

大豆根瘤 抽出物の 添加에 의한 *Rhizobium japonicum* 의 非共生的 窒素固定

金聖勲 · 李 潤 · 金昌鎭 · 俞益東 · 閔泰益

한국과학기술원 유전공학센터

Asymbiotic Nitrogen Fixation of *R. japonicum* in Soybean Nodule Extract

Kim, S.H., Y. Rhee, C.J. Kim, I.D. Yoo and T.I. Mheen

Genetic engineering Center, KAIST

Abstract: Soybean nodule extract was prepared and tested for the effectiveness in the induction of asymbiotic nitrogen fixation of *R. japonicum* P-168. A Asymbiotic nitrogenase activity was increased over twice when glutamate was replaced by nodule extract in the induction media. Independently of the induction media, the nitrogenase activity in the assay media was also enhanced by the addition of nodule extract (100-400 μ g protein/ml). The amount of ethylene in the assay media reached the highest point after 8 days incubation of R-168 and was decreased thereafter. The growth of *R. japonicum* R-168 was sensitive to the concentration of nodule extract. As a while, the effect of soybean root extract was not detected both in the induction of nitrogenase activity and in the growth of *R. japonicum* R-168.

Key Words: asymbiotic nitrogen fixation, nodule extract, *Rhizobium japonicum*

Rhizobium 류는 정상적으로는 두과식물 (Leguminosae) 의 뿌리에서 nodule 을 형성하며 bacteroid 로 전환된 후 공중질소를 고정하여 두과식물과 공생계를 유지하는 것으로 알려져 왔다. 그러나 최근 *Rhizobium* 중 "cowpea strain" 이 비두과식물의 세포배양 callus 와 연관 관계를 유지하며 질소를 고정하고 있다는 사실이 관찰된 후 (Child, 1975, Scowcroft and Gibson, 1975) 계속해서 slow-growing *Rhizobium japonicum* 중에서도 free-living 상태에서 공중질소를 고정하는 균주가 있다는 것이 보고되었다 (Keister 1975, Kurz and La Rue 1975, McComb 등 1975). 이에따라 *Rhizobium* 류의 비공생적 질소고정의 발현을 위하여 일부 연구가 실시되어져 왔고 이로부터 질소고정에 필요한 많은 요인들이 밝혀졌다 (Tjepkema and Evans

1975, Aguilar and Favelukes 1982, Kaneshiro and Kurtzman 1982). 그러나 현재까지 확립된 방법은 대부분이 slow-growing *Rhizobium* 류에만 적용되어 왔으며 특히 고정된 질소를 전혀 함유치 않은 배지에서는 아직 성공하지 못하고 있는 실정이다.

한편 식물 callus 와의 연관에 의해 *Rhizobium* 의 비공생적 질소고정이 성공한 이래 (Scowcroft and Gibson 1975) *Rhizobium* 의 nitrogenase 의 유도에는 식물에서 분비되는 diffusible-factor 가 필요할 것이라는 가설이 제시되었으며 그에 따라 식물대사 물질중 sugar 를 비롯한 여러 화합물이 *Rhizobium* 에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔고 그 결과 전술한 *Rhizobium* 의 비공생적 질소고정에 사용되는 defined media 들이 이용되게 되었다.

또한 최근에는 nodule 내에 *Rhizobium* 의 근류 형성 유전자 발현에 관여하는 특이한 조절인자가 존재하고 있다고도 보고되고 있다(Olson 등 1985).

본 실험에서는 이상에서 이미 확립된 방법들을 기초배지로 한 후 nodule extract 의 첨가 유무가 *Rhizobium japonicum* 의 비공생적 질소 고정 유도에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 사용배지

공시균주는 본 실험실에서 분리 선발한 slow-growing *R. japonicum* R-168 균주를 사용하였다(Kim 등 1985).

