

양파 부패병변에서 분리한 세균의 특성

이찬중 · 임시규¹ · 김병천¹ · 박 완^{1*}

농업과학기술원 응용미생물과, ¹경북대학교 미생물학과

Characterization of Bacteria Isolated from Rotted Onions (*Allium cepa*). Lee, Chan-Jung, Si-Kyu Lim, Byung-Chun Kim, and Wan Park^{1*}. Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea, ¹Department of Microbiology, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea – One hundred thirty nine bacteria were isolated from rotten onions collected from main producing districts, Chang-Nyung, Eui-Ryung, and Ham-Yang in Korea. The 18% (25 strains) of bacterial isolates have carboxymethylcellulase (CMCase) activity and the 53% (74 strains) have polygalacturonase (PGase) activity. Thirty one among randomly selected 45 strains of PGase producing bacteria have pathogenicity to onions. The isolates were classified into *Pseudomonas* sp. (18 strains), *Bacillus* sp. (11 strains), *Yersinia* sp. (7 strains), and others (9 strains) on the basis of FAMES patterns. Eighteen strains of *Pseudomonas* sp. were mainly divided into three cluster in the dendrogram and only the two clusters of them showed pathogenicity to onions. CMCase and PGase activities of *Pseudomonas* sp. weaker than those of *Bacillus* sp.. However, the pathogenicity of *Pseudomonas* sp. to soften onions was stronger than that of *Bacillus* sp. Inoculation of 10² cfu of *Pseudomonas* sp. gives rise to softening of onions. *Pseudomonas* sp. was identified as *Pseudomonas gladioli* by biochemical and physiological characteristics. *P. gladioli* is the first reported bacterium as a pathogen of onion in Korea. In low temperature, *P. gladioli* showed better growth and higher PGase activity than those of *Bacillus* sp. identified as *Bacillus subtilis*. And pH 9.0 is optimal pH for PGase activity of *B. subtilis* while that of *P. gladioli* is pH 5.0~6.0 which is the acidity of onions. Taken together, *P. gladioli* may be a main pathogene of onion rot during the cold storage condition.

Key words: Onion, rotted onion, CMCase, PGase, pathogenicity, *Pseudomonas gladioli*

양파는 저장하는 동안 맵아, 발근 및 위조에 의해서도 상품가치의 저하가 일어나지만 20~50%에 이르는 부패에 의한 피해가 가장 심각하다[15, 23]. 이러한 부패 방지를 위해서는 정확한 원인 규명이 필요하다. 양파의 부패는 품종, 수확기, 양파의 상태 등 여러 요인에 의해 영향을 받지만 근본적으로는 병원균 내지 부패균의 감염증식이 그 직접적인 원인이다. 양파 부패균으로 *Botrytis*속, *Fusarium*속, *Penicillium*속, *Sclerotium*속 및 *Aspergillus*속 등[1, 6, 16, 17]의 곰팡이와 *Erwinia*속, *Pseudomonas*속 등[3, 5, 8, 12, 21, 27]의 세균이 주로 알려져 있다.

일반적으로 식물 병원성 미생물의 감염 첫 단계는 숙주 식물의 조직을 분해하는 효소의 생산으로 시작된다고 알려져 있지만[4], 식물의 병 발생뿐만 아니라 수확 후 과실, 소재의 연화나 부패과정에도 이들 효소가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[2, 9, 11, 13, 14]. 식물조직은 세포벽 및 중간라멜라층을 구성하는 섬유소와 펙틴질을 주성분으로 이루어

져 있어 섬유소 분해효소 cellulase와 펙틴질 분해효소 등이 병원성, 부패와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다 [7,10].

이 연구에서는 양파 부패세균의 미생물학적 특성을 규명하기 위하여 양파 부패세균의 cellulase와 pectinolytic enzyme의 활성을 조사하고 부패 활성과 상관관계를 살펴본 것이다. 그리고 다양하고 넓은 범위에 걸쳐서 분리된 많은 수의 부패 세균에 대한 미생물학적 정보를 얻기 위해서는 다수의 균을 신속하게 특징화하여 분류할 수 있는 방법이 필요하게 된다. 지금까지 형태적, 생리, 생화학적 실험을 통하여 양파 부패 세균으로 특성의 몇몇 세균(*Pseudomonas*, *Erwinia* 등)이 분리 동정된 적은 있으나[3, 5, 8, 12] 부패된 양파로부터 분리된 많은 수의 균을 집단적으로 취급하여 분석한 보고는 볼 수 없었다. 우리는 부패 양파로부터 분리된 다수의 균주를 대상으로 자동화된 가스크로마토그래피를 이용하여 세포의 fatty acid methyl esters profile(FAMES)의 정량적 분석[20, 25]을 통해 부패세균을 신속하게 특징화하여 분류하고, 이들의 생리 효소학적 특성과 부패활성과의 상관관계를 살펴보았다.

