

## 사과 겹무늬썩음병균(*Botryosphaeria dothidea*)에 의해 부패된 사과 과실에서 Pectin질 분해효소의 생산과 Pectin질의 변화

박석희 · 이창은\*

영남대학교 농축산대학 원예학과

### Production of Pectolytic Enzymes and Change of Pectic Substances from Apple Fruits Infected with *Botryosphaeria dothidea*

Seok Hee Park and Chang Un Lee\*

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

**ABSTRACT:** Pectolytic enzymes were extracted in apple fruits rotted by *Botryosphaeria dothidea*, and their activities and change of pectic substances were investigated. Exo-polygalacturonase(exo-PG), exo-polymethylgalacturonase(exo-PMG), polygalacturonate-*trans*-eliminase(PGTE) and pectin-methyl-*trans*-eliminase(PMTE) were produced by the pathogen. Activities of exo-PG and exo-PMG extracted from rotten apple fruits were high to 21.15 and 24.65 units/mg protein in specific activity at seven days after inoculation, respectively. Activities of PGTE and PMTE showed 5.60 and 7.90 units/mg protein, respectively, but they were lower than those of the exo-type enzymes. Water-soluble and versene-soluble pectins were 11.50 mg/100 mg-AIS and 7.31 mg/100 mg-AIS at 14 days after inoculation, namely, they were increased by 4.23 and 2.16 mg/100 mg-AIS over those of sound apples, respectively. Total soluble pectic substances of rotten apple were 72.4% of total pectic substances and it was higher by 24.8% than sound apple. Insoluble pectic substance was notably decreased from 15.32 to 7.16 mg/100 mg-AIS according to progress of decay while total pectic substances were not changed remarkably.

**KEYWORDS:** Apple fruit rot, *Botryosphaeria dothidea*, pectolytic enzyme, pectic substances.

대부분의 식물병원균은 식물조직의 내부에 침입할 때 pectin질 분해효소를 생산하여 기주의 세포중엽 및 세포벽을 분해하며, 이들의 분해산물로 생장에 필요한 양분을 얻음과 동시에 조직을 연화 붕괴시킨다(Conway and Sams, 1983). 사과 겹무늬썩음병균이 생산하는 주요 pectin질 분해효소는 polygalacturonase(PG)와 *trans*-eliminase로서(박 등, 1991) pectin의 주성분인 rhamnogalacturonan의  $\alpha$ -1,4결합을 분해한다. 따라서 그 분해산물인 수용성 polyuronide의 함량은 증가되고 그 결과 일차 세포벽의 결합력은 소실되어 병원균의 침입 및 정착은 용이하게 된다(Barmore and Brown, 1981, Ben-Arie 등,

1979). McClendon 등(1960)은 *Botryosphaeria ribis*에 의한 부패과에서 추출한 조효소가 pectin을 가수분해한다고 하였으며 Barmore와 Brown(1979, 1981)은 *Penicillium italicum*에 의해 부패된 과실에서 PG가 세포중엽을 분해한다고 하였다. 그리고 Cole과 Wood(1961)는 *Penicillium expansum*에 의한 부패과에서 불용성 pectin물질이 70% 감소되었음을 보였다. 따라서 식물 병원균이 기주를 침입할 때 분비하는 pectin질 분해효소와 기주의 성분변화간에는 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되어 이를 구명하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

\*Corresponding author

병원균

본 실험에 사용한 *Botryosphaeria dothidea*균은 전보(박 등, 1991)와 같은 방법으로 분리, 배양, 보관하여 사용하였다.

### 접종 및 배양

사과 과실을 수세하여 건조시킨 후 직경 4 mm 깊이 3 mm의 상처를 내고, 여기에 potato sucrose agar에 배양한 균층에서 직경 4 mm의 원판을 절취하여 접종하였다. 같은 크기의 한천원판만을 접종한 사과를 대조로 사용하였으며, 접종 후 사과를 플라스틱 상자에 넣어  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다.

### Pectin질 분해효소의 활성 조사

1) Exo-polygalacturonase의 활성도는 Miller(1959)에 의해 수정된 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법에 준하였다. 효소 1 unit는 효소액 1 ml가 1분간에 1  $\mu\text{M}$ 의 환원당(galacturonic acid)을 증가시키는 것으로 하였다.

2) Exo-polymethylgalacturonase의 활성도는 1)과 같이 측정하였으며, 기질을 polygalacturonic acid 대신에 pectin을 사용하였다.

3) Pectinmethyl-*trans*-eliminase의 활성도는 Hancock등(1965, 1966)의 방법을 변형하여 235 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 unit는 효소액 1 ml가 1시간에 흡광도를 0.05 증가시키는 것으로 하였다.

4) Polygalacturonate-*trans*-eliminase(PGTE)의 활성도는 3)과 같이 측정하였으며 기질을 pectin 대신에 polygalacturonic acid를 사용하였다.

