것을暗示하는 것으로 생각된다.

4. β -amylase 活性

Fig. 4에 表示한 바와 같이 흰비단病菌에서는 培養濾液內의 酵素活性이 가장 높았고 最適 pH는 3.5였으며 pH 6.5에서도 약간의 活性이 認定되었다. 菌糸體內의 酵素活性의 peak는 pH 3.5와 6.5에서 나타났으

나 菌核의 酵素活性은 peak가 pH 6.5와 8.5로서 그 樣相이 매우 달랐다. 菌核病菌 역시 培養濾液의 酵素活性이 가장 높았고 菌糸體, 菌核의 順으로 活性이 떨어졌고, 最適活性 pH는 培養濾液에서는 pH 3.5였으나 菌糸體, 菌核에서는 6.5였다. 雜菌은 균핵病菌에서는 培養濾液, 菌糸體 모두에서 酵素活性이 認定되었는데, 兩者 모두 活性의 差가 認定되지 않았으며, 活性의 peak는 모두 pH 6.5였다.

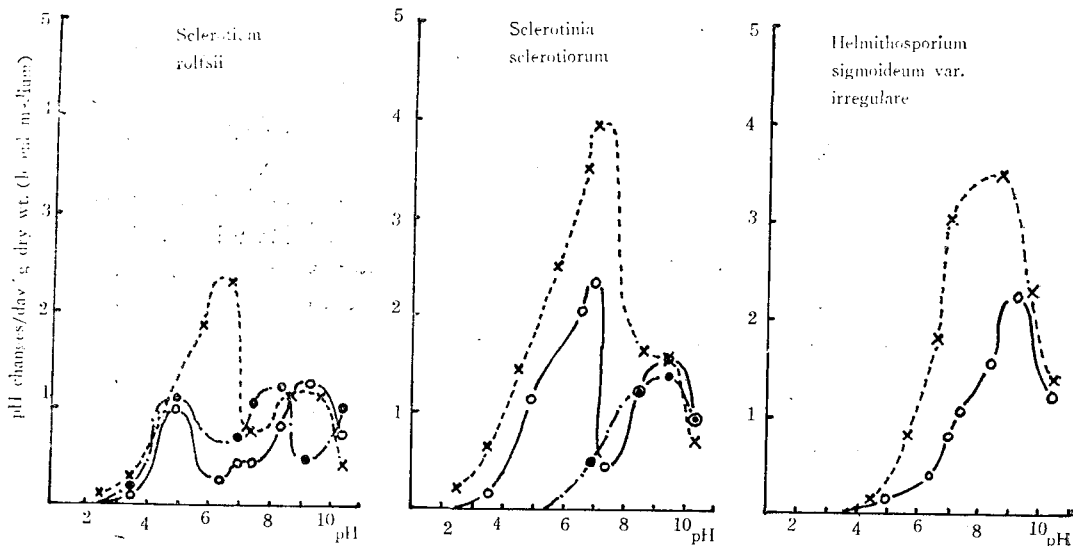


Fig. 5. Polymethylgalacturonase activity
Legend refers to Fig. 1.

後藤等¹¹⁾은 벼깨씨무늬병에서罹病葉의病斑周邊에澱粉이蓄積되나 벼흰빛잎마름병에서는罹病葉의澱粉蓄積이 다른病害와는 달리中毒部에 없었음을報告한 바 있고 또한宮崎¹⁷⁾등이 벼흰빛잎마름病罹病葉의 β -amylase의 높은活性을 確認하였고 그最適 pH가 5.0 이었다고 함은 벼흰빛잎마름病細菌이 β -amylase를生産하는 것이라 解釋할 수 있다. 그런데本實驗에서 깨씨무늬病菌과不完全世代의屬이 같은 좁검은균핵病菌에서는 높은 β -amylase活性이 認定되었다. 또 흰비단病菌 및 菌核病菌에서는同一菌의 酵素일지라도, 菌糸體, 菌核 및 培養濾液에 따라 pH에 對한 活性의 變化樣狀이 다른 것은亦足多數의 isoenzyme이 存在하는 것으로 믿어진다.