*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5376, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: celllife@mail.knu.ac.kr

재료 및 방법

배지 및 배양

부패 양파로부터 균의 분리 및 보존에는 nutrient agar (0.3% beef extract, 0.5% peptone, 1.5% agar; pH 7.0) 배지를 사용하였으며, 액체 파라핀 증층법으로 보존하였다. 균의 생육도 측정 및 효소 생산용 배지는 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% NaCl, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.1% K₂HPO₄, pH 7.0에 1% carboxymethylcellulose(CMC) 또는 polygalacturonic acid를 첨가한 액체배지를 사용하였다. 균의 배양은 30°C에서 36시간 동안 150 rpm으로 진탕배양하였다. 균의 생육도는 660 nm에서 흡광도로 측정하였으며 필요할 경우 배양액을 회수하였다. 양파를 이용한 효소생산을 위해 양파 100 g을 잘게 썰어 1% sodium hypochloride에 2분간 침지 후 멸균 증류수로 수회 세척 후 물기를 제거한 다음, 하룻밤 배양한 균액 5 mL를 양파에 접종하여 30°C에서 7일간 배양하였다.

부패균의 분리 및 분류 동정

수집한 부패양파의 병환부를 도려내어 멸균수로 3~4회 씻어 낸 다음 소량의 멸균수중에서 파쇄한 후 단계적으로 희석하여 nutrient agar 평판배지를 사용하여 양파 부패 세균을 순수분리 하였다.

전 세포의 지방산 조성에 의한 분류 동정은 Miller의 방법[20]에 따라 분리된 지방산을 fatty acid methyl esters (FAMES) 분석으로 분류하였다. FAMES는 25 mm × 0.2 mm의 methyl phenyl silicone fused silica capillary column을 사용하여 gas chromatography로 분석하였다. 유사성은 Euclidean distance로 표현하였고 clustering은 UPGMA법[24]을 이용하였다. 분리된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[22]에 따라 배양학적 생리학적 특성을 검정하거나, Biolog(Biolog Inc., Hayward, CA, USA) 또는 Vitek(Biomerieux Vitek Inc., Hazelwood) 동정 시스템을 병용하였다.

양파 부패 활성 검정

Nutrient agar 평판배지에서 48시간 배양한 세균을 다양한 농도가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다. 건전한 양파절편을 1% sodium hypochloride에 2분간 침지 후 멸균증류수로 수회 세척하여 물기를 제거하고 침으로 상처를 낸 후 세균현탁액 0.2 mL를 접종하였고, 또 건전한 양파의 경우 내부 및 바깥인편에 세균 현탁액 1 mL를 일회용 주사기로 접종하였다. 접종한 시료는 멸균상자에 넣어 30°C의 정온기에 정치 후 1~7일간 부패 여부를 육안으로 조사하였다. 대조구는 멸균증류수를 동일 양 사용하였다.

효소 활성측정

효소 생산 배지에서 각각의 균을 배양한 배양액을 원심분리에 의해 균체를 제거하고 그 상청액을 효소원으로 사용하였다. 양파 배지에 접종한 경우는 배양된 양파 절편을 빙냉하에 2분간 균질기로 마쇄한 후 4°C, 12,000×g, 10분간 원심분리한 후 그 상청액을 회수하여, 그 10배 용량의 20 mM

Table 1. Enzyme activities and pathogenicity of bacteria isolated from rotten onion.

