

Alternaria mali Roberts에 의한 Pectin質 分解酵素의 生産

金起弘·李昌垠

嶺南大學校 農畜產大學 園藝學科

Production of Pectolytic enzymes by *Alternaria mali* Roberts

Kee-Hong Kim and Chang-Un Lee

Department of Horticulture, Yeungnam University, Gyeong san 632, Korea

ABSTRACT: Isoates with changed pathogenicity were selected among iprodione-resistant *Alternaria mali* to investigate any relationship between their pectolytic enzyme activity and pathogenicity. In artificial medium, strongly pathogenic isolates S₁ and R₃ showed higher enzyme activity than weakly pathogenic isolate R₈. Activity of endo-polymethylgalacturonase and endo-polygalacturonase was more than 3 times. But activity of pectin methylesterase and pectin lyase by isolate S₁ was higher than those by R₃ and R₈ isolates. In apple medium dialyzed against distilled water, activity of enzyme by each isolate was increased but growth of each isolate was reduced. When iprodione was added to the medium, enzyme activity and growth of isolate S₁ were reduced but strongly pathogenic isolate R₃ among iprodione-resistant ones showed increased enzyme activity except for exo-polygalacturonase in dialyzed apple medium.

KEYWORDS: Pathogenicity, Iprodione-resistant *Alternaria mali*, Apple medium.

植物病原菌에 의하여 生産되는 pectin質 分解酵素는 植物組織의 細胞中葉과 細胞壁을 構成하고 있는 pectin質을 分解하여 組織을 軟化시켜서 菌의 侵入을 돕는 役割을 한다(Cole 등, 1961; McClendon 등, 1960; Wallace 등, 1955).

1960년에 McClendon 등은 *Botryosphaeria ribis*에 感染된 사과에서 pectinmethylesterase와 petin glycosidase의 活性을 報告하였으며, Cold와 Wood (1961)는 *Penicillium expansum*에 의하여 腐敗된 사과에서 polygalacturonase와 細胞壁 軟化酵素의 活性이 높다고 하였다. Wallace 등(1962)은 人工合成 培地에 *Physalospora obtusa*를 包含한 數種의 사과 病原菌을 培養하였을 때 exo-glycosidase와 pectinmethylesterase가 生産되었다고 하였다. Spalding 등(1973)은 前記한 사과 푸른곰팡이病菌이 사과에 侵入할 때와 人工培地에서 培養될 때 polygalacturanase와 pectin lyase를 生産하고 galactose 등에 의하여 이들 酵素의 生産이 抑制되며, 同病原菌을 蒸溜水로 透析시킨 사과培地에 培養하였을 때가 透析시키지 않은 培地에서 보다 그 活

性이 높다고 하였다.

本 實驗은 사과 斑點落葉病菌의 各種 pectin質 分解酵素의 活性을 調査하므로서 病原性과 關連된 基礎資料를 얻고자 實施하였다.

材料 및 方法

供試菌株는 殺菌劑 iprodione에 대하여 感受性이고 病原性인 S₁菌株와 抵抗性이며 病原性이 比較的 큰 R₃菌株 및 病原性이 작은 R₈菌株를 本 實驗室에서 分離保管中인 菌株中에서 選擇하여 使用하였다.

Pectin質 分解酵素의 活性調査에 使用된 人工培地는 citrus pectin과 sodium polypectate를 加한 基本無機鹽類(Spalding 등, 1973) 培地로 하였다 培地를 250 ml 삼각 flask에 100 ml씩 分注하여 密封한 후 PSA에서 5~7日間 培養된 菌叢에서 直徑 4 mm의 含菌寒天圓板을 3個씩 接種하였다. 이것을 30°C에서 振盪培養하는 동안에 一定한 時間間隔으로 꺼내어 Büchner funnel內에서 Whatman filter paper(No. 1)로 濾過하여 菌絲體를 제거하고 이 濾

過液을 酵素溶液으로 使用하였다.

人工培地에서 酵素活性的 測定

1) Exo-polymethylgalacturonase의 活性度는 Willstätter-Schudel의 hypiodite 方法을 改良한 方法(Jansen 등, 1945)에 따라 測定하였다. 酵素液 1 ml가 1分間에 1 micromole의 galacturonic acid 當量을 生成하는 酵素活性度를 1單位로 하였다.

