

## 사과 겹무늬썩음병균(*Botryosphaeria dothidea*)이 생산하는 Polygalacturonase의 생화학적 특성

박석희 · 서상곤 · 이창은\*  
영남대학교 자연자원대학 원예학과

### Biochemical Characters of Polygalacturonase Produced by *Botryosphaeria dothidea*

Seok-Hee Park, Sang-Gon Suh and Chang-Un Lee\*  
Department of Horticulture, College of Natural Resources, Yeungnam University,  
Kyongsan 712-749, Korea

**ABSTRACT :** The polygalacturonase (PG) production in rotten apples by *Botryosphaeria dothidea* was purified by using gel filtration and ion exchange column chromatography, and the biochemical characters of PG were investigated. The purified PG appeared as a single band on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with approximate molecular weight of 49 kilodalton (kDa). The molecular weight was equal to the native molecular weight estimated by gel filtration. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of PG were 0.51 mg/ml and 90.9  $\mu$ M/min/ml, respectively. Optimum pH was 4.0~5.0, and the PG activity was stable from pH 5.0~10.0. Optimum temperature of the enzyme activity was 40°C. The PG activity was relatively stable at 20°C, but it was reduced 45% at 40°C and completely inactivated at 80°C. The PG activity was considerably inhibited by  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , SDS and EDTA, whereas it was not effected by  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  or  $Na^+$  ions.

**Key words :** *Botryosphaeria dothidea*, polygalacturonase, SDS-PAGE, biochemical characters.

식물의 세포 중층은 인접한 세포의 일차세포벽 사이에 존재하며, 세포와 세포를 접착시키는 역할을 한다(8, 9). 병원균이 식물 조직 내부에 침입하기 위해서는 기주의 세포 중층 및 세포벽을 분해하여 균사가 진입하여야 하고 아울러 이들의 분해산물을 생장에 필요한 양분으로 사용한다(2, 6). 주로 pectic polysaccharides로 구성되어 있는 세포 중층은 병원균이 생산한 이들 효소에 의해 분해되어 세포벽의 구조적 결합력을 상실하며 그 결과로 조직의 결합력이 소실되어 병원균의 침입 및 정착이 용이하게 된다(3, 7, 12). 병원균이 생산하는 세포벽 분해효소로는 polygalacturonase(PG), pectin lyase(PL), pectin methylesterase(PME) 등이 보고되어 있으며(1, 6, 13), 이들 효소가 기주의 세포벽과 중층의 pectin질을 직접 또는 간접적으로 분해하는 것으로 알려져 있다. Barmore 등(1)은 *Penicillium italicum*에 의해 부패된 감귤 과실에서 분자량이 36 kilodalton (kDa)인 endo-PG를 분리, 정제하여 실험한 결과, *in vi-*

*tro*에서 감귤 조직을 연화시켰으며, 이 효소가 세포 중층을 분해하여 균사 침입을 일으키는 주요 요인이라고 하였고, Spalding 등(15)은 *P. expansum*이 사과에 침입할 때 PG가 PL과 함께 사과 조직의 분해에 주된 역할을 한다고 하였다. 이와 같이 국외의 여러 나라에서 식물병 발생에 관여하는 효소에 대한 연구가 진행되고 있으며, 이들 효소의 활성을 억제시킬 수 있는 방법을 모색하고 있다. 그러나 사과 겹무늬썩음병균이 생산하는 효소에 대한 연구 결과는 국내외를 막론하고 보고된 것이 없다.

본 실험에서는 사과 겹무늬썩음병균이 생산하는 세포 중층의 분해효소인 PG가 병원성에 미치는 역할과 면역조직학적 방법에 의한 기주 조직내의 위치를 추적하기 위한 연구의 일환으로 이 효소를 분리, 정제하여 그 분자량과 생화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

공시재료. 본 실험에서는 영남대학교 부속 농장에

\*Corresponding author.

서 수확한 후지품종 사과(*Malus domestica* cv. Fuji)를 접종용 과실로 사용하였고, 자연상태에서 감염된 사과 과로부터 순수분리한 사과 겹무늬썩음병균(*Botryosphaeria dothidea*)을 과실에 접종하였다.

병원균의 접종 및 배양. 사과의 표면을 수세하여 건조시킨 후 바늘로 깊이 2 mm의 상처를 내어 *B. dothidea*의 포자 현탁액( $5 \times 10^5$  spores/ml)을 접종하였다. 접종 후 사과는 플라스틱 상자에 넣어  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5~7일간 배양하여 병반 직경을 측정하였다.

