

근권에서 분리한 세균의 IAA 생합성 경로와 IAA 생성능과의 관계

김운진 · 송홍규*

강원대학교 자연과학대학 생명과학과

Interactions between Biosynthetic Pathway and Productivity of IAA in Some Rhizobacteria

Woon-Jin Kim and Hong-Gyu Song*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received January 18, 2012 / Accepted March 19, 2012)

This study explores the interaction between the production of indole-3-acetic acid (IAA), a typical phytohormone auxin and the role of IAA biosynthetic pathways in each IAA producing rhizobacterial strain. The bacterial strains were isolated from rhizosphere of wild plants and identified as *Acinetobacter guillouiae* SW5, *Bacillus thuringiensis* SW17, *Rhodococcus equi* SW9, and *Lysinibacillus fusiformis* SW13. *A. guillouiae* SW5 exhibited the highest production of IAA using tryptophan-dependent pathways among the 4 strains. When indole-3-acetamide (IAM) was added, *Rhodococcus equi* SW9 showed the highest IAA production of 3824 µg/mg protein using amidase activity. *A. guillouiae* SW5 also showed the highest production of IAA using two pathways with indole-3-acetonitrile (IAN), and its nitrile hydratase activity might be higher than nitrilase. *B. thuringiensis* SW17 showed the lowest IAA production, and most of IAA might be produced by the amidase activity, although the nitrilase activity was the highest among 4 strains. The roles of nitrile converting enzymes were relatively similar in IAA synthesis by *Lysinibacillus fusiformis* SW13. Tryptophan-independent pathway of IAA production was utilized by only *A. guillouiae* SW5.

Keywords: indole acetic acid, nitrilase, nitrile converting enzyme, rhizobacteria

옥신(auxin)은 대표적인 식물생장호르몬으로서 세포의 생장과 분화, 결실 성장, 뿌리신장, 꽃과 열매의 발달 등의 기능을 수행하는데, 식물 근권에서 일부 세균들이 옥신을 생성, 분비하고 이를 식물이 흡수하여 생장에 이용할 수 있다(Spaepen and Vanderleyden, 2010). 옥신 계열 중 대표적인 것이 indole-3-acetic acid (IAA)로서 IAA는 여러 세균에서 다양한 경로로 생성된다(Fig. 1). 그 중 가장 특징적인 것은 indole-3-acetamide (IAM) 경로로 두 단계를 거치는데, 먼저 아미노산 tryptophan이 *iaaM* 유전자에 의해 암호화된 tryptophan-2-monooxygenase에 의해 IAM으로 전환된 후 *iaaH* 유전자에 의해 암호화된 IAM hydrolase (amidase, IaaH)에 의해 IAA로 되며 많은 세균에서 *iaaM*과 *iaaH*가 발견되었다(Sekine *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1993; Morris, 1995; Theunis *et al.*, 2004). Indole-3-pyruvate (IPyA) 경로는 대부분의 식물에서 IAA를 합성하는 주요 경로이며 여러 세균에서도 존재하는데 tryptophan이 aminotransferase

에 의해 IPyA로 전환되면서 시작된다. IPyA는 decarboxylase (IPDC)에 의해 카르복시기가 제거되면서 indole-3-acetaldehyde (IAAld)로 바뀐 후 IAA로 산화된다(Spaepen *et al.*, 2007).

Indole-3-acetonitrile (IAN)을 거쳐 생합성되는 IAA에 대해서는 최근에 식물에서 광범위하게 연구되고 있는데 이 경로의 마지막 단계에서 IAN이 nitrilase에 의해 IAA로 전환된다(Bartling *et al.*, 1992). IAN에 대한 nitrilase의 특이성은 *Alcaligenes faecalis* 같은 세균에서 발견되었다(Nagasawa *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1993). Nitrilase는 최종 생성물로 carboxylic acid와 ammonia를 만드는데 IAA 생합성 과정에서는 이 때 IAN의 nitrile기가 carboxylic acid로 바뀌면서 IAA가 생성된다. Nitrilase는 IAN에서 IAA로의 전환을 촉매할 뿐만 아니라 하수나 전기도금 폐기물에서 나온 cyanide의 분해에도 관여한다. Cyanide는 독성이 강하고 폐공장지대나 산업폐수 등에서 발견되는데, 어류 등 많은 생물에 악영향을 미치고 KCN 제조의 원료로 사용되기 때문에 cyanide의 처리는 생태계 보존과 산업적 이용에 중요하다(Dash *et al.*, 2009). Nitrile hydratase가 수용성 nitrile을 가수분해할 수 있다는 것은 *Brevibacterium* R312를 이용한 실험에서 증명되었

*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr; Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-251-3990

다(Bui *et al.*, 1982). IAN을 IAM을 거쳐 IAA로의 전환을 촉매하는 nitrile hydratase (NHase)와 amidase가 *Agrobacterium tumefaciens*와 *Rhizobium spp.*에서 발견되고 이 경로를 이용한 IAA 생합성이 세균의 IAA 생성에 또 다른 큰 경로로 간주되고 있다(Kobayashi *et al.*, 1995). Amidase는 또한 부산물로 암모니아를 생성하는데, 암모니아는 공생하는 식물과 세균에서 중요한 질소 공급원으로 사용될 수 있다. 한편 tryptophan-비의존적 경로는 *Azospirillum brasilense*를 이용한 실험에서 증명되었는데 (Prinsen *et al.*, 1993), 현재까지 이 경로에 관여하는 효소는 확인되지 않았다.