Strain	CMCase activity ^a	PGase activity ^b	Pathogenicity ^c
<i>Bacillus</i> sp. OB-02	0.070	3.314	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-03	0.119	0.320	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-60	0.526	3.37	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-72	0.844	3.14	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-76	0.823	2.18	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-87	0.789	3.089	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-89	0.840	3.531	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-90	0.711	2.876	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-91	0.812	2.688	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-98	0.631	3.641	+
<i>Bacillus</i> sp. OB-138	-	0.528	+
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-01	-	0.343	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-04	-	0.114	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-24	-	0.315	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-35	-	0.408	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-44	-	0.148	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-50	-	0.187	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-59	-	0.320	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-67	-	0.275	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-92	-	0.321	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-19	0.070	0.140	-
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-22	0.052	0.096	-
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-102	0.101	0.308	-
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-104	0.053	0.213	-
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-128	0.007	0.366	-
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-133	0.193	0.291	+
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-122	-	0.122	++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-124	-	0.182	++
<i>Pseudomonas</i> sp. OB-08	-	0.366	-
<i>Comamonas</i> sp. OB-132	-	0.193	+
<i>Yersinia</i> sp. OB-33	0.007	0.042	+
<i>Yersinia</i> sp. OB-62	-	0.072	+
<i>Yersinia</i> sp. OB-63	0.011	0.492	+
<i>Yersinia</i> sp. OB-117	-	0.593	+
<i>Yersinia</i> sp. OB-71	-	0.299	+
<i>Yersinia</i> sp. OB-74	0.062	0.196	-
<i>Yersinia</i> sp. OB-113	0.001	0.063	-
<i>Erwinia</i> sp. OB-134	-	0.120	++
<i>Klebsiella</i> sp. OB-86	-	0.186	+
<i>Kluyvera</i> sp. OB-137	-	-	-
<i>Stenotropomonas</i> sp. OB-20	-	0.652	-
<i>Stenotropomonas</i> sp. OB-140	-	0.049	-
<i>Micrococcus</i> sp. OB-10	0.047	0.238	-
<i>Rahnella</i> sp. OB-135	-	0.034	-
<i>Agrobacterium</i> sp. OB-61	-	0.528	-

^aAbsorbance at 540 nm. ^bAbsorbance at 530 nm. ^c+++; strong, ++; week, -; none.

sodium phosphate buffer(pH 7.2)로 4°C에서 2시간씩 4회 투석하여 양파고유의 당 성분을 제거하였다. 투석 후 불용성 물질은 원심분리로 제거한 후 효소액으로 사용하였다.

섬유소 분해 효소(CMCase) 활성은 CMC를 기질로 하여 측정하였다. 1% CMC 용액 0.5 mL와 200 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.25 mL를 효소액 0.25 mL와 혼합하여 50°C에서 15분간 반응시킨 후 유리되는 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)와 반응시켜 540 nm에서 흡광

도로 측정하였다[19]. 펙틴질 분해효소 polygalacturonase (PGase) 활성은 polygalacturonic acid를 기질로 하여 측정하였다. 0.5% sodium polygalacturonic acid 용액 0.5 mL와 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.0) 0.25 mL, 효소 0.25 mL를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 환원당을 DNS법으로 정량하였다[18]. 효소 반응의 대조구는 100°C에서 10분간 가열한 효소를 사용하였고, 효소의 상대활성은 흡광도 값으로 비교하였다. 최적 pH를 조사하기

