

Pseudomonas syringae pv. *Phaseolicola*에 의한 Ethylene 생성에서의 전구물질

배 무* · 권혜영

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

Precursors for the Ethylene Evolution of *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*

Bae, Moo* and Hea-Young Kweon

Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract— The purpose of this work is to investigate the effects of various substrates on biosynthesis of ethylene by the Kudzu strain of *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* causing halo blight. In the intact cell of *P. syringae*, optimal condition for ethylene production was achieved at pH 7.5 and 30°C for 9 to 10 hours of culture. Ethylene was most effectively produced from amino acids such as Asn, Gln, Asp and Glu, compared to those of various kinds of sugars. While ethylene production from α -ketoglutarate (α -KG) was gradually increased throughout 51 hours incubation period tested. Ethylene production derived from citrate, α -KG and oxalacetate as well as a few amino acids was further enhanced by the addition of histidine or arginine. In cell-free ethylene-forming system, ethylene was most effectively produced from α -KG, compared to those from citrate, oxalacetate, Glu, Arg, or Asp, at 0.5 mM among the range from 0.25 mM to 5 mM. Aminooxyacetate, an inhibitor of a pyridoxal phosphate-linked enzyme, completely inhibited ethylene evolution derived from Glu but not affect that derived from α -KG. The results obtained in this work suggest that α -KG might be a direct precursor of ethylene production in this organism than any other substrates tested.

서 론

에틸렌은 기체상태로 존재하는 작은 분자량(28.05)의 유기화합물이다. 식물에서 생성되는 에틸렌은 과일, 성숙, 씨앗의 휴면, 낙엽, 노화 등 생육의 여러 단계에서 생리적 현상을 조절하는 호르몬으로서(1, 2), 고등식물에서 에틸렌 생성은 methionine을 전구체로 하여 methionine→S-adenosylmethionine→1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)의 경로를 통해 에틸렌이 생성된다고 밝혀졌다(3, 4).

1930년대 이후 에틸렌은 고등식물 뿐만 아니라 세균(26)이나 algae(5), fungi(6)에 의해 생성됨이 밝

혀졌고, 이러한 ethylene 생성 미생물들은 주로 식물 병원성으로 숙주의 생장에 중요한 영향을 미친다(7-11). 미생물에 의한 에틸렌 생성 연구는 주로 감귤류의 녹색 곰팡이인 *Penicillium digitatum* Sacc.에 의해 행해졌다(12). 이 곰팡이의 에틸렌 생성 전구체는 배양 상태에 따라 달라지는데, 정치배양에서는 고등 식물과는 달리 TCA 회로와 연관되어 있으며, Chou와 Yang(7)은 α -ketoglutarate나 glutamate를 전구체로 하여 3, 4번 탄소가 에틸렌으로 전환된다고 보고하였다. 또한, Fukuda 등(13, 14)에 의해 α -ketoglutarate를 전구체로 한 *P. digitatum*의 cell-free system이 만들어졌고, α -ketoglutarate로부터 ethylene으로의 carbon flux를 높이기 위한 실험이 시도되었다. 이외에도 methionine으로부터 에틸렌이 생성되는 미생물이 보고되었다(15-19).

Key words : Ethylene biosynthesis, *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*

*Corresponding author

세균에 의한 에틸렌 생성에 관해서는 생리적인 측면보다 오히려 병리적인 측면에서 더 관심이 있었고, Goto 등(20, 21)은 *Pueraria lobata*(wild) Ohwi에서 고조병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*의 Kudzu strain이 다른 세균이나 곰팡이, 식물보다 500~1000배 많은 에틸렌을 생성한다고 보고하였다. 이 균주는 식물과는 달리 methionine을 전구체로 사용하지 않고, 곰팡이처럼 α -ketoglutarate나 glutamate를 전구체로 사용한다고 보고하였다. 그러나 최근에는 α -ketoglutarate나 glutamate가 직접적인 전구체라기 보다는 oxalacetate나 pyruvate일 가능성이 보고되어(22), 이 균주에 의한 정확한 에틸렌 생성 과정 및 전구물질이 알려져 있지 않다. 이것이 밝혀지면 에틸렌 생성 기작 뿐만 아니라 식물병리학적 측면에서 고조병을 해결하는데 중요한 실마리가 될 것이고, 미래의 화학공업 원료로서의 에틸렌 생성을 기대할 수 있을 것이다.

이와 같은 목적의 일환으로 *P. syringae*의 intact cell과 cell-free system에 의한 에틸렌 생성에서 다양한 기질의 전환효과를 비교, 검토하여 직접적인 전구물질을 확인할 수가 있었다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 실험에 사용한 균주는 일본 Shizuoka 대학 Masao Goto로부터 분양 받은 *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*(Kudzu strain)를 사용하였다. 이 균주의 배지는 YP 배지(20)를 변형하여 사용하였으며, 그 조성은 yeast extract 10 g/l, peptone 10 g/l(pH 6.8)이다.

