

무름병균 *Erwinia chrysanthemi* PY35의 CMCase isozymes 분리

박상렬 · 조수정 · 윤한대*

경상대학교 농화학과

초 록 : 배추로부터 연부균을 분리하여 조사한 결과 *Erwinia chrysanthemi*(Ech)로 동정되었으며 분리균 Ech PY35는 CMCase, pectinase, pectate lyase, protease 활성은 있었으나 hemicellulase 활성은 없었다. 배추와 감자의 조직에서 24~48시간 이내에 연부증상을 일으키며, 배추 조직보다 감자 조직에서 연부증상의 발병 진행속도가 느린 편이었다. 전자현미경관찰 결과 병원균의 식물 조직 내의 침투가 확인되었으며 이들이 분비한 세포벽분해효소에 의한 식물조직의 연부현상도 관찰되었다. 분리균의 체내 및 체외효소를 분리하여 CMC-SDS-PAGE에 의한 CMCase 직접활성 염색법을 이용하여 5종류의 CMCase isozyme으로 추정되는 활성밴드를 관찰할 수 있었다. 체내분비효소로 48 kDa, 34 kDa, 31 kDa의 3종류, 체외분비효소는 50 kDa, 29 kDa 2종류로 확인되었다. (1999년 6월 25일 접수, 1999년 7월 20일 수리)

서 론

*Erwinia chrysanthemi*는 장내세균과 (Enterobacteriaceae)에 속하는 세균으로 연부병을 일으켜 작물재배, 저장 및 유통과정에서 경제적으로 큰 손실을 가져오고 있는 식물병원균이다. *Erwinia*의 연부병은 주로 이들이 균체 내에서 생산 및 분비하는 가수분해효소작용에 기인하는 것으로 알려지고 있다. 식물병원균은 pectinase, cellulase, pectate lyase, protease, phospholipase 등의 효소를 생성하며 이들 효소들이 직접 또는 간접으로 병원성 발현과 연관되어 있을 것으로 추측되고 있다. 연부병을 일으키는 *Erwinia*속 중에서 특히 *E. chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atropceptica*, *E. amylovora*에 대한 분자생물학적인 연구가 주로 되고 있다.¹⁻³⁾

*Erwinia*속 중에서 *E. chrysanthemi*가 생성, 분비하는 가수분해효소 중에서 다수의 pectate lyase isozyme이 분비되는 것이 확인되어 분자생물학적 수준에서 집중적으로 연구되고 있다. 특히 *E. chrysanthemi*는 *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD*, *pelE*, *pelI*, *pelL*, *pelZ* 등의 pectate lyase 유전자가 보고되었으며 이들의 일부는 cluster 상태로 존재하거나 일부는 다른 종류의 가수분해효소와 인접하여 있는 것으로 보고되었다.⁴⁻⁸⁾ *E. chrysanthemi*가 분비하는 CMCase는 현재까지 *celY*,⁹⁾ *celZ*¹⁰⁾의 두 종류의 CMCase 유전자가 보고되어 있다. 본 연구자는 전보¹¹⁾에서 *E. chrysanthemi*와 가장 유연관계가 가까운 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에서 CMCase isozyme이 5종류가 있다는 것을 처음으로 보고하였으며 이들 중에서 *celA*,¹²⁾ *celB*¹³⁾ 두 종류의 유전자를 분리하여 보고하였고 이들 유전자 산물을 신속한 방법으로 확인하는 방법을 개발하였다.¹⁴⁾ 본 실험은 식물의 연부현상을 분자생물학적 수준에서 이해하기 위하여 전보^{12,13)}에서 분

리 보고한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와의 대조적 연구를 위해 현재까지 2 종류의 CMCase isozyme이 존재하는 것으로 알려진 *E. chrysanthemi*를 분리, 동정하고, 이 균이 생성하는 식물 세포벽분해효소인 CMCase isozyme에 대한 연구를 하고자 채소 및 과일 시장과 재배 단지로부터 수집한 연부증상이 있는 시료로부터 연부증상이 가장 강한 균을 분리, 선정하였다. 이 분리한 균주의 생육상의 특성 조사와 병원성 검정을 하였다. 연부현상을 관찰하기 위하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 조직 내부에서의 균의 침투현상을 확인하였으며 연부과정에서 세포벽분해효소의 관련 현상을 확인하였다. 특히 *E. chrysanthemi*가 분비하는 체내효소와 체외로 분비하는 CMCase를 구분하였으며 CMC-SDS-PAGE 방법에 의해 분리균 *E. chrysanthemi* PY35에는 5종류의 CMCase isozyme으로 추정되는 활성대가 존재하고 있음이 확인되었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