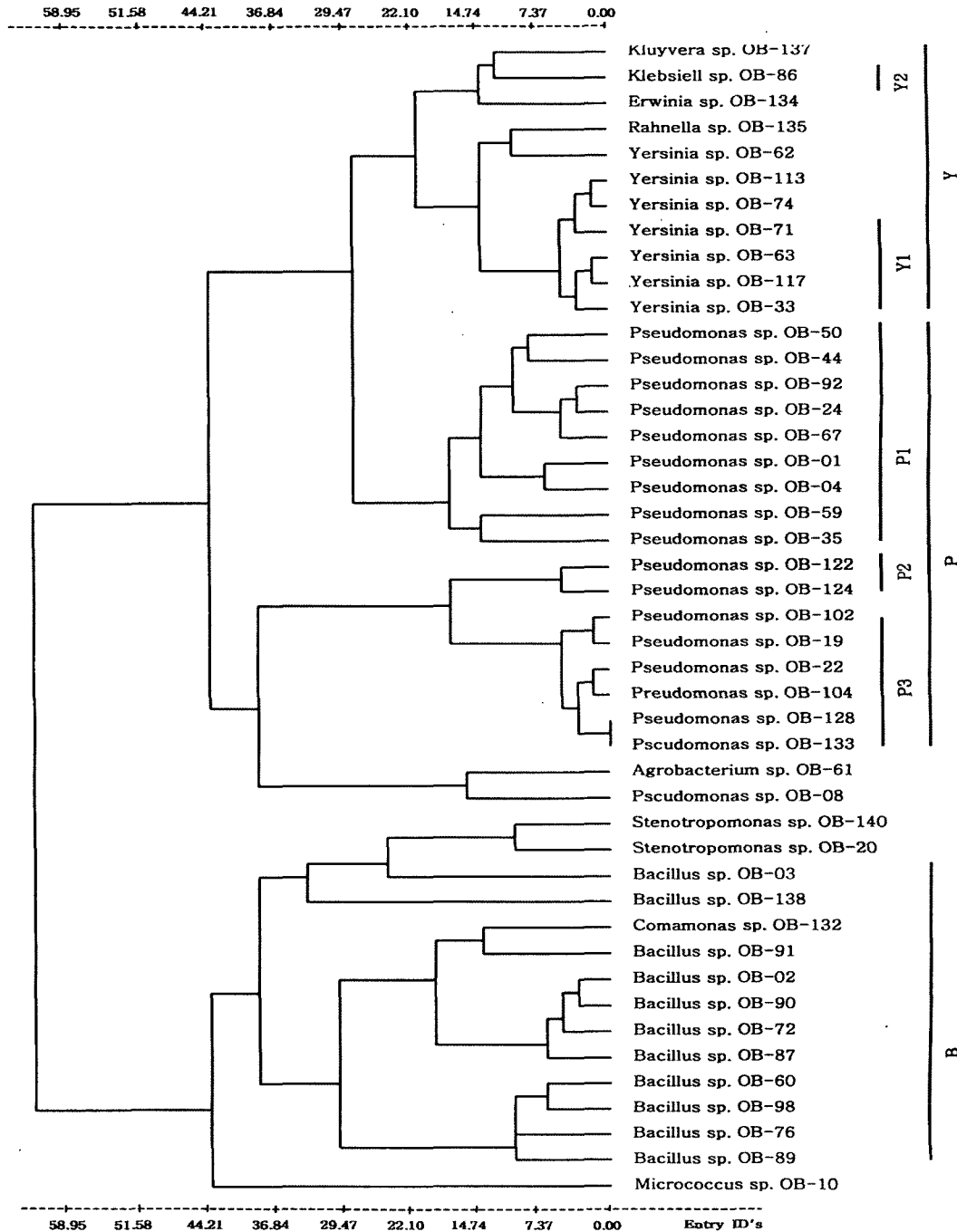


Fig. 1. Dendrogram of isolates by fatty acid methyl esters analysis. B, Bacillus group; P, Pseudomonas group; Y, Yersinia group.

위해 pH에 따른 완충액의 종류를 달리하였다. pH 3.0은 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 4.0~6.0은 0.2 M succinic acid-NaOH buffer, pH 6.0~8.0은 Tris-malate-NaOH buffer, pH 8.0~9.0은 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 10.0은 0.2 M KCl-H₃BO₃ buffer, pH 11.0은 0.1 M Glycine-NaOH buffer를 사용하였다.

결과 및 고찰

양파 부패 세균의 분리 및 특징화

우리나라 양파 주산지인 경남 창녕, 의령, 함양 등에서 수집한 부패 양파로부터 139 균주의 세균을 독립적으로 분리하였다. 이들 분리 균주로부터 식물조직의 연화, 부패에 관여하는 것으로 알려진 CMCase, PGase의 생산능을 조사하였다(Table 1). 그 결과 CMCase 활성을 가진 균주는 25 균주, PGase 활성을 가진 균주는 74 균주로 분리 균주의 반수 이상이 PGase 활성을 가지고 있었다. 이들 다수의 균주를 신속하게 분류 동정하기 위하여 PGase를 생산하는 균주를 중심으로 45 균주를 선별하여 세포의 지방산 조성을 분석하는 FAMES법으로 조사한 결과 *Bacillus*속(11주), *Pseudomonas*속(18주), *Yersinia*속(8주), 기타 (8주)로 동정되었으며, 대체적으로 같은 속끼리 크게 4 그룹으로 묶을 수 있었다(Fig. 1).

*Pseudomonas*속은 예상대로[5, 8] 우선종(우점종)으로 나타나고 대표적인 토양세균의 하나인 *Bacillus*속도 다수 분리되었으나 *Pseudomonas*와 함께 양파 부패 세균의 또 하나 주요 원인균으로 알려진 *Erwinia*속[21]은 분리되지 않았는데 이들 균주에 대해서는 더욱 면밀한 조사가 필요할 것으로 생각된다.