Polygalacturonase(PG)의 분리 및 정제. 본 병원균에 의해 부패된 사과 과육에서의 효소 추출은 전보(14)와 마찬가지로 조효소액을 얻었고, Diaflo PM 10 ultrafiltration membrane(M.W. cut off: 10,000)이 부착된 Amicon Diaflo System을 사용하여 질소 gas로 가압 농축시킨 후 Sephadex G-100 gel filtration column ( $2.8 \times 80$  cm)에 주입하여 0.36 ml/min의 유속으로 분획하였다. 효소활성이 나타난 분획을 모아 ultrafiltration으로 농축한 후 CM-Sephadex ion exchange column( $2.5 \times 50$  cm)에 주입하여 0.3 ml/min의 유속으로 용리한다 다음 PG 활성이 나타난 분획을 모아 농축하여 DEAE-Cellulose ion exchange column( $2.8 \times 50$  cm)에 주입하여 0.2 M NaCl로 충분히 씻은 다음, 0.2~0.5 M NaCl linear gradient로 용리하였다. 효소활성이 나타난 분획을 Sephacryl S-200 gel filtration column( $1.5 \times 90$  cm)에 주입하여 0.23 ml/min의 유속으로 분획하여 정제하였다. 이상의 모든 정제과정은  $4^\circ\text{C}$ 에서 실시하였다.

활성 측정. PG의 활성 측정은 Gross(5)에 의해 수정된 2-cyanoacetamide 방법으로 측정하였으며, 효소 활성 1 unit는 효소 1 ml가 1분간에 1  $\mu\text{M}$ 의 환원당을 증가시키는 것으로 하였다.

전기영동. 전기영동은 Laemmli 등(10)이 행한 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 하였다. 즉 separating gel과 stacking gel은 pH 8.8과 pH 6.8의 Tris-HCl buffer로 각각 조제하였고, polyacrylamide 농도는 각각 12.5%와 7%로 하였다. 시료에 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol을 각각 2%와 5%가 되게 첨가한 후  $100^\circ\text{C}$ 에서 2분간 끓였다. 전기영동은 10 mA에서 8시간 실시하였으며, 염색은 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액 [10% acetic acid: 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 in 95% ethanol=1:1(v/v)]으로 행하였고, acetic acid : methanol : 증류수=70 : 100 : 830(v/v/v)의 혼합 용액으로 탈색시켜 단백질 밴드를 확인하였다.

분자량 측정. Gel filtration에 의한 분자량 측정은 Whitaker(16)의 방법에 따라 측정하였고, 표준단백질은  $\beta$ -amylase(MW 200,000), alcohol dehydrogenase (MW 150,000), bovine serum albumin(MW 66,000), carbonic anhydrase(MW 29,000) 및 cytochrome C (MW 12,400)를 사용하였다. 또한 전기영동에 의한 분자량 측정은 SDS-PAGE로 실시하였으며, molecular marker로 이용된 표준단백질은 phosphorylase b(MW 97,400), bovine serum albumin(MW 66,200), ovalbumin(MW 45,000), carbonic anhydrase(MW 31,000), soybean trypsin inhibitor(MW 21,500)와 lysozyme (MW 14,400)을 사용하였다.

생화학적 특성 조사. 기질(polygalacturonic acid)의 농도에 따른 PG활성 변화를 측정하여 Lineweaver-Burk plot로  $K_m$ 과  $V_{max}$ 값을 구하였으며, 반응시간에 따른 효소활성을 측정하였다. 최적 온도와 최적 pH는 각 온도와 pH에서 효소의 활성을 측정하였고, 열에 대한 안정성은 효소액을 여러 온도에서 10분간 처리한 후 즉시 냉각시켜 잔존하는 효소활성을 측정하였다. pH에 대한 안정성은 효소액을 pH 3.0~11.0의 buffer로  $4^\circ\text{C}$ 에서 18시간 투석시킨 후 활성을 측정하였다. 이때 사용한 buffer는 10 mM acetate buffer(pH 3.0, 4.0, 5.0), 10 mM sodium phosphate buffer(pH 5.0, 6.0, 7.0), 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0, 8.0, 9.0) 및 10 mM glycine-NaOH buffer(pH 9.0, 10.0, 11.0)로 하였다. 효소활성에 미치는 금속이온, SDS, EDTA의 영향은 각각 2 mM의 용액을 조제한 후 이 용액과 효소액을 1:1로 혼합하여  $30^\circ\text{C}$ 에서 60분간 반응시킨 다음 효소활성의 변화를 측정하였다.