분리 및 동정

채소, 과일시장 및 이들의 재배단지로부터 수집한 275개의 연부증상이 있는 시료로부터 CMCase를 분비하는 연부균을 분리하기 위해 Nutrient agar를 사용하였다. 분리된 균주를 TY-CMC [tryptone 5 g, yeast extract 5 g, CaCl₂ 1 g, carboxymethyl cellulose(Sigma, high viscosity) 5 g, agar 15 g] 배지에 배양하여 24시간 후 1% Congo red로 염색하여 주위에 노란색 환¹⁵⁾을 나타내는 균에서 연부증상과 섬유소 분해능이 강한 균을 분리하였다. 선정균의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성 조사는 Dickey,¹⁶⁾ Thomson,¹⁷⁾ Schaad,¹⁸⁾ Dye¹⁹⁾ 및 Bergey's Manual^{20,21)}의 방법에 준하였으며 Microlog 2 kit (Biolog, Inc., USA) 및 MIDI system(Hewlett-Packard, USA)을 사용하였다.

찾는말 : *Erwinia chrysanthemi*, 병원성, CMCase, CMC-SDS-PAGE

*연락처

세포벽분해효소 활성 측정

Lim 등의 방법¹¹⁾에 따라 분리균의 세포벽분해효소의 생성 유무가 육안으로 직접 관찰될 수 있는 한천확산법(agar diffusion method)으로 pectate lyase, pectinase, CMCase의 활성을 TY배지(trypitone 5 g, yeast extract 5 g, CaCl₂ 1 g, agar 15 g)에 각 기질을 0.5%되게 첨가하여 측정하였으며, hemicellulase는 TY 배지에 0.5% xylan을 기질로, protease는 20% skim milk 용액을 최종 농도가 1%가 되게 만들어 사용하였다.

병원성 검정

공시균주의 병원성 조사는 Nutrient 고체배지에서 48시간 배양한 세균을 약 10⁸ cells/ml 농도가 되도록 현탁하여 표면 살균된 감자 및 배추절편에 접종하고 30°C에서 배양 관찰하였다. 시료는 1.5×1.5 cm 크기를 사용하였으며 먼저 멸균증류수로 씻어 내고 1% sodium hypochloride에 2분간 적신 후 멸균 증류수로 수회 세척하여 물기를 제거한 후 접종하여 연부 정도를 조사하였다.

광학 및 전자현미경 조사

배추와 감자 조직에 분리균을 접종하여 12, 24, 48시간 후 시료를 정기적으로 채취하여 광학현미경으로 관찰한 다음 일반적인 방법에 따라 전자현미경으로 관찰하였다.^{22,23)}

CMC-SDS-PAGE에 의한 CMCCase의 직접활성염색법

공시균에서 CMCCase 유도를 위하여 0.1%의 CMC를 첨가한 MMY (K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, CaCl₂ · 2H₂O 1 mM yeast extract 0.1%, CMC 0.1%) 배지 1 l에 *Ech* PY35를 접종하여 10⁸ cells/ml 농도로 생육시킨 후 CMCCase 생성을 유도하였다. 공시균이 분비하는 체외 CMCCase (extracellular CMCCase)를 분리하기 위해 4일 동안 배양한 상등액을 원심분리 후 유안을 85%로 포화시키고 침전물을 citric acid buffer(pH 6.0)에 녹여 반투막을 사용하여 멸균증류수를 3~4회 교환하면서 염을 제거하였으며, 효소의 활성을 CMC 배지 상에서 확인후 냉동 건조시켜 농축시킨 다음 보관하고 필요시 사용하였다. 체내효소(intracellular enzyme)는 원심분리한 균체를 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충 용액으로 현탁시킨 후 초음파 파쇄하여 완충용액에 녹여 다시 원심분리 후 사용하였다. 이들 조제된 효소를 Park 등의 방법¹⁴⁾인 직접활성염색법인 CMC-SDS-PAGE(carboxymethyl cellulose-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리된 활성 밴드를 확인하였다. CMCCase의 겔 상에서 직접 활성을 관찰하기 위해 0.1%의 CMC를 함유한 separating gel을 renaturation buffer(1% Triton X-100, 100 mM Tris · HCl, pH 7.5)에 8시간 renaturation 시킨 후 Congo red 염색을 통하여 겔 상에서 CMCCase의 isozyme 활성밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

