

## 사과검무늬썩음病菌 *Botryosphaeria dothidea*에 의한 Pectin質 分解酵素의 생산

朴錫熙 · 金起弘 · 李昌垠  
嶺南大學校 農畜産大學 園藝學科

### Production of Pectolytic Enzymes by *Botryosphaeria dothidea*

Seok-Hee Park, Kee-Hong Kim and Chang-Un Lee

Department of Horticulture, College of Agriculture and Animal Science Yeungnam University,  
Gyeongsan 712-749, Korea

**ABSTRACT:** *Botryosphaeria dothidea* causing apple fruit rot was cultured in pectin-polypectate mineral salts or apple mediumss, to investigate pectolytic enzyme production and activity. Exo-polygalacturonase(PG) and exo-polymethylgalacturonase (PMG) in apple medium showed maximum of activity to 6.4 and 7.2 units at six days of culture, respectively. Their maximum activity in pectin-polypectate mineral salts medium was 5.9 and 5.3 units at eight days of culture lower than in apple medium respectively. Endo-PG and endo-PMG in pectin-polypectate mineral salts medium were maximum of activity to 4.4 and 16.2 units at six and eight days of culture, respectively, but activities in apple medium were 3.2 and 6.7 units at eight days of culture. Activity of polygalacturonate-*trans*-eliminase(PGTE) and pectinmethyl-*trans*-eliminase(PMTE) was higher in pectin-polypectate mineral salts medium than in apple medium. Fungal growth was maximum at six and eight days of culture in pectin-polypectate mineral salts and apple medium, respectively.

**KEYWORDS:** Apple fruit rot, *Botryosphaeria dothidea*. Pectolytic enzyme.

병원균이 植物細胞組織에 침입하려면 寄主의 세포中葉과 一次細胞壁을 분해하여야 한다(Hancock, 1968). 병원균이 생산하는 pectin質 分解酵素는 세포중엽의 주요 성분인 pectin質을 분해하여 병원균이 寄主体内로 침입할 수 있게 한다. 이에 관련된 각종 pectin質 분해효소 가운데 polygalacturonase (PG)가 조직을 軟化시켜 병을 일으키는데 중요한 역할을 하는것이 사과와 감귤 등을 加害하는 식물 병원균 및 *Aspergillus japonicus*에서 보고되었다(Barmore 등, 1979; Bateman, 1976; Ishii 등; 1972). Spalding등(1972, 1973)은 *Penicillium expansum*이 사과에 침입할 때와 人工培地에서 培養될 때 PG와 pectinlyase(PL)를 생산하였으며 이들이 함께 식물 세포조직의 분해에 관여한다고 하였다.

Bush와 Codner(1968)는 *P. digitatum*의 培養濾

過液에서 pectinmethyl-*trans*-eliminase(PMTE)의 활성을 보았으며 endo-PG와 PMTE가 기주식물조직의 세포벽을 연화시키는 효소라고 하였다.

본 실험은 이병과에서 분리한 사과검무늬썩음병균에 의해 생산되는 각종 pectin質 분해효소와 그 활성을 조사하였다.

### 材料 및 方法

본 실험에 사용한 *Botryosphaeria dothidea*菌은 大邱所在 농협공판장에서 수집한 羅病果로부터 분리하였으며 單孢子분리 후 病原性檢定을 마친 菌株를 사용하였다. Pectin質 分解酵素의 활성조사에 사용된 人工培地(Spalding 등, 1972)는 citrus pectin과 polygalacturonic acid를 加用한 기본무기염류배지로

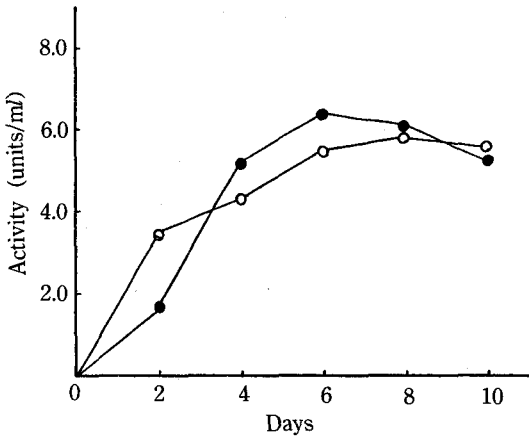


Fig. 1. Activity of exo-polygalacturonase produced by *Botryosphaeria dothidea* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts (-○-) and apple mediums (-●-) at 25°C.

