

Penicillium expansum 에 의한 Pectin 質 分解酵素의 生産

金蘭榮 · 金起弘 · 李昌垠
嶺南大學校 農畜産大學 園芸學科

Production of Pectolytic Enzymes by *Penicillium expansum*

Nan-Young Kim, Kee-Hong Kim and Chang-Un Lee

Department of Horticulture, Yeungnam University, Gyeoung San 713-749, Korea

ABSTRACT: Isolates of *Penicillium expansum* with reduced pathogenicity were arbitrarily selected among benomyl-resistant isolates in order to investigate relationship of their pectolytic enzyme activity with pathogenicity. In artificial medium, strongly pathogenic isolate S₁ and weakly pathogenic isolate R₂ produced considerable amounts of endo-polymethylgalacturonase, endo-polygalacturonase, pectin methyl-trans-eliminase, and polygalacturonate-trans-eliminase. No marked difference in enzyme activities was observed between two isolates. In apple medium, the activities of endo-polymethylgalacturonase and endo-polygalacturonase of isolate S₁ were over 6 times higher than those of isolate R₂. But pectin methyl-trans-eliminase and polygalacturonate-trans-eliminase did not show a great difference. Activities of endo-polymethylgalacturonase and endo-polygalacturonase precipitated at 80-95% saturation of ammonium sulfate were highest, and addition of these enzyme solutions increased pathogenicity of weakly pathogenic isolates R₁₋₄.

KEYWORDS: *Penicillium expansum*, Pectolytic enzyme activity

植物病原菌에 의하여 생산되는 pectin 質 分解酵素는 植物組織의 細胞中葉과 細胞壁에 包含된 pectin 質을 分解하여 植物組織을 崩壞시키고 細胞壁을 軟化시켜서 寄主내로 菌이 侵入할 수 있도록 돕는 역할을 한다(Cole 등, 1961; McClendon 등, 1960; Wallace 등, 1955).

1968년에 Bush 등은 endo-polygalacturonase (endo-PG)와 pectin methyl-trans-eliminase (PMTE)는 寄主組織의 細胞壁을 軟化시키는 酵素이나 pectin methylesterase (PME)와 exo-polygalacturonase (exo-PG)는 軟化過程에 관여하지 않는 것으로 보고하였다. Barmore 등 (1981)은 *Penicillium italicum* 에 감염된 감귤에서 endo-PG 를 분리, 정제하였으며 이 酵素가 細胞中葉을 分解하여 균사가 侵入하는데 주된 요인이 된다고 하였다. Bush 와 Codner (1968)는 *P. digitatum* 의 배양여과액에서 PMTE 를 발견하였고 Barash 와 Anegal (1970)은 같은 菌種에 의하

여 감염된 감귤에서 exo-PG 를 분리하였으나 細胞軟化에 있어서 이들의 역할을 언급하지 않았다. Spalding 등(1973)은 *P. expansum* 이 寄主를 侵入할 때와 인공배지에서 배양될 때 Polygalacturonase, Carboxyl methyl cellulase 및 Pectin lyase 를 생산하였으며 galactose, raffinose, glutamic acid 등에 의하여 이들 酵素생산이 억제되었다고 하였으며 같은 病菌에 감염된 사과에서 Polygalacturonase 와 Pectin lyase 가 사과조직의 분해와 고사에 주된 역할을 한다고 하였다.

본 실험은 사과 푸른곰팡이의 각종 Pectin 質 分解酵素의 활성을 조사하므로서 병원성과 관련된 기초자료를 얻고자 실시하였다.

材料 및 方法

공시균주는 살균제 benomyl 에 대하여 感受性이 있고 病原性이 있는 S. 균주와 살균제에 대해

耐성이 있으며 病原성이 낮은 $R_1 \sim R_4$ 균주를 본 실험실에서 분리 보관 중인 균주 중에서 선택하여 사용하였다.

Pectin 質 分解酵素의 활성조사에 사용된 인공 배지는 citrus pectin 과 polygalacturonic acid 를 가한 기본무기염류(Spalding 등, 1973) 배지로 하였다. 배지를 250 ml 삼각 flask 에 100 ml 씩 분注하여 密封한 후 공시균의 孢子懸濁液(5×10^6 spores/ml)을 4 ml 씩 접종하였다. 이것을 25°C에서 振蕩培養하는 동안에 일정한 시간 간격으로 꺼내어 Whatman filter paper (No.1)로 여과하여 균사체를 제거하고 이 여과액을 crude enzyme 용액으로 하였다. 또한 사과배지(Spalding 등, 1973)는 pH 6.8의 0.033 M sodium phosphate buffer 150 ml 에 얇게 썬 사과과육 200g 을 넣고 mixer 로 2분간 갈은 후 이것을 透析膜에 넣고 4°C에서 18시간 동안 증류수로 透析시켰다. 透析된 사과배지에 기본무기염류를 첨가하였으며 배지의 살균, 접종, 접종액의 배양 및 여과는 전기와 같은 방법으로 실시하였다.