5. Pectinase 活性

Pectin 質加水分解酵素로 알려져 있는 것은 Poylmet-hylgalacturonase(PMG)와 Polygalacturonase(PG)가 있으며 이들은 각己 endo와 exo-type을 가지고 있다.

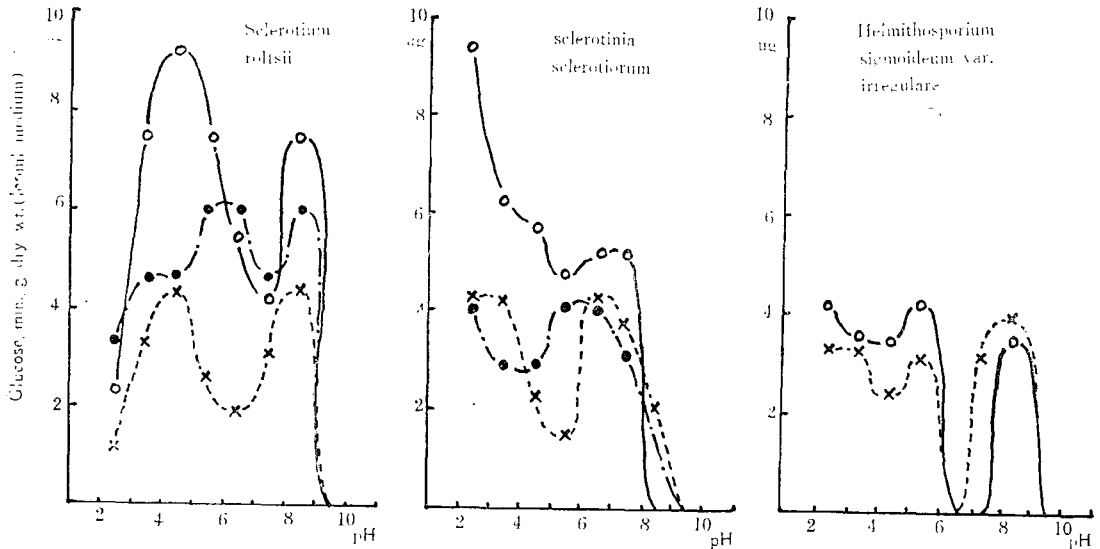


Fig. 6. Polygalacturonase activity
Legend refers to Fig. 1.

1 菌株가 活性最適 pH를 달리한多數의 酵素를 分泌하는 境遇도 적지 않다¹⁸⁾.

Hancock⁶⁾는 菌核病菌에 感染된 해바라기와 토마토 줄기에서 PMG의 活性이 增加한 反面 組織內의 總 methyl group의 含量이 減少하였음을 밝혔는데 本實驗에 供試한 菌核病菌에서 뿐만 아니라 좁검은균핵病菌이나 흰비단病菌에서도 그 活性이 認定되었다.

PG의 活性은 fig. 6에 表示하였다. 이 酵素는 PMG와는 달리 菌糸體에서 活性이 가장 높았다. 흰비단病菌에서는 菌糸體, 菌核 및 培養濾液 모두 pH 4.0-6.0 附近과 pH 8.5에서 活性이 높았지만 菌核病菌은 pH

Fig. 5에 PMG의 活性을 表示하였는데 各菌株 모두 培養濾液의 酵素活性이 가장 높았으며 다른 酵素들과 마찬가지로 菌糸體, 菌核, 培養濾液 別로 pH에 따른 活性의 變化가 多樣했다. 흰비단病菌에서는 培養濾液內의 酵素活性이 pH 6.0과 9.0에서, 菌糸體內의 酵素가 pH 4.5와 9.0 그리고 菌核內의 酵素는 pH 4.5와 8.0에서 peak를 나타냈고 菌核에서는 pH 10.5에서 높은 活性을 보였다. 菌核病菌에서는 培養濾液이 pH 7.0에서, 菌糸體는 pH 7.0과 9.5에서, 또 菌核은 pH 9.5에서 各各 活性 peak를 보였다. 또 좁검은균핵病菌은 培養濾液이나 菌糸體 모두 pH 9.0에서 活性이 가장 높았다.