본 연구에서는 IAA 생성량이 다른 균주들을 선발하여 그들의 IAA 생성경로 중 nitrile 전환경로를 비교하여 각 균주의 IAA 생성량과 nitrile 전환효소 활성 간에 상호연관성이 있는지 조사하였다. 또한 nitrilase 등에 의한 nitrile 전환능을 비교하여 cyanide 분해능 등으로 특화 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

근권세균의 분리와 IAA 생성능

초본류 근권토양에서 21개 균주를 분리하여 [SW1~6: 강아지풀 (*Setaria viridis*), SW7~10: 질경이(*Plantago asiatica*), SW11~21: 독새풀(*Alopecurus aequalis*)] IAA 생성능을 측정하였다. Nutrient broth (NB) 배지에서 배양(30°C)한 균주의 OD₆₀₀을 1.0으로 보정하고 IAA의 전구물질인 L-tryptophan을 3 mM 첨가한 NB 배지에 10%씩 접종하였다. 배양 중 24시간 간격으로 1 ml을 원심분리하여(3,010×g, 20 min) 상등액 0.5 ml을 Salkowski 용액 (H₂SO₄ 150 ml, H₂O 250 ml, 1.5 M FeCl₃·6H₂O 7.5 ml) 2 ml에

혼합하여 상온에서 30분 반응시킨 다음 Infinite 200 PRO multimode reader (Tecan, Austria)를 이용하여 OD₅₃₀을 측정하고, 표준 IAA (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 얻은 표준곡선을 이용하여 정량하였다. IAA 생성능과 nitrile 전환효소 활성을 비교하여 분리균주 SW5, SW9, SW13과 SW17를 선발하여 g-DNA를 추출하고 PCR을 수행한 후 (주)마크로젠에 의뢰하여 얻은 약 1,400 bp의 16S rRNA 유전자 염기서열을 EzTaxon server 2.1 (Chun Lab., Korea)을 이용하여 NCBI 등록 균주들과 비교하여 동정하였다.

Nitrile 전환효소의 활성능

NB 배지에서 분리균주를 12시간 동안 선배양한 후 2 ml을 1 g/L의 isobutyronitrile이 첨가된 NB 배지 100 ml에 접종하였다. 24시간 배양(200 rpm, 30°C) 후 원심분리하여(3,010×g, 15 min) 세균을 회수하고 phosphate buffer (10 mM, pH 7.2)로 세척 후 다시 원심분리를 하여 상등액을 제거한 후 세포 무게를 측정하였다. 96-well microplate에 전체 용량이 230 µl가 되도록 0.01% bromothymol blue (BTB)가 첨가된 phosphate buffer (10 mM, pH 7.2) 201 µl, mandelonitrile 5.75 µl (500 mM stock in ethanol), 그리고 vortexing을 통해 풀어준 균주를 23.25 µl 넣었다. 96-well microplate의 뚜껑을 덮고 30°C에서 6시간 배양 후 pH 변화에 따른 발색반응으로 nitrile 전환을 확인하였다(Banerjee *et al.*, 2003).

Nitrilase 활성 분석

Nitrile 전환효소 활성능 조사와 같은 방법으로 전체 용량이 10 ml이 되도록 0.01% BTB, 250 µl mandelonitrile, 1.01 ml