Pectin 質 分解酵素의 활성조사

1) Endo-polymethylgalacturonase 의 활성도는 pectin 의 점도감소율에 의하여(Nagel 등, 1962). 활성은 효소액 1 ml 에 의하여 기질의 점도를 50% 감소시키는데 걸리는 시간(분)의 역수로 계산하였다.

2) Endo-polygalacturonase 의 활성도는 1)의 방법에 따라 측정하였는데 다만 기질을 pectin 대신 polygalacturonic acid 를 사용하였다.

3) Pectin methyl-trans-eliminase 의 활성도는 pectin 의 분해산물에 대한 thiobarbituric acid (TBA)법을 수정한 방법(Ayer 등, 1966)에 따라 측정하였다. 이 효소 1 unit 는 효소액 1 ml 에 의하여 30°C에서 4시간 반응하는 동안에 吸光度 1.0 을 변화시키는데 필요한 효소량으로 하였다.

4) Polygalacturonate-trans-eliminase 의 활성도는 3)의 방법에 따라 측정하였으며 다만 기질을 pectin 대신 polygalacturonic acid 를 사용하였다.

Ammonium sulfate fractionation 에 의한 Pectin 質 分解酵素의 활성

배양여액에 함유되어 있는 단백질을 4°C에서

0~95%까지 4 단계(0~40, 40~60, 60~80, 80~95%)의 ammonium sulfate 로 염색시켰다. 沈澱物을 원심분리하여 얻고 이것을 0.05 M citrate-phosphate buffer (pH 6.5)에 溶解시킨 후 같은 buffer 로 하룻밤 동안 透析시켰다. 不溶性物質은 원심분리하여 제거한 후 이것을 -20°C에서 보관하고 각 효소의 활성을 전기한 방법으로 측정하였으며 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 측정하였다.

粗酵素液 添加에 따른 病原性 變化

感受性菌株의 배양여액(사과배지)을 ammonium sulfate 로 염색시켜(0~95%), 얻어진 粗酵素液에 感受性菌株과 抵抗性균주의 孢子懸濁液(1×10^6 spores/ml)을 조제한 후 표면살균된 사과에 4 mm 의 상처를 내고 접종하였다. 이것을 27°C에서 5일간 배양한 후 병반직경을 측정하였다. 이 때 대조구로서는 접종하지 않은 사과배지를 사용하였다.

結 果

Pectin 質 分解酵素의 활성

1) Endo-polymethylgalacturonase 의 생산 인공배지에서 感受性菌株(S_1)은 배양일수가 늘어남에 따라 활성이 증가되어 7일째에 11.0 units/m $\times 10^3$ 이었고 9일째에는 15.3 units 로 가장 높았다. 抵抗性菌株도 같은 경향으로 9일째 12.5 unit 로 가장 높았다. 그러나 사과배지에서는 感受性菌株의 활성이 7일째에 16.6 units 로 최고에 달했으나 9일째에는 8.3 units 로 감소되었다. 반면에 抵抗性菌株의 효소활성은 2.8 units 이상으로 증가되지 않고 낮았다(Fig.1)

2) Endo-polygalacturonase 의 생산

인공배지에서 感受性菌株는 7일째와 9일째에 각각 7.1 과 12.5 units/m $\times 10^3$ 의 활성을 나타내었고 抵抗性菌株도 각각 6.2 와 11.7 units 를 나타내어 두 균주간에 비슷한 경향을 보였다. 그러나 사과배지에서 感受性菌株는 7일째 12.5 units 로 최고의 활성을 보인 후 9일째에 11.1 units 로 감소하였으나 抵抗性菌株는 활성이 낮아 2.3 units 로 두 균주간에 차이를 나타내었다(Fig.2).