2) Endo-polymethylgalacturonase의 活性度는 pectin의 粘度減少率에 依하였다(Nagel 등, 1962). 酵素活性은 酵素液 1ml에 依하여 基質의 粘度를 50% 減少시키는데 걸리는 時間(分)의 逆數로 計算하였다.

3) polygalacturonase의 活性度는 exo-polygalacturonase와 endo-polygalacturonase의 경우 각각 前記한 1)과 2)의 方法에 따라 測定하였는데 다만 基質을 pectin 대신에 pectic acid를 使用하였다.

4) pectinmethylesterase의 活性度는 pectin에서 methoxyl基의 減少量을 測定하는 方法(Winstead 등, 1954)에 따라 測定하였다. Pectinmethylesterase 1單位는 酵素液 1ml에 依하여 매분당 1 micromole의 methoxyl基를 遊離시킬 수 있는 酵素의 量으로 하였다.

5) Pectin lyase의 活性度는 pectin의 分解產物에 對한 Newkom의 thiobabutaric acid(TBA)法을 修

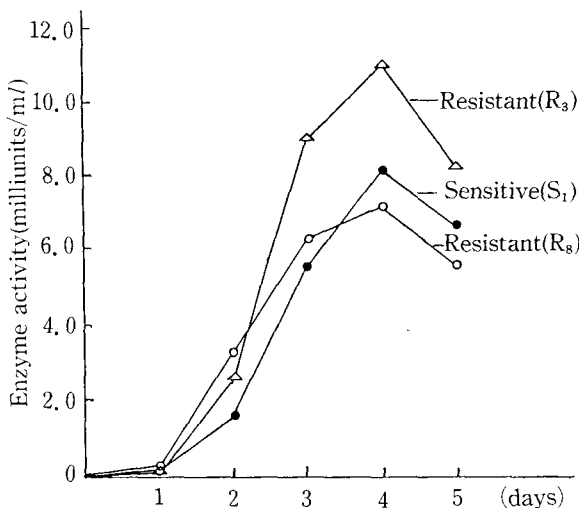


Fig.1. Activity of exo-polymethylgalacturonase produced by Iprodione-sensitive(S₁) and resistant(R₃, R₈) isolates of *Alternaria mali* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts medium at 30°C.

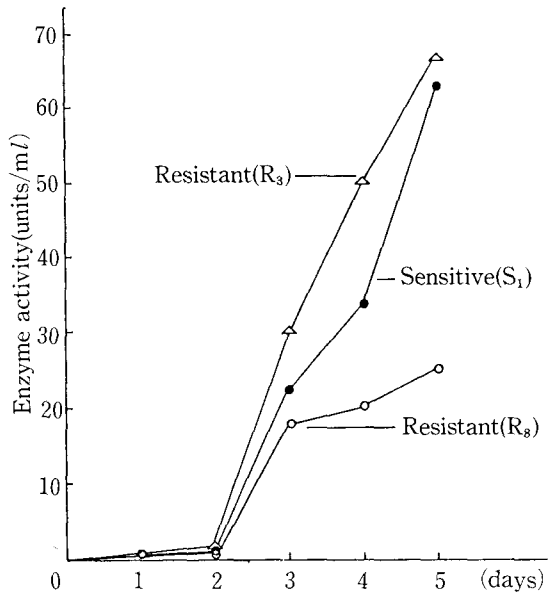


Fig.2. Activity of endo-polymethylgalacturonase produced by Iprodione-sensitive(S₁) and resistant(R₃, R₈) isolates of *Alternaria mali* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts medium at 30°C.

正한 方法(Ayer 등, 1966)에 따라 測定하였다. Pectin lyase 1單位는 吸光度 1.0을 變化시키는데 필요한 酵素量으로 하였다.

