

알카리성 *Bacillus* sp. Alk-7에 의한 Ethylene 생합성과 그 경로

배 무* · 김미예

이화여자대학교 생물학과

Ethylene Biosynthesis of an Alkalophilic *Bacillus* sp. Alk-7. Bae, Moo* and Mi-Ye Kim. Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea - An alkalophilic *Bacillus* sp. Alk-7, isolated from soil, produced ethylene. The characteristics of this microorganism is the ability to grow well under the alkaline condition, at pH 10.3. This strain is similar to *Bacillus alkalophilus* in terms of morphological, physiological and biological characteristics. In observation of relationship of cell growth and ethylene production according to incubation times, the ethylene synthesis mostly occur from the late exponential phase to the death phase of growth. The purpose of this paper is to study the effects of various substrates on the biosynthesis of ethylene in the intact cell and the cell-free system by the *Bacillus* sp. Alk-7. In both intact cell and cell-free extract, optimum conditions for ethylene production was achieved at pH 10.3 and 30°C. Ethylene was effectively produced from L-Met and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). In this case, ACC as the substrate on ethylene production were two fold higher than L-met at each concentration of substrates. On the other hand, the cell-free ethylene-forming system was used as a tool for the elucidation of the biochemical reaction involved in the formation of ethylene by *Bacillus* sp. Alk-7. Ethylene production in the cell-free system required the presence of manganese and cobalt ion to be stimulated a little. The result obtained in this work suggests that L-met and ACC may be a precursor more directly related to bacterial ethylene production than any other substrates tested.

Key words: alkalophilic bacteria, ethylene biosynthesis

Ethylene은 식물에서 생합성되는 식물호르몬으로서 식물의 성장, 과일의 성숙, 씨앗의 휴면 낙엽 노화등 식물의 생육의 여러단계에서 생리적 현상을 조절하는 물질로서 분자량 28.05의 C₂ 화합물이다.

식물에서의 ethylene 생합성 경로는 Yang 등에 의해서 밝혀졌는데 methionine(Met)을 전구 물질로 하여 S-adenosyl methionine(SAM) 그리고 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) 경로로 생합성된다[15]. 미생물에 의한 ethylene 생성 전구물질은 고등식물과는 달리 α -ketoglutarate(α -KG)라고[5] 밝혔고 최근에는 Fukuda 등이 ethylene-forming enzyme을 부분정제 하였다[6].

Ethylene 생성세균으로서 알려진 것은 토마토나 양배추에 고조병을 유발하는 *Pseudomonas solanacearum*[4], *Psyringae pv. phaseolicola*[7] *Xanthomonas citri*[8] 등의 식물병원성 세균이 알려져 있다. 이들 세균은 ethylene 생성전구 물질로서 methionine이 아닌 α -KG를 거친다는 것이 알려져 있고 또한 생성에 관여하기 위하여 cell free ethylene forming system을 조제하였다[7]. E. coli는 식물의 ethylene 생성이 methionine을 전구물질로 하는 것과 같은 것이긴 하나 중간대사 산물로서 α -

keto-r-methylthio-butyric acid(α -KMBA)를 거친다는 것이 보고되고 있다[10, 13]. 또한 Billington 등은 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Rhizobium* 그리고 *Corynebacteria* 등의 세균에서 methionine 존재하에서 증식시키면 KMBA가 일반적인 중간산물이라고 보고 하였다[3]. 이에 반해 본 연구에서는 Methionine 존재하에서 ethylene을 생성하는 알카리성 *Bacillus*속 세균을 분리하고 나아가 중간산물로서 KMBA가 아닌 ACC를 생성하는 세균을 분리하고 그 대사과정을 확인하였기에 여기에 그 내용을 배무 등[2]에 이어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

토양 및 퇴비등으로부터 분리한 호알칼리성 세균 152 균주로부터 ethylene 생성 유무를 검사하여 *Bacillus* sp. Alk-7을 선별하였다.