3) Pectin methyl-trans-eliminase 의 생산

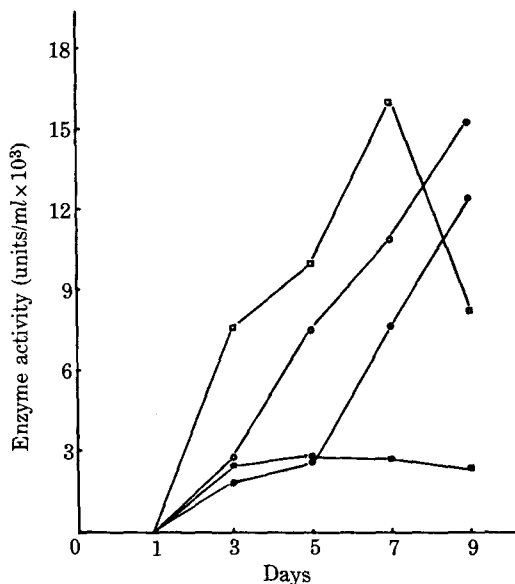


Fig. 1. Activity of endo-polymethylgalacturonase produced by benomyl-sensitive (S₁) and resistant (R₂) isolates of *Penicillium expansum* cultured in artificial (S₁:○-, R₂:●-) and apple (S₁:□-, R₂:■-) medium at 25°C.

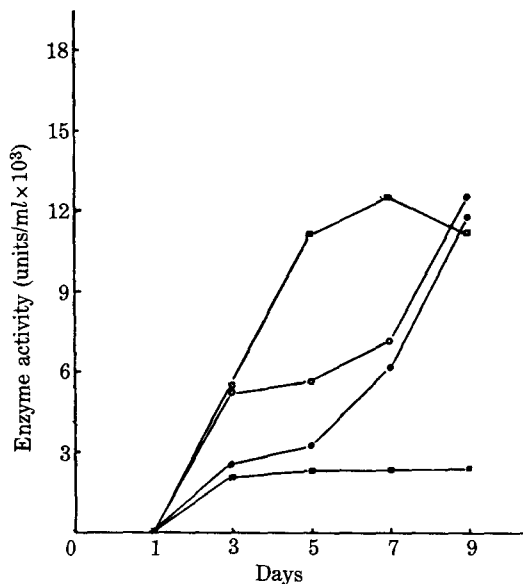


Fig. 2. Activity of endo-polygalacturonase produced by benomyl-sensitive (S₁) and resistant (R₂) isolates of *Penicillium expansum* cultured in artificial (S₁:□-, R₂:■-) and apple (S₁:○-, R₂:●-) medium at 25°C.

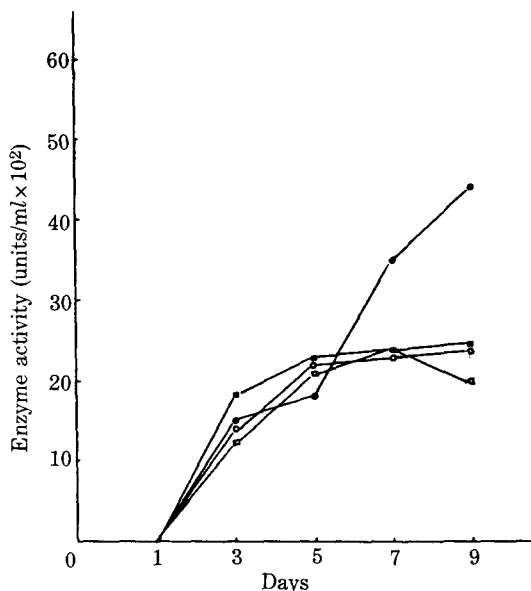


Fig. 3. Activity of pectin methyl-trans-eliminase produced by benomyl-sensitive (S₁) and resistant (R₂) isolates of *Penicillium expansum* cultured in artificial (S₁:○-, R₂:●-) and apple (S₁:□-, R₂:■-) medium at 25°C.

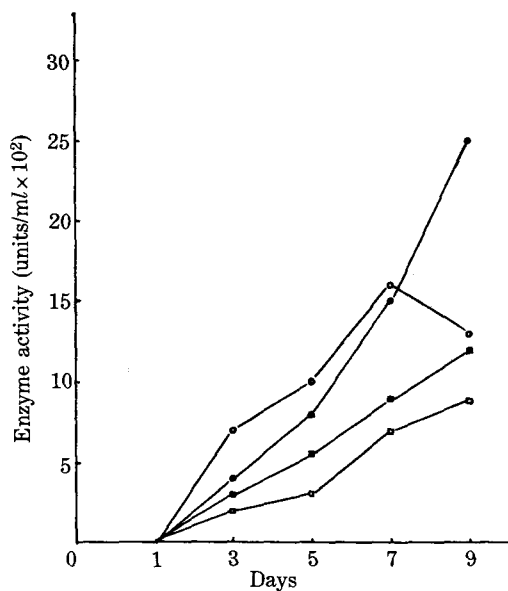


Fig. 4. Activity of polygalacturonate-trans-eliminase produced by benomyl-sensitive (S₁) and resistant (R₂) isolates of *Penicillium expansum* cultured in artificial (S₁:○-, R₂:●-) and apple (S₁:□-, R₂:■-) medium at 25°C.