상기 균주의 배양을 위한 기본 배지로는 yeast extract-mannitol (YM) 배지를 사용하였다(Vincent 1970). 또 질소고정력 측정을 위한 induction 배지로는 gluconate-yeast extract-glutamate (GYG, Kaneshiro 등, 1978) 배지와 assay 배지로 gluconate-mannitol-glutamate (GMG, Kaneshiro 등, 1982) 배지등을 기본으로 하였고 nodule extract 첨가 효과를 알기 위하여 glutamate 대신 nodule extract 를 첨가한 gluconate-yeast extract-nodule extract (GYN) 및 gluconate-mannitol-nodule extract (GMN) 배지를 각각 사용하였다.

Nodule 및 root extract 의 제조

신선한 대두의 nodule 약 25g을 채취하여 70% ethanol 및 0.1% HgCl₂ 용액으로 표면살균한 후 0.025M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 100ml에 침적하고 vortex mixer를 사용하여 균일하게 현탁시켰다. 이 현탁액을 상온에서 하룻밤 진탕한 후 여과하고, 그 여액은 다시 2000 rpm에서 3시간 원심분리하여 cell debris 및 불용성 고형물을 제거한 후 60°C에서 진공농축기를 사용하여 약 1/10 량으로 농축하였다. 이 농축액을 다시 8000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 여과살균한 다음 실험에 사용하였다. 추출정제된 nodule extract의 단백질 농도는 1.4mg/ml 이었다. 한편, 대두의 root extract도 위와 동일한 방법

으로 추출 농축하여 실험에 공시하였다.

Free-living 조건에서 nitrogenase 의 유도

Free-living 조건에서의 질소고정능 유도를 위하여 induction 배지로 GYG 배지, assay 배지로는 GMG 배지를 사용하는 Kaneshiro 법을 변형하여 사용하였으며 nodule extract 첨가량을 달리하여 효과를 조사하였고 각 처리는 3회 반복으로 실시하였다.

Acetylene 환원력 (ARA) 측정

공시균주를 GMG agar 배지에서 호기적으로 4일간 배양한 후 silicone rubber stopper 로 vial을 밀봉, 수차례 argon으로 치환하고 0.1 atm acetylene과 0.9 atm argon으로 채워 7일간 배양하여 환원된 ethylene을 gas chromatograph (Porapak R column)로 측정하였다.

Nodule extract에 의한 성장저해 실험

Rhizobium japonicum R-168 배양액을 0.6% (v/v)로 혼합하여 만든 YM agar plate 중앙 상부에 cylinder를 올려놓고 nodule extract 원액(1.4 mg protein/ml) 0.1 ml를 가한 후 배양하여 성장저해 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

Free-living 조건에서의 질소고정 발현에 미치는 nodule extract의 첨가효과

Rhizobium japonicum R-168 균주의 nitro-

Table 1. Acetylene reduction activity (ARA) of *R. japonicum* R-168 in various GM media

Induction media Assay media	ARA (nmol/vial)	
	GYG	GYN
GMG	0.2	6.9
GMG+Glycine 100µg/ml	0.2	3.6
GMG+Alanine 80µg/ml	0.2	5.6
GM+Nodule extract 100µg protein/ml	N. D.	57.7
GM+Nodule extract 10µg protein/ml	4.2	0.2
GM+Nodule extract 1µg protein/ml	0.2	0

* Protein concentration of nodule extract was 1.4mg/ml.

genase activity를 free-living 조건에서 발현시키기 위하여 induction 배지로 GYG 및 assay 배지로 GMG를 기본배지로 하고 nodule extract를 첨가하면서 질소고정 활성의 발현정도를 조사하였다.

