

참외 발효과를 유발하는 세균의 동정

최재을* · 차선경 · 김진희 · 육진아 · 황용수 · 권순우¹충남대학교 농업생명과학대학 식물자원학부, ¹농촌진흥청 농업생명공학연구원 유전자원과

Identification of Bacteria Causing Fermentation of Oriental Melon in Korea

Jae-Eul Choi*, Sun-Kyung Cha, Jin-Hee Kim, Jin-Ah Yuk,
Yong-Soo Hwang and Soon-Wo Kwon¹

Division of Plant Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹Genetic Resources Division NIAST Suwon 441-707, Korea

(Received on September 24, 2003)

Bacteria causing fermentation in Oriental melon were identified as three independent groups on the basis of 16S rDNA sequence analysis. The 16S rDNA sequence of the strain CM2105 showed the highest identity (99.6%) with that of *Microbacterium phyllosphaerae*, and also indicated high sequence identity to that of *M. holiorum* (99.5%). The 16S rDNA sequences of the strain CM2101 and CM2121 matched at the high sequence similarity (98.9%, 98.8, respectively), to that of *Pseudomonas pavonacea*, and the DNA sequence of CM2126 showed high sequence identity to that of *P. costantinii* (99.5%), and *P. grimontii* (99.0%). The 16S rDNA sequence of the strain CM2113 showed the highest identity (99.7%) with that of *Enterobacter cloacae*. The 16S rDNA sequences, the physiological and biochemical analysis suggested that the strain CM2105 belonged to *Microbacterium phyllosphaerae*, CM2101, CM2121 and CM2126 to *Pseudomonas* spp., CM2113 to *Enterobacter cloacae*.

Keywords: 16S rDNA, *Microbacterium phyllosphaerae*, “*Pseudomonas pavonacea*”, *P. costantinii*, *Enterobacter cloacae*

참외의 발효과는 겉으로는 건전한 참외와 차이가 없으나 잘라보면 과육에 수침증상을 보이며 불쾌한 냄새가 나고, 혀를 자극할 뿐만 아니라 상품가치를 상실하기 때문에 참외 생산에서 큰 장애요인이 되고 있다. 또한 발효과는 과실을 잘라야만 정확히 장애 발생 여부를 알기 때문에 수확한 과실의 유통에서도 문제가 크므로 이에 대한 대책이 절실히 요구되고 있다.

발효현상은 과실조직의 통기불량으로 생리적 과숙 상태(增井 등, 1954; 增井과 福島, 1955), 칼슘의 부족(五島 등, 1985; 정 등, 1998), 질소과다, 토양수분 과다, 약광조건 및 흡비력이 강한 대목 이용(신 등, 1991), 초세가 강한 대목 이용(박과 정, 1989), 호흡과 증산 부족(서, 1998),

칼리와 질산태 질소의 함량이 높은 토양, Ca/Mg의 비율이 낮은 토양(久保, 1986), 질소질과 칼슘의 함량(東 등, 1985) 등이 발생원인이라고 하였다.

한편, 황(1993), 황과 이(1993)는 발효과의 과육부 및 태좌부 모두 정상과에 비해 알코올 불용성 성분(alcohol insoluble solids : AIS)이 낮아 세포벽 합성이 저하되었거나 가수분해가 증가한 것으로 추정하였다. 이상과 같이 발효과에 관한 연구는 대부분이 발효과가 발생하기 쉬운 조건이나 발효과와 건전과의 성분 차이 등을 밝혔을 뿐이고 발효과의 직접적인 원인은 아직까지 밝혀지지 않았다.

최근에 최 등(2003)은 참외 발효과의 내생세균 밀도를 조사한 결과 건전과는 10^2 cfu/g.fw에 불과하였으나 발효과의 밀도는 10^5 ~ 10^6 cfu/g.fw로 월등히 높았으며, 내생세균의 대부분은 그람음성균으로 이중에서 24%가 참외에 발효증상을 유발하였다고 하였다.

*Corresponding author

Phone)+82-42-821-5729, Fax)+82-42-822-2631

E-mail)choije@cnu.ac.kr

본 연구는 참외의 발효과로부터 분리한 참외 발효과 유발 세균을 동정하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

사용균주. 본 시험에 사용한 세균은 참외 발효과(Fig. 1)에서 분리하여 참외발효과 유발균 중(최 등, 2003)에서 그람음성이고 혐기성 세균(CM2113균주), 그람음성이고 호기성 세균(CM2101, CM2121, CM2126 균주), 그람양성이고 호기성 세균(CM2105 균주)을 선발하여 사용하였다.