연부균의 분리

연부증상이 있는 시료에서 275균주를 분리하여 CMC를 함유한 고체배지 상에서 강한 활성을 갖는 55균주를 선별하였으며 병원성 검정을 한 결과 대부분 24시간 이내에 심한 악취와 함께 배추를 연화 부패시켰으며, 이 중에서 PY35 균주는 연부정도가 가장 심하였고 배추에 접종 후 12시간 이내에 연부증상이 시작되어 24시간 이후에 완전히 연화되었다. 또한 TY-CMC 배지 상에서도 CMCCase 활성이 강력하여 PY35를 본 실험의 공시균주로 사용하였다. 미생물학적 특징, 기기분석법인 Microlog 2 kit 및 MIDI system의 분석 결과를 Bergey's Manual^{20,21)} 등에 의하여 비교한 결과 Table 1과 같이 pectin 분해, catalase, 감자의 부패, gelatin 액화, 혐기적 증식, indole 생성, methyl red test는 양성이었으며 oxidase, starch와 maltose에 의한 산생성 실험은 음성이었다. Gram 염색 결과 음성균으로 전자현미경 관찰 결과 1.5 μm의 단간균이었다(Fig. 5 & Fig. 6). 이상의 결과로 분리균 PY35는 *Erwinia chrysanthemi* (*Ech* PY35)로 동정되었다.

세포벽분해효소

한천확산법에 의하여 *Ech* PY35에 대한 세포벽분해효소 생성을 실험한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1A는 CMCCase, Fig.

Table 1. Comparison of bacterial characteristics of the present isolate with *Erwinia chrysanthemi* described in Bergey's Manual

Characteristic	Isolated PY35	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
Pectate degradation	+	+
Potato soft rot	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Reducing substances from sucrose	-	-
Sensitivity to erythromycin	+	+
Anaerobic growth	+	+
Gas from glucose	+	+
Indole	+	+
Phosphatase	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Growth at 36-37°C	+	+
Methyl red test	+	+
Acid production from:		
L-Arabinose	+	+
Cellobiose	+	+
Fructose	+	+
D-Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
Glycerol	+	+
Lactose	v	d
Maltose	-	-
D-Mannitol	+	+
D-Mannose	+	+
Ribose	+	+
Starch	-	-
Sucrose	+	+
Trehalose	-	-
D-Xylose	+	+
Gram stain	-	-

+, positive; -, negative; d, data not detectable; v, variable.

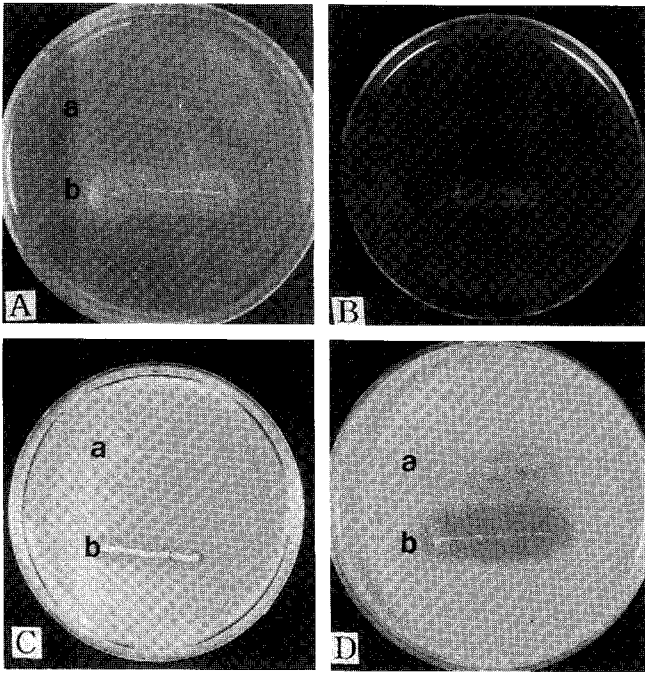


Fig. 1. Detection of cell-wall degrading enzyme by agar diffusion method (lane a, *E. coli* : lane b, *Erwinia chrysanthemi* PY35). A, CMCase test : B, pectate lyase test : C, protease test : D, pectinase test.