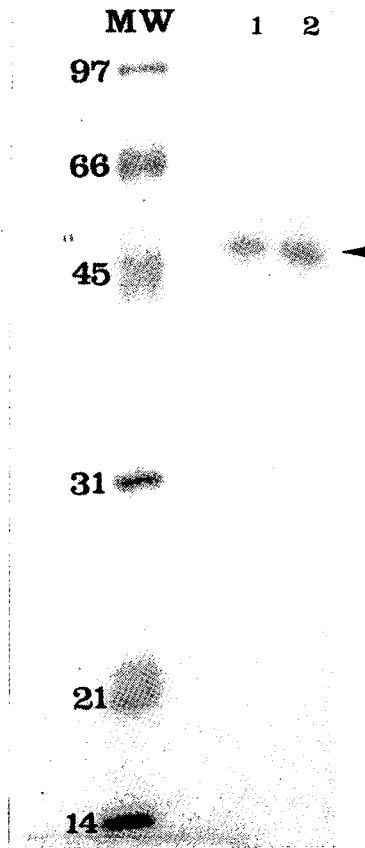
단백질의 정량. 단백질의 정량은 Lowry 등(11)의 방법에 따라 측정하였으며, bovine serum albumin을 사용한 표준 곡선에 의하여 단백질량을 환산하였다.

## 결과 및 고찰

### Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE).

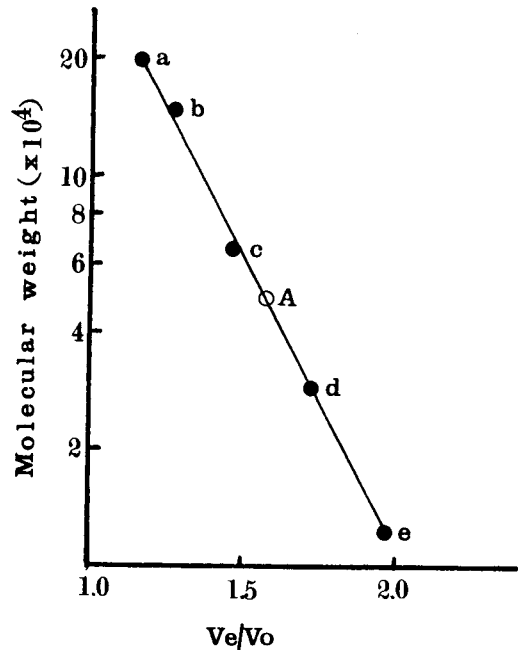
사과 겹무늬썩음병균에 의해 부패된 사과 과육에서 단백질을 추출하여 Sephadex G-100, Sephacryl S-200 gel filtration column, CM-Sephadex 및 DEAE-Cellulose ion exchange column에 주입하여 polygalacturonase(PG)를 정제한 다음 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 Fig. 1에서와 같이 반복된 두 lane에서 모두 단일 band로 나타나 순수한 PG가 정제되었음을 알 수 있었다.

분자량 측정. 위의 SDS-PAGE의 결과를 지표단백



**Fig. 1.** SDS-PAGE for the determination of molecular weight of polygalacturonase. Purified polygalacturonase was shown (lanes 1, 2; see arrow), and the standard molecular weight markers (MW) are also shown (phosphorylase b; MW 97,000, bovine serum albumin; MW 66,000, ovalbumin; MW 45,000, carbonic anhydrase; MW 31,000, soybean trypsin inhibitor; MW 21,000, and lysozyme; MW 14,000).

질의 분자량을 기준으로 계산한 결과는 분자량이 49 kDa 정도였다. Whitaker 등(16)의 방법에 따라 gel filtration column chromatography로 측정된 분자량도 49 kDa으로 전기영동에 의한 측정치와 일치하였다(Fig. 2). Conway 등(4)은 *Penicillium expansum*에 부패된 사과 과실에서 정제한 PG의 분자량은 47 kDa이라고 하여 본 병원균이 생산한 PG와 유사하였으나, Barmore 등(1)은 *P. italicum*에 감염된 감귤 과실에서 PG를 분리하여 분자량을 측정된 결과, 36 kDa이라고 하였고, Polizeli 등(14)이 *Neurospora crassa*로부터 정제한 PG는 36.6~37 kDa이라고 하여 본 실험의 결과와 비교하여 12~13 kDa 정도의 차이를 나타내었다. 이는 병



**Fig. 2.** Determination of the molecular weight of polygalacturonase by Sephacryl S-200 gel filtration chromatography. a:  $\beta$ -amylase (MW 220,000), b: alcohol dehydrogenase (MW 150,000), c: albumin (MW 66,000), d: carbonic anhydrase (MW 29,000), e: cytochrome c (MW 12,400), A: polygalacturonase, Vo: void volume, Ve: elution volume.