분리균의 부패활성

이들 45 균주를 대상으로 양파 부패활성을 조사한 결과 31 균주가 부패활성을 나타냈다(Table 1). CMCase와 PGase 활성이 높은 *Bacillus*속 균주들은 예상과는 달리 양파 부패활성은 약하게 나타났다. *Pseudomonas*속 균주들은 *Bacillus*속 균주에 비해 전체적으로 PGase활성은 훨씬 약했으나 아주 강한 부패활성을 나타내었으며, 아직 이유는 알 수 없으나 CMCase를 약하게나마 생성하는 *Pseudomonas*속 균주들은 부패활성이 없는 흥미 있는 결과를 얻었다. *Yersinia*속으로 분류된 균들은 대개 약한 부패활성을 나타내었다. 양파 부패 병변으로부터 PGase 생성 균주가 CMCase 생성 균주보다 훨씬 많이 분리되는 사실은 펙틴질을 주성분으로 하는 식물 조직의 중간 라멜라층의 분해가 섬유소를 주성분으로 하는 식물세포벽 분해보다도 더 밀접하게 부패와 관련이 있는 것으로 생각된다. 그러나 PGase의 활성이 *Pseudomonas*속에 비해 10여배나 높은 *Bacillus*속의 부패활성이 훨씬 낮은 것은 그람 양성, 음성균의 차이에 따른 효소의 분비능의

차이를 반영한 것인지[28], exo 또는 endo형[29]으로 기질을 분해하는 효소의 작용양식의 차이인지, 아니면 다른 미지의 부패성 인자의 존재 여부 때문인지는 앞으로 더욱 연구해야 할 과제로 생각된다. 이들 균주들의 부패양상을 보면, *Bacillus*속 균주들은 조직의 연화를 일으키지 않으면서 조직을 갉아먹듯이 병반부위가 움푹 패인 양상을 보이며, *Pseudomonas*속의 경우 양파 전체를 연화시켜 완전히 물렁하게 만드는 것을 볼 수 있었다(자료 미제시). 실제 저온 저장 중에 일어나는 양파 부패 양상의 대부분은 *Pseudomonas*에 의해 일어나는 양상과 같게 나타난다. *Yersinia*속의 경우는 활성은 약하지만 *Pseudomonas*와 비슷하였다. *Pseudomonas*속의 경우 부패 활성이 강하여 약 10² cfu 정도만 접종하여도 병증을 유발하였다(자료 미제시).

FAMES에 의한 dendrogram상에서 *Pseudomonas*속의 경우 부패활성 유무에 따라 묶여졌다(Fig. 1). P1, P2 그룹은 강한 부패활성을 나타냈고, 부패활성이 없는 P3은 다른 그룹으로 묶여졌다. 이러한 결과는 자연계로부터 분리되는 미지의 많은 수의 균들의 신속한 특징화 내지 그 부패균의 동정법으로 FAMES 분석은 효과적인 방법으로 생각된다.

분리균의 생육 및 효소학적 특성

P1 그룹의 *Pseudomonas* sp. OB-01과 *Bacillus* sp. OB-89 균주를 선택하여 이들의 동정과 생육 특성을 조사하였다.

Table 2. Biochemical, morphological, and cultural characteristics of *Pseudomonas gladioli* and OB-01 isolate.

Characteristics	Isolate OB-01	<i>Pseudomonas gladioli</i> ^b
Cell shape	short rod ^a	short rod
No. of flagella	3	>1
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Fluorescent pigment	-	-
Gram reaction	-	-
Growth at 4°C	-	-
41°C	+	+
P. H. B accumulation	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Denitrification	-	-
Utilization of :		
D-xylose	+	+
L-Rhamnose	-	-
Levulinate	+(late)	+(late)
Mesaconate	+	+
D(-)-Tartrate	+	+
2,3-Butylene glycol	-	-
m-Hydroxybenzoate	-	-
Tryptamine	-	-
α-Amylamine	-	-

^a+ : Positive reaction; - : Negative reaction

^bDetails of *Pseudomonas gladioli* were as described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Table 3. Biochemical, morphological, and cultural characteristics of *Bacillus subtilis* and OB-89 isolate.

Characteristics	Isolate OB-89	<i>Bacillus subtilis</i> ^b
Gram reaction	+ ^a	+
Endospore	+	+
Motility	+	+
Oval spore	+	+
Flagella	-	-
Catalase	+	+
Anaerobic growth in glucose broth	-	-
Utilization of citrate	+	+
Hydrolysis of starch	+	+
gelatin	+	+
Acid from D-glucose	+	+
L-arabinose	+	+
D-xylose	+	+
D-mannitol	+	+
Growth at 5°C	-	-
20°C	+	+
40°C	+	+
55°C	-	-
Growth at pH 5.7	+	+
Growth in 2% NaCl	+	+
5% NaCl	+	+
7% NaCl	+	+

^a + : Positive reaction; - : Negative reaction

^b Details of *Bacillus subtilis* were as described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

이들의 형태 및 생리·생화학적인 특성을 통하여 OB-89 균주는 *B. subtilis*로(Table 2), OB-01은 *P. gladioli*로 동정되었다(Table 3). *P. gladioli*는 양파 부패의 주요 원인균으로 외국에서의 보고는 있으나[26], 국내에서의 분리 동정은 처음으로 생각된다.