사과培地의 透析과 iprodione의 添加 效果

사과培地(Spalding 등, 1973)는 pH 6.8의 0.033 M Sodium-phosphate buffer 150 ml에 사과과육 200g을 blender로 混合하여 만든 후 반을 5°C에서 24시간 透析시켰다. 無基鹽類는 pectin-polypectate培地에서 사용한 것과 같이 添加하였다. 각각의 사과培地에 iprodione 10µg/ml를 添加하였다. 이렇게 準備한 후 前記와 같은 方法으로 殺菌, 接種하여 같은 條件下에서 4日間 培養하여 各 酵素의 活性度를 測定하였다.

菌絲生長 測定은 培養液을 濾過한 후 菌叢을 蒸溜水로 2회 水洗한 후 80°C에서 48시간 건조시켜 乾物重을 測定하였다.

結果 및 考察

人工培地에서 酵素活性

1) Exo-polymethylgalacturonase의 生産은 2日째까지 各 菌株의 活性이 낮았으나 4日째에는 7.

1~11.0單位로 增加하였으며 그 이후 減少하였다 (Fig. 1). 供試 3菌株中 病原성이 큰 R₃의 活性이 가장 높았고 病原성이 작은 R₈는 3日째까지는 S₁菌株보다 높은 傾向을 보였으나 4日째부터는 낮아졌다.

2) Endo-polymethylgalacturonase의 活性은 2日째까지는 극히 微弱하였으나 3日째부터 增加되어 5日째에는 각각 62.5, 66.6 및 25.0單位에 달하였다 (Fig. 2). 특히 R₃와 S₁菌株의 活性이 R₈보다 현저히 높아졌다.

3) Polygalacturonase : Exo-polygalacturonase의 活性은 2日째부터 높아지기 시작하여 4일째에는 7.1~9.3 milliunit로 增加되었고 그 이후 減少하였다 (Fig. 3). 특히 3日째부터는 R₃菌株의 活性이 S₁菌株보다 현저히 높았으며 R₈菌株는 S₁보다 낮았다.

Endo-polygalacturonase의 活性은 2日째까지는 거의 없었으나 3日째부터 나타나기 시작하여 그 이후 계속 增加하여 5日째에는 0.8~3.2單位에 달하였다. S₁과 R₃菌株의 活性은 R₈보다 현저히 높았다 (Fig. 4).

4) Pectinmethylesterase의 活性은 2日째까지는 20 milliunit 이하로 낮았으나 그 이후 增加하여 5日째에는 S₁, R₃, R₈菌株順으로 各各 210, 90 및 70 milliunit에 달하였다 (Fig. 5).

5) Pectin lyase의 活性은 2日째까지 微弱하였으나 3日째에는 S₁菌株의 活性이 1.1單位에 이르렀으

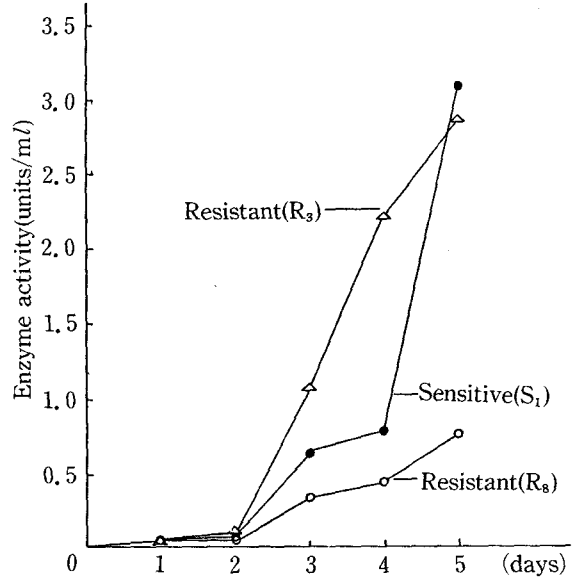


Fig. 4. Activity of endo-polygalacturonase produced by Iprodione-sensitive(S₁) and resistant(R₃, R₈) isolates of *Alternaria mali* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts medium at 30C.

나 R₃와 R₈菌株는 5日째에도 각각 1.2와 0.7單位로서 S₁의 1.7單位에 比하여 낮았다.