植物病과 關聯해서 가장 많은 研究가 이루어진 酵素는 Pectin 質分解酵素로서 大部分의 植物病原菌이 PG 또는 PMG를 生産하고 있으며 transeliminase도 1960年以後 많은 病原菌에서 報告되어 왔다. 뿐만 아니라

3.0附近과 pH 7.0附近에서, 또 좁검은균핵病菌은 pH 2.5, 5.5 및 8.5에서 各各 peak를 보였다. 흰비단病菌이나 菌核病菌은 높은 活性을 나타낸 反面에 좁검은균핵病菌은 이들 보다는 낮은 活性을 보였다.

PG와 發病力 및 組織의 軟化作用에 關하여 發表된 文獻은 매우 많지만 그중에서 本實驗에 供試한 菌과 關聯된 몇가지를 살펴보면 Chan et al⁵⁾은 해바라기에서 *Sclerotium bataticola*에 依해 生産되는 PG는 植物體의 侵入 및 發病의 初期段階에서 매우 重要한 役割을 하고 菌의 病原性과 密接한 關係를 갖는다고 하였고 梶⁹⁾는 흰비단病菌이 生産하는 PG가 植物組織의 崩

壞 및 果汁의 淸澄에 關與한다고 하였으며 永田 등은 흰 비단病菌이 生産하는 endo-polygalacturonase의 活性最適 pH가 3.5—4.0이라 發表한것⁹⁾과는 本試驗結果가 一致한 點도 있지만 알카리側에서 또 하나의 peak가 나타난 것은 亦是 菌의 生理的인 差異를 보여준 것이라 생각된다. 또 Hancock⁶⁾은 菌核病菌에 感染된 해바라기와 Tomato 組織內의 펙틴質이 PG에 의해 分解되며 感染組織內에 PG가 多量 存在할 뿐 아니라 健全組織과 比較하여 pectic acid의 含量도 아주 減少하였으

며 活性의 最適 pH는 4.5라고 하였다. 그러나 本實驗에서는 이보다는 훨씬 酸性인 pH 2.5에서 最高의 活性을 나타냈는데 *in vivo*와 *in vitro*에서 오는 差異가 아닌가 생각된다. Bateman et al¹⁵⁾과 Maxwell et al¹⁶⁾은 各各 흰 비단病菌과 菌核病菌이 Oxalic acid를 分泌하여 PG와의 Synergistic action을 明白히 하였는데 이것은 Oxalic acid로 말미암아 PG의 活性에 適合한 酸性環境(pH 4.0)이 造成되기 때문이다. 따라서 耐酸性 PG가 存在할수록 그 作用은 長期間 持續될 것으로 보