배양온도에 따른 균의 생육을 조사한 결과 *B. subtilis* OB-89는 비교적 고온 부위(최적 생육 온도, 37°C)에서, *P. gladioli* OB-01은 저온(최적 생육 온도, 27-32°C)에서 생육이 양호하였다(Fig. 2). 또 이들이 생산하는 효소의 작용 온도는 Fig. 3에서 보는 것처럼 *Bacillus*의 경우 CMCase는 비교적 넓은 온도 범위에서 활성을 나타냈으나, 양파 부패에 보다 더 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되는 PGase는 높은 온도에서 활성을 보였으며 60°C에서 최대 활성을 나타냈다. *Pseudomonas*속의 PGase는 45°C에서 최대 활성을 보였으나 20°C에서도 비교적 높은 활성을 나타내, 저온저장 중의 양파 부패에 *Pseudomonas*속이 더 많은 영향을 미칠 것으로 판단된다.

균의 최적 생육 pH를 살펴보면 *B. subtilis* OB-89 균주는 비교적 좁은 생육 pH 범위를 나타내고(최적 생육 pH, 6.0), *P. gladioli* OB-01 균주는 산성 영역을 포함한 넓은 범위에서 생육이 가능하였다(최적 생육 pH, 5.0)(Fig. 4). *Bacillus*의 CMCase는 pH 7.0에서 최대활성을 나타내고 산성에서도

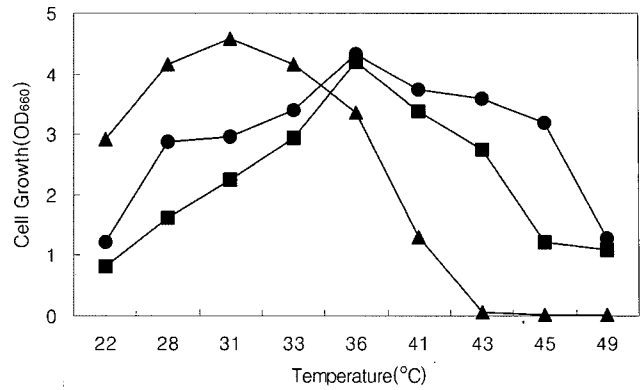


Fig. 2. Optimal temperature of cell growth of *Bacillus* sp. OB-89 in carboxymethylcellulose (-●-) and polygalacturonic acid medium (-■-) and *Pseudomonas* sp. OB-01 in polygalacturonic acid medium (-▲-). Cell growth was measured by optical density at 660 nm after 36 hr of growth.

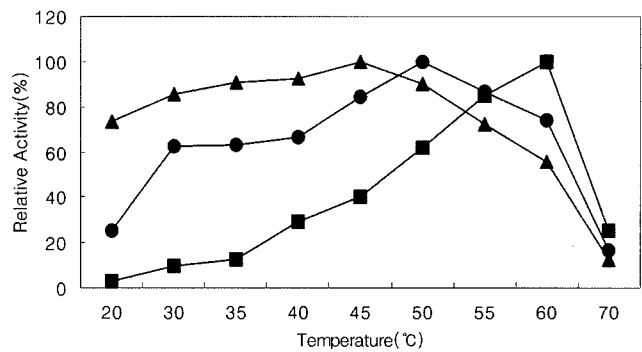


Fig. 3. Optimal temperature of CMCase (-●-) and PGase (-■-) activity from *Bacillus* sp. OB-89 and PGase (-▲-) from *Pseudomonas* sp. OB-01.