배양방법

5 ml YP 배지에 사면배지의 균을 한 백금이 접종하여, 30°C에서 10~15시간 진탕배양하고, 이 배양액을 동일배지에 대해 4% 접종하여 대수증식기까지(10시간) 진탕배양하였다.

Intact cell에서의 ethylene 생성량 측정

배양이 끝난 배양액을 2,700×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 10 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 현탁 후 다시 원심분리하여 상등액을 버

리고 동일 buffer에 현탁하여 660 nm 흡광도가 1.4가 되도록 희석하여 최종세포수가 1.6×10^9 cell/ml이 되도록 하였다. 15 ml vial에 세균현탁액 1.8 ml와 0.2 ml의 기질을 넣어 고무마개로 막고 aluminium cap을 씌워 밀봉한 후 30°C에서 진탕하였다. 일정시간 간격으로 용기내 기체 0.2 ml를 주사기로 취하여 gas chromatograph(Shimazu GC-9A, flame ionization detector, V Porapak-Q, column temp. 80°C, detector temp. 120°C, carrier gas N₂, flow rate 40 ml/min)로 분석하였다.

Cell-free extract의 조제

YP 배지에서 대수증식기 말기까지 배양한 세포배양액을 2,700×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하고 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁하였다. 초음파 분쇄기(Braun-Sonic 1510)로 400 Watt에서 냉각하면서 6분간 균체를 파쇄하여 4°C에서 다시 원심분리(16,000×g, 20분)한 상등액을 cell-free extract로 사용하였다(21).

Cell-free system에서의 ethylene 생성량 측정

Cell-free extract에 의한 최적의 에틸렌 생성계를 만들기 위해, Goto 등(21)의 assay mixture와 방법에 따랐고, 1시간 후에 생성된 기체는 gas chromatograph로 분석하여 생성된 에틸렌 양을 $n/(mg \text{ protein})^{-1} \cdot h^{-1}$ 로 표시하였다.

단백질의 정량

Cell-free extract내의 단백질은 Lowry 등(23)의 방법에 따라 측정하여 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 정량하였다.

결과 및 고찰

*Pseudomonas syringae*의 증식과 ethylene 생성

YP 배지에서 30°C로 진탕배양했을 때의 *P. syringae*는 10~11시간에 정지기를 나타내는 빠른 증식을 보여주었고, 에틸렌 생성은 증식과 동시에 시작되어 대수증식기 말로부터 정지기 초에 최대치를 나타내었다(Fig. 1). 생균수의 측정에서도 11시간까지 대수적으로 비례하여 증가하였기 때문에 본 실험에서는 10시간 배양 후에 균체를 회수하였다. 이 결과는 에

