

28. Mew, T. W., Mew, I. and J. S. Huang, 1984. Scanning E. M of Virulent and avirulent strains of *X. c. pv. oryzae*. *Phytopathol.* **74**: 635-641.
29. Jones, B. R. 1985. Electron microscopy. Library Research Association Inc, Monroe, New York.
30. Lim S. T. 1997. Molecular cloning and characterization of cellulose-degradation-enzyme in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34. Ph D. Dissertation. The Graduate School of Geongsang National Univ.
31. 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.
32. Kotoujansky, A., A. Diolez, M. Boccara, Y. Bertheau, T. Andro and A. Coleno. 1985. Molecular cloning of *Erwinia chrysanthemi* pectinase structural genes. *EMBO J.* **4**: 781-785.
33. Tardy, F., Nasser, W., Baudouy, R. J. and Pattat N. H. C. 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: Enzyme characteristic and potential inhibitors. *J. Bacteriol.* **179**: 2503-2511.
34. Barras, F., K. K. Thurn and A. K. Chatterjee. 1987. Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi*(EC16) and characterization of the enzymes produced in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 319-325.

(Received 12 May 1997)

과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Fukumori, F., N. Sashihara, T. Kudo and K. Horikoshi. 1986. Nucleotide sequences of two cellulase genes from alkalophilic *Bacillus* sp. strain N-4 and their strong homology. *J. Bacteriol.* **168**(2): 479-485.
2. Baird, S. D., D. A. Johnson and V. L. Seligy. 1990. Molecular cloning, expression, and characterization of e-[p ndo- β -1,4-glucanase genes from *Bacillus polymyxa* and *Bacillus circulans*. *J. Bacteriol.* **172**(3): 1576-1586.
3. Beguin, P., P. Cornet and J. -P. Aubert. 1985. Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* **162**(1): 102-105.
4. Cornet, P., D. Tronik, J. Millet and J. -P. Aubert. 1983. Cloning and expression in *E. coli* of *Clostridium thermocellum* genes coding for amino acid synthesis and cellulose hydrolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**: 137-141.
5. Hall, J. and H. J. Gilbert. 1988. The nucleotide sequence of a carboxymethylcellulase gene from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 112-117.
6. Huang, J. and M. A. Schell. 1991. Role of the two component leader sequence and mature amino acid sequence in extracellular export of endoglucanase EGL from *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* **174**: 1314-1321.
7. Wong, W. K. R., B. Gerhard, Z. M. Guo, D. G. Kilburn, R. Anthony, J. Warren and Jr. R. C. Miller. 1986. Characterization and structure of an endoglucanase gene *cenA* of *Cellulomonas fimi*. *Gene.* **44**: 315-324.
8. MacLeod, A., T. Lindhorst, S. G. Withers and R. A. J. Warren. 1994. The acid/base catalyst in the exoglucanase/xylanase from *Cellulomonas fimi* is glutamic acid 127: Evidence from detailed kinetic studies of mutants. *Biochemistry.* **33**: 6371-6376.
9. Gough, C. L., J. M. Dow, J. Keen, B. Henrissat and M. J. Daniels. 1990. Nucleotide sequence of the *engXCA* gene encoding the major endoglucanase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Gene.* **89**: 53-59.
10. Turner, P., C. Batber and M. Daniels. 1985. Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 213-221.
11. Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinia*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**: 405-430.
12. Willis, J., J. K. Engwall and A. K. Chatterjee. 1987. Cloning of genes for *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectolytic enzymes and further characterization of the polygalacturonases. *Mol. Plant. Pathology.* **77**: 1199-1205.
13. Baldwin, B. C. and W. G. Rathmell. 1988. Evolution of concepts for chemical control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 265-283.
14. Collmer, A. and N. T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409.
15. Daniels, M. J., J. M. Dow and A. E. Osbourn. 1988. Molecular genetics of phytopathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 285-312.
16. Murata, H., L. McEvoy, A. Chatterjee, A. Collmer and A. K. Chatterjee. 1991. Molecular cloning of an *aepA* gene that activates production of extracellular pectolytic, cellulolytic, and proteolytic enzymes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **4**(3): 239-246.
17. Zink, R. T., J. K. Engwall, J. L. McEvoy and A. K. Chatterjee. 1985. *recA* is required in the induction of pectin lyase and carotovoricin in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.* **164**(1): 390-396.
18. Liu, Y., H. Murata, A. Chatterjee, and A. K. Chatterjee. 1992. Characterization of a novel regulatory gene *aepA* that controls extracellular enzyme production in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **6**(3): 299-308.
19. Saarilahti, H. T., B. Henrissat and E. T. Palva. 1990. CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Gene.* **90**: 9-14.
20. Mae, A., R. Heikinheimo and E. T. Palva. 1995. Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celV1* and the role of cellulase in phytopathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 17-26.
21. Palva, T. K., K. O. Hoimstrom, P. Heino and E. T. Palva. 1992. Induction of plant defence response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **6**(2): 190-196.
22. Teather, M. R. and P. J. Wood. 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.
23. Dickey, R. S. 1979. *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. *Phytopathol.* **69**: 324-329.
24. Thomson, S. V., D. C. Hildebrand and M. N. Schroth. 1981. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugar beet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathol.* **71**: 1037-1042.
25. Schaad, N. W. 1980. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteriology*. Committee of American Pathopathological Society, St. Paul. Minnesota, 72-90.
26. Dye, D. W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia* II. the 'carotovora' group. *N. J. J. Sci.* **12**: 81-95.
27. Holt, J. G. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Press. **3**: 469-476.

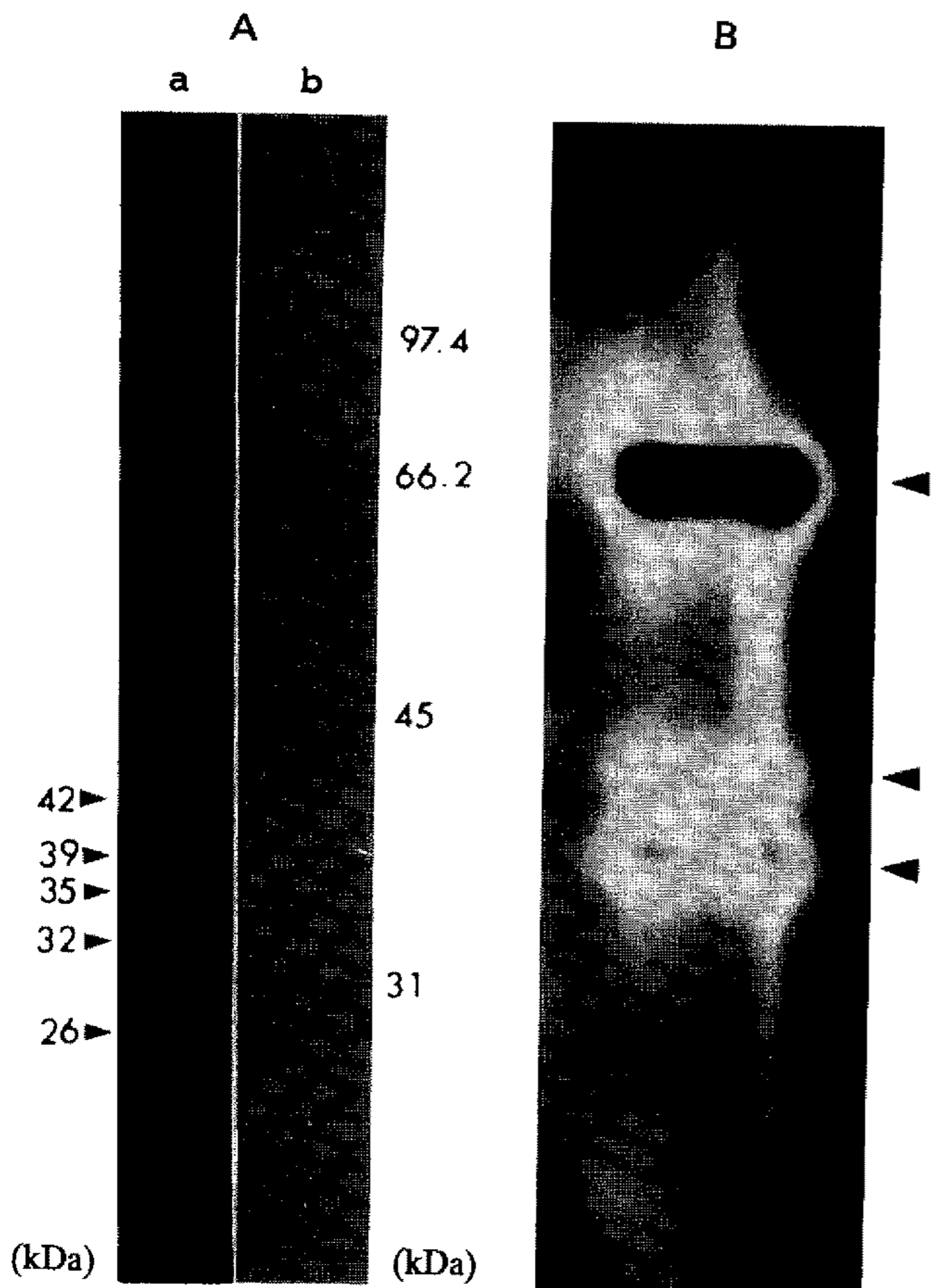


Fig. 10. A. Detection of CMCCase activity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 by CMC-SDS-PAGE.(a: cellulases of LY34. b: protein size markers) B. Detection of activity of isolated extracellular CMCCase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 by CMC gel overlay method.