세균학적 특성검정. 발효를 유발하는 세균의 세균학적 특성검정은 Schaad(1988) 및 Holt 등(1994)의 방법에 의해 실시하였으며, 속의 특이적 성질은 비교균주에서 사용한 실험법을 사용하였다.

형태적 특성. 세균의 형태적 특성은 King's B agar 배지에서 48시간 배양한 세균을 흑신으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 전자현미경 관찰은 배양세균을 생리식염수로 희석한 후 용액을 carbon-coated copper grid에 옮겨서 0.5% uranyl acetate로 염색한 다음에 TEM(model 912AB ; LEO)으로 관찰하였다.

16S rDNA 영역의 염기서열 분석. 염색체 DNA의 분리는 세균을 King's 배지에 배양한 후, Ausubel 등(1987)의 방법으로 DNA를 분리하였다. 16S rDNA 영역은 universal primers fD1(5'-AGAGTTTGATGGCTCAG-3')과 rP2(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 증폭하였으며(Weisburg 등, 1991), PCR 반응을 위한 시료는 2.5 mM dNTP, 10pmol primer, 2.5unit Taq DNA polymerase(Promega, USA), 5 μ l의 10x buffer(100 mM Tris pH9.0, 50 mM KCl, 10% Triton X-100), 2.5 mM MgCl₂, 50 ng genomic DNA를 멸균수와 잘 섞어 총량을 50 μ l로 한 후 30 μ l의 mineral oil을 첨가하여 조제하였다.



Fig. 1. Comparison of cut surface between sound and disordered 'Gumssarigi' melon fruit (left : sound, middle : mildly affected, right : severely affected).

PCR 반응조건은 (i) 94°C 4분간 denaturation, (ii) 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 3분 35회 반복, (iii) 72°C 10분간이었다.

PCR로 증폭된 16S rDNA 영역의 유전자 단편을 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 재조합한 후 *E. coli*로 형질전환 시켰다. 정제한 plasmid를 primer 16S R-1(TTACGGCGTGGACTACCAGG), 16S R-2(CATTGTAGCACGTGTGTAGC)를 사용하여 sequencing PCR로 증폭하였다. ABI Prism사 3100 sequencer(Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 읽고 DNASTAR Megalign program으로 염기서열을 연결하였다.

본 실험에서 밝혀진 16S rDNA 염기서열은 GeneBank database에 등록된 균주들의 염기서열과 상동성(homology)이 비교되었다. Clustal V 프로그램(Higgins 등, 1988)을 이용해 염기서열을 정렬하고 수작업으로 보정한 다음 Jukes와 Cantor(1969)의 방법을 이용해 evolutionary distance matrix를 산출하였다.

결과 및 고찰

발효과를 일으키는 세균의 형태적 특성. 본 시험에 사용한 CM2101, CM2121, CM2126, CM2105, 균주는 모두 간균의 단극모였으며, CM2113균주는 간균의 주모균이었다(Fig. 2).

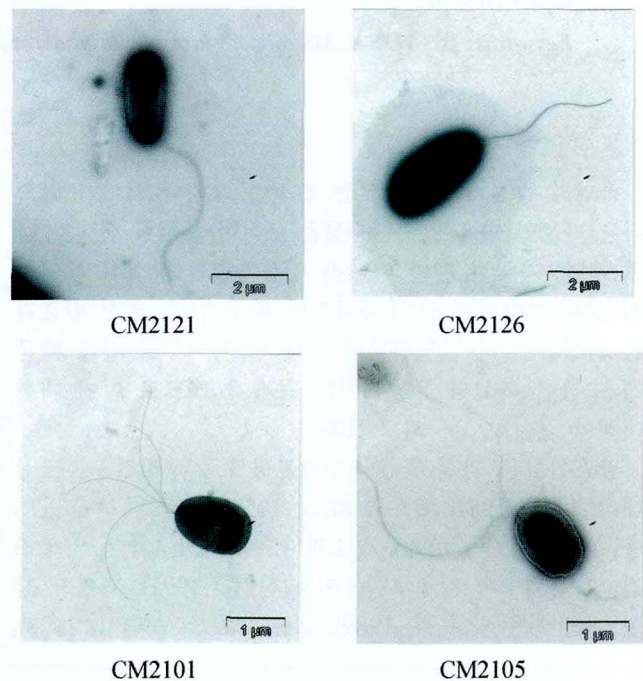


Fig. 2. Scanning electron images of isolated bacteria from fermented melon fruits.