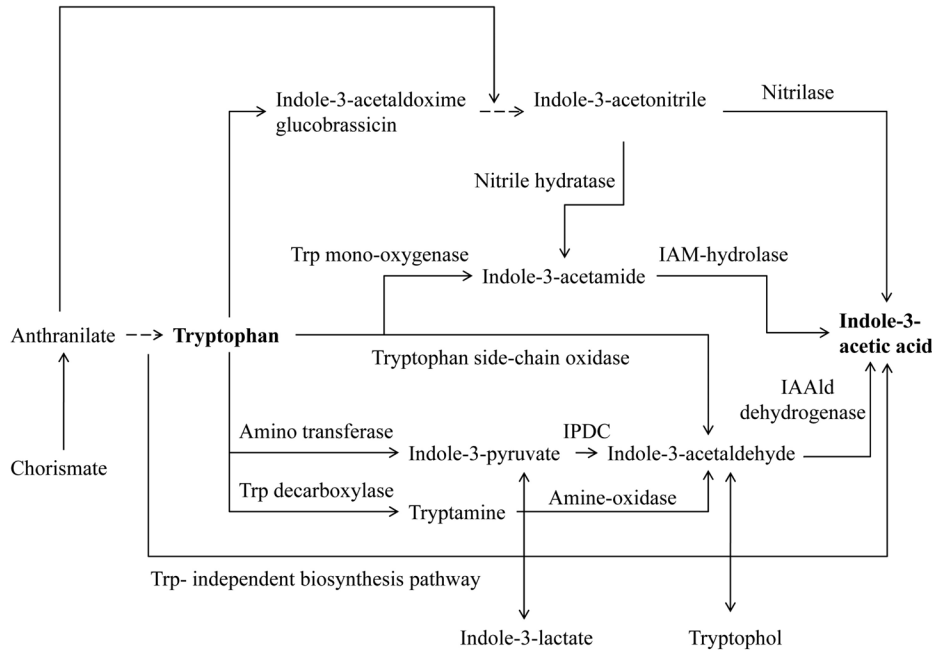


Fig. 1. Overview of the different pathways to synthesize IAA in bacteria. IAald, indole-3-acetaldehyde; IAM, indole-3-acetamide; IPDC, indole-3-pyruvate decarboxylase; Trp, tryptophan (from Spaepen *et al.*, 2007).

cell suspension을 넣고 conical tube에서 배양한(30°C, 200 rpm, 6시간) 후 세포는 원심분리로 제거하였다(3,010×g, 15 min). 상등액은 2 M NaOH를 이용해 pH 8.5로 맞춘 후 10 ml의 ether를 첨가하고 extraction shaker (Recipro shaker RS-1, JEIO TECH)에서 진탕하였다(300 rpm, 10분). 수용액은 다시 6 M HCl을 이용해 pH 1.5로 맞춘 후 다시 추출과정을 반복하였다. 회수한 ether를 증발시키고 5 ml의 methanol에 녹인 뒤 0.13 µm 공극의 여과막으로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 분석은 HPLC (Waters, Breeze Model, USA)로 Luna 5µ C18(2) 250×4.60 mm column (Phenomenex, USA)을 이용하였고, flow rate는 0.8 ml/min, 파장은 254 nm, 이동상은 0.01 M phosphate buffer (pH 4.8)와 methanol을 65:35로 섞어서 사용하였다. 시료 측정 시 mandelic acid를 standard로 사용하여 정량하였다(Banerjee *et al.*, 2003). 균주의 단백질량 분석을 위해 위 실험의 원심분리를 통해 취한 침전물에 1 ml의 증류수를 혼합하고 Bradford 시약(Sigma Aldrich, USA)을 넣어 30분간 반응시킨 후 OD₅₉₅를 측정하고, bovine serum albumin을 이용한 표준곡선으로 정량하였다.

기타 IAA 생합성 경로 조사

IAN과 IAM을 이용한 IAA 생성능 조사를 위해 NB 배지에서 선배양한 근권세균을 OD₆₀₀ 1.0으로 보정하고 IAA 생성경로의 중간산물인 IAN과 IAM이 각각 3 mM 첨가된 NB 배지에 10% 씩 접종하였다. 배양 중 24시간 간격으로 1 ml을 원심분리하여 (3,010×g, 20 min) 상등액 0.5 ml을 Salkowski 용액(H₂SO₄ 150 ml, H₂O 250 ml, 1.5 M FeCl₃·6H₂O 7.5 ml) 2 ml에 혼합하여 상온에서 30분 반응시킨 후 위에서 설명한 IAA 측정방법과 동일하게 IAA를 측정하여 각각 nitrile hydratase와 amidase의 활성을 세포 단백질 무게비로 계산하였다.

Tryptophan-비의존적 경로에 의한 IAA 생성을 조사하기 위해 NB 배지에서 선배양한 근권세균을 OD₆₀₀ 1.0으로 보정하고 추가 물질을 넣지 않은 NB 배지에 10% 접종하였다. 위의 IAA 측정방법과 동일하게 배양 중 24시간 주기로 IAA 양을 530 nm에서 측정하였다.

결과

근권세균의 IAA 생성능과 동정

균주 선발과 특성 파악을 위해 IAA 생성능을 단백질당 생성량으로 측정하였는데 21개 균주에서 13,368–147 µmol/mg protein으로 매우 넓은 범위를 나타내었다. Nitrile 전환효소 활성을 가진 균주들 중 IAA 생성능이 크게 다른 4균주를 선택하였는데 이들의 IAA 생성능은 SW5가 13,368 µmol/mg protein으로 월등하게 높고 SW13과 SW9가 각각 1,021과 1,004 µmol/mg protein, 그리고 SW17이 147 µmol/mg protein으로 가장 낮았으며 SW5, 9와 17은 그람 양성이고 SW13은 그람 음성이었다. 선발한 균주들을 16S rRNA 유전자 염기서열로 동정한 결과 SW5는 *Acinetobacter guillouiae* ATCC 11171(T)와 97.875%, SW17은 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792(T)와 99.801%, SW9는 *Rhodococcus equi* DSM 20307(T)와 100%, SW13은

Lysinibacillus fusiformis NBRC 15717(T)와 97.319%의 상동성을 보였다.