Triton-X 100으로 renaturation한 방법을 이용하여 congo red 염색을 통하여 직접 gel 상에서 섬유소분해효소 활성 밴드를 확인할 수 있다. Fig. 10A는 CMC-SDS-PAGE 의한 섬유소분해효소 직접활성염색법의 결과 분리균 LY34는 5가지의 섬유소분해효소 활성밴드를 확인할 수 있었다. 이들 섬유소분해효소의 대략적인 분자량은 표준단백질을 기준으로 42, 39, 35, 31, 26 kDa이었다. 이 방법의 장점으로 CMC-SDS-PAGE 상의 단백질 standard marker를 이용하여 활성밴드를 가진 섬유소분해효소 대략적인 분자량을 직접 알 수 있었으며, Palva 등(19)이 보고한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에서 CelS의 섬유소분해효소 분자량은 27 kDa 으로 본 실험에서 수행한 CMC-SDS-PAGE법으로 확인한 3번째 밴드와 일치하는 것으로 추측되어진다.

CMC-SDS-PAGE 방법은 *Erwinia*속 뿐만 아니라 섬유소분해효소 활성을 가진 다른 균주의 섬유소분해효소 유전자의 수를 예측할 수 있으며 간단한 열과 SDS의 처리 과정을 통하여 단백질 전기영동과정에서 효소 dimer 형성 가능성이 적으며, 이들 유전자의 분자량을 직접 확인할

수 있으므로 앞으로 섬유소분해효소 확인실험에 있어서 유용한 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되어진다.

지금까지 Palva 등(19, 20)에 의해 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에서 세포벽 분해효소로 2종류의 섬유소분해효소가 보고되었으며, 본 실험에서는 5종류의 섬유소분해효소가 존재할 것으로 생각되어진다. Kotoujansky 등(32)에 의하면 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*와 유사한 기능을 가진 *Erwinia chrysanthemi*에서 식물병원성에 관련되는 세포벽분해효소 중의 하나인 pectate lyase가 5종류 존재한다는 것을 밝혔으며 Pattat 등(33)은 효소의 특성과 전위 억제제들(potential inhibitors)에 의한 다섯 가지의 pectate lyase를 비교 분석하여 발표한 바가 있으며, 또한 Barras 등(34)은 이들이 chromosome 상에 2개의 cluster형태로 존재한다고 보고하였다. 이와 관련하여 본 실험은 CMC-SDS-PAGE법을 이용하여 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 존재하는 5종류의 섬유소분해효소 유전자를 크로닝하여 이들 유전자 산물을 확인하고 어떤 섬유소분해효소 isozyme이 연부병과 관련이 있는가를 밝히고자 한다.

요 약

분리 동정한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34는 cellulase, pectinase, polygalacturonase, protease 활성은 있었으나 hemicellulase의 활성은 없었다. 배추와 감자의 조직에서 24시간 이내에 연부증상을 일으키며, 배추의 조직보다 감자조직에서 연부증상의 발병 진행속도가 느린 편이었다. CMC 액체배지의 점성은 6시간 만에 50%의 최대 감소치를 나타내며 급격히 감소하였으며, 체외효소는 12시간까지 급속한 반응을 보이다가 18시간에서 최고치를 가진 후 더 이상의 변화는 없는 지속적인 활성을 가졌다. 체내효소는 18시간까지 급속한 반응을 보이다가 30시간 이후는 상대 활성도 70%에서 거의 일정한 활성을 가지는 반응을 보였으며 체내효소는 체외효소보다 활성이 약한 편이었으나 지속적이었다. 체내효소를 분리하여 non-denaturated polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 CMC gel에 전이시켜 3개의 섬유소분해효소 활성밴드를 확인할 수 있었으며, CMC-SDS-PAGE에 의한 섬유소분해효소 직접활성 염색법을 이용하여 5종류의 섬유소분해효소 isozyme으로 추정되는 활성밴드를 관찰할 수 있었다. 활성을 가진 5개의 섬유소분해효소의 분자량은 표준단백질에 의하여 42, 39, 35, 31, 26 kDa일 것으로 추정된다.

감사의 말

이 논문은 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구

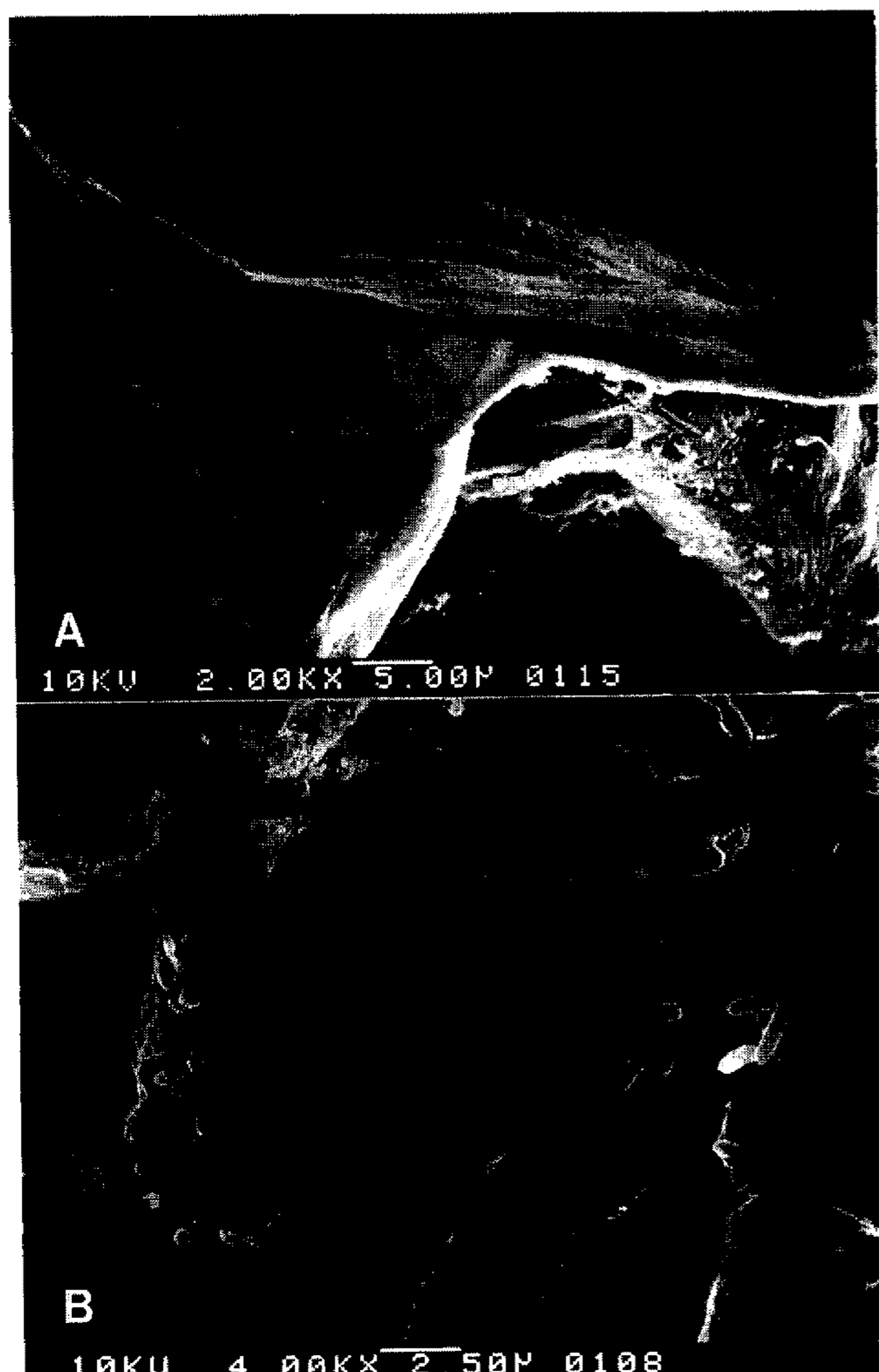


Fig. 8. Episcopical examination of healthy and inoculated chinese cabbage transverse section structures with scanning electron microscopy.