사과培地의 透析과 iprodione의 添加 效果

蒸溜水에 透析시키지 않은 사과培地에서는 4日間

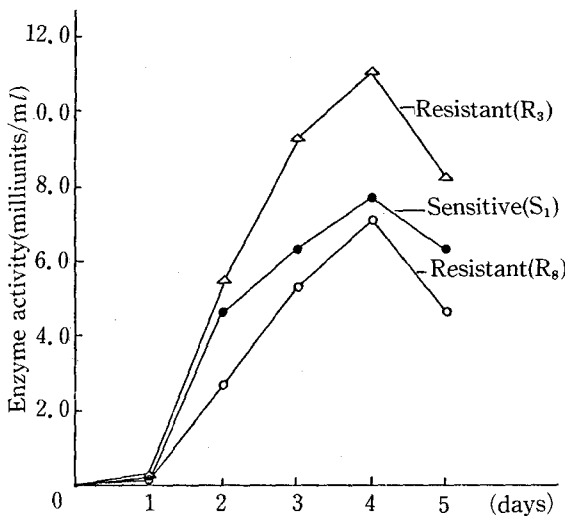


Fig. 3. Activity of exo-polygalacturonase produced by Iprodione-sensitive(S₁) and resistant(R₃, R₈) isolates of *Alternaria mali* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts medium at 30C.

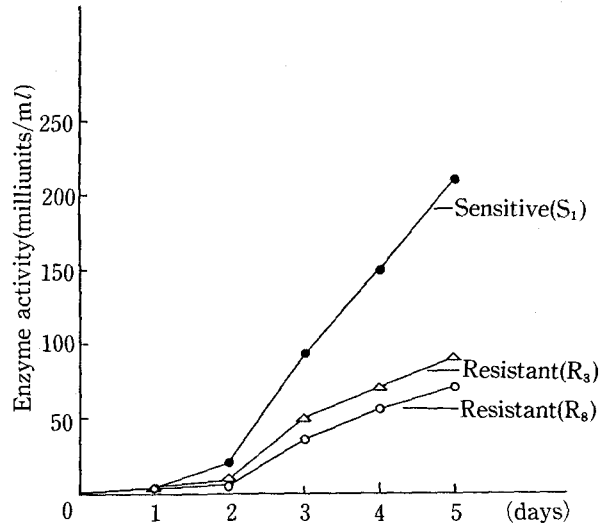


Fig. 5. Activity of pectinmethylesterase produced by Iprodione-sensitive(S₁) and resistant(R₃, R₈) isolates of *Alternaria mali* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts medium at 30C.

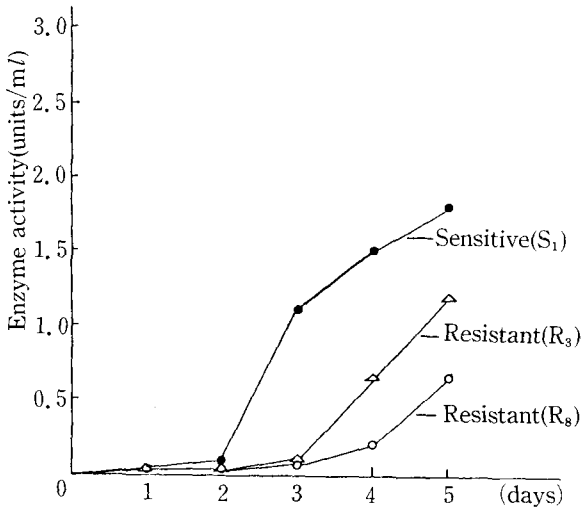


Fig. 6. Activity of pectin lyase produced by Iprodione-sensitive(S₁) and resistant(R₃, R₈) isolates of *Alternaria mali* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts medium at 30C.

培養하였을 때의 생장이 11.2~12.8 mg/ml의 乾物重을 보였으나 endo-polygalacturonase, pectinmethyl-esterase 및 pectin lyase의 活性은 없었으며, exo-polymethylgalacturonase, endo-polymethylgalacturonase 및 exo-polygalacturonase의 活性은 0.5~7.7單位로 낮았다(Table 1). 그러나 透析한

사과培地에서는 菌絲生長 乾物重이 8.2~8.8 mg/ml로 減少되었으나 pectin質 分解酵素의 活性은 0.8~20.0單位로서 透析시키지 않은 사과培地에서 보다 增進되었고 透析시키지 않았을 때에는 活性을 보이지 않았던 前記 3種의 酵素도 0.1~3.0單位의 活性을 보였다.