사용한 배지는 Horikoshi 등이 사용한 알카리성 세균을 배지[9]로서 glucose 1.0%, polypeptone 0.5% yeast extract 0.5% KH₂PO₄ 0.1% MgSO₄ 0.02% Na₂CO₃ 1.0% 첨가하여 pH 0.3으로 주정하였고 고체배지로 사용할 때에는 한천을 2.0% 첨가하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-2-360-2361, Fax. 82-2-360-2385

Ethylene생성의 분석

Ethylene 생성 유무를 검사하고자 하는 균주를 페트리 접수에 도달하여 30°C에서 하루동안 배양 한후에 1백금이 취해서 5 ml 액체 배지에 접종하고 14시간 종배양한다. 고무마개와 aluminium cap으로 밀봉할 수 있는 30 ml 용량 vial에 액체배지 5ml을 담고 멸균한 후 종배양 한균체를 3% (0.15 ml)씩 접종하여 30°C에서 24시간 진탕 배양 한후에 ethylene 생성을 vial내 기층에서 gas-tight syringe로 뽑아낸 것을 gas-chromatograph(shimadzu GC-9A)로 분석하였다.

Gas-ohromatograph는 detector로서 hydrogen flame ionization detector로 장착된 것으로서 column material로서 Porapak-Q, column 온도는 80°C로 유지되었고 carrier gas는 N₂이며, 가스의 유속은 40 ml/min로 가동되었다. 순수한 ethylene으로 0.1에서 10 nl 영역에서 직선관계를 나타냄으로 정량이 가능하였다.

Cell-free system의 조제법

알카리성 배지에서 알카리성 *Bacillus* sp. Alk-7을 접종후 24시간 배양 후 배양액을 2700×g에서 20분간 원심분리하여 집균하고 10 mM Na₂CO₃-NaHCO₃ buffer (pH 10.3)에 현탁하여 -20°C에 얼렸다가 녹인후 3 ml씩 초음파 분쇄기(Bram-Sonic, 1510)로 350 watt에서 2내지 3회 냉각상태에서 마쇄하였다. 마쇄된 세포추출물은 16,000×g 20분간 원심분리하여 그 상등액을 cell-free extract을 사용하였다. cell-free extract는 5 mM DDT와 10 mM CoCl₂ 및 MnCl₂를 첨가하여 cell-free system으로 사용하였다.

단백질 농도 측정법

Cell-free extract 내의 단백질 농도는 Lowry 등의 방법에 따라[11]으며 spectrophotometer(Hitachi, U-2000) 750 nm에서 그 흡광도를 측정하였고 Bovine Serum Albumin을 표준품으로 하여 나타내었고, 생성된 ethylene양은 nl(mg protein)⁻¹ h⁻¹로 표시하였다.

결과 및 고찰

Ethylene 생성균주의 동정

Ethylene을 생성시키는 본 실험균주는 중성이하의 PH에서는 자라지 않을 뿐 아니라 잘 자라는 pH는 10.3으로서 호알카리성 세균이었다. Gram 양성이며 운동성을 가진 막대형이고 catalase 양성균으로 starch를 가수분해 하므로 배지 성분으로서 포도당 대신 전분을 대치시켜도 잘 자랐다.

Table 1과 같은 생리학적 성질을 지니므로서 전형적인 *Bacillus*속 세균이나 잠정적인 결과로 보아 *Bacillus al-*

Table 1. Morphological, Cultural and Biochemical characteristics strain *Bacillus* sp. Alk-7

Morphological characteristics		
Form		Rods
Size		
Width		0.5-0.7 μm
Length		2-5 μm
Motility		motile
Gram staining		positive
Spore		forming
Cultural characteristics		
Temperature for growth		
Maximum		35-40°C
Minimum		10-15°C
pH range		8-11
Optimum pH		10.3
Biochemical characteristics		
Catalase activity		positive
Hydrolysis of		
Starch		positive
Casein		negative
Reduction of nitrate		positive
Indole test		positive ^a
Growth in		
Anaerobic agar		negative
Sabouraud dextrose		negative
5% NaCl		negative
7% NaCl		negative
0.001% lysozyme		positive
Methyl red test		negative
Acetoin on glucose		slow
Litmus milk reaction		negative
Gelatin liquefaction		negative

^aslightly and slowly reagent changed to red.

*colophilus*와 유사한 것으로 동정되었다.