A, a healthy chinese cabbage tissue (2,000×); B, An inoculated tissue by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 after 24 hours incubated (4,000×).

는 LY34 접종 후 24시간이 지난 조직으로 정상조직에 비하여 분리균에 의하여 많이 와해되고 조직이 손상된 것을 알 수 있었다. Fig. 8A는 2,000 배율에서 본 배추의 정상조직의 단면도로서 조직의 손상이 없었으며, B는 LY34 접종 후 24시간이 지난 조직을 4,000 배율에서 관찰한 것으로 정상조직과 비교하여 볼 때 감염조직은 균들에 의하여 많이 부풀어오르고 연부의 정도가 심한 것을 알 수 있었다. 전자현미경으로 관찰한 감자의 단면조직으로 Fig. 9A는 감자의 정상조직의 단면도이며 건강한 조직과 과립의 형태도 선명하게 관찰이 가능했으며, B는 LY34 접종 후 48시간이 지난 감자조직을 관찰한 것으로 정상조직과 비교하여 감염조직은 균들에 의하여 연부현상이 관찰되었다. 이상의 현미경적 관찰을 통하여 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34가 분비하는 세포벽분해효소 작용에 의해 연부가 진행되는 것으로 생각되며 이들 중

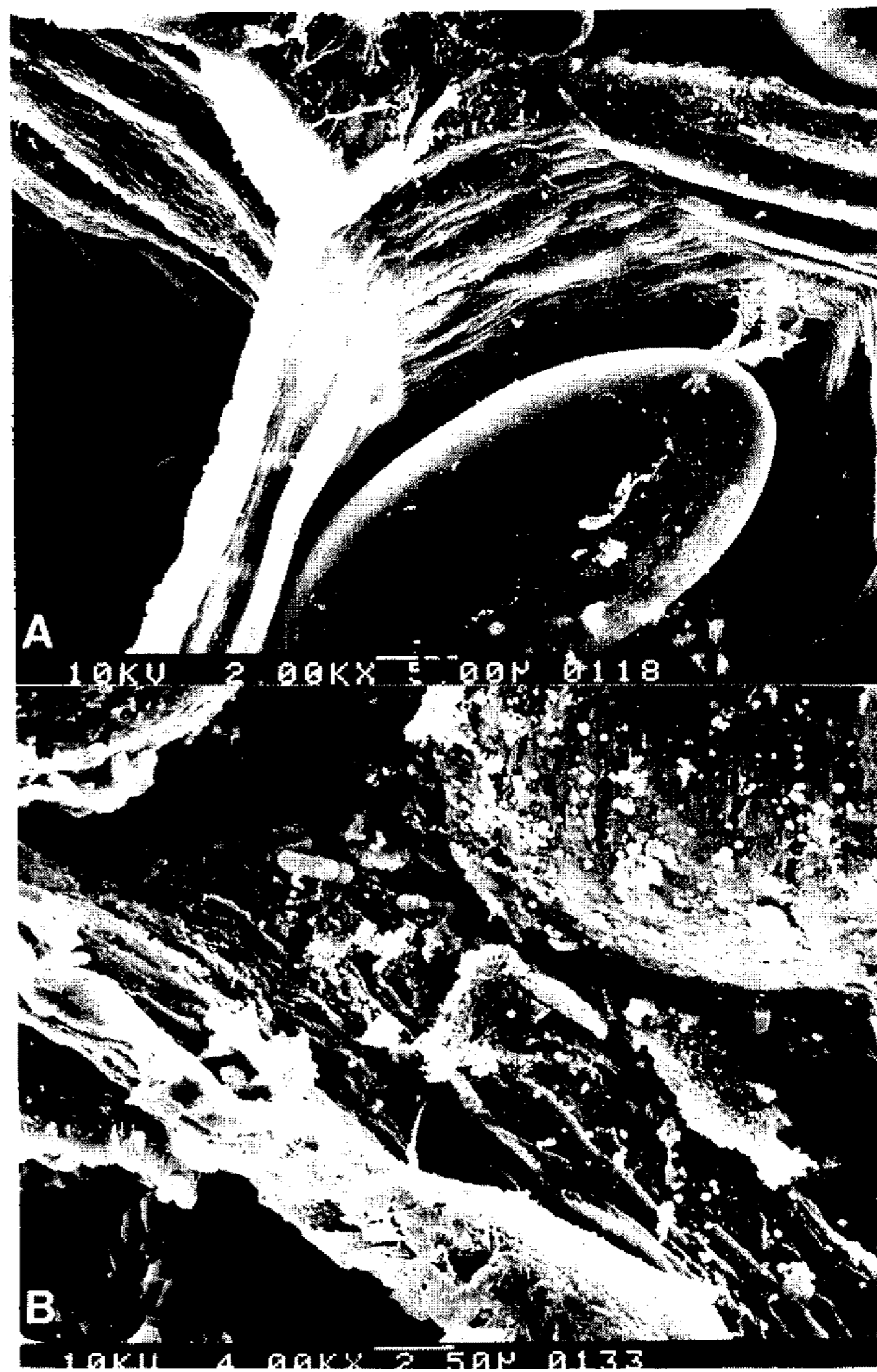


Fig. 9. Episcopical examination of healthy and inoculated potato transverse section structures with scanning electron microscopy.

A, a healthy potato tissue (2,000×); B, An inoculated tissue by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 after 48 hours incubated (4,000×).

섬유소분해효소가 어떤 역할을 하는가에 대한 조사하기 위하여 LY34가 분비하는 섬유소분해효소를 조사하였다.

SDS 섬유소분해효소 직접활성염색법에 의한 효소의 분자량 결정

분리한 체외 섬유소분해효소를 non-denaturated polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 CMC gel에 전이시켜 활성을 본 것으로 3개의 섬유소분해효소 활성 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 10B). 그러나 이 방법은 조효소의 분리와 실험에 많은 시간을 요하며 dimer 형성 가능성이 있어 실험 결과에 대한 확신에 어려움이 있으므로 본 실험에서는 이러한 단점을 해결하고자 SDS-PAGE법의 변형으로 0.1% CMC를 첨가하여 만든 gel 상에 분리한 섬유소분해효소 단백질을 전기영동한 후 Potvin 등이(31) SDS를 gel 상에서 제거하기 위하여 사용한