선발 균주들의 IAA 생합성량 측정

선발한 4균주의 배양 시 L-tryptophan, IAN과 IAM을 각각 첨가한 조건과 tryptophan 무첨가 조건에서 IAA 생합성량을 측정하였다. L-tryptophan 첨가 시 *A. guillouiae* SW5가 배양 2일째에 농도로는 1.66 mg/ml, 단백질량 기준으로는 3,936 µg/mg protein으로 가장 높은 생성능을 보였다(Fig. 2). IAN 첨가 시에도 *A. guillouiae* SW5가 2일째에 7.3 mg/mg protein으로 가장 높은 IAA 생성능을 나타내었다(Fig. 3). IAM 첨가 시에는 *R. equi* SW9가 배양 1일째에 가장 높은 6.2 mg/mg protein의 IAA 생성능을 나타내었다(Fig. 4). Tryptophan, IAN과 IAM을 첨가하지 않은 NB 배지에서의 IAA 생합성은 *A. guillouiae* SW5에서만 배양 1일째에 19 mg/L와 2일째에 16 mg/L의 낮은 수준으로 측정되었다.

분리균주의 IAA 생합성 경로 활성

각 균주들의 IAA 생합성 경로 활성을 종합하여 도식화하였는데 화살표의 굵기가 굵을수록 활성도가 높은 것이다. *A. guillouiae* SW5는 NHase의 활성이 nitrilase와 amidase 보다 높았으며 tryptophan-비의존적 경로의 활성도 나타내었다(Fig. 5). *B. thuringiensis* SW17은 전체 IAA 생성량이 가장 낮았지만 nitrilase 활성은 101 nM/mg protein으로 *A. guillouiae* SW5의 55.5 nM/mg protein, *R. equi* SW9의 1 nM/mg protein, *L. fusiformis* SW13의 0.8 nM/mg protein에 비해 가장 높았으며 다른 생합성 경로보다 더 많이 IAA 생합성에 이용하였다(Fig. 6). *R. equi* SW9는 amidase의 활성이 4균주 중 가장 높았으며 또한 다른 생합성 경로보다 더 많이 IAA 생합성에 이용하였다(Fig. 7). *L. fusiformis* SW13은 4균주 중 nitrilase, NHase와 amidase를 비교적 고르게 이용하여 IAA를 생합성하였다(Fig. 8).

고찰

IAA 생성균주들의 IAA 생합성 경로를 파악하기 위해 총 21개 분리균주 중 nitrile 전환효소 활성을 가지면서 IAA 생성능이 크

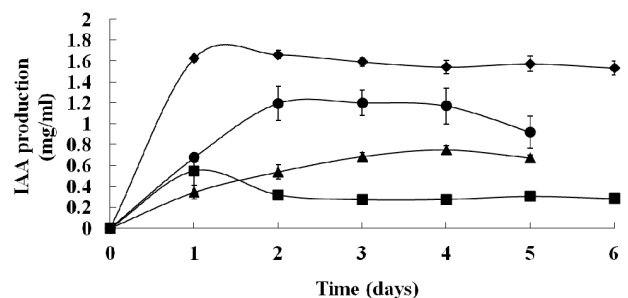


Fig. 2. IAA production by *A. guillouiae* SW5 (◆), *B. thuringiensis* SW17 (■), *R. equi* SW9 (▲) and *L. fusiformis* SW13 (●) in nutrient broth medium containing 3 mM L-tryptophan.

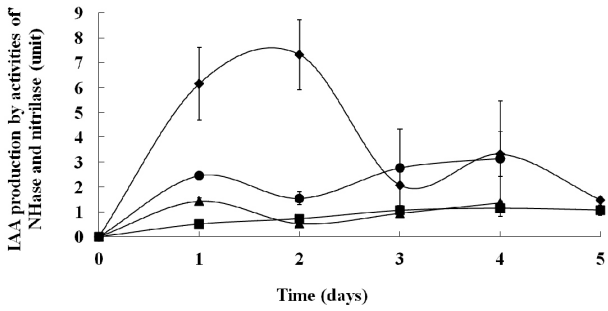


Fig. 3. IAA production by activities of NHase (nitrile hydratase) and nitrilase of *A. guillouiae* SW5 (◆), *B. thuringiensis* SW17 (■), *R. equi* SW9 (▲) and *L. fusiformis* SW13 (●) in Nutrient Broth containing 3 mM indole-3-acetonitrile (1 unit: 1 mg indole-3-acetic acid per mg of cell protein).

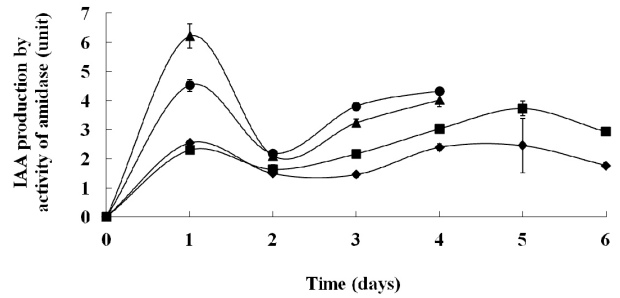


Fig. 4. IAA production by amidase activity of *A. guillouiae* SW5 (◆), *B. thuringiensis* SW17 (■), *R. equi* SW9 (▲), and *L. fusiformis* SW13 (●) in Nutrient Broth containing 3 mM indole-3-acetamide (1 unit: 1 mg indole-3-acetic acid per mg of cell protein).