Ethylene 생성에 미치는 배양 조건

Gas가 새지 않게 막을 수 있는 vial에 알카리성 배지를 담고 균을 접종하여 10°C에서 40°C까지 각 5°C별로 48시간 진탕 배양 한 후 ethylene 생성량을 분석한 결과는 30°C에서 가장 잘 자라고 ethylene 생성량도 많았다. 또한 pH에서도 10.3이 최적이며 pH 8 이하와 pH 11 이상에서는 본균주는 자라지도 않을 뿐 아니라 ethylene 생성도 전혀 일어나지 않음을 알 수 있다(Fig.1. Fig.2)

본균은 호알카리성균이긴 하지만 일정한 pH별로 ethylene 생성 양상을 조사해 보면 수산기를 지닌 알카리 약품으로 pH를 조정한 경우 pH 10.3에서 ethylene 생성의 양은 미소한데 반해서 탄산기를 가진 약품으로 배지의 pH를 조정하는 경우는 ethylene의 생성이 pH 10.3에 최고치를 나타냈다(Fig. 3).

Ethylene 생합성 경로에 대한 가능성

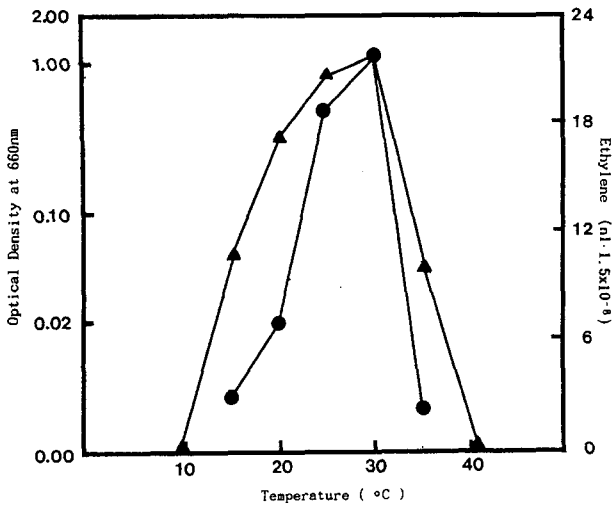


Fig. 1. Effect of growth temperature on ethylene production by intact cell of *Bacillus* sp. Alk-7. Samples were incubated for 48 hr.

●—●, ethylene produced; ▲—▲, growth.

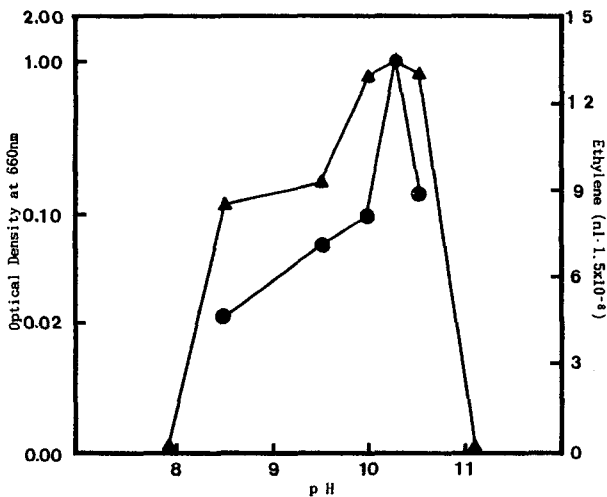


Fig. 2. Effect of initial pH of growth medium on ethylene production by intact cell of *Bacillus* sp. Alk-7. Samples were incubated for 48 hrs.

●—●, ethylene produced; ▲—▲, growth.

Ethylene 생합성 경로는 식물에서는 methionine을 출발 물질로 했을 때는 ACC를 경유하여 최종산물로 ethylene이 생합성 되는 것이 알려져 있으나[15] *E. coli*에서는 출발물질로서 methionine에서 ethylene을 생합성 할 때 두가지 경로 즉, 효소학적 경로나 빛 조사하에서 flavin의 작용으로 KMBA를 경유하여 생합성 되는 것으로 알려져 있다[13].