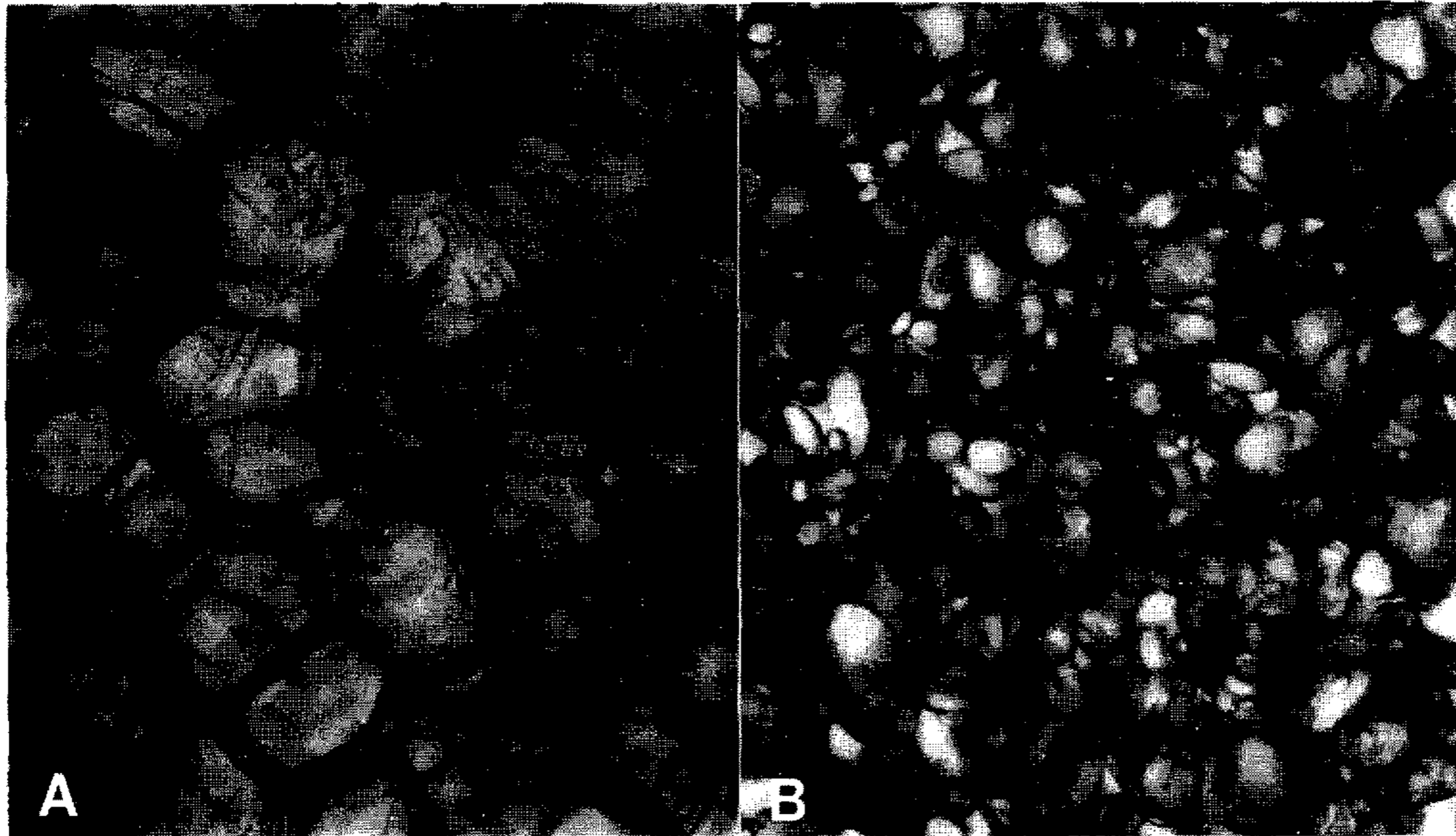


Fig. 6. Examination of potato tissue under the photomicroscopy.

A, A healthy potato: B, An inoculated potato tissue by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 after 48 hours incubation.

을 기준으로 상대적인 활성을 구한 것으로 18시간까지 급속한 반응을 보이다가 30시간 이후는 상대활성도 70%에서 거의 일정한 활성을 가지는 반응을 보였으며 체내효소는 체외효소보다 활성이 약한 편이었으나 지속적이었다.

병원성 검정

분리균 LY34에 의한 배추의 병원성 검정으로 표면살균된 배추조직에 Fig. 4A는 LY34, B는 *E. coli*, C는 대조구로 멸균된 주사바늘로 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 관찰한 것으로, LY34로 접종한 배추조직은 심한 연부현상을 나타내었다. 이것으로 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34는 병원성을 갖는 것을 알 수 있었다.

현미경 관찰

병원성 검정을 통하여 본 LY34의 연부현상에 따른 식물조직의 변화를 관찰하기 위하여 광학현미경을 사용하였다. Fig. 5A는 배추의 정상조직 B는 LY34 접종 후 24시간, C는 접종 후 48시간이 지난 조직으로, 접종 후 24시간이 지난 조직은 정상조직에 비하여 세포가 많이 와해된 것을 볼 수 있고 48시간이 지난 후의 배추조직은 조직의 형태를 관찰하기 어려웠다. 400 배율에서 본 감자의 조직으로 Fig. 6A는 정상조직, B는 LY34 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 생각되어진다.

주사전자현미경으로 배추의 표면조직을 관찰한 것으로 Fig. 7A는 4,000 배에서 본 배추의 정상조직이며, B

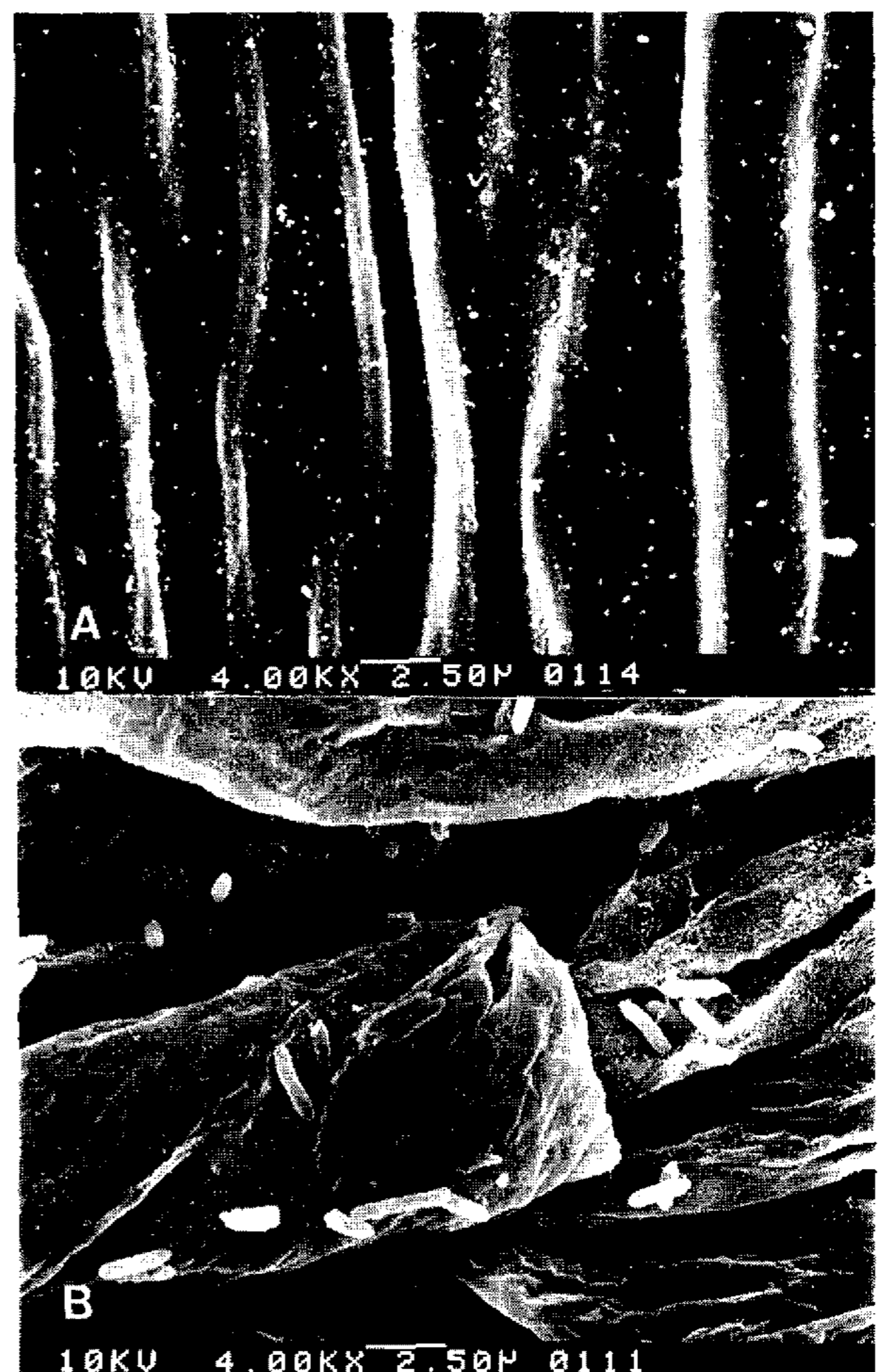


Fig. 7. Episcopical examination of healthy and inoculated chinese cabbage surface structures with scanning electron microscopy.

A, a healthy chinese cabbage tissue (4,000×): B, An inoculated tissue by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 after 24 hours incubated (4,000×).