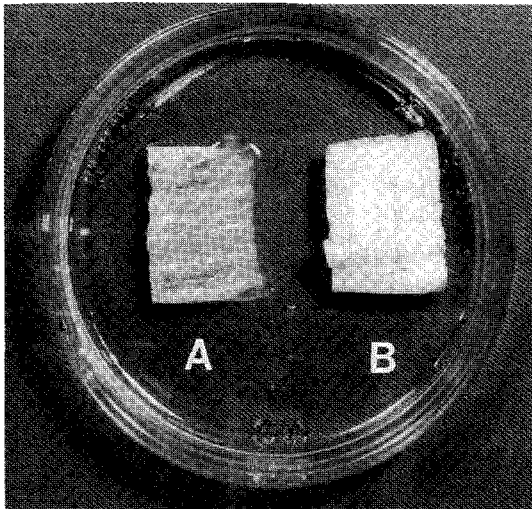


Fig. 2. Pathogenicity test on chinese cabbage by *Erwinia chrysanthemi* PY35. A, An inoculation of *Erwinia chrysanthemi* PY 35 : B, An inoculation negative control by *E. coli*.

1B는 pectate lyase, Fig. 1C는 protease, Fig. 1D는 pectinase 활성실험 결과로 *Ech* PY35는 CMCase, pectate lyase, protease, pectinase의 분해능을 가지고 있었으나 hemicellulase 활성은 관찰되지 않았다(미제시 자료). 이상의 결과로 분리균은 식물에 침투하여 식물세포벽을 와해시킬 수 있는 다양한 세포벽가수분해효소를 분비하는 것으로 판단되었다.

식물병원성 검증

분리균 *Ech* PY35에 의한 배추의 병원성 검증으로 표면 살균된 배추조직에 Fig. 2A는 *Ech* PY35, Fig. 2B는 *E. coli*로

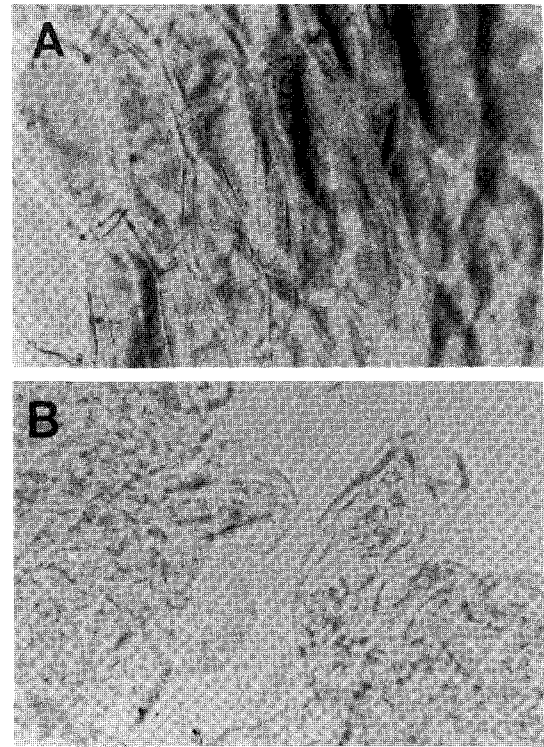


Fig. 3. Examination of chinese cabbage tissue under the photomicroscopy. A, A healthy plant (400x): B, An inoculated plant tissue by *Erwinia chrysanthemi* PY35 after 24 hours incubation (400x).

접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 육안으로 관찰한 것으로, *Ech* PY35로 접종한 배추조직은 심한 연부현상을 나타내었다. 이것으로 *Ech* PY35는 식물병원성을 가지고 있음을 확인하였다.