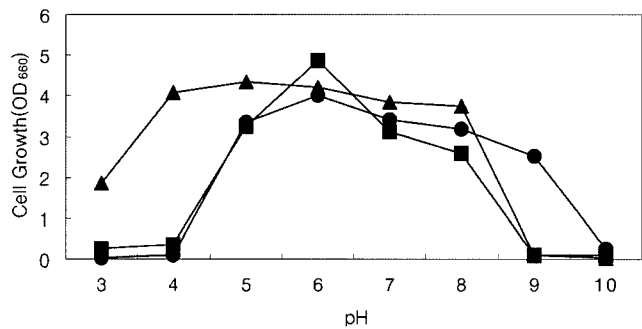


Fig. 4. Optimal pH of cell growth of *Bacillus* sp. OB-89 in carboxymethylcellulose (-●-) and polygalacturonic acid medium (-■-) at 37°C and *Pseudomonas* sp. OB-01 in polygalacturonic acid medium (-▲-) at 30°C. Cell growth was measured by optical density at 660 nm after 36 hr of growth.

높은 활성을 보였으나, PGase는 중성 및 알칼리성에서 높은 활성을 보이고 pH 9.0에서 최대 활성을 나타내었다. 이에 비해 *P. gladioli* OB-01 균주의 PGase는 산성에서 효소활성이 높았고 pH 7.0 이상에서는 활성의 급격한 감소를 보이며 pH

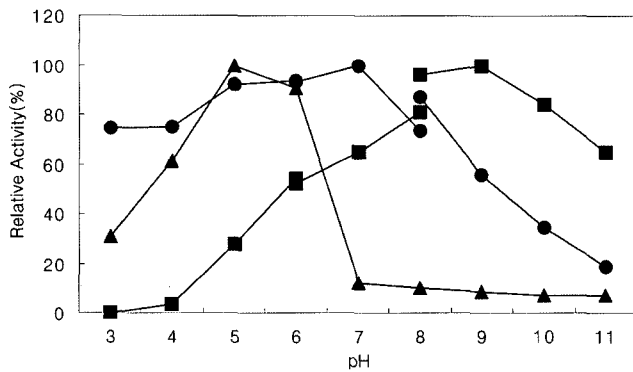


Fig. 5. Optimal pH of CMCase (●) and PGase (■) activity from *Bacillus* sp. OB-89 and PGase (▲) from *Pseudomonas* sp. OB-01.

5.0에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 5). 양파의 산도가 pH 5.0~6.0인 것을 고려하면 양파 조직의 붕괴나 부패에는 *Pseudomonas* 유래의 PGase가 더 밀접하게 작용할 것으로 생각된다. 이는 CMCase와 PGase의 in vitro 활성이 높은 *Bacillus*가 *Pseudomonas*에 비해 양파 부패활성이 훨씬 약한 사실을 설명할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 생각된다. 실제 *Bacillus*는 지금까지 양파 부패에 관여하는 주요 원인균으로 분류되어 있지 않고, 부패 양상으로 보아 양파 세균병의 전형적인 양상을 보이지도 않았다. 이러한 결과를 종합해보면 *Bacillus*는 대표적인 토양세균으로 분리과정 중에 혼입되어 분리되었거나 2차 감염균으로 양파 부패에 소극적으로 관여하는 것으로 보여지며, *Pseudomonas*속 세균이 양파의 주요 부패 원인균의 하나라고 생각되고, 이들의 증식과 효소활성을 저해할 수 있는 수단을 강구할 수 있다면 양파의 저장성을 높일 수 있으리라 생각된다.

요 약

경남 창녕, 의령, 함양지역의 양파 주산지에서 수집한 부패 양파로부터 분리한 세균 139 균주의 약 18%가 CMCase 활성을, 53%가 PGase 활성을 가지고 있었다. 이들 분리균 중 PGase를 생성하는 균주를 중심으로 선별한 45 균주 중에서 31 균주가 양파 부패 활성을 나타냈고, FAMES 분석에 의해 *Pseudomonas*속 18주, *Bacillus*속 11주, *Yersinia*속 7주 및 기타 9주로 분류되었다. 이 dendrogram상에서 *Pseudomonas*는 부패 활성 유무에 따라 clustering이 가능하였다. *Bacillus*속은 CMCase와 PGase 활성이 높았으나 부패 활성은 약했으며, *Pseudomonas*속은 *Bacillus*속에 비해 PGase의 활성이 훨씬 약했으나 양파 전체 조직을 연화시켜 물렁하게 만드는 강력한 부패 활성을 나타내었으며 10^2 cfu 정도만 접종하여도 부패증상을 일으켰다. 병원성이 강한 *Pseudomonas*는 *P. gladioli*로 동정되었는데 양파부패균으로서 국내에서 분리 동정은 첫 보고로 생각된다. *P. gladioli*는