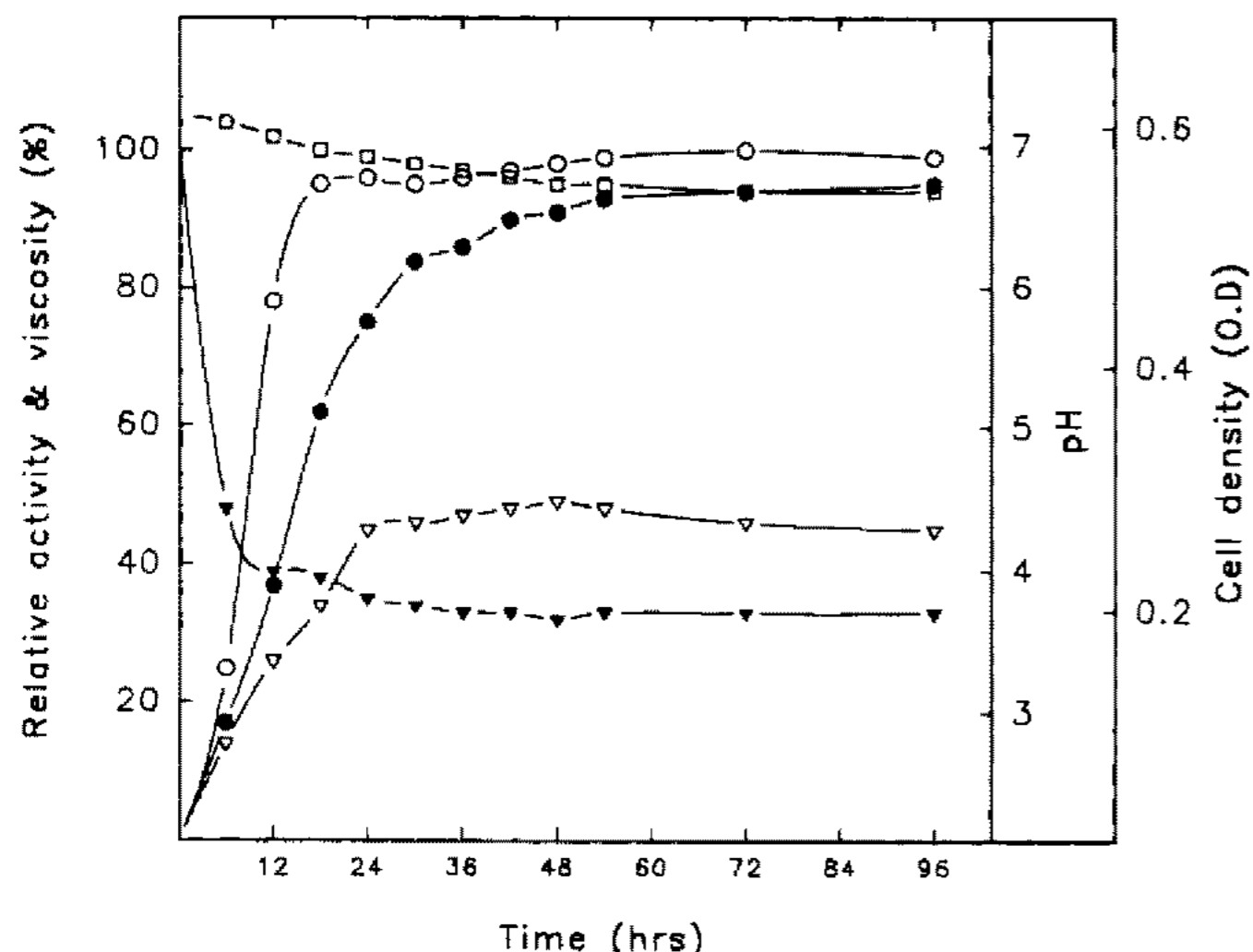


Fig. 3. Change of cell growth and isozyme activity at MMY broth.

●--●, cell density (OD_{600}): ○--○, extracellular CMCase: ▽--▽, intracellular CMCase: □--□, pH at MMY broth: ▼--▼, viscosity at MMY broth.

성을 실험한 결과로서 Fig. 2A는 pectate lyase, B는 pectinase, C는 cellulase, D는 protease 활성을 가지고 있었으나 hemicellulase 활성은 관찰되지 않았다.

분리 선정균의 생화학적 특성

분리균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34의 생육 특성인 pH, 세포밀도, 점성변화와 조효소 활성도를 경시적으로 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. LY34의 생육 시간별로 세포밀도를 OD_{600} 에서 측정된 결과 24시간 후 흡광도가 0.45인 정지기에 도달했으며 그후 변화가 없는 점차적으로 줄어드는 일반적인 세균의 생육상과 같았으

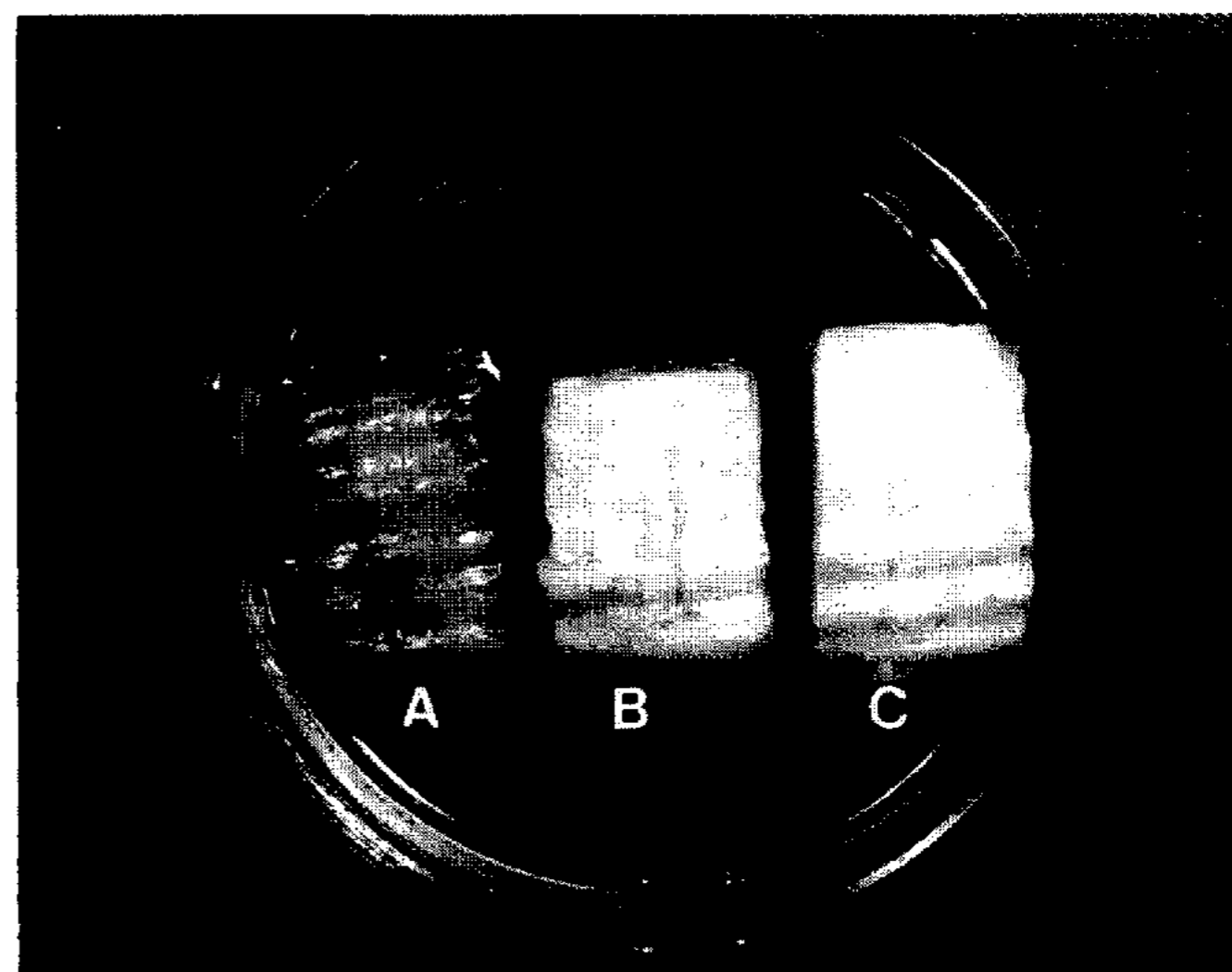


Fig. 4. Pathogenicity test on chinese cabbage by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34.