현미경 관찰

대부분의 식물세포는 기능적, 구조적 구분에 따라 middle lamella, primary wall 및 secondary wall로 구분된다. Primary wall은 arabinogalactan이 pectin 물질을 공유적으로 연결시켜 주고 있으며 구조적으로 식물세포는 matrix를 둘러싸고 있는 microfibril의 망상구조이다. Microfibril은 대부분 섬유소이며 matrix는 pectin 물질이 대부분이다. 본 실험에서는 분리균 *Ech* PY35를 식물에 접종하여 연부현상을 경시적으로 관찰한 결과 분비되는 가수분해효소의 작용현상을 확인하였다. Fig. 3A는 400 배의 배율에서 배추의 정상조직이며 Fig. 3B는 *Ech* PY35 접종 후 24시간이 지난 조직으로 정상조직에 비하여 세포가 많이 와해된 것을 볼 수 있었다. 마찬가지로 Fig. 4는 400 배의 배율에서 본 감자의 조직으로 Fig. 4A는 정상조직, Fig. 4B는 *Ech* PY35 접종 후 48시간이 지난 조직으로, 정상조직에 비하여 세포가 많이 와해된 것을 볼 수 있었으며 배추조직에 비하여 감자조직은 연부의 진행이 느린 것을 알 수 있었다. 이것은 배추와 감자조직의 구성성분의 차이에 의하여 병의 진행 속도 차이가 나타나는 것으로 생각된다.

Fig. 5는 전자현미경으로 배추의 내부조직을 관찰한 것으로 Fig. 5A는 4,000 배율에서 본 배추의 정상조직의 단면도로서

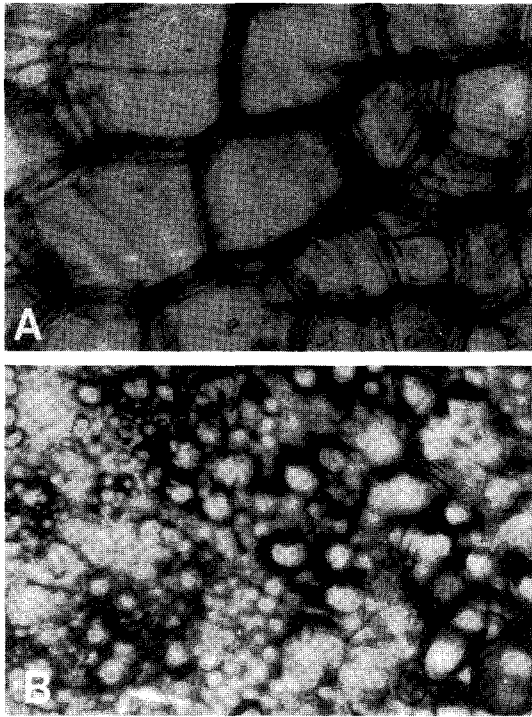


Fig. 4. Examination of potato tissue under the photomicroscopy. A, A healthy potato (400x); B, An inoculated potato tissue by *Erwinia chrysanthemi* PY35 after 48 hours incubation (400x).

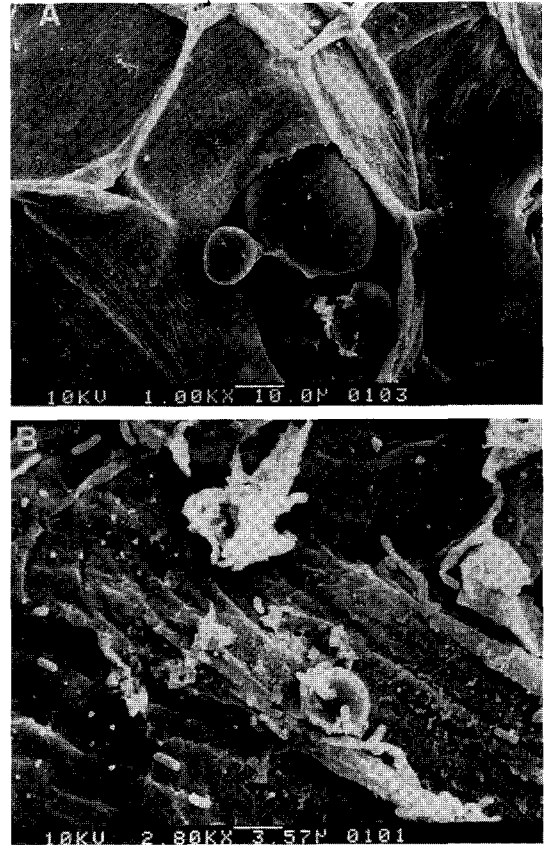


Fig. 6. Episcopical examination of healthy and inoculated potato transverse section structures with electron microscopy. A, A healthy potato tissue (1,000x); B, An inoculated tissue by *Erwinia chrysanthemi* PY35 after 48 hours incubated (2,800x).