16S rDNA 영역의 염기서열 분석. 6균주에 대한 16S rDNA 영역의 염기서열 분석 결과 CM2113균주는 *Enterobacter* 속, CM2105는 *Microbacterium* 속, CM2101·CM2121 및 CM2126 균주는 *Pseudomonas* 속의 세균과 높은 염기배열 상동성을 나타내었다. CM2105 균주와 *Microbacterium* 속 세균의 16S rDNA 영역의 염기서열 비교해 본 결과, CM2105 균주는 *M. foliorum*, *M. phyllosphaerae*와 각각 99.5%, 99.6%의 높은 상동성을 나타내었으며, *Microbacterium* 속의 다른 종과는 비교적 상동성이 낮았다(Table 1).

CM2101, CM2121, CM2126 균주와 *Pseudomonas* 속 세균의 16S rDNA 영역의 염기서열을 비교해 본 결과 CM2121과 CM2126 균주의 염기서열은 “*P. pavonaceae*”와 각각 98.9%, 98.8%, *P. jessenii*와는 각각 98.9%, 98.7%의 상동성을 보였고, CM2101 균주는 *P. constantinii*, *P. grimontii*와 각각 99.5%, 99.0%의 높은 상동성을 나타내었다. 그러나 *Pseudomonas* 속의 다른 종과는 상동성이 낮아 유연관계가 먼 것으로 나타났다(Table 2).

CM2113 균주와 *Enterobacter* 속 세균의 16S rDNA 영역의 염기서열을 비교한 결과 *E. cloacae*와 99.7%의 높

Table 1. Comparison of the 16s rDNA sequences of CM2105 to that of several strains of *Microbacterium*

| Organism | % 16s rRNA gene sequence similarity | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1. <i>M. testaceum</i> DSM20166 ^T X77445 | 100 | | | | | | | | | |
| 2. <i>M. saperdae</i> IFO15038 ^T AB004718 | 97.2 | 100 | | | | | | | | |
| 3. <i>M. resistens</i> DMMZ1710 ^T Y14699 | 98.1 | 96.9 | 100 | | | | | | | |
| 4. <i>M. phyllosphaerae</i> DSM13468 ^T AJ277840 | 97.8 | 97.5 | 97.8 | 100 | | | | | | |
| 5. <i>M. oxydans</i> DSM20578 ^T Y17227 | 98.1 | 98.0 | 97.6 | 98.2 | 100 | | | | | |
| 6. <i>M. luteolum</i> IFO15074 ^T AB004718 | 97.2 | 98.0 | 97.1 | 97.3 | 97.9 | 100 | | | | |
| 7. <i>M. liquefaciens</i> DSM20638 ^T X77444 | 97.9 | 97.7 | 97.4 | 98.0 | 99.6 | 97.6 | 100 | | | |
| 8. <i>M. keratanolyticum</i> IFO13309 ^T AB004717 | 97.2 | 96.5 | 97.2 | 98.5 | 98.2 | 96.5 | 98.0 | 100 | | |
| 9. <i>M. foliorum</i> DSM12966 ^T AJ249780 | 97.5 | 97.0 | 97.7 | 99.6 | 97.7 | 96.9 | 97.5 | 98.1 | 100 | |
| 10. CM2105 | 98.0 | 97.2 | 98.3 | 99.6 | 97.9 | 97.2 | 97.6 | 98.3 | 99.5 | 100 |

Table 2. Similarities of three isolates, CM2121, CM2126, and CM2101 to several strains of the genus *Pseudomonas* at the 16s rDNA sequences