Table I. Pectolytic enzymes activity of fractions precipitated with ammonium sulfate in culture filtrate of benomyl-sensitive isolate (S_1) of *Penicillium expansum*

Ammonium sulfate saturation (%)	Specific activity				Protein ($\mu\text{g/ml}$)
	PMG (units/mg $\times 10^2$)	PG	PMTE (units/mg)	PGTE	
0-40	6.5	12.8	30.8	17.7	30.5
40-60	15.9	20.2	32.2	16.3	17.4
60-80	34.0	36.2	29.9	14.4	18.4
80-95	41.0	68.3	29.2	14.3	19.5

PMG: endo-polymethylgalacturonase.
 PG: endo-polygalacturonase.
 PMTE: pectin methyl-trans-eliminase.
 PGTE: polygalacturonate-trans-eliminase.

인공배지에서 感受性菌株의 활성은 배양일수가 늘어남에 따라 증가되어 9일째에는 24 units/m $\times 10^2$ 을 나타내었고 抵抗性菌株도 같은 경향을 나타내었으나 오히려 7일째부터는 感受性菌株보다 높은 활성을 보였다. 사과배지에서는 두 菌株 모두 7일째 23 units로 최고의 활성을 보인 후 감소하였다(Fig.3).

4) Polygalacturonate-trans-eliminase 의 생산

인공배지에서 感受性菌株는 7일째에 16 units/m $\times 10^2$ 으로 최고의 활성을 보인 후 9일째에는 13 units로 감소되었으나 抵抗性菌株는 배양일수가 늘어남에 따라 활성이 증가되어 9일째에는 25 units를 나타내었다. 또한 사과배지에서도 두 균주 모두 배양일수가 늘어남에 따라 효소활성이 증가되어 9일째에 感受性菌株는 9 units였고 抵抗性菌株의 활성은 12 units였다(Fig.4).

Ammonium sulfate fractionation 에 의한 Pectin 質 分解酵素의 활성

Endo-PMG와 PG는 80~95% fraction에서 가장 높은 활성을 나타내어 각각 41과 68.3 units/mg $\times 10^2$ 이었으나 PMTE와 PGTE는 각 fraction 간에 별차이가 없었다(Table I).

粗酵素液 添加에 따른 病原性 變化

Ammonium sulfate로 염석시켜 얻어진 粗酵

Table II. Change of virulence of benomyl-resistant isolates (R_{1-4}) of *Penicillium expansum* by supplementation with partially purified enzyme solution of benomyl-sensitive isolate (S_1)

Isolate	Diameter of lesion (mm)				
	control	0-40	40-60	60-80	80-95 %
S_1	20	19	19	19	20
R_1	8	10	11	12	13
R_2	8	9	9	12	12
R_3	8	10	11	12	12
R_4	8	9	10	12	12

Control: apple medium only
 %: ammonium sulfate saturation.

素液으로 각 균주의 孢子懸濁液을 조제하여 사과에 접종한 결과, 感受性菌株는 대조구와 비슷한 병반 직경을 나타내었으나 抵抗性菌株는 대조구가 8 mm 인데 비해 60~80, 80~95% fraction에서 12~13 mm로 병반 직경이 증가되었다(Table II).

考 察

病原성이 다른 두 균주간에 pectin 質 分解酵素의 활성을 조사한 결과 인공배지에서는 病原성이 강한 S_1 균주와 病原성이 약한 R_2 균주간의 효소활성에 큰 차이가 없었고 배양일수가 늘어남에 따라 두 균주 모두 효소활성이 증가되었다. 이러한 결과는 인공배지에 低分子水溶性 炭素原이 들어있지 않기 때문에 생장에 필요한 영양분을 얻기 위해 pectin 質을 분해해야 하므로 이들 효소의 활성이 두 균주간에 비슷하게 나타난 것으로 생각된다(Bateman 등, 1966; Keen 등, 1965). 그러나 사과배지에서는 두 균주간의 효소활성에 차이를 나타내어 endo-PMG와 PG의 활성은 病原성이 강한 S_1 균주가 병원성이 약한 R_2 균주보다 높은 반면에 PMTE와 PGTE는 두 균주간에 큰 차이가 없었다. 사과 과육으로 만든 사과배지에서는 병원균이 기주 침입시 생산하는 pectin 質 分解酵素로 사과조직에 들어 있는 pectin 質을 分解하여 생장에 필요한 영양분을 얻어야 하므로 病原성과 밀접한 관계가 있을 것이다(Wood 등, 1955). 이러한