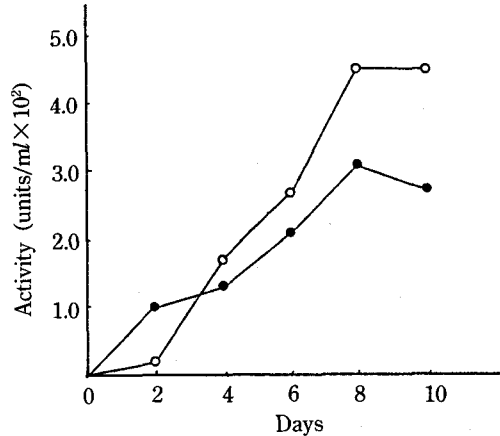


Fig. 2. Activity of endo-polygalacturonase produced by *Botryosphaeria dothidea* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts (-○-) and apple mediums (-●-) at 25°C.

하였다.

배지를 250 ml 삼각flask에 100 ml씩 분주한 후 *B. dothidea*의 孢子懸濁液( $5 \times 10^6$  spores/ml)을 4 ml씩 접종하였다. 이것을 25°C에서 振蕩培養하면서 일정한 시간 간격으로 꺼내어 Whatman filter paper (No. 1)로 濾過하여 여과액을 crude enzyme 용액으로 하였다. 사과배지(Spalding 등, 1973)는 0.033 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 150 ml에 사과과육 200 g을 넣고 mixer로 2분간 磨碎한 후 이것을 4°C에서 18시간 증류수로 透析하여 기본무기염류를 첨가하였다. 배지의 살균·접종·접종액의 배양 및 여과는 前記와 같은 방법으로 실시하였다.

**Pectin質 分解酵素의 活性 調査**

1) Exo-PG의 活性도는 Miller에 의해 수정된 di-nitrosalicylic acid(DNS)방법(Miller, 1959)에 준하였다. 효소 1 unit는 효소액 1 ml가 1분간에 1 μM의 환원당(galacturonic acid)을 증가시키는 것으로 하였다.

2) Endo-PG의 활성도 측정은 polygalacturonic acid의 粘度 減少率(Nagel 등, 1962)에 의하였다. 활성은 효소액 1 ml에 의하여 基質의 粘度를 50% 감소시키는데 걸리는 시간(분)의 逆數로 나타내었다.

3) Exo-PMG와 Endo-PMG의 활성도는 1), 2)와 같이 측정하였으며 기질을 polygalacturonic acid 대신에 pectin을 사용하였다.

4) PMTE의 활성도는 Hancock 등 (1965, 1966)의 방법을 변형하여 235 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 unit는 효소액 1 ml가 1시간에 흡광도를 0.05증가시키는 것으로 하였다.

5) polygalacturonate-trans-eliminase(PGTE)의 활성도는 위의 방법에 따라 측정하였으며 기질을 pectin 대신에 polygalacturonic acid를 사용하였다.

**菌絲生長 測定**

배양액을 진공여과하여 菌叢을 살균증류수로 수회水洗한 후 80°C에서 48시간 건조시켜 乾物重을 측정하였다.

**結 果**

**Pectin質 分解酵素의 活性**

1) PG의 生産

Exo-PG의 生産과정은 人工培地에서는 培養日數가 늘어남에 따라 활성이 증가하여 4일째에 4.3 units/ml였고 8일째에 5.9 units/ml로 가장 높았다. 사과培地에서도 人工배지와 비슷한 경향을 나타내었으나 4일째와 6일째에 각각 5.2, 6.4 units/ml로 人工배지보다는 높은 활성을 보였다(Fig. 1).

Endo-PG는 人工배지와 사과배지에서 모두 2일째에는 낮은 활성을 보이다가 배양일수가 늘어남에 따라 그 활성은 증가하여 人工배지에서는 6일과 8일째에 각각 2.7, 4.4 units/ml × 10<sup>2</sup>으로 나타났다.