Iprodione 10μg/ml를 添加하였을 때에는 本藥劑에 感受性인 S₁菌株의 酵素活性과 菌絲生長은 減少되었으나, 抵抗力菌株中 病原性이 큰 R₃는 透析시킨 사과培地에서 exo-polygalacturonase를 除外한 酵素의 活性이 增加되었다(Table 1).

植物病原菌은 生長에 必要한 窒素源, 無機鹽類 및 低分子의 水溶性 炭素源을 吸收 利用한다(Bateman 등, 1966; Keen 등, 1965). 本試驗에서 사용된 人工培地에는 巨大分子인 pectin과 polypectate안을 炭素源으로 넣었기 때문에 供試菌은 生長에 必要한 養分을 얻기 위하여서는 이들 物質을 分解해야 하므로 pectin質 分解酵素를 生産하였을 것이다. 그러나 사과培地에는 病原菌의 生長에 必要한 各種 아미노산 窒素源과 함께 glucose 및 fructose 등을 포함한 低分子의 炭素源이 含有되어 있기 때문에 달리 pectin質을 分解하지 않아도 生長할 수 있어서 이들 酵素의 生産이 낮았는 것으로 생각된다(Spalding 등, 1973). 사과培地를 蒸溜水로 透析시킴으로써 養

Table 1. Effect of apple medium dialysis and 10 ng/ml iprodione addition on growth and enzyme production of Iprodione-sensitive(S₁) and resistant(R₃, R₈) isolates of *Alternaria mali* in four days at 30C.

Test medium	Isolate	exo-PMG ^a	exo-PG ^a	endo-PMG ^b	endo-PG ^b	PME ^a	PL ^b	Growth(dry wt.)
Nondialyzed	S ₁	5.5	3.8	0.5	0	0	0	11.6 (mg/ml)
	R ₃	5.5	5.5	3.0	0	0	0	11.2
	R ₈	3.8	1.6	7.7	0	0	0	12.8
Nondialyzed plus iprodione	S ₁	2.7	1.6	0.2	0	0	0	6.0
	R ₃	5.5	3.8	2.7	0	0	0	11.0
	R ₈	2.2	0.6	5.5	0	0	0	12.4
Dialyzed	S ₁	8.2	5.5	0.8	0.1	20	0.1	8.4
	R ₃	9.3	7.7	16.7	0.2	30	0.2	8.2
	R ₈	7.1	5.5	20.0	0.3	24	0.2	8.8
Dialyzed plus iprodione	S ₁	5.5	3.3	0.5	0.1	7	0.1	4.0
	R ₃	13.7	5.5	33.3	0.4	50	0.4	7.0
	R ₈	7.7	3.8	5.0	0.2	70	0.1	6.8

^aExo-PMG(exo-polymethylgalacturonase), exo-PG(exo-polygalacturonase), PME(pectinmethyl-esterase) activity expressed in milliunit/ml.

^bEndo-PMG(endo-polymethylgalacturonase), endo-PG(endo-polygalacturonase), PL(pectin lyase) activity expressed in unit/ml.

분으로 이용될 수 있는 前記한 低分子水溶性 物質이 除去되었으므로 病原菌은 生長에 필요한 養分을 얻기 위하여 사과細胞에 함유된 pectin質을 分解하는 酵素를 生産하여 그 活性이 높아진 것으로 생각된다 (Spalding 등, 1973). 각종 pectin質 分解酵素와 病原性과의 관계는 本 實驗結果로서는 明確하지 않았으나 人工培地에서 基質을 末端切斷(terminal cleavage)하는 exo-polymethylgalacturonase와 exo-polygalacturonase의 生産傾向이 비슷하고 이들 酵素에 의한 生産物은 monomer나 dimer이므로 菌의 生長에 利用되었을 것이다(Wood 등, 1955). 그러나 基質을 임의로 切斷(random cleavage)하는 endo-polymethylgalacturonase와 endo-polygalacturonase는 菌絲生長이 減少되기 始作한 5日째에도 增加되었는데 이들 酵素의 生産物은 oligomer 이상의 大分子이므로 菌의 生長에 利用할 수 없었으나 寄主侵入에 있어서 細胞組織의 軟化에 관련이 있을 것이다(Bateman 등, 1966).