그 결과, Table 1과 같이 기본배지인 GYG-GMG 배지에서의 질소고정 활성은 0.2 nmol / vial로 아주 미미한 활성을 나타냈으나 이에 비하여 induction 배지에 nodule extract를 첨가한 GYN-GMG 배지에서는 약 10배 이상의 높은 활성증가를 나타냈다. 또 induction 배지와 assay 배지에 동시에 nodule extract를 첨가한 GYN-GMN 배지의 경우 질소고정 활성의 발현은 더욱 촉진되어 최고 57.7 nmol/vial로 GYG-GMG 배지에 비하여 약 100배 이상의 현저히 높은 활성을 나타냈다. 그러나 이와같은 nodule extract의 첨가효과는 첨가량에 따라 크게 달라 nodule extract 10 μ g protein/ml 및 1 μ g protein/ml 첨가군에서는 그 효과가 인정되지 않고 100 μ g protein/ml 첨가군에서만 인정되었다. 또 1 mg protein/ml로 nodule extract를 과량 첨가한 경우에는 오히려 *Rhizobium* 균이 생육저해를 받아 질소고정 활성의 변화도 확인할 수 없었다(unpublished data).

이상의 결과는 free-living 조건에서의 *Rhizobium*의 nitrogenase 발현에는 이미 보고된 glutamate 이외에 nodule extract내에 특이하게 함유되어 있는 미지의 물질이 크게 관여한다는 것을 시사하고 있다고 생각되며 그량은 100 μ g protein/ml 전후의 함량이 질소고정력 유도에 적당한 것으로 판단되었다.

한편 nodule extract의 아미노산 조성에 관한 연구는 많이 되어 있으나 그 중에서도 *Rhizobium*이 bacteroid로 전환될때 관여하는 것으로 생각되는 glycine (Berry and Atherly, 1984) 및 nitrogenase의 역할을 향상시킨다고 보고된 alanine (Van Egeraat, 1976) 첨가에 의해서는 free-living 조건에서의 질소고정 활성의 증가는 본 실험에서 첨가한 농도에서는 전혀 인정되지 않았다. 더욱 induction 배지에 nodule extract 대신 nodule extract 중에 함유되어 있는 amino acid 조성과 동일하게 제조된 amino acid

mixture를 첨가해 주었을 경우에도 질소고정 활성의 발현에는 전혀 유효하지 않았음을 관찰하였는데 이러한 결과들은 nodule extract 중의 질소고정활성에 유효한 물질은 amino acid라기 보다는 기타 성분으로 *Rhizobium*의 질소고정 유도에 필요한 조절인자이거나 혹은 nodule extract의 첨가로 인한 환경적 요인으로 분석되었다.

전술한 실험결과로부터 100 μ g protein/ml 수준의 nodule extract를 첨가함으로써 free-living 조건에서 질소고정 활성이 유도된다는 것이 확인되었다. 따라서 nodule extract의 최적 첨가량을 확인하기 위하여 첨가량을 달리한 후 질소고정 활성의 발현정도를 조사하였다. 또 nodule extract 대신 대두의 root extract를 첨가하여도 발현되는지의 여부도 아울러 검토하여 Fig. 1에 나타냈다.

먼저 induction 배지로 glutamate를 첨가한 GYG 배지를 기본배지로 하고 assay 배지에 nodule 및 root extract의 첨가량을 달리하여 질소고정 활성의 발현정도를 조사한 결과, nodule extract 100 μ g~400 μ g protein/ml 범위내에서는 70~80 nmol/vial로 첨가량에 따른 차이가 없이 비슷한 활성을 나타냈다. 이에 비해 root