원균에 의한 부패과정에서 기주-기생체의 상호작용 또는 phosphorylation이나 glycosylation의 정도 등의 post-translational modification에 의하여 분자량이 차이가 있을 것으로 생각된다.

**생화학적 특성.** 기질(polygalacturonic acid)의 농도에 따른 PG의 활성 변화를 조사한 결과 기질의 농도가 낮을 때에는(0.2~1.0 mg/ml) 가수분해 속도가 직선적으로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 기질 포화 양상을 나타내어 가수분해속도가 둔화되었다(Fig. 3). 또한 Lineweaver-Burk plot로 측정된  $K_m$ 값은 0.51 mg/ml이었고,  $V_{max}$ 값은 90.90  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 이었다. 이와 같은 결과는 Polizeli 등(14)이 보고한 5.0 mg/ml의  $K_m$ 값과 차이를 보였는데 이는 PG의 작용에 의하여 분해된 산물이 exo나 endo-type의 작용양상에 따라 달라진 것으로 생각된다.

반응시간에 따른 효소 활성 변화는 Fig. 4와 같이 120분 동안 효소활성이 직선적으로 증가하였는데 효소액을 첨가한 후 60분 동안에 27.5  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 을 생성하였으며 120분에는 54.8  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 에 달하였다.

따라서 본 실험에서 효소활성을 60분으로 측정하는 것이 가능한 것으로 생각된다.

반응 pH에 따른 효소활성 변화는 pH 4.0에서 28.6  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 로 가장 높은 활성을 보였으며, pH가 증가하면서 효소활성은 감소되어 pH 8.0에서는 5.04  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 로 나타났다(Fig. 5-A). Hancock 등(6)이 분리한 PG는 최적 pH가 4.5이며, Barmore 등(1)은 pH 5.0, Conway 등(4)은 pH 5.0~5.5라고 하여 본 실험의 결과와 비슷하였다. 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 20~80°C의 반응 온도에서 활성을 측정된 결과(Fig. 5-B), 40°C에서 44.8  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었고 60°C에서 거의 모든 활성을 잃었다.

pH에 대한 안정성은 효소액을 pH 3.0~11.0의 각 pH에서 투석시킨 후 잔존하는 효소활성을 측정된 결과(Fig. 6-A), pH 6.0~9.0에서는 30.1~33.2  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 로 활성이 높았고, pH 5.0과 10.0에서도 큰 변화는 없었으나, pH 4.0 이하에서는 활성이 감소하였다. 따라서 효소 활성의 안정범위는 pH 5.0~10.0으로 나타났다. 열에 대한 안정성은 효소액을 20~80°C의 각 온도에서 10분간 열처리한 후 즉시 냉각시켜 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 6-B). 그 결과 30°C에서는 28.1  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 로 감소되지 않았으나, 40°C에서 15.8  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ 로 45% 감소하였으며, 80°C에서는 완전히 불활성화 되었다. Hancock 등(6)도 이와 유사한 결과를 보고하여 50°C에서 96%의 활성을 잃었다고

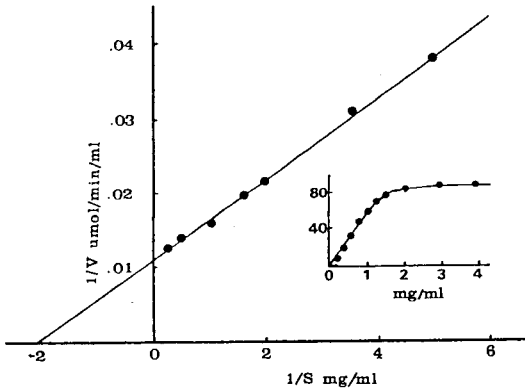


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of the polygalacturonase purified from rotten apple fruits by *Botryosphaeria dothidea*.