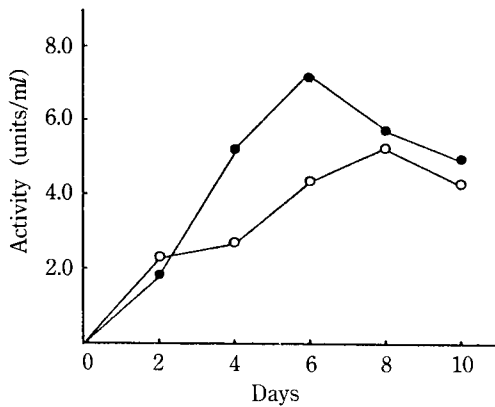


Fig. 3. Activity of exo-polymethylgalacturonase produced by *Botryosphaeria dothidea* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts (○-○) and apple mediums (●-●) at 25°C.

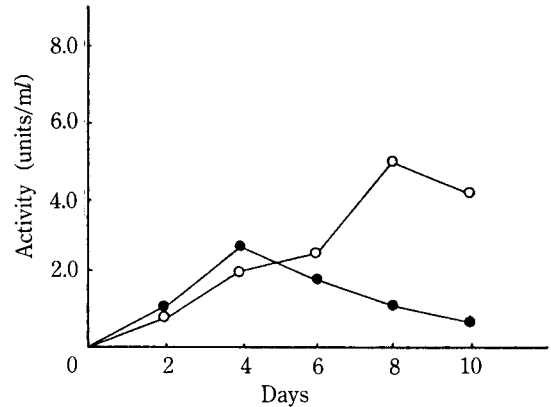


Fig. 5. Activity of polygalacturonate-*trans*-eliminase produced by *Botryosphaeria dothidea* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts (○-○) and apple mediums (●-●) at 25°C.

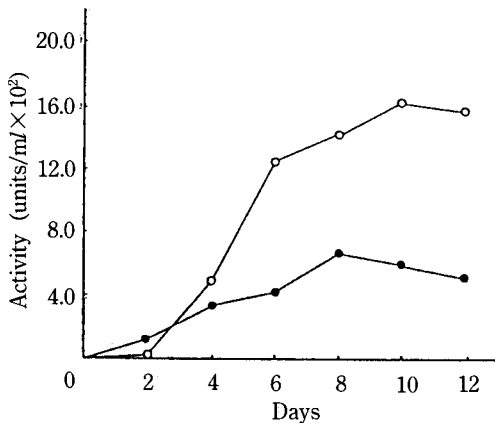


Fig. 4. Activity of endo-polymethylgalacturonase produced by *Botryosphaeria dothidea* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts (○-○) and apple mediums (●-●) at 25°C.

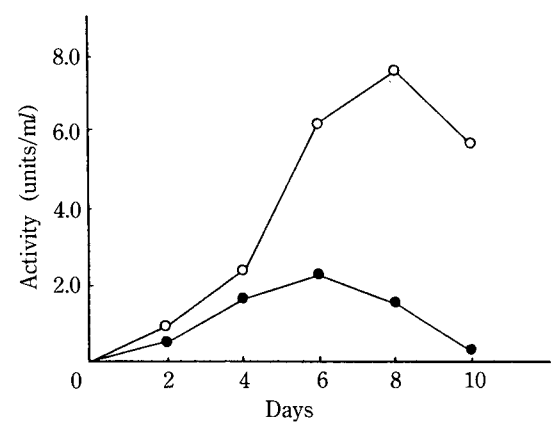


Fig. 6. Activity of pectinmethyl-*trans*-eliminase produced by *Botryosphaeria dothidea* cultured in 0.5% pectin-polypectate mineral salts (○-○) and apple mediums (●-●) at 25°C.

사과배지에서도 인공배지와 같은 경향을 나타내어 6일과 8일째에는 2.1, 3.2 units/ml $\times 10^2$ 이었으나 인공배지보다는 낮은 활성을 보였다(Fig. 2).