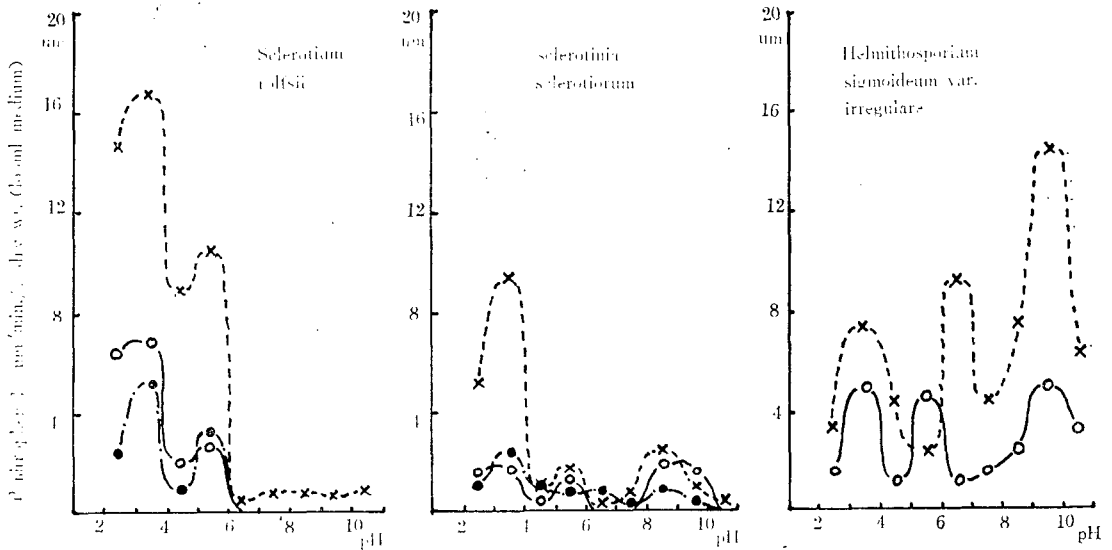


Fig. 7. Phosphatase activity
Legend refers to Fig. 1.

本實驗에서 極耐酸性인 PG (pH 2.5)가 存在한다는 것이 提示되었다.

6. Phosphatase 活性

結果는 fig. 7에 表示했다. 供試 3 菌株 모두 培養液內의 酵素活性이 두드러지게 높았다. 그리고 흰 비단病菌이나 좀검은 균핵病菌에서는 菌糸體 또는 菌核에서 相當한 酵素活性을 보였으나 菌核病菌에서는 그 活性이 他 2 菌에 比較하여 아주 떨어졌다. 菌株別 酵素活性最適 pH를 보면 흰 비단病菌은 菌糸體·菌核·培養液 모두 pH 3.5이고 5.5에서 또 하나의 peak가 나타났다. 그러나 菌核病菌과 좀검은 균핵病菌은 pH 3.5, 5.5, 8.5와 pH 3.5, 6.0附近, 9.5의 各各 3 個所에서 높은 活性을 나타냈는데 培養液의 最高活性이 菌核病菌에서는 pH 3.5에서, 또 좀검은 균핵病菌에는 pH 8.5에서 나타내는 아주 相反된 性質을 表示했다. 即 3 菌株 모두 pH에 따른 活性變化의 傾向은 비슷했지만 最適條件은 흰 비단病菌과 菌核病菌이 酸性側에서

좀검은 균핵病菌이 알카리側에서 나타났다.

宮崎 등¹⁷⁾은 벼 흰빛잎마름病的 罹病葉病斑部位에서 無機磷의 增加를 認定하고 이에 關聯해서 phosphatase의 活性을 測定한 結果 最適 pH 5를 報告하였으며 Tseng et al도 흰 비단病에서 phosphatase의 活性을 認定하였음을 報告하고 있다⁹⁾.

7) Protease 活性

Fig. 8에 表示한 바와 같이 protease의 活性은 各菌 모두 全般的으로 높았고 특히 좀검은 균핵病菌의 培養液內 酵素가 가장 높았다. 그런데 本實驗에 있어서 基質로 使用한 milk Casein이 pH 6.0 以下에서는 溶解되지 않았기 때문에 pH 6.0 以上에서만 活性의 變化를 測定할 수 있었는데 3 菌株 모두 pH 10.0에서 最高 活性을 나타냈고 菌糸體나 菌核에서 보다는 培養液에서 活性이 높았다.