본 알칼리성 *Bacillus* sp. Alk-7에서는 L-methionine을 배지에 첨가 하였을 때 그리고 cell-free extract를 이용한 L-methionine이나 ACC에서도 ethylene 생성이 현저히 증가 하였으므로 다른 중간대사 산물에 대해서 추

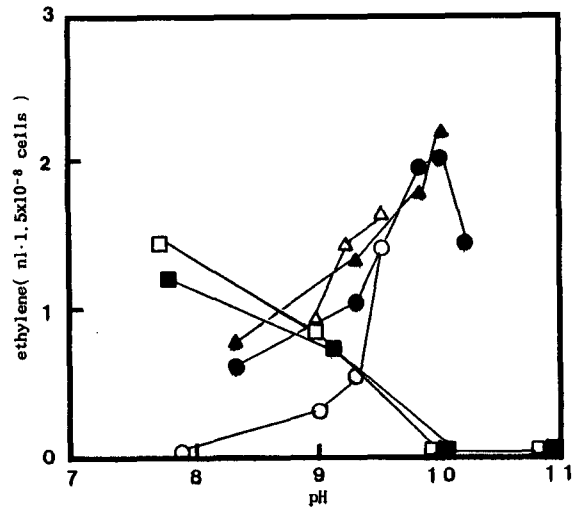


Fig. 3. Effect of pH by various salts on ethylene production by intact cell of *Bacillus* sp. Alk-7. Samples were incubated for 24 hrs.

○—○, NaHCO₃; ●—●, Na₂CO₃; △—△, KHCO₃; ▲—▲, K₂CO₃; □—□, KOH; ■—■, NaOH.

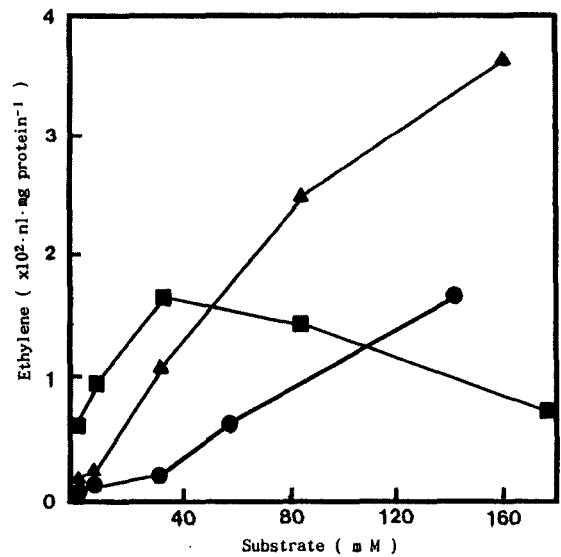


Fig. 4. Effect of concentration of L-Met, ACC and KMBA on ethylene production by cell-free extract of *Bacillus* sp. Alk-7. Samples were incubated for 48 hrs.

●—●, L-Met; ▲—▲, ACC; ■—■, KMBA.

가로 조사하였다.

즉 *E. coli*에서 중간 산물로 인정된 KMBA를 본균의 cell-free extract에 첨가해 본 결과 그 농도가 35 mM 이하에서는 ethylene 생성이 증가되는 경향을 보였으나 그 농도 이상에서는 기질 농도가 증가함에 따라 ethylene 생성은 감소하였고 오히려 KMBA는 ethylene 생성에 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

저해제의 영향

Table 2. Inhibitory and stimulatory effect of various compound on ethylene production from L-Met and from ACC in a cell-free extract of *Bacillus* sp. Alk-7

Compound	Ethylene production from L-Met*		Ethylene production from ACC*	
	nl·mg protein ⁻¹ ·h ⁻¹	%	nl·mg protein ⁻¹ ·h ⁻¹	%
Control	18.67	100.0	69.9	100.0
NaN ₃	1.33	7.1	903.2	1292.1
KCN	1.50	8.0	2.9	4.1
EDTA	1.05	5.6	1.0	1.4
AOA	1.08	5.7	1.3	1.8
AVG	5.33	28.5		

*nl·mg protein⁻¹. Vials with 40 mM ACC and 40 mM various compound were incubated for 48 hrs.

L-Met과 ACC를 기질로 하여 저해제를 첨가하여 ethylene 생성을 조사한 결과 azide, cyanide, EDTA, aminoxyacetic acid(ADA)는 저해제를 첨가하지 않는 대조구에 비해 90% 이상의 저해를 했고 aminoethoxyvinylglycin(AVG)는 72% 정도의 저해를 하였다(Table 2).