게 다른 4개 균주를 선발하고 16S rRNA 유전자 염기서열 결정을 통해 동정하였다. 그러나 종 수준까지 보다 정확하게 동정하기 위해서는 DNA-DNA hybridization이 필요하다. L-tryptophan을 3 mM 첨가한 NB 배지에서 분리균주들의 IAA 생성능을 조사하였는데 *A. guillouiae* SW5가 배양 2일째에 1.66 mg/ml로 가장 높은 IAA 생성능을 보였으며 배양 6일까지도 유사한 수준을 유지하였는데(Fig. 2) 이는 *Azotobacter* sp. AZS₆의 L-tryptophan 2 mM과 5 mM 첨가 시 각각 24.8과 32.8 µg/ml에 비해 매우 높은 결과이며(Ahmad *et al.*, 2004) 다른 3개의 균주들도 IAA 생성능이 다른 균주들에 비해 우수함을 알 수 있다(Felici *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2009). 특정 경로를 이용한 IAA 생합성 정도를 조사하기 위해 주요 전구물질을 첨가하여 IAA 생성을 조사하였

다. 세균의 IAA 생합성에 IAM을 통한 경로가 매우 중요하며 (Sekine *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1993; Morris, 1995; Theunis *et al.*, 2004), IAM을 3 mM 첨가한 NB 배지에서는 amidase (IAM hydrolase)의 활성도를 알 수 있었는데, 4개의 분리균주 중 *R. equi* SW9의 활성이 가장 높았다(Fig. 4). 이는 *R. equi* SW9가 nitrile 전환효소들을 거치는 경로가 아닌 두 가지 주요 IAA 생합성 경로인 IAM 또는 indole-3-pyruvate를 거치는 경로를 통해 더 많은 양의 IAA를 생성하기 때문인 것으로 추정된다 (Fig. 7). 따라서 indole-3-pyruvate를 거치는 경로에 관여하는 효소들의 활성도를 측정한다면 보다 정확한 예측이 가능할 것이다.

Tryptophan에서 생성된 IAN은 nitrilase 또는 nitrile hydratase/amidase를 이용하는 2가지 경로에 의해 IAA로 전환된다(Fig. 1).

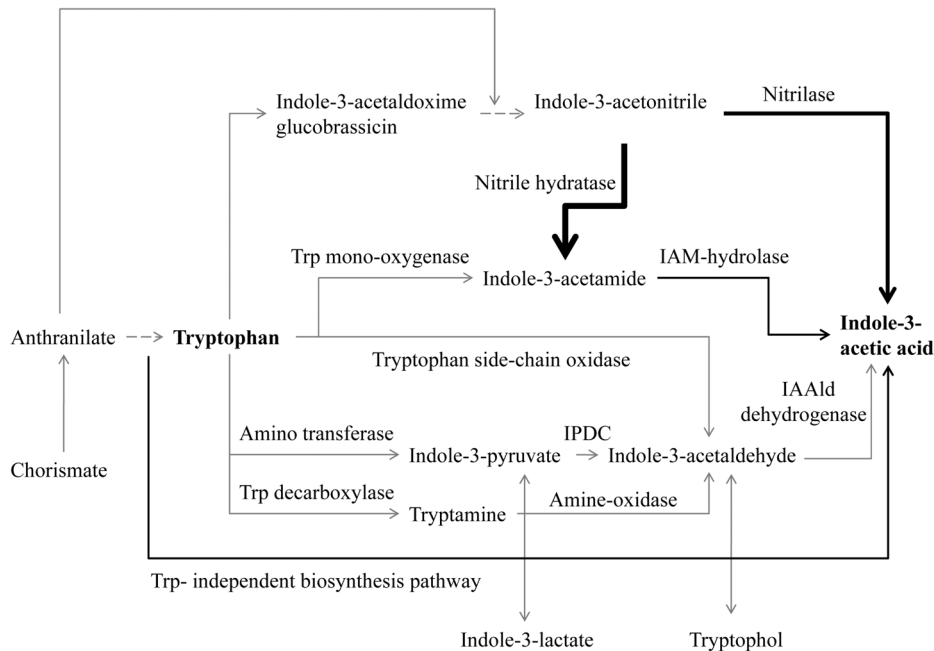


Fig. 5. Tentative pathways for IAA biosynthesis by *Acinetobacter guillouiae* SW5 (◆) in nutrient broth medium. The thickness of the dark line indicates the relative activity in IAA production pathways.