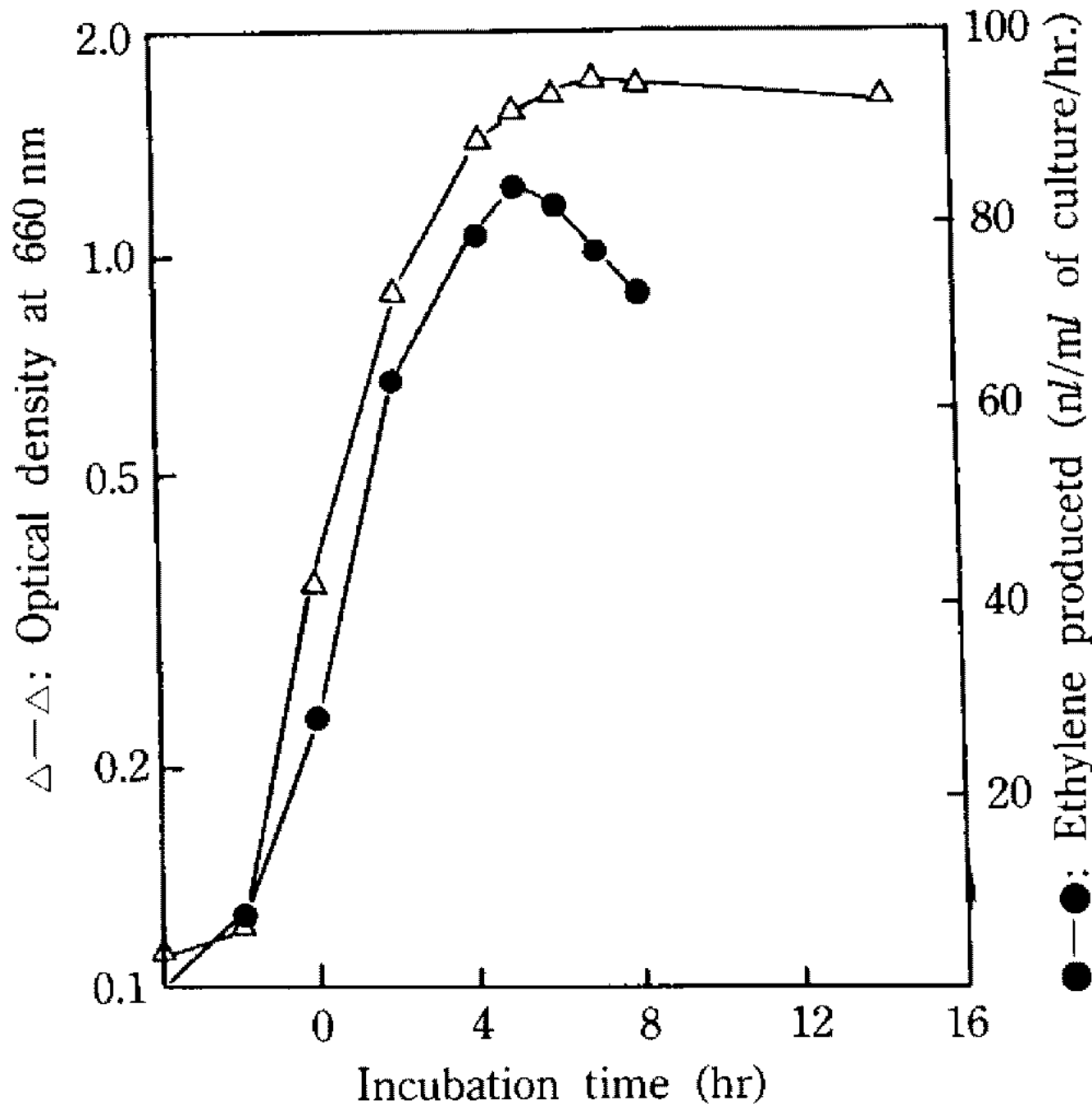


Fig. 1. Growth curve and time-course of ethylene production in YP broth by *Pseudomonas syringae*.

틸렌 생성이 균사체의 증식과 무관한 *Penicillium digitatum*과는 일치하지 않으나(24), *Pseudomonas solanacearum*과는 일치하였다(20).

Intact cell에서의 ethylene 생성

아미노산, 유기산, 당류의 영향: 본 균주의 에틸렌 생성에서 다양한 기질의 전환효과를 일정시간 간격으로 조사하였다(Table 1). 이 때 phosphate buffer와 각 기질의 pH는 6.8로 하였다. 51시간의 배양 동안 에틸렌 생성량은 Goto 등(20)의 결과에서 α-KG가 크게 효과를 나타내지 않았던 것과는 달리 Asp>α-KG>Asn>citrate>Gln>Glu>oxalacetate(OAA) 순으로 나타났으며, 다른 기질과는 달리 α-KG는 시간에 따라 지속적으로 증가하여 51시간에 최대치를 나타내었다. 에틸렌 생성의 전구물질의 특성으로부터 에틸렌 생성이 TCA 회로와 깊이 연관되어 있음을 나타내고 있다.

Ethylene 생성에 영향을 미치는 배양조건 검토: 본 균주의 최적 증식 온도와 에틸렌 생성온도는 Goto 등(20)의 보고와 일치한 30°C로 조사되었으나, 에틸렌 생성에서 pH의 영향을 조사한 결과 pH 7.5에서 에틸렌 생성량이 최대치를 보였다(결과 미제시). 또한 각 pH에서 기질로서 Asp나 citrate를 넣었을 때 반응 후 pH는 7.4~7.5로 나타났고, 반응액내의 pH가 6.8일

Table 1. Effect of various substrates on ethylene production by the intact cells of *Pseudomonas syringae*

Substrates (0.2 M)	Ethylene produced (nl × 10 ⁹ cells)			
	After 1h	10 h	25 h	51 h
Amino acids				
L-Aspartic acids	482	574	558	561
L-Asparagine	455	514	528	533
Sodium glutamate	414	490	487	464
L-Glutamine	315	483	517	499
L-Serine	369	381	404	430
L-Arginine	84	124	129	138
L-Proline			274	
L-Alanine			136	
L-Valine			71	
L-Methionine			65	
Organic acids				
Oxalacetate	269	392	389	359
DL-Malate	141	288	306	268
α-Ketoglutarate	181	353	525	559
Sodium citrate	179	517	530	535
Pyruvate	226	273	287	264
Sodium succinate		235	259	240
Sodium acetate		180	184	182
Sugars				
Saccharose	206	325	331	320
Galactose	138	222	246	246
Fructose	213	304	328	306
Glucose	215	247	257	236
Mannose	171	243	244	224
No substrate	40	48	48	49

Initial pH of phosphate buffer: pH 6.8

때와는 달리 가장 효과적인 기질은 Asn으로 pH 6.8일 때의 Asp 보다 2배 이상 많은 에틸렌을 생성하였다(Fig. 3). 따라서 이후의 실험은 30°C, pH 7.5로 하였다.