ACC를 기질로 했을때는 cyanide, EDTA, AOA가 96% 이상 저해를 한 반면에 azide는 ethylene 생성은 12배 정도 증가 시켰다. 이들 결과는 2가 양이온과 결합하는 EDTA에 의해서 저해되었으므로 ethylene 생성에는 2가의 양이온이 필요한 것을 의미하며 고등식물에서 AVG는 SAM에서 ACC 전환과정을 억제하는 저해제이고[15] AOA는 pgridoxal phosphate 관련 효소계의 저해제로 transamination 반응을 억제하여 SAM에서는 ACC 과정을 억제하는 저해제인데[1] 본 알칼리성 *Bacillus* sp. Alk-7 균주는 이들 두 물질에 의해서 저해되었고 azide는 methionine으로부터 ACC 전환단계는 저해하나 ACC에서 ethylene으로서 전환단계는 촉진효과가 크다는 것을 의미한다.

2가 양이온의 영향 및 농도

Table 3. The effect of various divalent ion on ethylene production from L-Met from ACC in a cell-free extract of *Bacillus* sp. Alk-7

Divalent Ion	Ethylene production from L-Met		Ethylene production from ACC	
	nl·(mg protein) ⁻¹ ·h ⁻¹	%	nl·(mg protein) ⁻¹ ·h ⁻¹	%
	Control	13	100	62
CoCl ₂	2	15	4646	7493
MgCl ₂	17	130	27	44
MnCl ₂	0.5	4	5777	9318
CaCl ₂	19	146	189	305
BaCl ₂	14	107	7	11

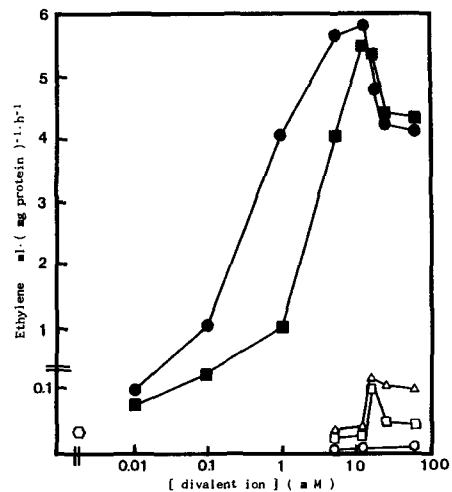


Fig. 5. Effect of various divalent ion's concentration on ethylene production from ACC by cell-free extract of *Bacillus* sp. Alk-7. ACC is added to 40 mM.

■—■, CoCl₂; ●—●, MnCl₂; □—□, MgCl₂; ○—○, BaCl₂; △—△, CaCl₂; ○, Control.

2가 양이온 Co²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺의 Met를 기질로 한 ethylene 생성과 ACC를 기질로 한 ethylene 생성에서 다른 양상을 보였다(Table 3). ACC를 기질로 했을때 Co²⁺와 Mn²⁺는 어떤 2가 이온도 첨가되지 않은 control에 비해 70-90배 많은 ethylene을 생성했으나 Met을 기질로 했을때 Mn²⁺, Co²⁺는 ethylene 생성에 현저한 감소를 유발시켰다. ACC로부터의 ethylene 생성에서는 Mg²⁺와 Ba²⁺이 60-90% 저해하였고, met으로부터의 ethylene 생성에서는 Mg²⁺과 Ca²⁺이 약간의 증가를 보였을 뿐이다.

Co²⁺와 Mn²⁺은 Met, ACC를 기질로 했을 때 좋은 대조를 보인다. 이는 Co²⁺와 Mn²⁺이 ACC로부터의 ethylene 생성에 관여하는 효소에 cofactor로 작용해서 enzyme의 활성을 높여 주지만 Met에서부터의 ACC 생성에 관여하는 효소에는 억제하는 효과가 있어 Met을 기질로 주면 Co²⁺, Mn²⁺이 ACC 수준을 감소시키기 때문에 ethylene 생성이 감소했을 것으로 생각된다. 반면에, ACC를 기질로 주면 충분한 양의 ACC와 함께 Co²⁺, Mn²⁺가 효소에 작용하여서 많은 양의 ethylene을 생성했을 것이라고 생각된다.