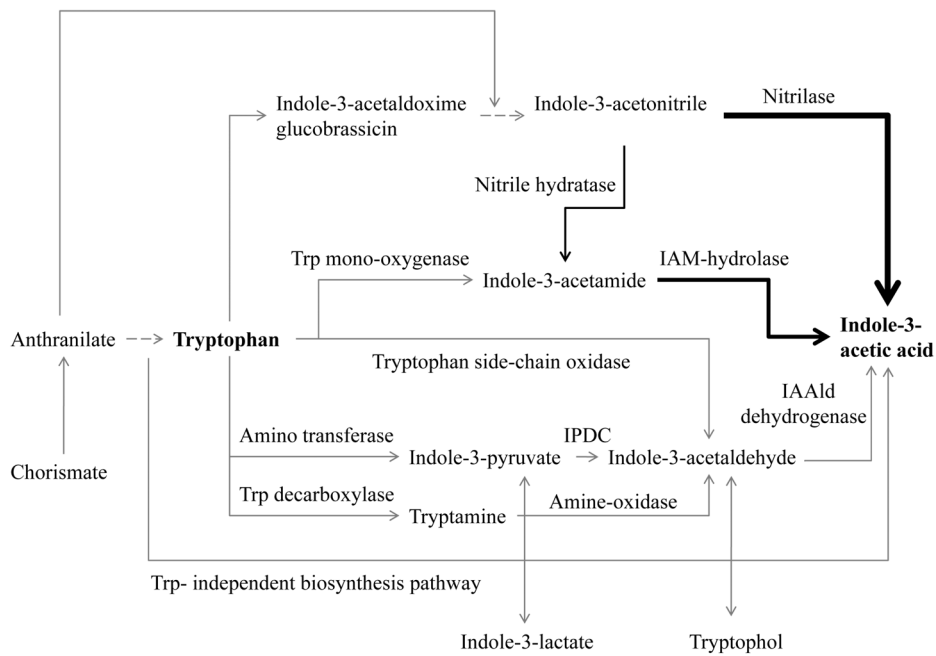


Fig. 6. Tentative pathway for IAA biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* SW17 (◆) in nutrient broth medium. The thickness of the dark line indicates the relative activity in IAA production pathways.

이 두 경로의 공동 전구물질인 IAN을 첨가하였을 때 IAA 생합성은 *A. guillouiae* SW5가 가장 높았으며(Fig. 3), 총 IAA 생합성능도 가장 높았지만(Fig. 2), nitrilase 보다는 nitrile hydratase의 활성이 높은 것으로 추정된다(Fig. 5). 그러나 두 경로 중 IAN을 직접 IAA로 전환시키는 nitrilase의 활성은 *B. thuringiensis*

SW17이 101 nM/mg protein으로 4개 균주 중 가장 높았지만 0.118 μmol mandelonitrile에서 14 $\mu\text{mol/mg}$ protein을 생성하는 *Corynebacterium* sp. strain C5에 비해 훨씬 낮았다(Yamamoto *et al.*, 1991). *B. thuringiensis* SW17은 4균주 중 IAA 생합성량이 가장 낮았지만(Fig. 2), amidase 활성을 이용할 경우 5일째

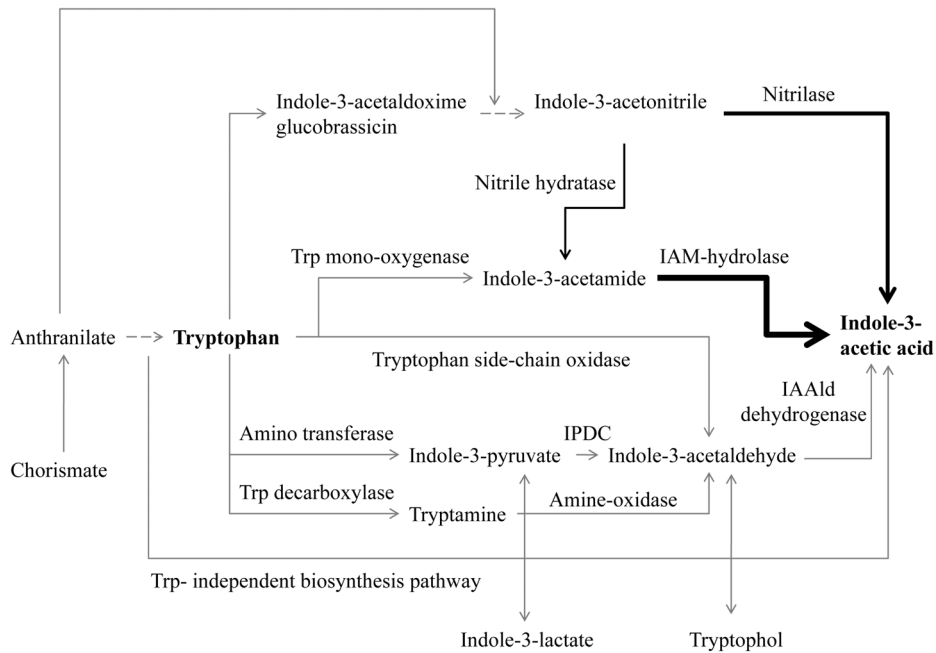


Fig. 7. Tentative pathway for IAA biosynthesis by *Rhodococcus equi* SW9 (◆) in nutrient broth medium. The thickness of the dark line indicates the relative activity in IAA production pathways.