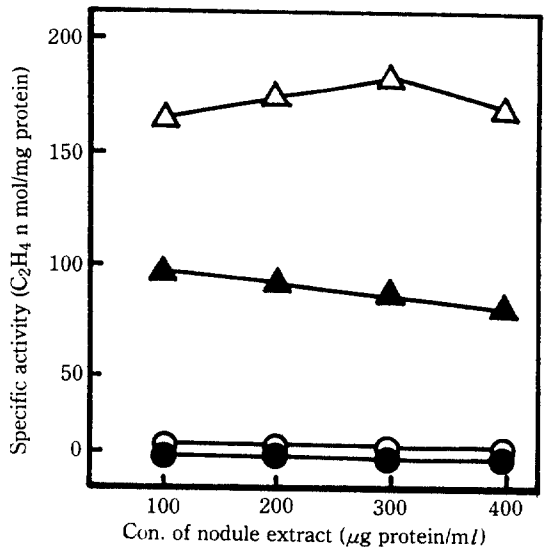


Fig. 1. Enhancement of ARA in *R. japonicum* R-168 by nodule extract (7 days incubation)
 \triangle - \triangle GYN-GMN \blacktriangle - \blacktriangle GYG-GMN
 \circ - \circ GYG-GMR \bullet - \bullet GYG-GMR

extract 첨가구에서는 첨가량에 관계없이 모두 질소고정 활성의 발현은 인정되지 않았다.

또 induction 배지로 glutamate 대신 nodule extract를 첨가한 GYN배지를 기본배지로 하고 assay 배지에 nodule 및 root extract의 첨가량을 달리하며 조사한 결과에서도 nodule extract 첨가량에 따라서는 큰 차이 없이 160~180nmol/vial 범위이었고 root extract 첨가구에서는 첨가량에 관계없이 질소고정 활성은 인정되지 않았다. 따라서 본 실험조건으로 주어진 농도(nodule extract 100 μ g-400 μ g protein/ml) 내에서는 질소고정 활성의 발현에는 큰 차이가 없이 첨가 효과가 나타나는 것이 확인되었다. 또 질소고정 활성의 발현을 위한 induction 효과는 GYG배지 보다 GYN배지가 약 2배 이상의 높은 효과를 나타냈다. 특히 root extract를 첨가한 배지에서 nodule extract를 첨가한 배지보다 cell의 생육은 양호하였으나 질소고정 활성이 발현되지 않은 결과는 전술한 바와같이 free-living 조건에서의 질소고정 활성 발현에 nodule extract가 특이하게 함유하고 있는 어떤 성분이 유효하게 작용하였음을 예상할 수 있겠다.

배양시간에 따른 질소고정 활성의 변화

Nodule extract를 첨가함으로써 free living 조건에서 nitrogenase activity가 발현된다는 것이 전항에서 밝혀졌으나 이때의 최적 배양시

간을 확립하기 위하여 배양시간을 달리하여 질소고정 활성의 변화를 조사하였다(Fig. 2).

그 결과 GMN 배지에서의 질소고정 활성은 배양시간에 따라 상이하여 약 8일간 배양하였을 때 최대의 집적량을 나타내었으며 그 이후에는 급격히 감소하는 경향을 나타냈다.

한편 GMG배지에서는 전기간 동안 10nmol/vial 이하의 낮은 질소고정 활성을 나타내 GMN 배지에서 보다 약 1/100 수준밖에 나타내지 않았고 배양시간에 따른 차이도 크게 나타나지 않았다. 배양 8일후 질소고정 활성이 감소하는 원인으로서는 silicon rubber stopper를 통한 산소의 투과에 의해 배양용기내의 산소분압이 변화되어 *Rhizobium*의 질소고정력 유도에 적당치 않게 됨과 동시에 일부 생성된 ethylene은 stopper를 통해 외부로 확산되어 나갔기 때문인 것으로 추측되었다.

Nodule extract 첨가에 따른 *R. japonicum*의 성장저해 효과

*Rhizobium*의 질소고정 형태의 cell인 bacteroid는 pleomorphism현상을 보이는데 이와같은 현상은 외부에서 stress가 가하여질때 나타나는 것으로 밝혀졌다(Jordan, 1984). 또 *Rhizobium*의 free living 질소고정 cell과 bacteroid간의 형태적 연관성도 이미 보고된 바 있