다양한 기질의 농도 영향: 에틸렌 생성에 효과적인 기질로 조사된 유기산과 아미노산의 농도에 따른 영향을 검토한 결과, 각 유기산은 농도가 높아짐에 따라 에틸렌 생성이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2). 0.1 M 이하의 저농도에서 citrate와 α-KG의 에틸렌 생성량은 9~10시간에 최대치를 보였으나, 고농도(0.4 M)에서는 시간에 따라 지속적으로 증가하여 51시간에 최대치를 나타내었다. 저농도에서 10시간 이후에 에틸렌 생성량의 증가가 없었던 것은 기질의 고갈 때문으로

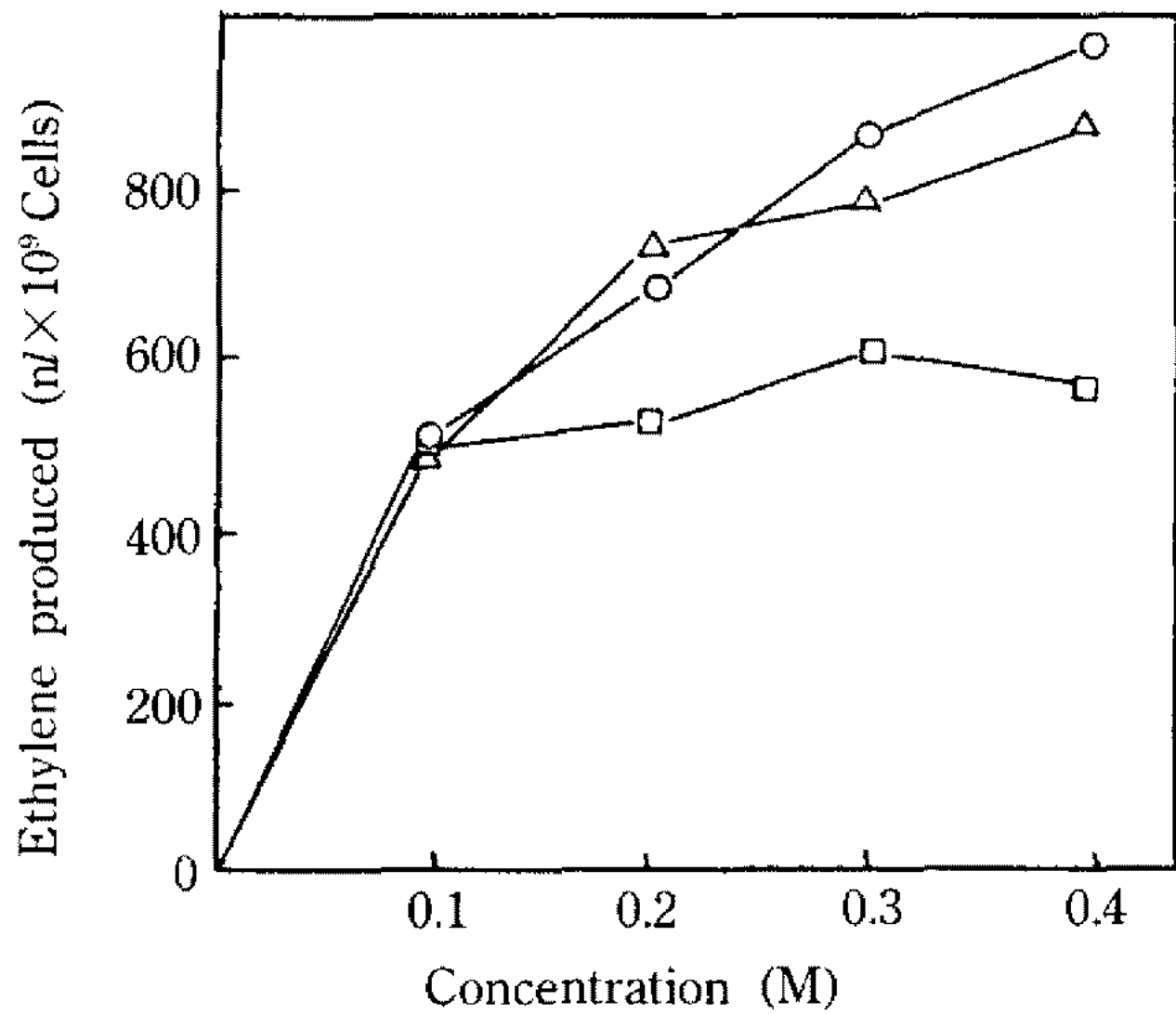


Fig. 2. Effect of concentration of organic acids on ethylene production by *Pseudomonas syringae* (51 hr, incubation).