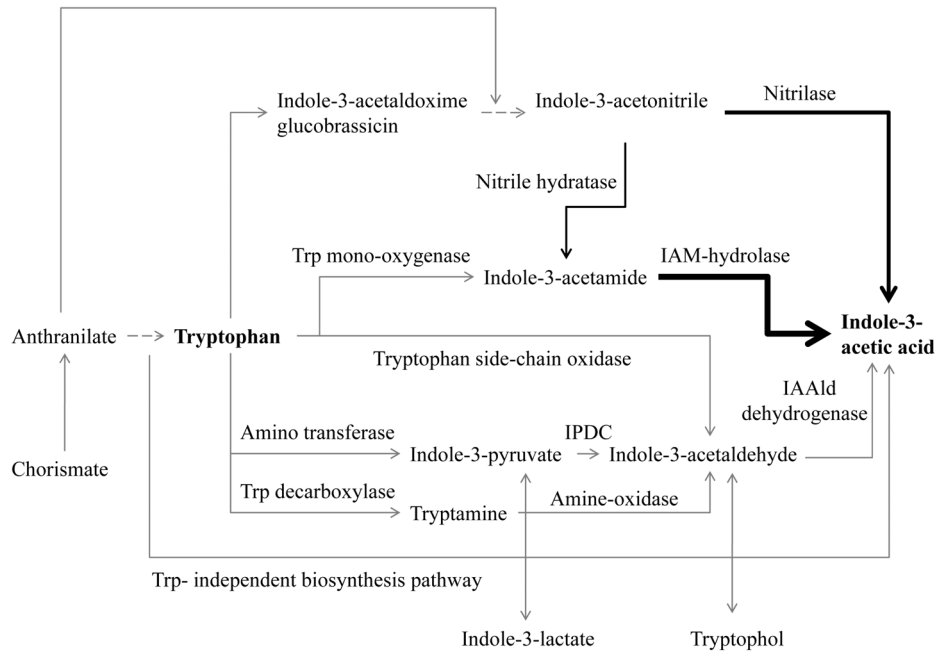


Fig. 8. Tentative pathway for IAA biosynthesis by *Lysinibacillus fusiformis* SW13 (◆) in nutrient broth medium. The thickness of the dark line indicates the relative activity in IAA production pathways.

3,727 µg/mg protein의 IAA를 생합성하여 전체 IAA 생성 양상과는 매우 상이함을 보였다(Fig. 4). *B. thuringiensis* SW17의 경우 tryptophan-의존적 경로를 통해 생합성되는 전체 IAA 중 상당량이 IAM을 거치는 경로를 통해 생성되며, nitrilase 활성은 높으나 이전 단계 효소들의 활성이 낮은 것으로 추정된다(Fig. 6). 만일 nitrilase 활성이 높은 균주를 찾아낸다면 여러 연구들에서 판명된 것처럼 환경 오염물질인 cyanide 분해 등에 이용할 수 있을 것이다(Meyers *et al.*, 1991; Sewell *et al.*, 2003; Baxter and Cummings, 2006; Dash *et al.*, 2009). 한편 *L. fusiformis* SW13은 L-tryptophan 3 mM을 NB에 첨가했을 때 전체적으로 *A. guillouiae* SW9와 유사한 IAA 생합성 양상을 보였고, 배양 4일째 1.2 mg/ml의 IAA를 생성하여 L-tryptophan 0.98 mM에서 12.03 µg/ml의 IAA를 생성한다고 보고된 *Vibrio fluvialis* 보다 상당히 높은 결과를 나타내었다(Gutierrez *et al.*, 2009). *L. fusiformis* SW13은 IAA 생합성에 관여하는 nitrile 전환효소들의 활성도 비교적 고른 것으로 추정된다(Fig. 8).

Tryptophan-비의존적 경로를 통한 IAA 생합성도 여러 연구에서 보고되었다(Prinsen *et al.*, 1993; Rapparini *et al.*, 1999). 본 연구에서는 4균주 중 *A. guillouiae* SW5만이 tryptophan을 첨가하지 않은 NB 배지에서 16–19 mg/L의 IAA를 생성하였다. 이는 이 균주의 다른 경로들보다는 매우 적은 IAA 생성량이지만 다양한 *Bacillus* spp.의 1.7–12.8 mg/L (Felici *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2009)이나 *Azospirillum brasilense*의 7.95 mg/L (Felici *et al.*, 2008)에 비해 매우 높은 IAA 생성능이다. 현재 알려진 tryptophan-비의존적 경로의 전구물질로 anthranilate가 있는데, NB의 배지조성에는 이 물질이 많이 포함되어 있지 않아 아직 명확하게 밝혀지지 않은 tryptophan-비의존적 경로를 통해

IAA를 생성하는 것으로 보인다.

본 연구에서는 IAA 생성균주에서 IAA 생합성능과 생합성 경로와의 관계를 밝히고자 하였는데 분리균주 중 *A. guillouiae* SW5는 IAA 생합성 경로 중 tryptophan-의존적 경로에 관여하는 여러 가지 효소들의 활성이 우수하며 또한 tryptophan-비의존적 경로를 통한 IAA 생합성까지도 확인되었다. 이 *A. guillouiae* 종은 최근에 알려졌으며(Nemec *et al.*, 2010) SW5 균주는 IAA 생합성능이 매우 높기 때문에 보다 많은 연구를 통해 식물생장 촉진을 위한 미생물제로 개발될 가능성이 높다. 또한 nitrilase, amidase 등 nitrile converting enzyme의 활성이 높은 균주들을 cyanide 제거 등의 특화된 용도에 효율적으로 이용하거나 유전자 형질전환에도 활용할 수 있을 것이다.