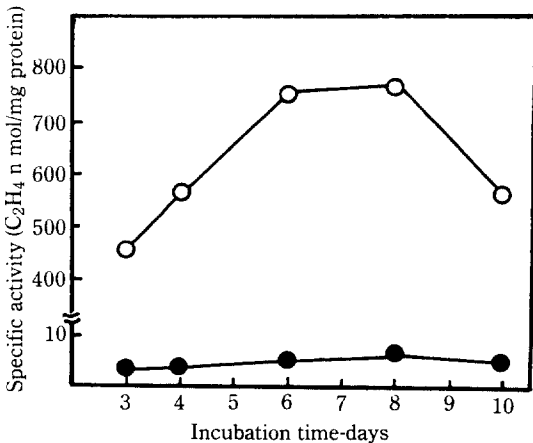


Fig. 2. Induction kinetics of asymbiotic nitrogen fixation in GMG and GMN media. ○-○GMN ●-●GMG

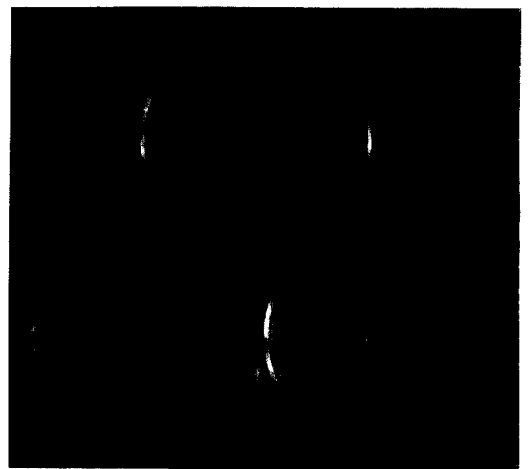


Fig. 3. Growth inhibition effect of nodule extract a. autoclaved nodule extract b. root extract c. nodule extract

으며(Pankhurst and Craig, 1978, Van Brussel 1978) 이와같은 관계를 유도하기 위한 성장 억제제의 사용도 시도되고 있다(Kaneshiro 등 1983).

본 실험에서도 nodule extract의 첨가에 따른 질소고정 활성의 발현과 상기와 같은 연관성을 확인하기 위하여 고농도의 nodule extract 첨가에 따른 *Rhizobium*의 성장억제에 관한 실험을 실시하였으며 그 결과 공시한 균주인 *R. japonicum* R-168의 성장억제 효과가 관찰되었다(Fig. 3).

이때 사용한 nodule extract의 유리ammonia 농도는 20-80mM 범위이었으며 이와같은 범위의 ammonia 농도에서 *Rhizobium*의 성장은 억제되지 않았다(unpublished data). 또 이와같

은 성장억제 효과는 nodule extract를 습열멸균한 후 사용하였을 경우 더욱 선명하게 나타났는데(Fig. 3) 이상의 결과로부터 성장억제 물질은 protein류가 아닌 열에 안정한 물질인 것으로 추측되었다. 또 root extract를 첨가한 경우에는 성장억제 효과는 나타나지 않았고 오히려 더욱 왕성한 성장이 관찰되었다.

전술한 보고 및 *Rhizobium*의 질소고정은 cell중 비성장 non-vegetative cell에서 일어난다는 사실(Ludwig 1984) 등과 비교할때 nodule extract의 성장억제 효과와 질소고정 활성의 발현촉진과는 어떤 상관관계가 있을 것으로 예상되며 그에 관한 연구는 현재 본 연구실에서 진행중에 있다.

적 요

Soybean nodule로 부터 extract를 제조하여 *R. japonicum* R-168균주의 free living 조건에서의 질소고정 활성 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 그결과 induction배지(GYG)중 glutamate 대신 nodule extract를 첨가함으로써(GYN) 약 2배 이상의 질소고정 활성의 증가를 나타내었으며, assay배지(GMG)의 경우에도 induction배지에 관계없이 100~400µg protein/ml의 농도로 nodule extract를 첨가(GMN)한것이 질소고정 활성에 매우 효과적임이 밝혀졌다. 또한 *R. japonicum* R-168균주의 질소고정 활성은 GMN배지에서 8일간 배양시 최대의 ethylene 농도에 이르렀으며 그 후는 감소하였다. 한편 고농도의 nodule extract첨가는 *R. japonicum*의 성장을 저해하는 현상도 관찰되었다. 그러나 soybean root extract 첨가에 의해서는 질소고정활성의 유도나 성장억제 효과는 나타나지 않았다.