○—○: Sodium citrate, △—△: α-ketoglutarate, □—□: Oxalacetate

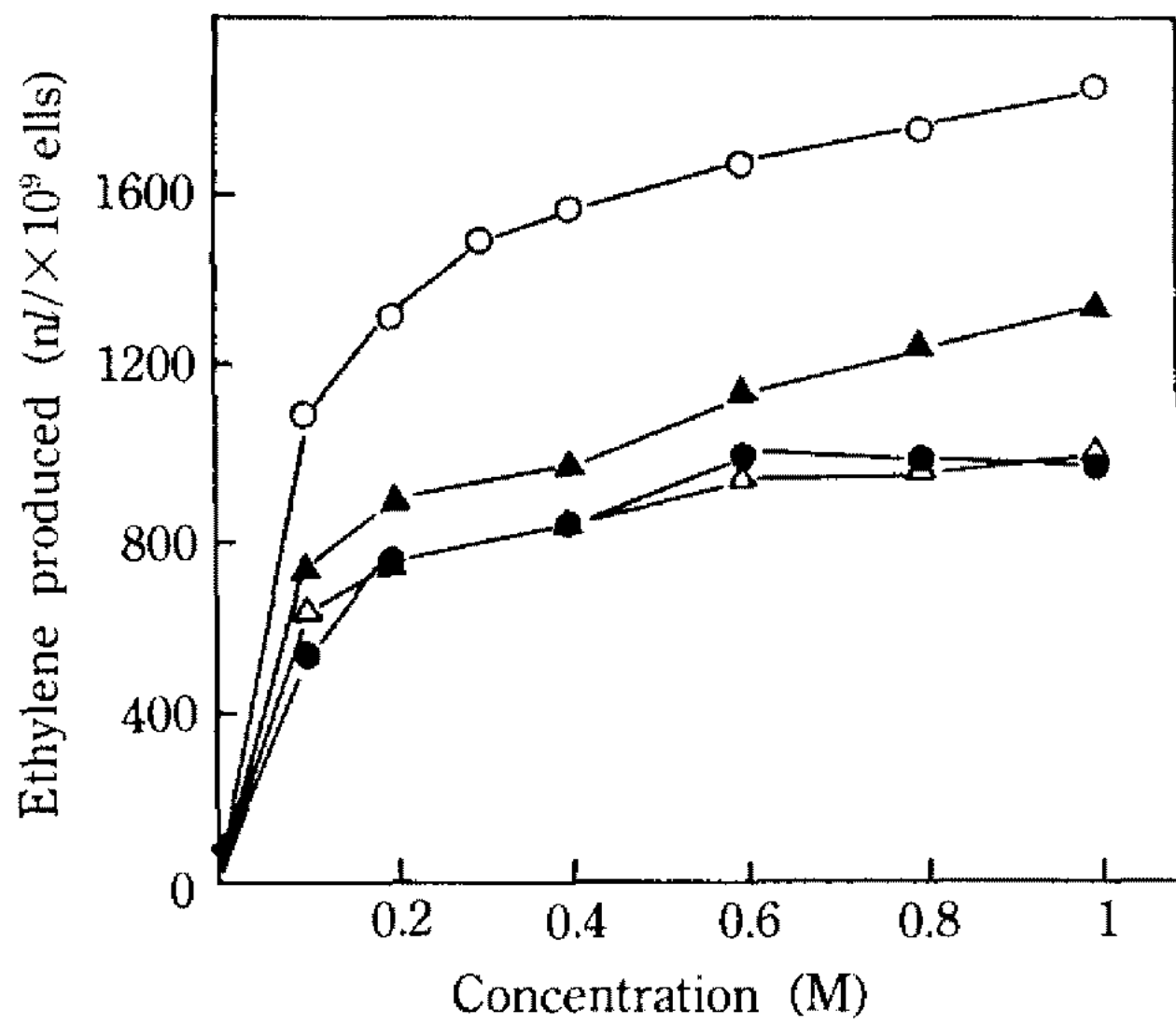


Fig. 3. Effect of concentration of amino acids on ethylene production by *Pseudomonas syringae* (51 hr, incubation).

○—○: L-Asn, △—△: Sodium glutamate, ●—●: L-Asp, ▲—▲: L-Gln

생각된다. 또한, 아미노산도 농도에 따라 에틸렌 생성량이 증가하였다(Fig. 3). 여러 농도에서 아미노산에 의한 에틸렌 생성은 10시간에 최대치를 보였는데, Asp와 Glu가 기질로 이용되었을 때의 에틸렌 생성은 3시간 이후에 큰 증가가 없는 반면, 이것의 amide인 Asn과 Gln은 10시간의 에틸렌 생성량이 3시간의 2배로 측정되었다. 이와 같은 결과는 에틸렌으로의 전환이 acid 형태보다 느리기 때문으로 생각되나, 에