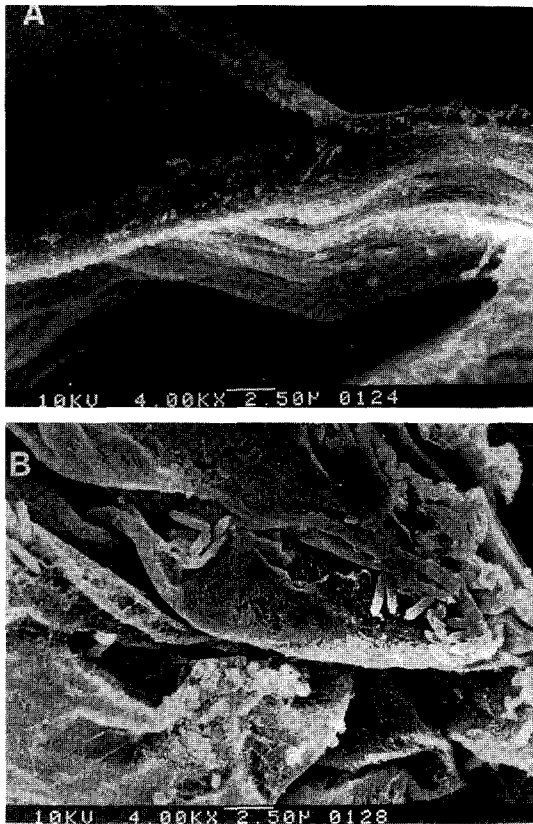


Fig. 5. Episcopical examination of healthy and inoculated chinese cabbage transverse section structures with electron microscopy. A, a healthy chinese cabbage tissue (4,000x); B, An inoculated tissue by *Erwinia chrysanthemi* PY35 after 24 hours incubated (4,000x).

조직의 손상이 없었으며, Fig. 5B는 *Ech* PY35 접종 후 24시간이 지난 조직을 4,000 배율에서 관찰한 것으로 정상조직과 비교하여 볼 때 감염조직에 균이 침투하여 이들이 분비한 가수분해효소 작용에 의해 조직들이 와해되는 현상을 관찰하였다. 전자현미경으로 관찰한 감자의 단면조직으로 Fig. 6A는 감자의 정상조직의 단면도이며 건강한 조직과 과립의 형태도 선명하게 관찰이 가능했으며, Fig. 6B는 *Ech* PY35 접종 후 48시간이 지난 감자조직을 관찰한 것으로 정상조직과 비교하여 균의 침투 및 감염조직은 균들에 의하여 연부현상이 관찰되었다.

이상의 현미경적 관찰을 통하여 *Ech* PY35가 식물조직으로 침투 및 이들이 분비하는 세포벽분해효소 작용에 의해 연부가 진행되는 것으로 생각된다. 이들 식물체를 구성하는 조직의 구성분인 섬유소가 다양한 형태의 화학적 결합을 가진 복합된 polymer이기 때문에 이들을 분해하기 위해서는 특이한 형태의 효소작용이 존재할 것이며 따라서 *Ech* PY35는 다양한 CMCase isozyme이 생성될 것으로 추정된다.

CMCase 직접활성염색법에 의한 효소의 분자량 결정

SDS-PAGE법의 변형으로 0.1% CMC를 첨가하여 만든 겔 상에 분리한 CMCcase 단백질을 전기영동한 후 Povin 등²⁴⁾이 SDS를 겔 상에서 제거하기 위하여 사용한 Triton X-100으로 renaturation하여 Congo red 염색을 통하여 겔 상에서 CMCcase

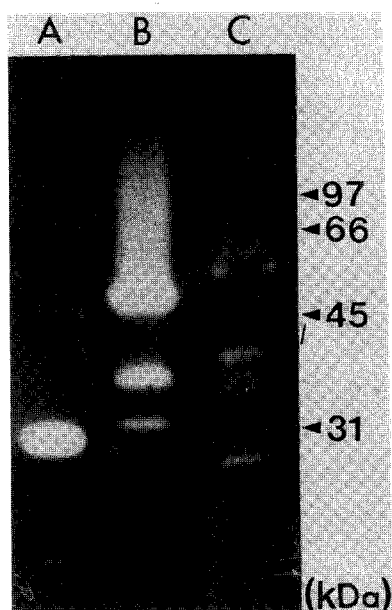


Fig. 7. Detection of CMCase activity by CMC-SDS-PAGE. Lane A is extracellular CMCase of *Erwinia chrysanthemi* PY35. Lane B is intracellular CMCase of *Erwinia chrysanthemi* PY35. Lane C is mixture of extracellular CMCase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34¹⁴.