A, An inoculation of LY 34: B, An inoculation negative control by *E. coli*: C, An inoculation negative control by sterilized needle.

며, 배지의 pH 변화는 거의 없었다. CMC 액체배지의 점성은 6시간만에 50%의 최대 감소치를 나타내며 급격히 감소하였고 이후에는 변화가 관찰되지 않았다. 이 결과는 균 생육에 따른 균체의 섬유소분해효소 생성으로 기질로 첨가한 CMC가 분해되어 점성이 낮아지는 것으로 생각되어진다. 체외효소는 시간별로 활성을 측정하여 최고치를 100으로 두고 상대적인 활성도를 구하였다. 12시간까지 급속한 반응을 보이다가 18시간에서 최고치를 가진 후 더 이상의 변화가 없는 지속적인 활성을 가졌다. 체내효소(intracellular enzyme)도 체외효소와 같은 조건에서 시간별로 활성을 측정하여 체외효소 최고치 100

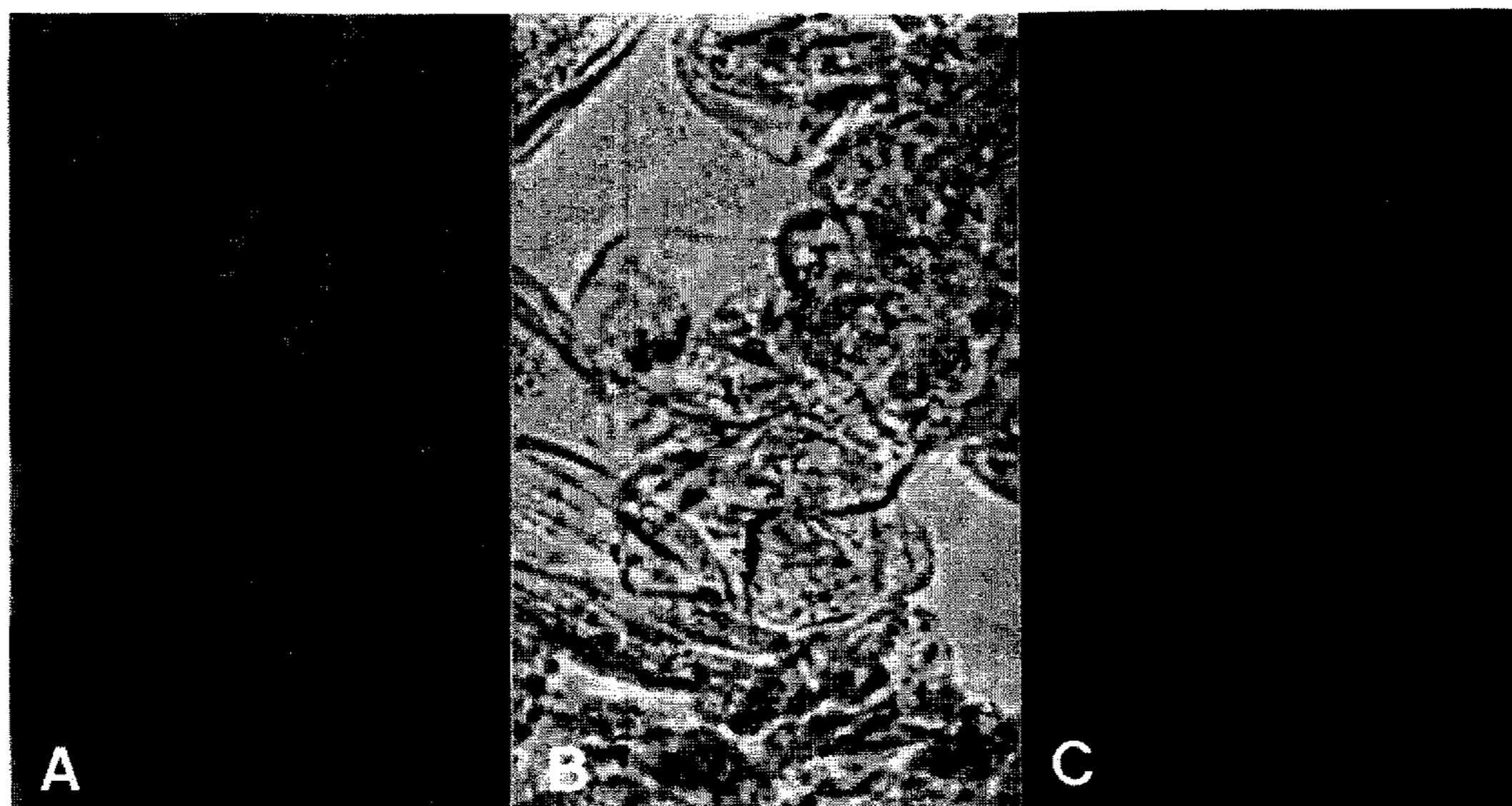


Fig. 5. Examination of chinese cabbage tissue under the photomicroscopy.

A, A healthy plant: B, An inoculated plant tissue by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 after 24hours incubation: C, An inoculated plant tissue *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 after 48 hours incubation.

간 renaturation 시킨 후 congo red 염색을 통하여 직접 gel 상에서 섬유소분해효소의 isozyme 활성밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

연부균의 분리

연부증상이 있는 시료에서 315균주를 분리하여 CMC 배지상에서 강한 활성을 갖는 40 균주를 선별하였으며 병원성 검정을 한 결과 대부분 24시간 이내에 심한 악취와 함께 배추를 연화 부패시켰으며, 이 중에서 LY34 균주는 연부정도가 가장 심하였고 배추에 접종 후 12시간 이내에 연부증상이 시작되어 24시간 이후에 완전 연화되었다. 또한 TY-CMC 배지 상에서도 섬유소분해효소 활성이 강력하여 LY34를 본 실험의 실험균주로 사용하였다. Bergey's manual 등에 의하여 동정한 결과 Table 1과 같이 pectin 분해, 감자의 부패, gelatin 액화, 혐기적 증식, catalase, methyl red test는 양성이었으며 indole

Table 1. Comparison of bacterial characteristics of the present isolates of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* with described by Dye

Characteristics	Isolated <i>Erwinia carotovora</i>	
	LY-34	subsp. <i>carotovora</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:		
D-Lactose	+	+
Trehalose	+	+
Maltose	-	-
Cellobiose	+	+
α -Methyl glucoside	-	-
Inositol	+	∇
Mannitol	+	+
Mannose	+	+
Sorbitol	+	+
Utilization of		
Malonate	-	-
Galacturonate	+	+
Gram stain	-	-

+: Positive, -: negative, ∇: variable.