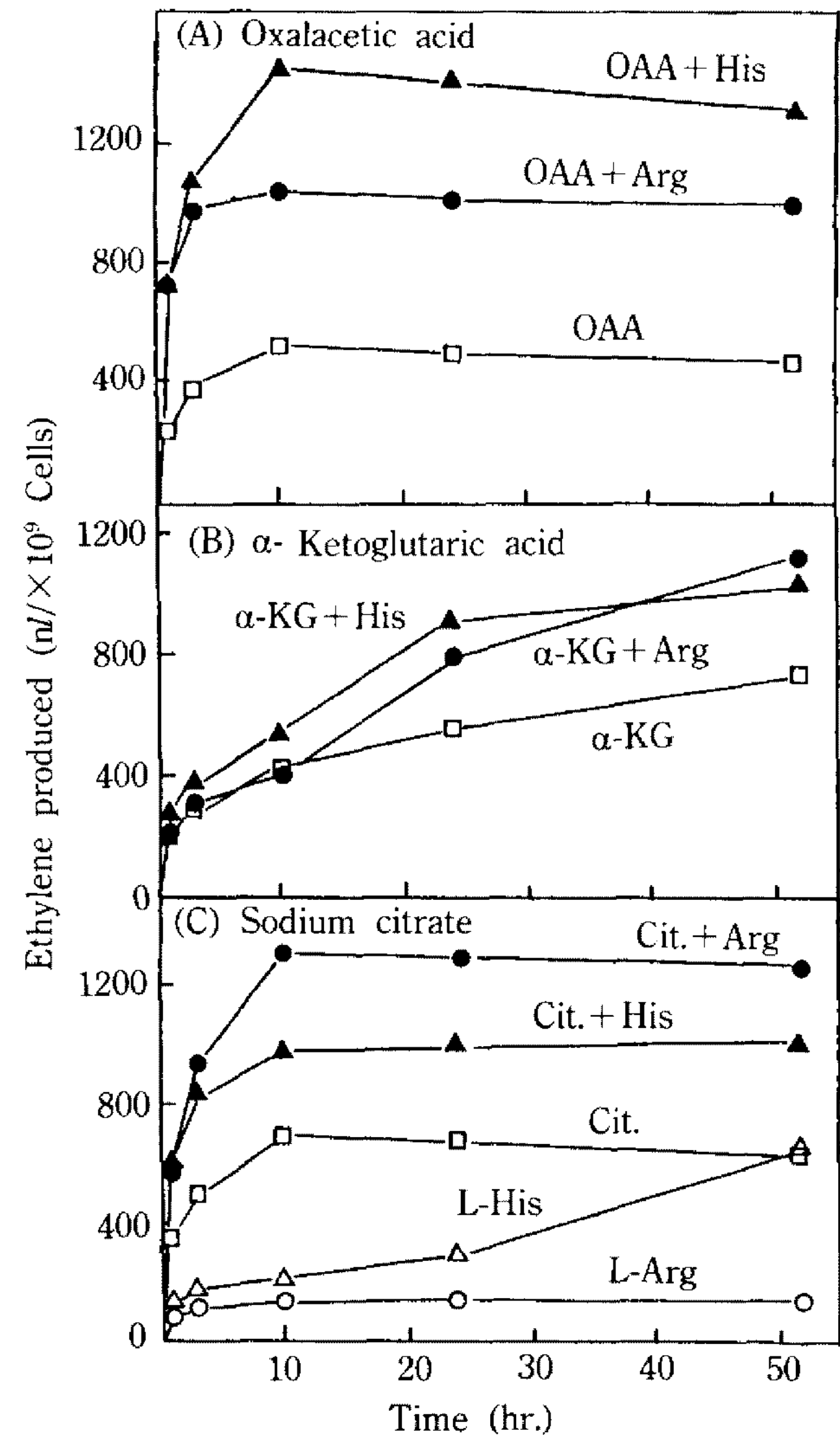


Fig. 4. Synergistic effects of L-Arg and L-His on ethylene production from OAA, α-KG and Sodium citrate.

Table 2. Synergistic effects of L-Arg and L-His on ethylene production with amino acids as substrates

Amino acids (0.2 M)	Ethylene produced (nL × 10 ⁹ cells)	
	L-Arg	L-His
L-Asp	743.8*	950.2
L-Asn	1322	1486.8
Sodium glu	735	1001.8
L-Gln	891.5	1107.5

* Ethylene produced (nL × 10⁹ cells), Ethylene produced was determined after 51 hr. incubation.

틸렌 생성에는 Asn과 Gln이 더 좋은 기질로 이용되었다.

아미노산과 유기산의 공동효과 : *P. syringae*의 cell-

Table 3. Effect of various substrates on ethylene production by a cell-free system of *Pseudomonase syringae*

Substrates	Ethylene production*
Organic acids (0.5 mM)	
α -Ketoglutarate	310.8
Sodium citrate	19.7
Oxalacetate	11.8
Pyruvate	7.9
Sodium acetate	7.1
Sodium tartrate	4.92
Sodium succinate	4.68
Fumarate	4.45
DL-Malate	4.4
Sodium oxalate	3.3
Maleic acid	2.78
Amino acids (5 mM)	
Sodium glutamate	88.7
L-Glutamine	15.5
L-Serine	11.2
L-Proline	7.89
L-Alanine	5.77
L-Histidine	5.62
L-Methionine	4.41
L-Asparagine	2.92
L-Arginine	2.89
L-Aspartate	2.53
Sugars (5 mM)	
Saccharose	8.33
Glucose	7.89
Xylose	7.52
Galactose	7.5
Mannose	7.5
Fructose	7.39
Maltose	7.31
No substrate	6.31