활성밴드를 확인할 수 있다. Fig. 7은 CMC-SDS-PAGE 의한 CMCase 직접활성염색법의 결과 분리균 *Ech* PY35 배양 물에는 종류의 CMCase 활성밴드가 존재함을 확인할 수 있었다. 이들 CMCase의 대략적인 분자량은 표준단백질을 기준으로 대략의 추정치는 50 kDa, 48 kDa, 34 kDa, 31 kDa, 29 kDa이었다. 체외분비효소는 50 kDa, 29 kDa 2 종류로 확인되었으며 50 kDa는 그 활성이 매우 미약하여 육안으로 겨우 관찰이 가능하였다(lane A). 체내분비효소로 48 kDa, 34 kDa, 31 kDa의 3종류로 관찰되었다(lane B). 그러나 실제 균이 식물체 내로 침투되거나 생육 조건, 작용기질의 대상에 따라 분비되는 CMCase isozyme의 종류가 다양할 것이라 생각된다. Fig. 7의 결과에서와 같이 본 연구자들이 전보에서 보고한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* LY34에서도 5종류의 endo-1,4-β-glucanase를 분비하였다¹⁴(lane C). *E. chrysanthemi*와 *E. carotovora* subsp. *carotovora*가 비슷한 종류의 CMCase isozyme을 분비하는 것으로 추정되나 그 분자량은 각기 상이한 것으로 나타났다.

CMC-SDS-PAGE 방법의 장점으로 단백질 standard marker를 이용하여 활성밴드를 가진 CMCase의 대략적인 분자량을 직접 알 수 있었으며 또한 이 방법은 *Erwinia* 속뿐만 아니라 CMCase 활성을 가진 다른 균주의 CMCase 유전자의 수를 예측할 수 있으며 간단한 열처리와 SDS의 처리를 통하여 단백질 전기영동과정에서 효소 dimer 형성 가능성이 적으며, 이들 유전자의 분자량을 직접 확인할 수 있으므로 앞으로 CMCase 확인실험에 있어서 유용한 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되어 진다.²⁵⁾

본 연구자들은 5종류의 CMCase isozyme을 분비하는 *E. carotovora* subsp. *carotovora* LY34에서 CMCase 유전자 *celA*,¹²⁾ *celB*¹³⁾를 분리보고 한 바가 있으며 현재 새로운

CMCase isozyme 유전자를 확인하고 그 특성을 조사하고 있으며 분리균 *E. chrysanthemi* PY35에서도 이에 대응하는 유전자를 분리하여 작용 특성을 비교하고자 한다. *Erwinia*에서 분비되는 다양한 종류의 CMCase isozyme의 유전자가 분리 확인되어 각 유전자산물의 기능이 구명되면 연부현상기작 뿐만 아니라 궁극적으로는 지구상에서 해마다 다량으로 생합성되는 biomass인 다양한 형태의 섬유질을 효소적 방법에 의해 효과적으로 분해하는 데 중요한 역할을 할 것이며 앞으로 섬유질로부터 대체 에너지 개발을 위한 기초 자료가 될 것으로도 기대된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 농림기술개발사업 연구비에 지원으로 수행되었으며 지원에 감사 드립니다.