透析시킨 사과培地에 微量의 iprodione을 添加하였을 때 感受性菌株 S₁에 比하여 抵抗性菌株 R₃는 exo-polygalacturonase를 除外한 5種의 pectin質 分解酵素의 活性이 높았으며 R₃菌株는 pectinmethylesterase의 活性이 增加되었는데 이는 極히 낮은 濃度의 iprodione이 本 藥劑 抵抗性菌株에 의한 이들 酵素의 活性을 促進한 것으로 생각된다. 그러나 抵抗性 發生에 따른 病原性의 變化와 이에 따른 각종 pectin質 分解酵素의 生産變化 關係를 究明하기 위하여서는 本 試驗에 使用한 粗酵素를 더욱 純化한 것을 使用하여 세밀한 調查研究를 하여야 할 것이다.

摘 要

사과斑點落葉病菌 *Alternaria mali*의 iprodione 抵抗性菌株中 病原性이 變化된 菌株를 구하여 pectin質 分解酵素의 活性과 病原性간의 關係를 알아 보았다. 人工培地에서는 病原性이 큰 S₁과 R₃菌株가 病原性이 작은 R₆菌株보다 酵素活性이 높았으며 endo-polymethylgalacturonase와 endo-polygalacturonase의 活性은 3배 이상이었다. 그러나 pectinmethylesterase와 pectin lyase의 活性은 S₁菌株가 R₃와 R₆보다 높게 나타났다. 蒸溜水로 透析시킨 사과培地에서 각 菌株는 높아진 酵素活性을 보

였으나 菌의 生長은 減少하였다. 또한 iprodione을 添加하므로써 感受性 菌株인 S₁의 酵素活性과 菌絲生長은 減少되었으나, 抵抗性菌株중 病原性이 큰 R₃菌株는 透析시킨 사과培地에서 exo-polygalacturonase를 除外한 酵素의 活性이 增加되었다.

參考文獻

- Ayers, W.A., Papavizis, G.C. and Diem, A.F.(1966): Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase produced by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 56: 1006-1011.
- Bateman, D.F. and Millar, R.L.(1966): Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathology* 4: 119-146.
- Cole, M. and Wood, R.K.S.(1961): Pectic enzymes and phenolic substances in apples rotted by fungi. *Annals of Botany*, N.S. 25: 432-452.
- Jansen, E.F. and MacDonnel, L.R.(1945): Influence of methoxyl content of pectic substances on action of polygalacturonase. *Arch. Biochem.* 8: 97-112.
- Keen, N.T. and Horton, J.T.(1965): Induction and repression of endopolygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Can. J. Microbiology* 12: 443-453.
- McClendon, J.H., Somers, G.F. and Heuberger, J. W.(1960): The occurrence of a variety of enzymes hydrolyzing cell wall polysaccharides in apples rotted by *Botryosphaeria ribis*. *Phytopathology* 50: 258-261.
- Nagel, C.W. and Vaughn, R.H.(1962): Comparison of growth and pectolytic enzyme production by *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriology* 83: 1-5.
- Spalding, D.H. and Abdul-Baki, A.A.(1973): In vitro and in vivo production of pectin lyase by *Penicillium expansum*. *Phytopathology* 63: 231-235.
- Spalding, D.H., Wells, J.M. and Allison, D.W.(1973): Catabolite repression of polygalacturonase, pectin lyase and cellulase synthesis in *Penicillium expansum*. *Phytopathology* 63: 840-844.
- Wallace, J., Kuc, J. and Williams, E.B.(1962): The production of extracellular enzymes by four pathogens of apple fruit. *Phytopathology* 52: 1006-1009.
- Winstead, N.N. and Walker, J.C.(1954): Production of vascular browning by metabolites from several

pathogens. *Phytopathology* **44**: 153-158.

Wood, R.K.S.(1955): Pectic enzymes secreted by pathogens and their role in plant infection.

Mechanisms of microbial pathogenicity. *Symposium Soc. Gen. Microbiol.* 5th. p263-293.

Accepted for Publication 7 April