* $nI \cdot (mg \text{ protein})^{-1} \cdot h^{-1}$

free system에서 histidine이 에틸렌 생성을 촉진한다고 하였다(21). 여기서는 균체를 사용하여 아미노산과 유기산의 공동효과를 더욱 광범위하게 조사한 결과, Arg와 His이 유기산에 의한 에틸렌 생성에 상승적 효과가 있었다(Fig. 4). Oxalacetate는 Arg보다는 His의 첨가시 40% 이상 많은 에틸렌을 생성하였고, 이 양은 같은 시간의 Asn(0.2 M)에 의한 에틸렌 생성과 비슷한 양으로 나타났다. Citrate와 α -KG는 His

Table 4. Effect of concentration of organic acids on ethylene production in a cell-free system of *Pseudomonas syringae*

Organic acids	concentration(mM)	Ethylene production	
		$nI \cdot (mg \text{ prot})^{-1} \cdot h^{-1}$	%
α -keto-glutarate	0.25	278.5	95.3
	0.5	292.3	100
	1.25	289.7	99.1
	2.5	272.3	93.2
	5	233.9	80
Sodium citrate	0.025	28.3	61.5
	0.05	40.3	87.6
	0.1	46	100
	0.25	29.6	64.3
	0.5	21.4	46.5
Oxalacetate	1.25	9.52	20.7
	2.5	6.8	14.8
	5	5.03	10.9
	0.25	11.2	94.1
	0.5	11.9	100
Oxalacetate	1.25	10.8	90.8
	2.5	9.16	77
	5	4.2	35.3

보다는 Arg이 첨가되었을 때 더 효과적이었다. 이 등(22)의 보고와는 달리 Arg와 His은 Asp나 Asn, Glu, Gln에도 상승적 효과가 있었다(Table 2).

Cell-free system에서의 ethylene 생성

아미노산과 유기산, 당류의 영향: 전구물질의 막 투과성 등의 장애를 제거하기 위해 cell-free system에 의한 ethylene 생성에서 Goto 등(21)이 제시하지 않았던 다양한 기질의 전환효과를 조사한 결과 가장 효과적인 기질은 α -KG이고 다음은 Glu로 조사되었다(Table 3). Citrate와 Gln, oxalacetate, Ser은 saccharose, glucose같은 당류보다 효과적이었다. α -KG와 Glu의 에틸렌 생성은 1시간 동안 지속적으로 증가하였고, α -KG는 Glu에 비해 3배 이상 많은 에틸렌을 생성하였다. Intact cell에서 에틸렌 생성에 효과적인 기질은 세포안으로 쉽게 흡수되어 대사경로를 통해 α -KG로 전환되고, 효소계에 의해 에틸렌으로 전환될 것이라 생각되는데, intact cell에서 효과적인 기질인 Asn, Asp은 cell-free system에서 거의 에틸렌으로 전환되지 않은 결과는 Asn과 Asp같은 기질은 막에

Table 5. Effect of concentration of amino acids on ethylene production in a cell-free system of *Pseudomonas syringae*

Amino acids	concentration(mM)	Ethylene production	
		$\mu\text{l} \cdot (\text{mg prot})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	%
Sodium glutamate	0.5	44	37.6
	1.25	57.3	49
	2.5	74.7	63.9
	5	90.3	77.2
	10	116.9	100
L-Glutamine	0.5	13	80.7
	1.25	13.3	82.6
	2.5	14.9	92.5
	5	16.1	100

대한 흡수도가 높고 쉽게 에틸렌으로 전환될 수 있는 형태로 변화했으리라 생각된다. Cell-free system에서 가장 효과적인 α -KG가 intact cell에서 시간에 따라 지속적으로 에틸렌이 생성된 것은 α -KG가 세포막 통과에 지연되기 때문으로 생각된다.

다양한 기질의 농도 영향: Table 4는 cell free계에서 α -KG와 citrate, oxalacetate의 농도영향을 조사한 것으로, α -KG와 oxalacetate는 농도가 증가함에 따라 에틸렌 생성이 감소하였지만, citrate나 OAA에 비해 농도에 큰 영향을 받지 않는 것으로 조사되었다. Glu와 Gln는 농도가 증가할수록 더 많은 에틸렌을 생성하였으며, Glu는 α -KG에 비해 농도 영향이 큰 것으로 나타났다(Table 5).