| Organism | % 16s rRNA gene sequence similarity | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 1. CM2121 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. CM2126 | 99.7 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. CM2101 | 96.4 | 96.2 | 100 | | | | | | | | | | | | | |
| 4. <i>P. extremorientalis</i> KMM3447 ^T (AF405328) | 96.1 | 95.9 | 98.7 | 100 | | | | | | | | | | | | |
| 5. <i>P. constantinii</i> HAMB12444 ^T (AF374472) | 96.4 | 96.3 | 99.5 | 98.6 | 100 | | | | | | | | | | | |
| 6. <i>P. veronii</i> CIP 104663 ^T (AB021411) | 96.3 | 96.1 | 98.7 | 98.2 | 98.7 | 100 | | | | | | | | | | |
| 7. <i>P. synxantha</i> IAM 12356 ^T (D84025) | 97.4 | 97.2 | 98.3 | 97.3 | 98.3 | 98.0 | 100 | | | | | | | | | |
| 8. <i>P. rhodesiae</i> CIP 104664 ^T (AB021410) | 96.3 | 96.1 | 98.9 | 98.2 | 98.6 | 98.6 | 98.1 | 100 | | | | | | | | |
| 9. <i>P. pavonaceae</i> IAM 1155 (D84019) | 98.9 | 98.8 | 95.8 | 95.7 | 96.0 | 95.8 | 96.8 | 95.8 | 100 | | | | | | | |
| 10. <i>P. migulae</i> CIP 105470 ^T (AF074383) | 97.7 | 97.6 | 98.3 | 97.8 | 98.5 | 98.3 | 98.6 | 97.9 | 97.0 | 100 | | | | | | |
| 11. <i>P. libanensis</i> CIP 105460 ^T (AF057645) | 97.7 | 97.5 | 98.6 | 97.6 | 98.5 | 98.1 | 99.6 | 98.3 | 97.0 | 98.9 | 100 | | | | | |
| 12. <i>P. jessenii</i> CIP 105274 ^T (AF068259) | 98.9 | 98.7 | 96.9 | 96.7 | 97.0 | 96.8 | 97.4 | 96.9 | 98.4 | 97.9 | 97.6 | 100 | | | | |
| 13. <i>P. grimontii</i> CFML97-514 ^T (AF268029) | 96.6 | 96.4 | 99.0 | 98.3 | 98.9 | 98.8 | 98.5 | 99.3 | 96.1 | 98.4 | 98.7 | 97.1 | 100 | | | |
| 14. <i>P. gessardii</i> CIP 105469 ^T (AF074384) | 97.7 | 97.5 | 98.5 | 97.5 | 98.4 | 98.1 | 99.5 | 98.2 | 97.0 | 98.9 | 99.8 | 97.5 | 98.6 | 100 | | |
| 15. <i>P. fluorescens</i> IAM 12022 ^T (D84013) | 96.1 | 96.0 | 98.5 | 97.7 | 98.6 | 98.0 | 97.9 | 98.1 | 95.5 | 98.3 | 98.1 | 96.6 | 98.6 | 98.0 | 100 | |
| 16. <i>P. graminis</i> DSM 11363 ^T (Y1115) | 98.0 | 97.8 | 96.2 | 95.6 | 96.4 | 95.8 | 95.9 | 95.3 | 97.0 | 97.2 | 96.2 | 97.5 | 96.0 | 96.2 | 95.8 | 100 |

Table 3. 16s rDNA sequence comparison between the isolate CM2113 and several strains of the genus *Enterobacter*

| Organism | %16s rRNA gene sequence similarity | | | | | | | |
|---|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1. CM2113 | 100 | | | | | | | |
| 2. <i>E. sakazakii</i> JCM1233 ^T AB004746 | 95.5 | 100 | | | | | | |
| 3. <i>E. nimipressuralis</i> LMG10245 ^T Z96077 | 97.0 | 94.9 | 100 | | | | | |
| 4. <i>E. intermedius</i> ATCC33110 ^T AF310217 | 97.7 | 95.3 | 97.6 | 100 | | | | |
| 5. <i>E. dissolvens</i> LMG268 ^T 3 Z96079 | 98.7 | 96.1 | 97.2 | 97.5 | 100 | | | |
| 6. <i>E. cloacae</i> ATCC13047 ^T AJ300553 | 99.7 | 96.2 | 97.2 | 97.6 | 99.6 | 100 | | |
| 7. <i>E. canerpgeus</i> LMG2693 ^T AF299365 | 98.0 | 95.1 | 97.2 | 97.6 | 97.7 | 97.7 | 100 | |
| 8. <i>E. aerogenes</i> NCTC10006 ^T AJ251468 | 97.8 | 95.3 | 97.5 | 98.5 | 97.5 | 97.5 | 98.5 | 100 |