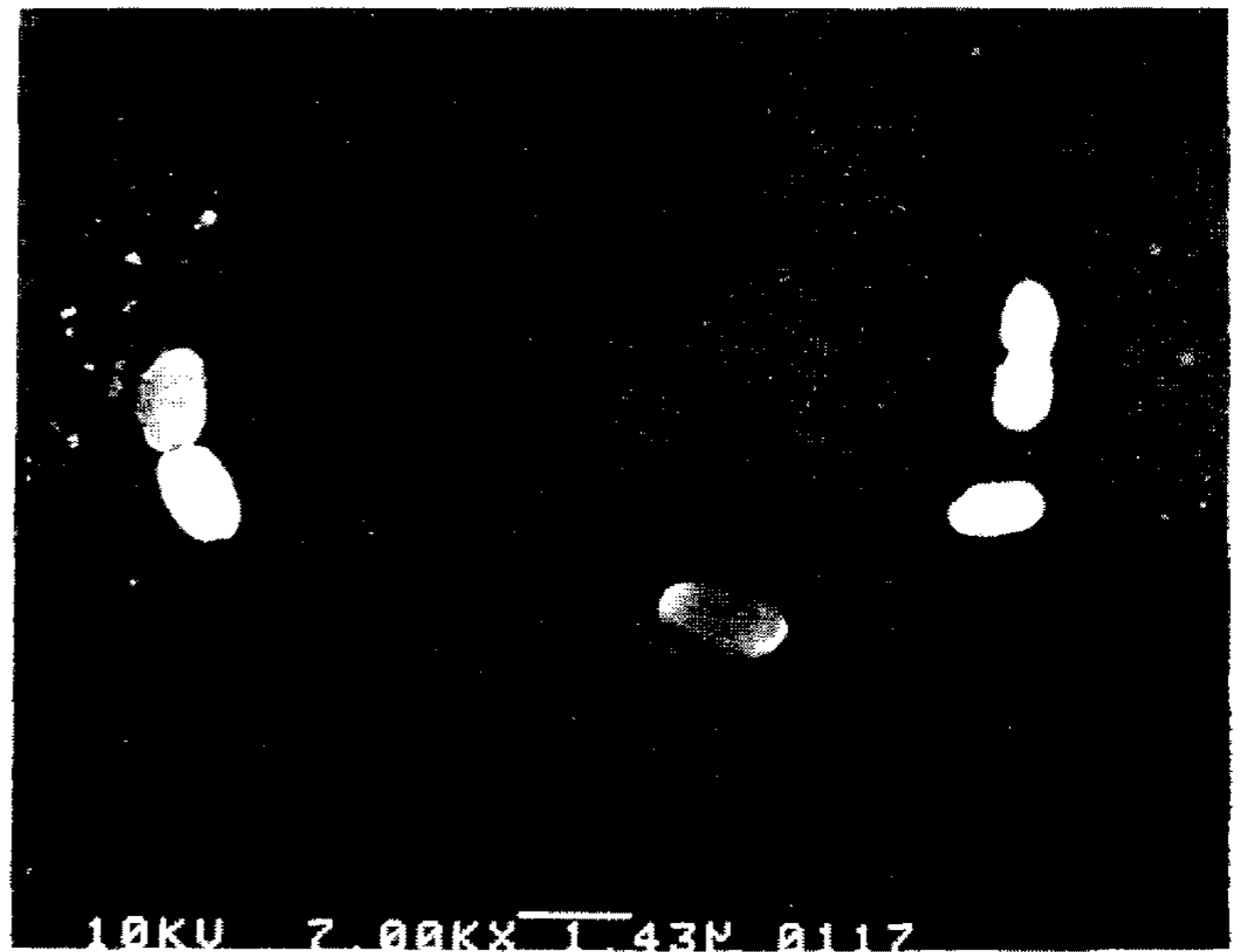


Fig. 1. SEM of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 showing straight rods (7,000 \times).

생성 및 oxidase는 음성, 산 생성 실험에서 maltose, α -methyl glucoside에서 음성이었다. Gram 염색 결과 음성균으로 전자현미경 관찰 결과 1.5 μ m의 단간균이었다 (Fig. 1). 이상의 결과로 분리균 LY34는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*로 동정되었다.

세포벽분해효소

한천확산법에 의하여 LY34에 대한 세포벽분해효소 생

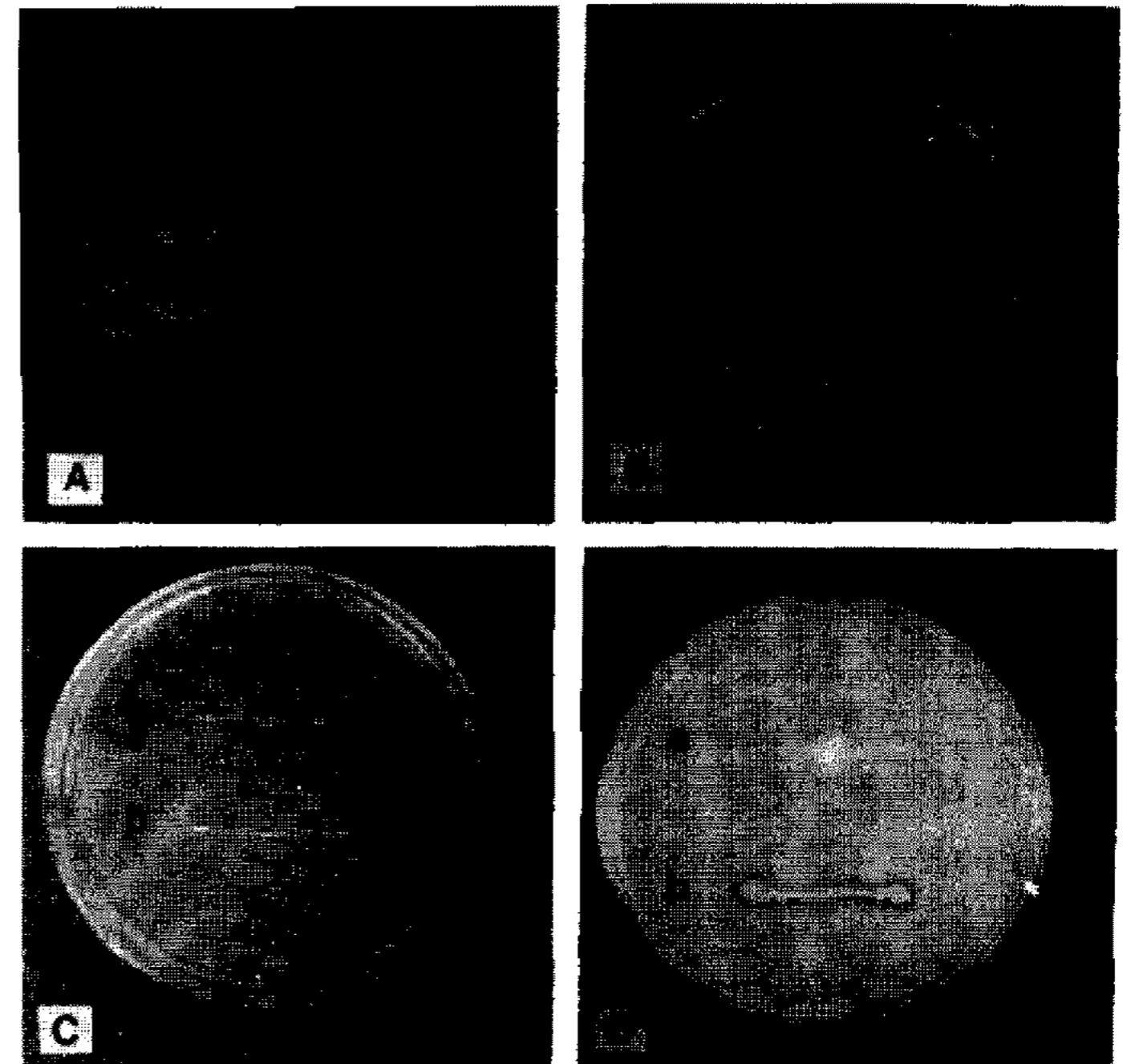


Fig. 2. Detection of cell-wall degrading enzyme by agar diffusion method (lane a, *E. coli*: lane b, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34).

A, polygalacturonase activity test: B, pectinase test: C, cellulase test: D, protease test.

로 노란색 환(22)을 나타내는 균에서 연부증상과 섬유소 분해능이 강한 균을 분리 선정하였다. 선정균의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성은 Dickey(23), Thomson (24), Schaad(25), Dye(26) 및 Bergey's manual(27)의 방법에 준하였다.

배양 및 분리균의 특성

일반적인 균의 배양은 LB(Luria-Bertani: tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g) 배지에 생육시켰으며 배양 온도는 30°C로 하였다. 균주의 특성을 조사하기 위하여 분리한 균을 LB 액체배지 50 ml에 접종하여 10^8 cells/ml 농도로 생육시킨 1 L의 MMY(K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 mM yeast extract 0.1%, CMC 0.3%) 액체배지에 분리균 LY34를 접종하여 경시적으로 점성, pH, 세포밀도를 측정하였으며, 점성측정은 효소반응액을 50 ml 뷰렛을 사용하여 시료가 통과하는데 걸린 시간을 4일간 6시간별로 측정하였으며, 대조구는 접종전의 MMY 액체배지가 통과하는데 걸린 시간을 상대치 100으로 하여 측정하였다.