저해제의 영향: α -KG와 Glu에 의한 에틸렌 생성에서 고등식물의 ethylene 생합성 저해제인 aminoethoxyvinylglycine(AVG)와 aminooxyacetic acid(AOA), CoCl_2 의 영향을 조사하였다(Table 6). AVG는 고등식물의 에틸렌 생합성 과정 중 SAM에서 ACC단계를 저해하는데(4), 양기질로부터의 에틸렌 생성은 거의 저해하지 않았다. 그러나 이 단계의 다른 저해제인 AOA는 pyridoxal phosphate-linked 효소계의 억제제로 aminotransferase 반응을 억제하는데(22, 25), α -KG로부터의 생성은 1 mM에서도 거의 억제하지 않았으나, Glu에 의한 ethylene 생성은 0.2 mM의 AOA에 의해 95% 이상 크게 억제되었다. 즉 Glu에 의한 에틸렌 생성은 glutamate dehydrogenase에 의해 α -KG로 전환된 후 ethylene으로 전환된다는 것이 본

Table 6. Inhibitory effect of various substances on ethylene production from α -KG and sodium glutamate in a cell-free system of *Pseudomonas syringae*

Compound	Ethylene production ^a	
	α -KG (0.5 mM)	Sodium glu (5 mM)
Control ^b	100	100
AVG (0.2 mM)	102.3	94.2
AOA (1 mM)	93.3	3.2
(0.2 mM)	98.3	5.2
CoCl_2 (1 mM)	15.6	17.8

^a: percent of the control

^b: without addition of inhibitory substances

AVG (Aminoethoxyvinylglycine), AOA (Aminooxyacetic acid)

저해제 실험결과로 알 수 있다.

요 약

*Pseudomonas syringae*의 intact cell에서 에틸렌 생성을 극대화 하기 위한 전환조건은 30°C, pH 7.5로 조사되었고, 다양한 기질의 전환효과를 검토한 결과, $\text{Asn} > \text{Gln} > \text{Asp} > \text{Glu} > \alpha\text{-KG} > \text{citrate} > \text{oxalacetate}$ 의 순으로 많은 양의 에틸렌을 생성하였다. 또한, arginine과 histidine을 상기 유기산과 함께 넣었을 때 에틸렌 생성에 현저한 상승효과를 나타냈다.

Cell-free system에서는 $\alpha\text{-KG} > \text{Glu} > \text{citrate} > \text{Gln} > \text{Ser}$ 순으로 0.5 mM α -KG에서 $310.8(\mu\text{l} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ 로 가장 많은 에틸렌을 생성하였고, aminotransferase 억제제인 AOA를 사용해 본 결과, Glu는 glutamate dehydrogenase에 의해 α -KG를 거쳐서 에틸렌으로 전환된 것이라 생각된다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단 일반기초연구비의 보조로 이루어졌으며 본 연구에 협조해 주신 모든 분께 감사드립니다.

References

1. Abeles, F.B.: Ethylene in Plant Biology, Acade-

- mic Press (1973).
2. Burg, S.P. and E.A. Burg: *Plant Physiol.* **43**, 1069 (1968).
 3. Lieberman, M.: *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **30**, 533 (1979).
 4. Yang, S.F. and N.F. Hoffman: *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, (1984).
 5. Watanabe, T. and N. Kondo: *Plant & Cell Physiol.* **17**, 1159 (1975).
 6. Ilag, L. and R.W. Curtis: *Science* **159**, 1357 (1968).
 7. Chou, T.W. and S.F. Yang: *Arch. Biochem. Biophys.* **157**, 73 (1973).
 8. Chalutz, E. and M. Lieberman: *Plant Physiol.* **60**, 402 (1977).
 9. Jacobsen, D.W. and C.H. Wang: *Plant Physiol.* **43**, 1959 (1968).
 10. Bonn, W.G. and L. Sequeira: *Plant Physiol.* **56**, 688 (1975).
 11. Lund, B.M. and L.W. Mapson: *Biochem. J.* **119**, 251 (1970).
 12. Primrose, S.B.: *J. Gen. Microbiol.* **95**, 159 (1976).
 13. Fukuda, H., T. Fujii and T. Ogawa: *Arg. Biol. Chem.* **50**(4), 977 (1986).
 14. Fukuda, H., T. Fujii and T. Ogawa: *Biotech. Bioeng.* **31**, 620 (1988).
 15. Thomas, K.C. and M. Spencer: *Can. J. Microbiol.* **23**, 1669 (1977).
 16. Thomas, K.C. and M. Spencer: *Can. J. Microbiol.* **24**, 637 (1978).
 17. Lynch, J.M.: *Nature* **240**, 45 (1972).
 18. Lynch, J.M.: *J. Gen. Microbiol.* **83**, 407 (1974).
 19. Primrose, S.B. and M.J. Dilworth: *J. Gen. Microbiol.* **93**, 177 (1976).
 20. Goto, M., Y. Ishida, Y. Akikawa and H. Hyodo: *Plant & Cell Physiol.* **26**(1), 141 (1985).
 21. Goto, M. and H. Hyodo: *Plant & Cell Physiol.* **28**(3), 405 (1987).
 22. 이준승: *Korean Biochem. J.* **21**(3), 299 (1988).
 23. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
 24. Spalding, D.H. and M. Lieberman: *Plant Physiol.* **40**, 645 (1965).
 25. Amrhein, N. and D. Wenker: *Plant & Cell Physiol.* **20**(8), 1635 (1979).
 26. Freebairn, H.T. and I.W. Budolenhagen: *Nature* **202**, 313-314 (1964).

(Received January 21, 1991)