Table 4. Comparison of the characteristics of the isolates from fermented melon with *Microbacterium* members^a

| Characteristics | CM2105 | <i>M. foliorum</i> | <i>M. phyllosphaerae</i> | <i>M. oxydans</i> | <i>M. resistens</i> |
|-----------------------------|----------------|--------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|
| Color of colony | Y ^b | Y | Y | Y | Y |
| Motility | + | + | + | + | - |
| Growth at 37°C | + | d | d | - | + |
| Grow with 2% NaCl | + | + | + | + | + |
| Gelatin hydrolysis | + | - | - | + | + |
| Starch hydrolysis | + | - | + | - | - |
| H ₂ S production | + | - | - | + | - |
| Voges-Proskauer test | - | - | - | - | - |
| Arginine dihydrolase | - | - | - | - | - |
| Assimilation of: Arabinose | + | + | + | - | - |
| N-acetylglucos amine | + | + | + | + | + |
| Citrate | - | d | - | + | + |
| Malate | + | + | + | + | - |
| Phenyl acetate | - | d | d | - | - |
| Acid from glucose | + | + | + | + | + |

^aData were taken from Behrendt *et al.* (2001).

^bY; yellow; +; positive reaction, -; negative reaction, d; reaction differs among strains.

은 상동성을 보였으나, *Enterobacter* 속의 다른 종과는 유연관계가 먼 것으로 나타났다(Table 3).

세균학적 특성. 16S rDNA 영역의 염기서열 분석에서 *M. foliorum* 및 *M. phyllosphaerae*와 염기서열의 상동성이 높은 CM2105 균주의 세균학적 특성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. CM2105 균주는 그람양성 세균으로 노란 콜로니를 형성하고, 운동성을 나타내며, 37°C와 2% NaCl 첨가배지에서 증식하였다. 젤라틴 액화, 전분 분해, arabinose, N-acetylglucosamine, malate의 이용성, glucose로부터의 산 생성은 양성반응을 하였고, V-P 시험, arginine dihydrolase, citrate 이용성은 음성으로 반응하였다.

CM2105 균주의 특성을 *M. foliorum* 및 *M. phyllosphaerae* (Behrendt 등, 2001)의 세균학적 특성과 비교한 결과 *M.*

*foliorum*과는 젤라틴 액화, H₂S gas 생성, 전분분해에서 차이가 있었고, *M. phyllosphaerae*와는 젤라틴 액화와 H₂S gas 생성에서 차이가 있었다. 따라서 발효과를 일으키는 CM2105 균주는 *M. phyllosphaerae*로 동정하였다. *Microbacterium*속 세균은 작물이나 목초 등에 널리 분포되어 있으며, *M. foliorum*과 *M. phyllosphaerae*는 목초의 염균(Behrendt 등, 2001)에서 분리된 신종이다.

16S rDNA 염기분석에서 *Pseudomonas* 속으로 구분된 CM2101, CM2121, CM2126 균주의 세균학적 특성은 Table 5와 같다. "*P. pavonaceae*"와 *P. jessenii*의 16S rDNA와 98.9%의 염기상동성을 나타낸 CM2121균주는 4°C에서 생장, gelatin 액화, L-arabitol, L-arabinose, D-trehalose, D-xylose, D-saccharate, D-mannose, D-alanine, D-galactose,

sucrose 이용성은 양성반응을 나타냈고, 41°C에서의 생장, levan 생산, adonitol, meso-erythritol, xylitol, D-sorbitol 이용성은 음성반응을 나타냈다. 이러한 특성을 “*P. pavonaceae*”와 *P. jessenii*의 세균학적 특성을 비교한 결과 levan 형성, gelatin 액화, L-arabinose, D-trehalose, sucrose 이용성 등에서 서로 일치하지 않아 종의 동정이 곤란하였다.

P. costantinii, *P. grimontii*와 각각 99.5%와 99.0%의 염기상동성을 나타낸 CM2101 균주는 gelatin 액화, 4°C에서 생장, myo-inositol, L-arabinose, D-saccharate, L-histidine, D-mannose, D-galactose, sucrose, L-arabinose 이용성은 양성반응을 나타냈고, 41°C에서의 생장, levan 생산, meso-erythritol, adonitol, xylitol, D-sorbitol 이용성은 음성반응을 나타냈다. 이러한 특성을 *P. costantinii*(Munsch 등, 2002)의 세균학적 특성과 비교한 결과, meso-erythritol, xylitol, L-histidine, D-sorbitol 이용성에서 차이가 있었다. *P. grimontii*의 세균학적 특성을 비교한 결과, 젤라틴 액화, L-arabinose, D-saccharate, adonitol, L-histidine, xylitol, sucrose 이용성에서 차이가 있었다. 이와 같이 CM2126 균주는 *P. costantinii*, *P. grimontii*의 16S rDNA의 염기서

열과 상동성은 높았으나 세균학적 특성에서는 상반되는 특성이 많아 본 연구 결과만으로는 CM2101 균주의 종 동정은 곤란하였다.