REFERENCE

1. Aguilar, O.M. and Favelukes, G., 1982, Requirement for carbon dioxide for nonsymbiotic expression of *R. japonicum* nitrogenase activity. *J. Bacteriol.* **152**: 510
2. Berry, J.O. and A.G. Atherly, 1984, Spheroplasts of *R. japonicum*, *Can. J. Microbiol.* **30**: 415
3. Child, J.J., 1975, Nitrogen fixation by *Rhizobium* sp. in association with non-leguminous plant cell., *Nature (London)*, **253**: 350
4. Jordan, D.C., 1984, Bergey's manual of systematic bacteriology, Ed. by N.R. Krieg, William & Wilkins, Baltimore, Vol. 1., 234
5. Kaneshiro, T., C.D. Crowell and R.F. Hanrahan, 1978, Acetylene reduction activity in free living cultures of *Rhizobia*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 27
6. Kaneshiro, T. and M.A. Kurtzman, 1982, Glutamate as a differential nitrogen source for the characterization of acetylene reducing *Rhizobium* strains. *J. Appl. Bacteriol.*, **152**: 510
7. Kaneshiro, T., F.L. Baker and D.E. Johnson, 1983, Pleomorphism and acetylene reducing activity of free living *Rhizobia*, *J. Bacteriol.*, **153**: 1045
8. Keister, D.L., 1975, Acetylene reduction by pure culture of *Rhizobia*., *J. Bacteriol.* **123**: 1265
9. Kim, C.J., S.H. Kim, Y. Rhee, I.D. Yoo and T.I. Mheen, 1985, Selection of *R. japonicum* strains for developing soybean inoculant and plasmid characterization., *J. Korean Agri. Chem. Soci.* **28**: 149
10. Kurz, W.G.W. and T.A. La Rue, 1975, Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host., *Nature (London)*, **256**: 407

11. Ludwig, R.A., 1984, *Rhizobium* free-living nitrogen fixation occurs in specialized nongrowing cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 156
12. McComb, J.A., J. Elliott and M.J. Dilworth, 1975, Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture., *Nature* (London), **256**: 409
13. Olson, E.R., M.J. Sadowsky and D.P.S. Vermar, 1985, Identification of genes involved in the *Rhizobium*-legume symbiosis by Mu-dI (kan, lac)-generated transcription fusions, *Biotechnology*, **3**: 143
14. Pankhurst, C.E. and A.S. Craig, 1978, Effect of oxygen concentration temperature and combined nitrogen on the morphology and nitrogenase activity of *Rhizobium* sp. strain 32H1 in agar culture., *J. Gen. Microbiol.* **106**: 107
15. Scowcroft, W.R. and A.H. Gibson, 1975, Nitrogen fixation by *Rhizobium* associated with tobacco and cowpea cell cultures., *Nature* (London), **253**: 351
16. Tjepkema, J. and H.J. Evans, 1975, Nitrogen fixation by free living *Rhizobium* in a defined liquid medium., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **65**: 625
17. Van Brussel, A.A.N. J.W. Costerson and J.J. Child., 1983, Nitrogen fixation by *Rhizobium* sp. 32H1. A. morphological and ultrastructural composition of asymbiotic and symbiotic nitrogen fixation forms., *Can. J. Microbiol.* **25**: 352
18. Van Egeraat, A.W.S.M., 1976, Response of *Rhizobium* species and pea seedlings to glycine., *Plant Soil*, **45**: 191
19. Vincent, J.M., 1970, A manual for the practical study of root nodulation bacteria., Blackwell Scientific Publication, Ltd., Oxford, England.

(Received Mar. 17, 1986)