pectin 質 分解酵素들 중에 endo-PG와 PTE는 기주를 연화시키는 효소이나 PME와 exo-PG는 연화과정에 관여하지 않는 것으로 보고되어 있다 (Bush 등, 1968). 또한 Barmore 등(1981)은 *P. italicum*에 감염된 감귤에서 endo-PG를 분리, 정제하여 실험한 결과 이 효소에 의한 細胞中葉의 분해가 菌絲貫入에 기여하는 중요한 요인이라고 하였다. 따라서 본 실험에서 사용된 두 균주간의 효소활성에 차이를 나타낸 endo-PMG와 PG가 병원성에 미치는 영향을 알아보코자 ammonium sulfate로 염석하여 얻어진 粗酵素液을 添加하였을 때 endo-PMG와 PG의 활성이 높게 나타난 60~80, 80~95% fraction에서 병원성이 약한 抵抗性菌株의 병반직경이 증가되었으나 PMTE와 PGTE의 활성이 비교적 높았던 0~40, 40~80% fraction에서는 크게 증가되지 않았다. 이 결과는 endo-PMG와 PG가 기주조직을 연화시켜 병원성이 약한 抵抗性菌株의 병원성 증가에 도움이 된 것으로 생각되며 Wild 등(1982)의 결과와도 상응하였다. 따라서 endo-PMG와 PG가 *P. expansum*의 병원성 변화에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러나 이들 효소를 더욱 순화하여 病原性實驗을 실시할 필요가 있다고 생각된다.

摘 要

사과푸른곰팡이병균 *Penicillium expansum*의 benomyl 抵抗性菌株 中 병원성이 약화된 균주를 선발하여 pectin 質 分解酵素의 활성과 病原性간의 관계를 알아보았다. 인공배지에서는 병원성이 높은 S₂균주와 병원성이 낮은 R₂균주가 endo-poly-methylgalacturonase, endo-polygalacturonase, pectin methyl-trans-eliminase, polygalacturonate-trans-eliminase를 생산하였으며 두 균주간의 효소활성에 있어서 현저한 차이는 없었다. 사과배지에서는 위의 4개의 효소가 모두 생산되었으나 endo-poly-methylgalacturonase, endo-polygalacturonase의 활성은 병원성이 높은 S₁균주가 병원성이 낮은 R₂균주보다 6배 이상 높은 활성을 보였으나 pectin methyl-trans-eliminase와 polygalacturonate-trans-eliminase의 활성은 큰

차이가 없었다. Ammonium sulfate로 염석시켜 얻어진 粗酵素液 中 80~90% fraction에서 endo-PMG와 endo-PG의 활성이 가장 높았으며 이 粗酵素液의 添加에 따른 抵抗性菌株의 병원성이 대조구에 비하여 증가하였다.

參考文獻

- Ayer, W.A., Papvitz, G.C. and Diem, A.F. (1966): Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase produced by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **56**: 1006-1011.
- Barash, I. and Angel, E. (1970): Isolation and properties of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium digitatum* during infection of lemon fruit. *Israel J. Bot.* **10**: 599-608.
- Barmore, C.R. and Brown, G.E. (1981): Polygalacturonase from citrus fruit infected with *Penicillium italicum*. *Phytopathology* **71**: 328-331.
- Bateman, D.F. and Millar, R.L. (1966): Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Review of Phytopathology* **4**: 119-139.
- Bush, D.A. and Condner, R.C. (1968): The nature of macerating factor of *Penicillium digitatum* Saccardo. *Phytochem.* **7**: 863-869.
- 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.
- Keen, N.T. and Horton, J.T. (1965): Induction and repression of endopolygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Can. J. Microbiology* **12**: 443-453.
- 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.
- McClendon, J.H., Somers, G.F. and Heuberger, J.W. (1960): The occurrence of 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., 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.
- Wild, B.L. and Eckert, J.W. (1982): Synergy between a benzimidazole-sensitive isolates and benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium expansum*. *Phytopathology* **72**: 1329-1332.
- Wood, R.K.S. (1955): Pectic enzymes secreted by pathogens and their role in plant infection. Mechanism of microbial pathogenicity. Symposium. *Gen. Microbiol.* 5th. pp.263-293.

Accepted for Publication 29 November 1989