*P. pavonaceae*와 *P. jessenii*의 16S rDNA와 각각 98.8%, 98.7%의 상동성을 나타낸 CM2126 균주의 세균학적 특성은 4°C에서 생장, L-arabinose, D-trehalose, D-xylose, D-saccharate, D-mannose, D-galactose, sucrose, L-arabinose 이용성은 양성반응, 41°C에서의 생장, levan 생산, gelatin 액화, meso-erythritol, adonitol, L-histidine, xylitol, D-sorbitol 이용성은 음성반응을 나타냈다. 이러한 특성을 “*P. pavonaceae*”와 *P. jessenii*의 세균학적 특성을 비교한 결과 levan 형성, gelatin 액화, L-arabinose, D-trehalose 이용성 등에서 서로 일치하지 않았다. CM2126 균주와 16S rDNA의 염기서열의 상동성이 각각 96.1%, 97.5, 96.3%인 *P. veronii*, *P. libanensis*, *P. costantinii*의 세균학적 특성과 비교한 결과 levan 형성, meso-erythritol, adonitol, xylitol, D-sorbitol 이용성 등에서 일치하지 않았다. 이와 같이 CM2126 균주는 “*P. pavonaceae*”와 *P. jessenii*의 16S rDNA의 염기서열과 상동성은 높았으나 세균학적 특성에

Table 5. Comparison of the characteristics of the isolates from fermented melon with *Pseudomonas* members^a

| Characteristic | CM2101 | CM2121 | CM2126 | PP ^b | PJ | PV | PL | PC | PG |
|-------------------------------|--------|--------|--------|-----------------|----|----|----|----|----|
| Growth at 4 | + | + | + | + | + | + | + | | + |
| Growth 41 | - | - | - | - | - | - | - | | - |
| Production of levan | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| Gelatin liquefaction | + | + | - | - | - | d | - | + | - |
| Assimilation of: myo-Inositol | + | + | + | d | | + | + | + | + |
| L-Arabinose | + | + | + | - | | + | + | + | + |
| D-Trehalose | + | + | + | - | | d | d | + | - |
| D-Xylose | + | + | + | + | | + | + | + | + |
| D-Saccharate | + | + | + | | | | + | + | + |
| meso-Erythritol | - | - | - | | | + | + | + | - |
| Adonitol | - | - | - | | | - | + | + | + |
| L-Histidine | + | | - | | | d | - | - | - |
| Xylitol | - | - | - | | | | + | + | - |
| D-Mannose | + | + | + | | | + | + | + | + |
| D-Alanine | | + | | - | | + | + | + | + |
| D-Sorbitol | - | - | - | - | | + | + | + | - |
| D-Galactose | + | + | + | | | + | + | + | d |
| Sucrose | + | + | + | - | | + | - | d | + |
| L-Arabitol | + | + | + | | | - | + | + | - |

^aData were taken from Poelarends *et al.* (2001), Poelarends *et al.* (1998), Kwon *et al.* (2003), Munsch *et al.* (2002), Dabboussi *et al.* (1999), Eloomari *et al.* (1996) and Baïda *et al.* (2002).

^bPP, *P. pavonaceae*, PJ; *P. jessenii*, PV; *P. veronii*, PL; *P. libanensis*, PC; *P. costantinii*, PG; *P. grimontii*.

^c+, positive reaction, -, negative reaction, d, reaction differs among strains.

Table 6. Comparison of the characteristics of the isolates from fermented melon with *Enterobater* members

| Characteristic | CM2113 | <i>E. cloacae</i> | <i>E. dissolvens</i> | <i>E. intermedius</i> | <i>E. nimipressuralis</i> | <i>E. sakazakii</i> | <i>E. aerogenes</i> |
|---------------------------------|--------|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| Indoel production | - | - | - | - | - | - | - |
| Methly red | - | - | - | + | - | - | - |
| Urea hydrolysis | - | d | + | - | - | - | - |
| Arginine dihydrolase | - | + | + | - | + | + | - |
| Motility | + | + | + | + | + | + | + |
| Malonate utilization | | d | + | + | + | - | + |
| Gas production from D-glucose | + | + | + | + | + | + | + |
| Acid production from D-adonitol | | d | - | - | - | - | + |
| myo-Inositol | + | d | d | - | - | - | + |
| Melibiose | + | + | + | + | + | + | + |
| Voges-proskauer | + | + | + | + | + | + | + |
| Gelatin hydrolysis | - | - | - | - | + | - | - |

^aData were taken from Holt *et al.* (1994).