宮崎 등¹⁷⁾에 依하면 벼 흰빛잎마름病的 病斑部位에는 蛋白質이 顯著히 減少되기 때문에 protease의 活性을

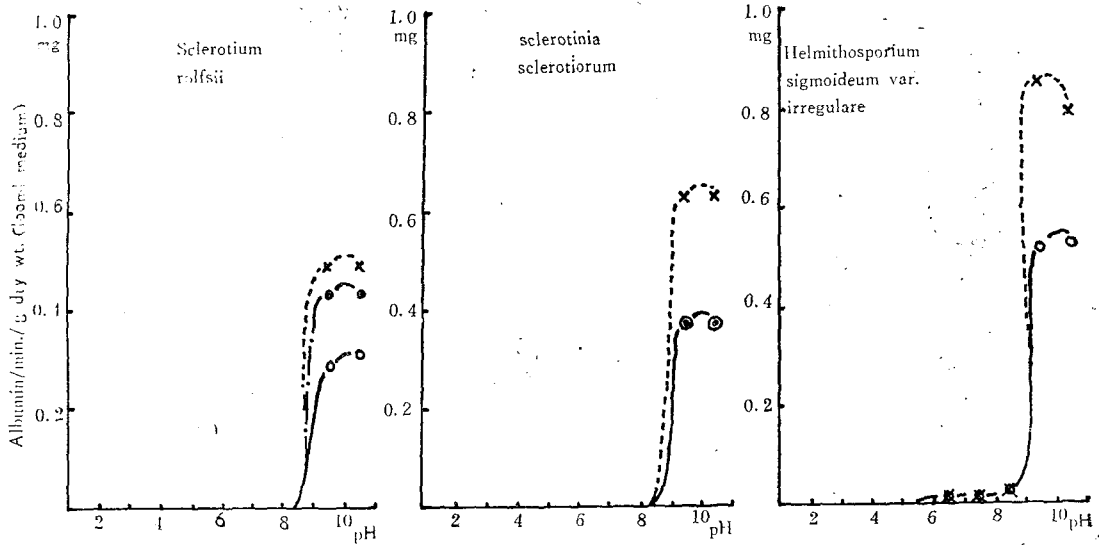


Fig. 8. Protease activity
Legend refers to Fig. 1.

測定한 結果 健全部位에서 보다 活性이 훨씬 높았고 pH 5.0, 8.7, 10.5 附近에서 3個의 Peak 를 認定하였으며 梶⁹⁾는 田川¹⁰⁾이 흰비단病菌에서는 pH 2.5에서 最高 活性을 나타내는 酸性 Protease 가 生産되고 pH 2.3—5.0에서도 安定하였다고 指摘하였다.

以上の 結果를 綜合해 보면 흰비단病菌, 菌核病菌 및 좀검은균핵病菌은 모두 비록 量은 다르지만 Cellulase (Cx), Invertase, β -amylase, Xylanase, PMG, PG Phosphatase, 및 Protease 全部를 生産하며 同一菌의 酵素라 할지라도 그의 生産部位 即 菌糸體, 菌核 또는 培養濾液에 따라 pH에 따른 活性의 變化曲線이 달라진 것으로 보아 各酵素마다 數種의 iso enzyme 이 存在한다는 것을 提示하고 있다.

摘 要

數種의 植物病原菌(흰비단病菌, 菌核病菌, 좀검은균핵病菌)이 生産하는 加水分解酵素(Cellulase Cx, Invertase, β -amylase, Xylanase, PMG, PG, Phosphatase, Protease)를 菌糸體內의 酵素 및 培養濾液內의 酵素와 菌核內의 酵素(좀검은균핵病菌은 除外)로 나누어 그의 生産量과 pH에 따른 活性의 變化를 檢討한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 培養 10日後의 Cx 活性은 菌核病菌이 다른 菌에 比여 活性이 높았고 흰비단病菌과 菌核病菌은 酸性側(pH 3.0 附近)에서, 좀검은균핵病菌은 中性側(pH 6.0 附近)에서 活性이 높았다.

2. 흰비단病菌의 Invertase는 다른 菌에 比하여 約 20

倍程度 높은 活性을 보였고 3菌株 모두 培養濾液과 菌糸體間에 酵素活性의 差가 認定되지 않았다.

3. Xylanase의 活性은 3菌株 모두 菌糸體, 菌核 및 培養濾液에 따라 또 pH에 따라 아주 多樣한 變化를 나타냈고 菌核內에서 活性이 높았다.

4. β -amylase의 活性은 供試菌中 좀검은균핵病菌의 菌糸體, 培養濾液이 가장 높았다. (約 12.0 μ g/min) 흰비단病菌과 菌核病菌에서는 菌糸體나 菌核에서 보다 培養濾液에서 높았는데 活性最適 pH는 菌糸體, 菌核 모두 pH 6.2였으나 培養濾液에서는 흰비단病菌과 菌核病菌이 pH 3.0이었는데 反해 좀검은균핵病菌은 pH 6.2였다.