세포벽분해효소 분리 및 활성 측정

분리균의 세포벽분해효소의 생성 유무가 육안으로 관찰될 수 있는 한천확산법(agar diffusion method)으로 pectinase, cellulase, polygalacturonase의 활성을 TY배지(tryptone 5 g, yeast extract 5 g, $CaCl_2$ 1 g, agar 15 g)에 각 기질을 0.5% 되게 첨가하여 측정하였으며, hemicellulase는 TY배지에 0.5% xylan을 기질로, protease는 20% 탈지분유 용액을 최종 농도가 1%가 되게 만들어 사용하였다. 섬유소분해효소 분리를 위하여 0.1%의 CMC를 첨가한 MMY 배지 1 L에 LY34를 접종하여 10^8 cells/ml 농도로 생육시킨 후 섬유소분해효소 생성을 유도하였다. 4일간 배양한 상등액을 원심분리한 후 황산암모늄을 85% 포화시킨 침전물을 citric acid buffer(pH 6.0)에 녹여 membrane(Spectra/Por6)을 사용하여 멸균증류수를 3-4회 교환하면서 투석시킨 후 분자량이 30,000-100,000 사이의 단백질을 분리하는 Centriprep 30 및 100(Amicon, U.S.A.)을 사용하였으며, 효소의 활성을 CMC배지 상에서 확인후 냉동 건조시켜 농축시킨 시료를 non-denaturated polyacrylamide gel의 전기영동에 사용하였다. 0.1%의 CMC를 첨가한 MMY 배지 10 ml에 LY34를 접종하여 10^8 cells/ml 농도로 생육시킨 후 섬유소분해효소 생성을 유도하여 체외효소는 분리한 조효소를 적정 pH인 7에서 시간별로 활성을 측정하여 최고치를 100으로 두고 상대적인 활성도를 구하였다. 체내효소(intracellular enzyme)는 원심분리한 균체를 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 현탁시킨 후 초음파 파쇄하여 완

충용액에 녹여 다시 원심분리 한 용액으로 적정 pH 7에서 활성을 측정하여, 체외효소의 최고치 100을 기준으로 상대적인 활성도를 구하였다.

병원성 검정

공시균주의 병원성 조사는 nutrient 고체배지에서 48시간 배양한 세균을 약 10^8 cells/ml 농도가 되도록 현탁하여 표면 살균된 배추절편에 균을 접종하고 30°C에서 배양 관찰하였다. 배추 시료는 1.5×1.5 cm² 크기를 사용하였으며 먼저 멸균증류수로 씻어 내고 1% sodium hypochloride에 2분간 적신 후 멸균증류수로 수회 세척하여 물기를 제거한 후 접종하여 연부 정도를 조사하였다.

광학 및 전자현미경 조사

배추와 감자 조직으로 분리균의 연부현상은 병원균을 식물조직에 접종하여 12, 18, 36시간 후 시료를 경시적으로 채취하여 광학현미경으로 관찰한 다음 주사 전자현미경 관찰을 위하여 0.025 M potassium phosphate와 2% glutaraldehyde(pH 7.0)를 섞은 용액으로 4°C에서 24시간 동안 시료의 조직을 고정시킨 후 0.025 M potassium phosphate buffer에 1% osmium tetroxide를 넣은 용액에 2시간후 고정 시킨 다음 phosphate buffer로 2-3회 세척하여 70-95% ethanol로 순차적으로 탈수반응시켜 carbon dioxide로 임계점 건조한 후 gold ion으로 입혀서 주사 전자현미경(Hitachi, DS-1300)으로 관찰하였다(28, 29).

Non-denaturated polyacrylamide gel의 전기영동

SDS-PAGE는 Laemmli 방법(30)에 준하여 7.5% 농도의 gel을 사용하였으며 표준단백질은 Bio-Rad의 low molecular weight standard marker(MW. 14,400-97,400)를 사용하였다. Non-denaturated polyacrylamide gel의 표준단백질은 Sigma사의 nondenaturated 단백질 molecular weight marker kit(MW.14,200-66,000)를 사용하였다.

CMC-SDS-PAGE에 의한 섬유소분해효소의 직접활성 염색법

CMC 0.3%를 첨가한 MMY 3 ml 액체배지에 분리균 LY34를 접종하여 10^8 cells/ml 농도로 생육시킨 후 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하여 침전물을 100 mM Tris · HCl(pH 7.0) 200 μ l에 현탁시켜 세포 파쇄한 후 상등액과 같은 비율로 sample buffer를 혼합한 다음 Lim(30)의 CMC-SDS-PAGE(carboxymethyl cellulose-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 직접활성염색법에 의해 실험하였다. 섬유소분해효소의 gel 상에서의 직접활성염색법으로는 0.1%의 CMC를 함유한 separating gel을 이용하여 renaturation buffer (1% tryptonX-100, 100 mM Tris · HCl, pH 7.5)에 8시

분리균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34의 병원성 및 CMCase Isozymes 생성

임선택 · 박용우 · 조수정 · 윤한대*
경상대학교 농화학과

Phytopathogenicity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and Production of CMCase Isozymes. Sun-Tech Lim, Yong-Yoo Park, Soo-Jeong Cho and Han-Dae Yun.* Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea - 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 it was identified as *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 (*E. c.* subsp. *carotovora* LY34). *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 did not have hemicellulase but extracellular cellulase, pectinase, polygalacturonase, protease activity. The results of the microscopy showed that chinese cabbage tissue and potato tissue were macerated by infection of *E. c.* subsp. *carotovora* LY34. In analysis of the cellulases activity of the isolated cellulose-degradation enzymes from *E. c.* subsp. *carotovora* LY34 total protein, three cellulase activity bands were detected by non-denaturation gel electrophoresis method and five cellulase activity bands were detected by CMC-SDS-PAGE direct stain method.

섬유소분해효소를 많이 생성하는 세균에는 *Bacillus* 속(1, 2), *Clostridium* 속(3, 4), *Pseudomonas* 속(5, 6), *Cel-lulomonas* 속(7, 8), *Xanthomonas* 속(9, 10), *Erwinia* 속(11, 12) 등이 알려져 있고 이들이 생산하는 효소에 대한 연구가 계속되고 있으며, 이들 중 식물병원성 미생물들이 분비하는 세포벽분해효소가 식물병의 원인 중의 하나로 생각되어 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 식물병원성균은 식물 물질을 이용할 수 있고 또한 식물 세포벽의 혼합물을 분해하는 pectinase, cellulase, polygalacturonase, protease, phospholipase 등의 효소를 생성하며 이들 효소들이 직접 또는 간접으로 병원성 발현과 연관되어 있을 것으로 추측되고 있다(13-15). 특히 연부병을 일으키는 *Erwinia* 속의 pectate lyase에 대한 분자생물학적인 연구가 주를 이루었고(14, 15) 섬유소분해효소에 대한 연구는 미비한 편이었으나 최근 들어 이에 대한 연구가 많이 진행 중이다. *Erwinia* 속에 대한 연구는 Chatterjee 등(16-18)과 Palva 등(19-21)에 의하여 세포벽분해효소에 대한 연구가 일부 계속되고 있다.

Erwinia carotovora subsp. *carotovora*는 전 세계적으로 광범위한 지역에 존재하며 열대와 아열대 지역에 있는 당근, 셀러리, 오이, 무 등의 많은 작물에 연부병을 일으키는 원인이 되고(18), 온난 지방에서는 비닐하우스에서 자라는 작물들과 여름 작물에서도 나타난다. 이러한 연

부병은 식물 세포벽과 식물 세포막 구성물을 분해하는 효소들을 분비·생산하며, 작물의 재배와 저장 및 유통에 있어 경제적으로 큰 손실을 가져오고 있는 실정이다.

본 실험은 연부현상을 생화학적 수준에서 이해하기 위하여 연부세균을 분리, 동정하고, 이 균이 생성하는 식물 세포벽분해효소와 이들 중 섬유소분해효소에 대한 연구를 하고자 한다. 채소 및 과일 시장과 재배 단지로부터 수집한 연부증상이 있는 시료로부터 평판회석법에 의해 순수 분리하여 연부증상이 가장 강한 균을 분리, 선정하였다. 이 분리한 균주의 배양 조건, 생육상의 특성, 세포벽분해효소의 활성 측정, 병원성 검정을 하였으며, 연부현상을 관찰하기 위하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 조직 내부에서의 균을 관찰하였으며 CMC-SDS-PAGE방법에 의해 분리균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34에는 5종류의 섬유소분해효소 isozyme으로 추정되는 활성대를 확인하고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

분리 및 동정

본 실험에서 사용한 균은 채소, 과일시장과 재배단지로부터 수집한 315개의 연부증상이 있는 시료로부터 nutrient agar(beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 15 g)를 사용하여 평판회석법에 의해 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주를 TY-CMC(tryptone 5 g, yeast extract 5 g, CaCl₂ 1 g, carboxymethyl cellulose 5 g, agar 15 g)배지에 배양하여 24시간 후 1% Congo red로 염색하여 주위

*Corresponding author

Tel. 82-591-751-5469, Fax. 82-591-57-0178

E-mail: hdyun@nongae.gsnu.ac.kr

Key words: *Erwinia carotovora*, Pathogenicity, CMCase, CMC-SDS-PAGE