참고 문헌

- Baldwin, B. C. and Rathmell, W. G. (1988) Evolution of concepts for chemical control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**, 265-283.
- Collmer, A. and Keen, N. T. (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 383-409.
- Daniels, M. J., Dow, J. M. and Osbourn, A. E. (1988) Molecular genetics of phytopathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**, 285-312.
- Alfano, J. R., Ham, J. H. and Collmer, A. (1995) Use of *Tn5tac1* to clone a *pel* gene encoding a highly alkaline, asparagine-rich pectate lyase isozyme from an *Erwinia chrysanthemi* EC16 mutant with deletions affecting the major pectate lyase isozymes. *J. Bacteriol.* **177**, 4553-4556.
- Pissavin, C., J., Robert-Baudouy, N. H. and Pattat, C. (1996) Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **178**, 7187-7196.
- Lim, S. T., Park, Y. W. and Yun, H. D. (1997) Cloning and sequencing of the *pelCI* gene encoding pectate lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34. *Agri. Chem. Biotechnol.* **40**, 380-387.
- Tardy, F., Nasser, W. J., Robert-Baudouy, N. H. and Pattat, C. (1997) Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase. *J. Bacteriol.* **179**, 2505-2511.
- Tardy, F., Nasser, W. J., Robert-Baudouy, N. H. and Pattat, C. (1997) Pectate lyase *pelI* of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *J. Bacteriol.* **179**, 7321-7330.
- Guiseppe, A., Aymeric, J. L., Cami, B., Barras, F. and Creuzet, N. (1991) Sequence analysis of the CMCase-encoding *celY* gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. *Gene* **106**, 109-114.
- Guiseppe, A., Cami, B., Aymeric, J. L., Ball, G. and Creuzet, N. (1988) Homology between endoglucanase Z of *Erwinia chrysanthemi* and endoglucanase of *Bacillus subtilis* and alkalophilic *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **2**, 159-164.
- Lim, S. T., Park, Y. W., Cho, S. J. and Yun, H. D. (1997) Phy-

- topathogenicity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and production of CMCase isozymes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 468-476.
12. Park, Y. W., Lim, S. T. and Yun, H. D. (1998) Cloning and sequencing of the *celA* gene encoding CMCase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34. *Mol. Cells.* **8**, 27-35.
 13. Park, Y. W., Lim, S. T. and Yun, H. D. (1998) Cloning and characterization of a CMCase gene, *celB*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and its comparison to *celA*. *Mol. Cells.* **8**, 280-285.
 14. Park, Y. W., Lim, S. T., Cho, S. J. and Yun, H. D. (1997) Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 endo-1,4- β -glucanase genes and rapid identification of their gene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 636-641.
 15. Teather, M. R. and Wood, P. J. (1982) Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(4), 777-780.
 16. Dickey, R. S. (1979) *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. *Phytopathol.* **69**, 324-329.
 17. Thomson, S. V., Hildebrand, D. C. and Schroth, M. N. (1981) Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugar beet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathol.* **71**, 1037-1042.
 18. Schaad, N. W. (1980) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteriology. Committee of American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 72-90.
 19. Dye, D. W. (1969) A taxonomic study of the genus *Erwinia* II. the '*carotovora*' group. *N. J. J. Sci.* **12**, 81-95.
 20. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, 1984, The William and Wilkins Co., U.S.A
 21. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., 1994, William and Wilkins Co., U.S.A
 22. Mew, T. W., Mew, I. P. and Huang, J. S. (1984) Scanning E. M of virulent and avirulent strains of *X. c. pv. oryzae*. *Phytopathol.* **74**, 635-641
 23. Jones, B. R. (1985) Electron microscopy. Library Research Association Inc, Monroe, New York.
 24. Povin, C., Leclere, D., Tremblay, G., Asselin, A. and Bellemare, G. (1988) Cloning, sequencing and expression of a *Bacillus* bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 241-248.
 25. Park, Y. W. and Yun, H. D. (1999) Cloning of the *Escherichia coli* endo-1,4- β -glucanase gene identification of its products. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 236-241.

Isolation of CMCase Isozymes from Phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* PY35

Sang-Ryeol Park, Soo-Jeong Cho and Han-Dae Yun* (Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea)

Abstract: Soft-rot bacterial pathogen, *Erwinia* sp., was isolated from chinese cabbage tissue showing soft-rot symptom. This bacterial strain caused soft-rot to chinese cabbage and potato, and identified as *Erwinia chrysanthemi* PY35(*Ech* PY35). *Ech* PY35 have extracellular CMCase, pectinase, pectate lyase, and protease activity, but not hemicellulase activity. The results of the microscopy showed that chinese cabbage tissue and potato tissue were macerated by infection of *Ech* PY35. In analysis of the CMCase activity in the total protein of *Ech* PY35, three CMCase were detected as intracellular protein while two CMCase were as extracellular protein by CMC-SDS-PAGE direct stain method.

Key words: *Erwinia chrysanthemi*, pathogenicity, CMCase, CMC-SDS-PAGE

*Corresponding author