5. PMG의 活性은 供試菌 모두 培養濾液에서 높았고 菌糸體에서는 菌核病菌과 좀검은균핵病菌이 높았으며 活性最適 pH는 菌에 따라 또는 測定部分에 따라 多樣하게 나타났다.

6. PG의 活性은 흰비단病菌과 菌核病菌의 菌糸體에서 各各 9.1 μ g/min, 9.5 μ g/min으로서 가장 높았고 活性最適 pH는 흰비단病菌이 pH 4.5 附近 菌核病菌이 pH 3.0 附近이었다.

7. 흰비단病菌과 菌核病菌의 Phosphatase는 酸性側(最適 pH 3.5)에서 活性이 높았고 좀검은균핵病菌은 酸性, 中性, 알카리側에서 各各 Peak가 나타났으나 最適 pH는 9.5였다.

8. 供試菌株 모두 Protease는 pH 10.0에서 最高 活性을 나타냈고 특히 좀검은균핵病菌의 培養濾液內 酵素 活性이 높았다.

引用文献

1. Agrios, G.N. 1969. How pathogens attack plants. In "Plant pathology" pp. 36-61. Academic Press. New York and London.
2. de Bary, A. 1887. Comparative morphology and biology of the fungi, mycetezoa and bacteria. English edition. The Clarendon Press, Oxford. p. 382.
3. Bateman, D.F., and S.V. Beer. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 55 : 204-211.
4. Brown, W. 1915. Studies in the physiology of parasitism. I. The action of *Botrytis cinerea*. Ann. Botany 29 : 313-348.
5. Chan, Y.H. and W.E. Sackston. 1972. Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by virulent and avirulent isolates of *Sclerotium bataticola* during development in sunflowers. Can. J. Bot. 50 : 2449-2453.
6. Hancock, J.G. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. Phytopathology 56 : 975-979.
7. _____. 1967. Hemicellulose degradation in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 57 : 203-206.
8. Hiroyasu Tanaka. 1965. The activity of some carbohydrases produced by *Cochliobolus miyabeanus*, the causal fungus of Helminthosporium leaf spot of rice plants. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 30, (4) : 192-196.
9. 梶 明 : 白絹病菌の生産する耐酸性酵素とその応用化学と生物 Vol.11. Ne. 5. p. 330-335.
10. Kelman, A., and E. B. Cowling. 1965. Cellulase of *Pseudomonas solanacearum* in relation to pathogenesis. Phytopathology 55 : 148-155.
11. 後藤和夫・深津量榮, 1955. 病斑周辺の澱粉滞積について, 東海近畿農試報告 2 : 41-51.
12. Lai, Ming-Tan, A.R. Weinhold, and J.G. Hancock. 1968. Permeability change: in *Phaseolus aureu* with infection by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 58 : 240-245.
13. Linsday, H. 1973. A colorimetric estimation of reducing sugars in potates with 3.5-pinitrosalicylic acid. Potato Res. 16 : 176-179.
14. Luke, H. H., H.E.Warmke, and P. Honchey. 1966. Effect of the pathotoxin victorin on ultrastructure of root and leaf tissue of Avena Species. Phytopathology 56 : 1178-1183.
15. Lumsden, R.D. 1968. *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulose. Phytopathology 59 : 653-657.
16. Maxwell, D.P., and R.D. Lumsden. 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. Phytopathology 60 : 1395-1398.
17. 宮崎榮一郎・山中達・三澤正生・1976. イネ白葉枯病に関する研究 II. 病斑組織の加水分解酵素について日植病報 42 : 21-29.
18. 谷 利一 1970. 細胞壁成分分解酵素 : 平井篤透, 鈴木直治編感染の生化学植物 p. 35-41 日本農業技術協會刊
19. Taubenhous, J.J. 1919. Recent studies on *Sclerotium rolfsii* Sacc. J. Res. 18:127-183.
20. Thatcher, F.S. 1942. Further studies of osmotic and permeability relations. Canad. J. Res. Sect. C. 20:283-311.
21. Tribe, H. L. 1955. Studies in the Physiology of parasitism. XIX. On the killing of the plant cells by enzymes from *Botrytis cinerea* and *Bacterium aroideae*. Ann. Botany 14:351-558