적요

대표적인 식물호르몬인 indole-acetic acid (IAA)를 생성하는 근권세균에서 IAA 생합성 경로와 생성량과의 관계를 파악하기 위해 IAA 생성능이 크게 다른 4개 균주를 선발하고 동정하였다. 특정 경로를 이용한 IAA 생합성능의 조사를 위해 주요 전구물질을 첨가하여 IAA 생성량을 측정하였다. Tryptophan 의존적 경로에 의한 총 IAA 생성량은 *Acinetobacter guillouiae* SW5가 1.66 mg/ml로 가장 높았으며, indole acetamide (IAM)를 배지에 첨가했을 때 amidase의 활성은 분리균주 중 *Rhodococcus equi* SW9이 가장 높았다. IAA 생합성을 위한 또 다른 두 가지 경로의 전구물질인 indole acetonitrile (IAN)을 첨가하였을 때 IAA 생합성은 *A. guillouiae* SW5가 가장 높았으며, 이 때 nitrilase 보다는 nitrile hydratase의 활성이 높았다. 그러나 두 경로 중 IAN을

직접 IAA로 전환시키는 nitrilase의 활성은 *Bacillus thuringiensis* SW17이 균주들 중 가장 높았다. *B. thuringiensis* SW17은 4균주 중 IAA생합성능이 가장 낮았으며 tryptophan을 이용하여 생합성하는 IAA 중 상당량을 IAM을 거치는 경로를 통해 생성한다. *Lysinibacillus fusiformis* SW13은 IAA 생합성에 관여하는 nitrilase 전환경로들을 비교적 고르게 이용하여 IAA를 생성하였다. Tryptophan 비의존적 경로를 통한 IAA 생합성은 *A. guillouiae* SW5에서만 소량 관찰되었다.

감사의 말

본 연구는 환경부 Eco-STAR Project의 수생태복원사업 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. 2004. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.* **29**, 29–34.
- Ali, B., Sabri, A., Ljung, K., and Hasnain, S. 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 519–526.
- Banerjee, A., Kaul, P., Sharma, R., and Banerjee, U. 2003. A high-throughput amenable colorimetric assay for enantioselective screening of nitrilase-producing microorganisms using pH sensitive indicators. *J. Biomol. Scr.* **8**, 559–564.
- Bartling, D., Seedorf, M., Mithöfer, A., and Weiler, E. 1992. Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* **205**, 417–424.
- Baxter, J. and Cummings, S.P. 2006. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**, 1–17.
- Bui, K., Arnaud, A., and Galzy, P. 1982. A new method to prepare amide by bioconversion of corresponding nitriles. *Enzyme Microb. Technol.* **4**, 195–197.
- Clark, E., Manulis, S., Ophir, Y., Barash, L., and Gafni, Y. 1993. Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophylae*. *Phytopathol.* **83**, 234–240.
- Dash, R., Gaur, A., and Balomajumder, C. 2009. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *J. Hazard. Mater.* **163**, 1–11.
- Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L., Toffanin, A., Tagliasacchi, A., and Nuti, M. 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Appl. Soil Ecol.* **40**, 260–270.
- Gutiérrez, C., Matsui, G., Lincoln, D., and Lovell, C. 2009. Production of the phytohormone indole-3-acetic acid by estuarine species of the genus *Vibrio*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2253–2258.
- Kobayashi, M., Izui, H., Nagasawa, T., and Yamada, H. 1993. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: Cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 247–251.
- Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M., and Shimizu, S. 1995. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Microbiol.* **92**, 714–718.
- Meyers, P., Gokool, P., Rawlings, D., and Woods, D. 1991. An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1397–1400.
- Morris, R.O. 1995. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes, pp. 318–339. In Davies, P. (ed.) *Plant hormones*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Nagasawa, T., Mauger, J., and Yamada, H. 1990. A novel nitrilase, arylacetone nitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3 purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **194**, 765–772.
- Nemec, A., Musilek, M., Šedo, O., De Baere, T., Maixnerová, M., van der Reijden, T., Zdráhal, Z., Vanechoutte, M., and Dijkshoorn, L. 2010. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 896–903.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Onckelen, H. 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **6**, 609–615.
- Rapparini, F., Cohen, J., and Slovin, J. 1999. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Lemna gibba* studied using stable isotope labeled anthranilate and tryptophan. *Plant Growth Regul.* **27**, 139–144.
- Sekine, M., Ichikawa, T., Kuga, N., and Kobayashi, M. 1988. Detection of the IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-acetamide in *Bradyrhizobium* spp. *Plant Cell Physiol.* **29**, 867–874.
- Sewell, B., Berman, M., Meyers, P., Jandhyala, D., and Benedik, M. 2003. The cyanide degrading nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 is a two-fold symmetric, 14-subunit spiral. *Structure* **11**, 1413–1422.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. 2010. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a001438.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol.* **31**, 425–448.
- Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W., and Prinsen, E. 2004. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Plant-Microbe Interact* **17**, 1153–1161.
- Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., and Komatsu, K. 1991. Production of R(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3028–3032.