*B. subtilis*로 동정된 *Bacillus*에 비해 낮은 온도에서 균의 생육과 PGase 활성이 양호하였다. 또 *B. subtilis* PGase의 활성 최적 pH가 9.0인데 비해 *P. gladioli*는 양파의 산도인 pH 5.0~6.0에서 최대 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 종합하면 *Pseudomonas*속 세균이 저온 저장 중의 양파의 주요 부패 원인균의 하나라 추정된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 경북대학교 교비연구지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Abawi, G. S. and J. W. Lorbeer. 1971. Reaction of selected onion varieties to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Plant Disease Reporter* **55**: 1000-1004.
2. Baldwin, B. C. and W. G. Rathmell. 1988. Evolution of concepts for chemical control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**: 265-283.
3. Ballard, R. W., N. J. Palleroni, M. Doudoroff, and R. Y. Stainer. 1970. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginalis*, *P. allicola*, and *P. carophylli*. *J. Gen. Microbiol.* **60**: 199-214.
4. Bateman, D. F. and H. G. Basham. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* **4**: 316-355.
5. Burkholder, W. H. 1949. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* **40**: 115.
6. Chung, H. D. 1982. Control of onion bulb rot during storage at low temperature by postharvest treatment of fungicides. *Kor. J. Soc. Hort.* **23**: 17-22.
7. Collmer, A. and N. T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409.
8. Cother, E. J., B. Darbyshire, and J. Brewer. 1976. *Pseudomonas aeruginosa*: Cause of internal brown rot of onion. *Phytopathology* **66**: 828-834.
9. Daniels, M. J., J. M. Dow, and A. E. Osbourn. 1988. Molecular genetics of phytopathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**: 285-312.
10. Hancock, J. G. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* **55**: 975-979.
11. Hancock, J. G. and R. L. Millar. 1965. Relative importance of polygalacturonate-*trans*-eliminase and other pectolytic enzymes in southern anthracnose, spring black stem and *Stemhylium* leaf of alfalfa. *Phytopathology* **55**: 246-355.
12. Hevesi, M. and F. Viranyi. 1975. An unknown symptom on onion plants cause by *Pseudomonas allicola*. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **10**: 281-286.
13. Hobson, G. E. 1981. Enzymes and texture changes during

- ripening, pp 123-132. In J. Friend and M. J. C. Rhodes (eds), *Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables*, Academic Press, London.
14. Huber, D. J. 1983. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hort. Rev.* **5**: 169-219.
 15. Lee, W. S. 1984. Studies on improvement of storability of onion bulbs. *Kor. J. Soc. Hort. Sci.* **25**: 227-232.
 16. MaCoy, D. C. and R. Machtmes. 1974. Control of onion white rot by furrow and root dip application of fungicides. *Plant Disease Reporter*. **58**: 6-9.
 17. Maude, R. B. and A. H. Presly. 1977. Neck rot(*Botrytis allii*) of bulb onions. I. Seed borne infection in relationship to the disease in store and the effect of seed treatment. *Annal. Appl. Biol.* **86**: 181-188.
 18. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 19. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**: 127-132.
 20. Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acid. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 584-586.
 21. Ohuchi, A., T. Ahaswa, and J. Nishimura. 1983. Two pathogenic bacteria, *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 and *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925, causing a soft rot of onion. *Jap. Annal. Phytopathol. Soc.* **49**: 619-626.
 22. Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas*. In N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. I, Williams and Wilkins, Baltimore.
 23. Peter, P. and B. Volks. 1975. Results of once-over harvesting of onions. *Gartenbau* **22**: 291-294.
 24. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
 25. Sasser, M. J. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. Newark, DE: Microbial ID Inc.
 26. Tesoriero, L. A., P. C. Fahy, and L. V. Gunn. 1982. First record of a bacterial rot of onion in Australia caused by *Pseudomonas gladioli* pv. *alliiicola* and association with internal browning caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Australia Plant Pathol.* **11**: 56-57.
 27. Ulrich, J. M. 1975. Pectic enzymes of *Pseudomonas cepacea* and penetration of polygalacturonase into cells. *Physiol. Plant Pathol.* **5**: 37-44.
 28. Yoo, J. Y., Y. J. Koo, D. H. Shin, and D. H. Chung. 1988. Polysaccharide production by a gram negative facultatively anaerobic rod. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 98-104.
 29. Yu, J. Y., B. K. Lee, S. H. Cho, and J. Lew. 1976. Studies on the pectic enzymes produced by *Aspergillus* sp. I. Screening endo-polygalacturonase producing fungi and their toxic effects on HeLa cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **4**: 57-62.

(Received Sep. 20, 2005/Accepted Dec. 12, 2005)