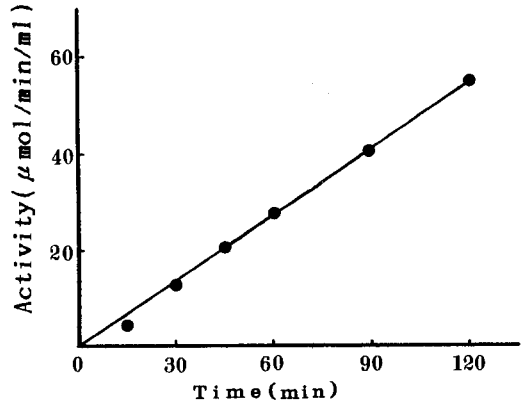


Fig. 4. Effect of reaction time on polygalacturonic acid hydrolysis by polygalacturonase purified from rotten apple fruits by *Botryosphaeria dothidea*.

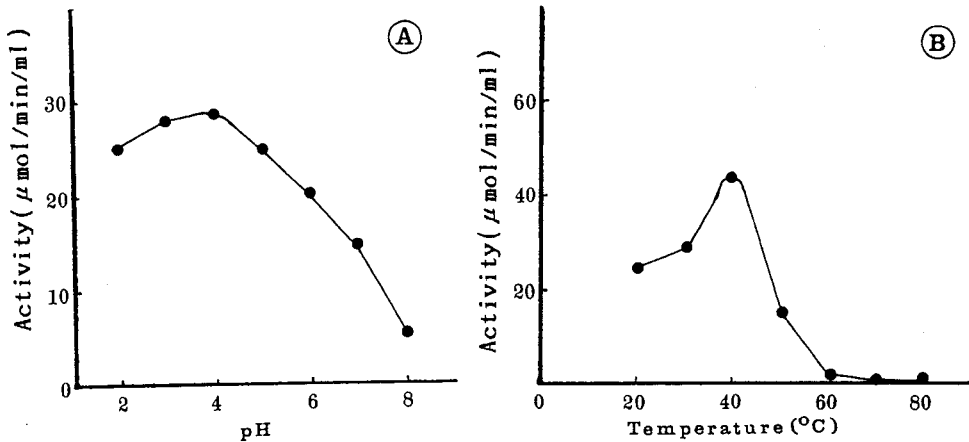


Fig. 5. Effect of pH (A) and temperature (B) on polygalacturonic acid hydrolysis by polygalacturonase purified from rotten apple fruits by *Botryosphaeria dothidea*.

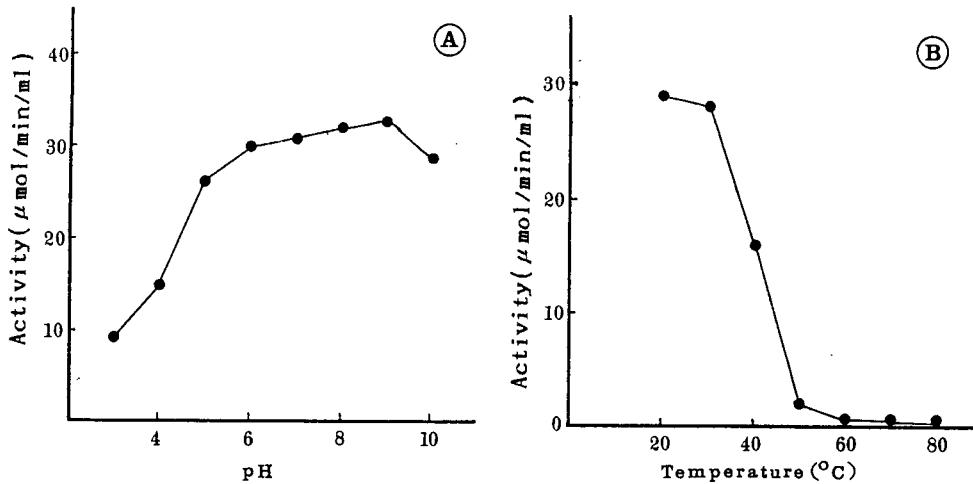


Fig. 6. Effect of pH (A) and heat treatment (B) on the stability of polygalacturonase purified from rotten apple fruits by *Botryosphaeria dothidea*.