고등식물에서 Co²⁺는 ACC → ethylene에 관여하는 ethylene forming enzyme(EFE)의 저해제임이 밝혀졌는데[15], 본 연구에서 사용하는 알칼리성 *Bacillus* sp. Alk-7는 오히려 ACC로부터의 ethylene 생성에 효과적인 영향을 미치는 것으로 나타났다.

0.01 mM에서 100 mM까지의 여러 농도의 여러기질에 따른 ethylene 생성은 Mn²⁺ Co²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺인 경우에 대체로 30 mM 정도에서 최대치를 나타냈으나, Ba²⁺은 100 mM까지도 약간 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5).

요 약

Ethylene을 생성하는 호알칼리성 *Bacillus* sp. Alk-7를 분리 동정 하였고, *Bacillus* sp. Alk-7의 ethylene 생성 경로와 전구 물질을 규명하기 위한 일환으로 이 균주의 intact cell과 cell-free system에서의 다양한 기질의 전환효과를 검토하였다. intact cell과 cell-free system 모두에서 ethylene 생성을 극대화 하기 위한 전환 조건은 30℃, pH 10.3으로 조사되었고, 기질 전환 효과를 검토한 결과 methionine(Met)과 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)가 압도적일 많은 ethylene을 생성하였다. Cell-free system에서 저해제의 영향을 살펴본 결과 EDTA 억제 효과로 2가 양이온이 필요함을, AOA 억제효과로 transaminase가 필요함을 알 수 있었다. Azide는 Met에서 ACC로의 단계에선 억제효과가 있었으나, ACC ethylene 전환 단계에선 오히려 활성효과를 보여주었다. 식물에서는 ACC에서 ethylene 과정은 Co^{2+} 에 의해 저해받는데 반해 *Bacillus* sp. Alk-7은 Co^{2+} 에 의해 ACC에서 ethylene 과정이 10-70배 활성을 보였다. 이상의 결과를 통해 *Bacillus* sp. Alk-7에 의한 ethylene 생성 전구체는 Met과 ACC일 가능성이 있다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단의 생물산업소재 연구센터(연세대학교)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드리는 바입니다.

참고문헌

1. Anrhein, N. and D. Wenker. 1979. Novel inhibitors of ethylene production in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **20**: 1935-1942.
2. Bae, M. and M. Y. Kim. 1997. A new alkalophilic Bacterium producing ethylene. *J. Microbiol Biotech.* **7**: 212-214.
3. Billington, D. C., B. T. Golding, and S. B. Primrose. 1979. Biosynthesis of ethylene from methionine. *Biochem. J.* **182**: 182-827.
4. Bonn, W. G. and L. Squeria. 1975. Technique for the determination of the rate of ethylene production by *Pseud. solanacearum*. *Plant Physiol.* **56**: 688-691.
5. Chou, T. W. and S. F. Yang. 1973. The biosynthesis of ethylene in *Penicillium digitatum*. *Arch. Biochem. Biol.* **157**: 73-82.
6. Fukuda, H. T. and T. Ogaa. 1986. Preparation of cell-free ethylene forming system from *Pen. digitatum*. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 977-981.
7. Goto, M. Y. and H. Hyodo. 1985. Ethylene production by the Kudzu strain of *Psyringae* pv. *Phaseolicola* causing Hala Blight in *Pueraria lobata*. *Plant Cell Physiol.* **26**: 141-150.
8. Goto, M. Y. and H. Hyodo. 1981. Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri*. *Physiol. Plant Path.* **16**: 343-350.
9. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*, p. 9. Japan Scientific Soc. Press, Tokyo, Springer, Verlag, Berlin.
10. Ince, J. E. and C. J. Knowles. 1986. Ethylene formation by cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **146**: 151.
11. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
12. Peter, H., A. Sneath, and John G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (section 13) The Williams & Wilkins Co.
13. Primrose, S. B. 1977. Evaluation of the role of methional, 2-keto-4-methyl thiobutyric acid and peroxidase in ethylene formation by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 519.
14. Spalding, D. H. and M. Lieberman. 1965. Factors affecting the production of ethylene by *Penicillium digitatum*. *Plant Physiol.* **40**: 645-648.
15. Yang, S. F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 155-189.

(Received September 26, 1997)