^b +; positive reaction, -, negative reaction, d; reaction differs among strains.

서는 상반되는 특성이 많아 본 연구 결과만으로는 CM2121 균주의 종 동정은 곤란하였다.

CM2121균주와 16S rDNA의 염기서열의 상동성이 각각 96.3%, 97.7%, 96.4%인 *P. veronii*, *P. libanensis*, *P. constantinii*의 세균학적 특성과 비교한 결과 levan 형성, meso-erythritol, D-mannose, D-sorbitol 이용성 등에서 일치하지 않았다. 따라서 본 연구 결과만으로는 CM2121균주의 종 동정은 곤란하였다. CM2121 균주와 CM2126 균주는 Table 2와 5에서와 같이 16S rDNA의 염기서열이 99.7%의 상동성을 갖고 있고 세균학적 특성이 서로 일치함으로 동일한 종으로 판단되었다.

이상과 같이 *Pseudomonas* 속으로 판정된 CM2101, CM2121, CM2126 균주는 본 연구 결과만으로 종의 판정이 어려웠다. 이들 균주는 신종의 가능성이 높거나 다른 *Pseudomonas* 종으로 추정되므로 보다 정밀한 연구가 요구된다.

최근에 *Pseudomonas*속 세균이 의학, 식품, 환경미생물 및 식물병리학에서 중요성이 증가되면서 천연수에서 *P. veronii*(Elomari *et al.* 1996), *P. grimontii*(Baida *et al.* 1996), 버섯에서 *P. constantinii*(Munsch, 2002), 토양에서 *P. jinjuensis*(Kwon 등, 2003) 신종의 *Pseudomonas*속이 분리되었으며, 이러한 세균종에는 식물에 병원성을 갖는 세균이 포함될 수 있으므로 병원성 등의 검토도 필요할 것으로 생각된다.

*E. cloacae*와 99.7%의 염기상동성을 나타내는 CM2113 균주의 세균학적 특성을 조사한 결과 malonate 이용성, D-glucose로부터 gas 생산, 운동성, myo-inositol과 melibiose

로부터의 산생성 및 Voges-proskauer 반응은 양성, 인돌생산, methyl red, urease hydrolysis, arginine dihydrolase, D-adonitol로부터의 산 생성은 음성반응을 나타냈다. 이러한 특성을 *E. cloacae*의 세균학적 특성과 비교한 결과 arginine dihydrolase 생성 이외의 특성은 잘 일치하므로 M2113 균주를 *E. cloacae*로 동정하였다.

이와 같이 참외 발효과를 유발하는 세균은 토양, 물 또는 식물체에서 서식하는 균과 동일하거나 유사한 세균으로 동정되었으므로 참외발효를 유발하는 세균은 이러한 환경에 서식하는 세균이 참외로 침입하여 내생균으로 잠복하였다가 참외의 저항성이 약화되거나 세균의 증식조건이 좋아지면 급속히 증식하여 발효과를 유발할 것으로 추정된다.

요 약

참외의 발효과를 유발하는 세균은 16S rDNA 염기분석에 의해 3 group으로 분류되었다. CM2105균주의 16S rDNA 염기서열은 *Microbacterium phyllosphaerae*의 염기서열과 99.6%의 높은 상동성을 나타냈고, *M. holiorum*과도 99.5%의 높은 상동성을 나타냈다. CM2101과 CM2121 균주의 16S rDNA 염기서열은 "*P. pavonaceae*"와 각각 98.9%, 98.8, CM2126균주는 *P. constantinii*와 99.5%, *P. grimontii*와 99.0%의 높은 상동성을 나타냈다. CM21131 균주의 16S rDNA 염기서열은 *Enterobacter cloacae*와 99.7%의 높은 상동성 나타냈다. 검정균주의 생리적, 생화학적인 특성과 16S rDNA의 염기분석에 따라 CM2105 균

주는 *M. phyllosphaerae*, CM2101, CM2121, CM2126 균주는 *Pseudomonas* spp., 그리고 CM2113 균주는 *E. cloacae*로 동정하였다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단 목적기초연구지원사업(105005) 및 농촌진흥청 농업과학기술원 지원과제로 수행된 논문이다. 이 연구를 수행하도록 연구비를 지원해주신 한국과학재단과 농촌진흥청 농업과학기술원에 심심한 감사를 드린다.