Table 1. Effects of various additives on the activity of polygalacturonase purified from rotten apples by *Botryosphaeria dothidea*

Additive <sup>a</sup>	Compound	Relative activity (%)
None	-	100.0
Ca <sup>2+</sup>	CaCO <sub>3</sub>	98.3
Cu <sup>2+</sup>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	70.2
Fe <sup>2+</sup>	FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	81.4
K <sup>+</sup>	K <sub>2</sub> CrO <sub>7</sub>	96.1
Mg <sup>2+</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	93.2
Na <sup>+</sup>	NaCO <sub>3</sub>	103.1
Zn <sup>2+</sup>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	80.5

<sup>a</sup> Final concentration of the reaction mixture was adjusted to 1 mM.

하였으나 본 실험에서 정제한 PG가 열에 더 강한 것으로 생각되었다.

금속이온과 SDS, EDTA의 영향. 금속이온의 첨가에 따른 효소활성 변화는 최종농도를 1 mM되게 하여 반응시킨 후 활성을 측정할 결과(Table 1), Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 이온의 처리구에서는 상대적 효소활성이 70.2~81.4%로 19~30% 정도 억제되었으나, 기타 금속이온들은 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않았다. SDS 첨가구는 36.3%의 활성감소를 보였고, EDTA와 반응시켰을 때는 34.9%의 감소를 나타내어 활성부위에 금속이온이 관여하고 있을 것으로 생각되었다. 따라서 PG의 활성 억제제로는 Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 이온과 SDS, EDTA 등을 이용할 수 있을 것으로 생각되었다.

## 요 약

사과 검무늬썩음병균에 의해서 부패된 사과과육에서 단백질을 추출한 다음 gel filtration과 ion exchange chromatography로 polygalacturonase(PG)를 정제하여 생화학적 특성을 조사하였다. 정제한 PG는 SDS-PAGE 에서 단일 band로 관찰되었고, 분자량은 49 kDa로 gel filtration에 의한 측정치와 동일하였다. PG의 K<sub>m</sub>값과 V<sub>max</sub>값은 각각 0.51 mg/ml, 90.9 μM/min/ml였다. 효소 활성의 최적 pH는 4.0~5.0이었고, pH에 대한 안정성은 pH 5.0~10.0, 최적 온도는 40°C였다. 열에 대한 안정성은 20°C에서는 비교적 안정하였으나, 40°C에서 45%의 활성을 잃었고, 80°C에서는 완전히 불활성화되었다. PG는 Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, SDS 및 EDTA 등에 의하여 그 활성이 현저히 저해되었으나, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> 이온들은 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않았다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- Barmore, C. R. and Brown, G. E. 1981. Polygalacturonase from citrus fruit infected with *Penicillium italicum*. *Phytopathology* 71 : 328-331.

2. Bateman, D. F. 1976. Plant cell wall hydrolysis by pathogens. In : *Biochemical aspects of plant-parasite relationship*, ed. by J. Friend and D. R. Threlfall, pp. 79-99. Annu. Proc. Phytochem. Soc. Academic Press, NY. 354pp.
3. Collmer, A. and Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24 : 383-409.
4. Conway, W. S., Gross, K. C., Boyer, C. D. and Sams, C. E. 1988. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increase apple cell wall calcium. *Phytopathology* 78 : 1052-1055.
5. Gross, K. C. 1982. A rapid and sensitive method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *HortScience* 17 : 933-934.
6. Hancock, J. G. and Millar, R. L. 1965. Relative importance of polygalacturonate-*trans*-eliminase and other pectolytic enzymes in southern anthracnose, spring black stem and *Stemphylium* leaf of alfalfa. *Phytopathology* 55 : 346-355.
7. Hancock, J. C. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* 56 : 975-979.
8. Hobson, G. E. 1981. Enzymes and texture changes during ripening. In : *Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables*, ed. by J. Friend and M. J. C. Rhodes, pp. 123-132. Academic Press, London.
9. Huber, D. J. 1983. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Reviews* 5 : 169-219.
10. Laemmli, U. K. and King, J. 1971. Polypeptides of the tail fibers of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 62 : 465-477.
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
12. McGuire, R. G. and Kelman, A. 1986. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. *Phytopathology* 76 : 401-406.
13. 박석희, 이창은. 1993. 사과 겹무늬썩음병균 (*Botryosphaeria dothidea*)에 의해 부패된 사과 과실에서 Pectin질 분해효소의 생산과 Pectin질의 변화. *한국균학회지* 21(2) : 106-111.
14. Polizeli, M. L. T. M., Jorge, J. A. and Terenzi, H. F. 1991. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 1815-1823.
15. 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.
16. Whitaker, J. R. 1963. Determination of molecular weight of protein by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.* 35 : 1950-1953.