#### 2) PMG의 生産

Exo-PMG의 생산과정은 Exo-PG와 같은 경향을 나타내어 인공배지에서는 6일째와 8일째의 활성이 각각 4.4, 5.3 units/ml이었으며 사과배지에서는 4일째와 6일째에 5.3, 7.2 units/ml로 인공배지보다는 높은 활성을 보였다(Fig. 3).

Endo-PMG는 2일째에는 인공배지와 사과배지에서 각각 0.2, 1.1 units/ml $\times 10^2$ 로 활성이 미약하였으나 그 후 배양일수가 늘어남에 따라 증가하여

인공배지에서는 6일째와 10일째에 12.4, 16.2 units/ml $\times 10^2$ 로 높은 활성을 나타낸 반면 사과배지에서는 8일째에 6.7 units/ml $\times 10^2$ 의 활성을 보였으나 인공배지보다는 낮은 경향이였다(Fig. 4).

#### 3) PGTE의 生産

인공배지에서는 2일째에 0.9 units/ml로 낮은 활성을 나타내었으나 6일째와 8일째에 2.5, 4.9 units/ml로 증가한 반면 사과배지에서는 4일째에 2.6 units/ml의 활성을 보인 후 감소하여 인공배지보다는 낮은 활성을 보였다(Fig. 5).

#### 4) PMTE의 生産

PGTE와 비슷한 경향을 나타내어 2일째에는 인



었으나 사과배지에 비해 낮았다. endo-polygalacturonase와 endo-polymethylgalacturonase는 인공배지에서 각각 4.4와 16.2 units로 배양 8일과 10일에서 최대활성을 나타내었으나 사과배지에서는 배양 8일에 각각 3.2와 6.7 units로 낮은 활성을 보였다. pectinmethyl-trans-eliminase와 polygalacturonate-trans-eliminase의 활성은 사과배지보다 인공배지에서 높게 나타났으며, 균 생장은 인공배지와 사과배지에서 각각 배양 6일과 8일에 최고의 생장을 나타내었다.

### 参考文献

- Barmore, C. R. and Brown, G. E. (1979): Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruit decay caused by *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 69 : 675-678.
- Bateman, D. F. and Milar, R. L. (1966): Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathology* 4 : 119-146.
- Bateman, D. F. (1976): Plant cell wall hydrolysis by pathogens. page 79-99 in J. Friend and D. R. Threlfall eds Biochemical insects of plant-parasite relationship. *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Academic Press*. New York NY. 354p.
- Bush, D. A. and Codner, R. C. (1968): The nature of macerating factor of *Penicillium digitatum* Saccardo. *Phytochem.* 7 : 863-869.
- Hancock, J. G. and Milar, R. L. (1965): Relative importance of polygalacturonate trans-eliminase and other pectolytic enzymes in southern anthracnose, spring black stem and *Stemphylium* leaf of alfalfa. *Phytopathology* 55 : 346-355.
- Hancock, J. G. (1966): Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* 56 : 975-979.
- Hancock, J. G. (1968): Degradation of pectic substances during pathogenesis by *Fusarium solani* f.sp. *cucurbital*. *Phytopathology* 58 : 62-69.
- Ishii, S. and Yokotsuka, T. (1972): Purification and properties of endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* 36 : 1885-1893.
- Miller, G. L. (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 : 426-428.
- Nagel, C. W. and Vaughn, R. H. (1962): Comparison of growth and pectolytic enzyme production by *Bacillus polymyxa*. *J. Bacterol.* 83 : 1-5.
- Spalding, D. H. and Abdul-Baki, A. A. (1972): In vitro and in vivo production of pectin lyase by *Penicillium expansum*. *Phytopathology* 63 : 230-235.
- Spalding, D. H., Wells, J. M. and Allison, D. W. (1973): Catabolite repression of polygalacturonase, pectin lyase and cellulase synthesis in *Penicillium expansum*. *Phytopathology* 63 : 840-844.
- Wood, R. K. S. (1955): Pectic enzymes secreted by pathogens and their role in plant infection. *Soc. Gen. Microbiol.* 1955: 263-293.
- 金起弘, 李昌垠. (1988): *Alternaria mali* Roberts에 의한 Pectin質 分解酵素의 生産. *韓菌誌*, 16(2) : 64-69.

Accepted for Publication on June 7, 1991