참고문헌

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sediman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.(eds). 1987. Current protocols in molecular biology 1~5. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. New York, USA.
- Baïda, N., Yazourh, A., Singer, E. and Izard, D. 2002. *Pseudomonas grimontii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52: 1497-1503.
- Behrendt, U., Ulrich, A. and Schumann, P. 2001. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke *et al.* 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51: 1267-1276.
- 최재을, 차선경, 김진희, 육진아, 황용수. 2003. 이상발효 참외로부터 분리한 내생세균의 특성 및 발효증상 유기. *한국원예학회지* 44: 292-296.
- 정희돈, 윤선주, 최영준. 1998. CaCl₂의 엽면처리가 참외의 이상 발효과 발생억제 및 과실성분에 미치는 영향. *한국원예과학기술지* 16: 215-218.
- Dabboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baïda, N., Izard, D. and Leclerc, H. 1999. *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1091-1101.
- Elomari, M., Coroler, L., Hoste, B., Gillis, M. Izard, D. and Leclerc, H. 1996. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1138-1144.
- 五島一成, 官崎孝, 岡野剛建. 1985. プリンスメロンの醱酵果の發生要因解析と改善對策. 長崎縣綜合農林試驗場研究報告 13. 57pp.
- Higgins, D. G. and Sharp, P. M. 1988. Clustal : a package for performing multiple sequence alignment on a computer. *Gene.* 73: 237-244.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (eds). 1994. Facultively anaerobic gram-negative rods. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 175-289. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- 황용수. 1993. 이상 발효 참외의 세포벽 특성. *한국원예학회지* 34: 273-278.
- 황용수, 이재창. 1993. 이상발효 참외의 생리적 특성. *한국원예학회지* 34: 339-343.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In: N. Munro(ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, USA.
- 久保研一. 1986. プリンスメロンの異常醱酵果に關する研究. 熊本縣農業試驗場研究報告 11(別刷): 1-42.
- Kwon, S. W., Kim, J. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Park, D. H., Lim, C. K. and Go, S. J. 2003. *Pseudomonas korënsis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 21-27.
- 増井五夫, 福島與平. 1955. メロン果實の呼吸について(續報). 静岡大學農學部研究報告 5: 35-39.
- 増井正夫, 福島與平, 鈴木實. 1954. メロン果實の呼吸について. 静岡大學農學部研究報告 4: 24-27.
- 東隆夫, 小川芳久, 久保研一, 大田讓一. 1985. プリンスメロンの異常醱酵果防止對策. 熊本縣農業試驗場研究報告 9: 47-63.
- Munsch, P., Alatosava, T., Martinen, N., Meyer, J. M., Christen, R. and Gardan, L. 2002. *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent to brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52: 1973-1983.
- 박재영, 정희돈. 1989. 대목의 종류가 참외의 생장, 과실의 품질 및 수량에 미치는 영향. *한국원예학회지*. 30: 262-270.
- Poelarends, G. J., Saunier, R. and Janssen, D. B. 2001. *trans*-3-Chloroacrylic acid dehalogenase from *Pseudomonas pavonaceae* 170 shares structural and mechanistic similarities with 4-oxalocrotonate tautomerase. *J. Bacteriol.* 183: 4268-4277.
- Poelarends, G. J., Wilkens, M., Larkin, M. J., van Elsas, J. D. and Janssen, D. B. 1998. Degradation of 1,3-dichloropropene by *Pseudomonas cichorii* 170. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2931-2936.
- Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. *Bacteriol. Commit. Amer. Phtopath. Soc. St. Paul. Minn. USA.* 164pp.
- 서동환. 1998. 칼슘, 질소부족 및 생장조절제 처리가 참외발효과 발생에 미치는 영향. 경북대학교 박사학위논문. 123pp.
- 신관용, 정천순, 유근창. 1991. 생육온도, 광도 및 착과절위가 참외의 당축적 및 발효과발생에 미치는 영향. *한국원예학회지* 32: 440-446.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.