### 부패과에서의 효소 추출

부패과의 효소 추출은 Hasegawa와 Crawford(1969)가 행한 방법에 준하였다. 접종 후 7일과 14일된 사과와 껍질을 제거한 후 건전부위를 제외한 부패된 부분의 과육 100 g에 0.5% polyvinylpyrrolidone(PVP)을 함유하고 있는 4.0% NaCl용액 100 ml를 가하여 2분동안 마쇄한 후 12,000 g에서 원심분리하였다. 그 상정액은 증류수로 18시간 투석시킨 다음 일정량을 조효소액으로 사용하였고 나머지는 ammonium sulfate로 85% 포화시켜 단백질을 염석시켰다. 그 후 원심분리하여 침전물을 얻고 이것을 증류수에 용해시킨 다음 4.0% NaCl 용액으로 하루 밤 동안 투석하였다. 불용성 물질은 원심분리하여 제거한 후 이 효소액을  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하고 각 효소의 활성을 앞에서와 같은 방법으로 측정하였으며,

단백질 함량은 Lowry등(1951)의 방법에 따라 측정하였다.

### Pectin질의 추출 및 측정

Yamaki 등(1979)이 행한 방법에 준하여 과피를 제거한 과육 100 g에 80% ethanol 200 ml를 가하여 마쇄한 후  $80^\circ\text{C}$ 에서 20분간 가열처리하여 효소를 불활성화시킨 다음 80% ethanol로 3회 여과, 수세하여 동결 건조한 것을 alcohol insoluble substances(AIS)로 하였다. 가용성 pectin은 AIS 0.1 g에 50 ml의 증류수를 첨가하여  $25^\circ\text{C}$ 에서 2시간 용해시킨 후 원심분리하여 상정액을 수용성 pectin으로 하였고, 잔사에 0.5% EDTA 용액을 가하여 용해한 것을 versene-soluble pectin으로 하였다. 불용성 pectin은 남은 잔사를, 그리고 총 pectin은 AIS를 각각 진한 황산으로 용해한 것으로 하였다. Pectin의 측정은 Blumankrantz 등(1973)의 방법에 따라 각 시료용액 1 ml에  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /sodium tetraborate 용액 6 ml를 첨가하여 ice box에 넣은 후 vortex mix로 잘 혼합하여  $100^\circ\text{C}$ 에서 5분간 가열한 후 냉각하였다. 이 용액에 0.1 ml의 meta-hydroxydiphenyl(0.5% NaOH 용액에 용해한 0.15% meta-hydroxydiphenyl)시약을 첨가하여 발색시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 mono galacturonic acid를 사용하였고 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

## 結 果

### Pectin질 분해효소의 활성 조사

병원균을 사과에 접종하여 7일간 배양한 부패과에서 추출한 pectin질 분해효소의 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 추출한 pectolytic enzyme는 exo-PG, exo-PMG, PGTE, PMTE 등이었으며, endo-PG와 endo-PMG의 활성은 나타나지 않았다. exo-PG의 활성은 4.23 units/ml였으며, specific activity는 21.15 units/mg protein으로 높은 활성을 보였다. exo-PMG의 활성은 4.93 units/ml로 나타나 exo-PG의 활성보다 약간 높은 경향이었으며, specific activity에서도 24.65 units/mg protein으로 높은 활성을 보였다. PGTE와 PMTE의 활성은 specific activity가 각각 5.60 및 7.90 units/mg protein으로 나타났으나 exo-type의 효소활성보다는 낮은 경향

**Table 1.** Activity of pectolytic enzymes extracted from rotten apples after incubation for 7 days at 27°C.

Pectolytic enzyme	Enzyme activity (units/ml)	Protein content (mg/ml)	Specific activity (units/mg protein)
PG <sup>a</sup>	4.23	0.20	21.15
PMG <sup>b</sup>	4.93	0.20	24.65
PGTE <sup>c</sup>	1.12	0.20	5.60
PMTE <sup>d</sup>	1.58	0.20	7.90

<sup>a</sup> PG: exo-polygalacturonase  
<sup>b</sup> PMG: exo-polymethylgalacturonase  
<sup>c</sup> PGTE: polygalacturonate-*trans*-eliminase  
<sup>d</sup> PMTE: pectinmethyl-*trans*-eliminase

이었다.

1) Exo-polygalacturonase

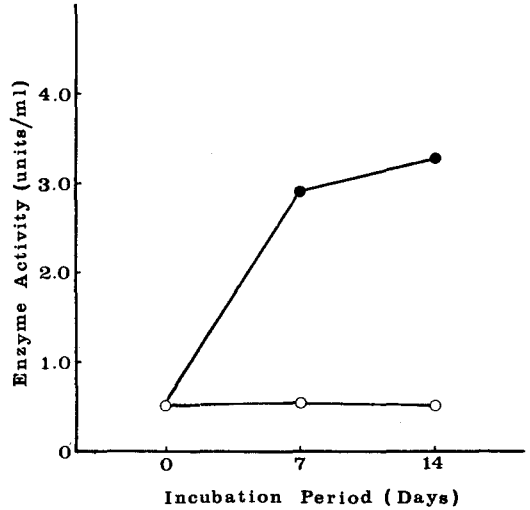
사과의 부패과정에서 병원균이 생산한 exo-PG의 활성을 측정한 결과 접종하기 직전의 사과에서는 0.50 units/ml였으나 접종 후 7일째와 14일째에는 각각 2.91, 3.21 units/ml로 부패가 진행됨에 따라 활성도 증가하였다. 건전과에서 추출한 exo-PG의 활성은 배양 7일째와 14일째에 각각 0.53, 0.50 units/ml로 낮은 활성을 보였는데 부패과의 효소활성은 건전과에 비하여 5-6배의 현저한 증가를 보였다(Fig. 1).

2) Exo-polymethylgalacturonase

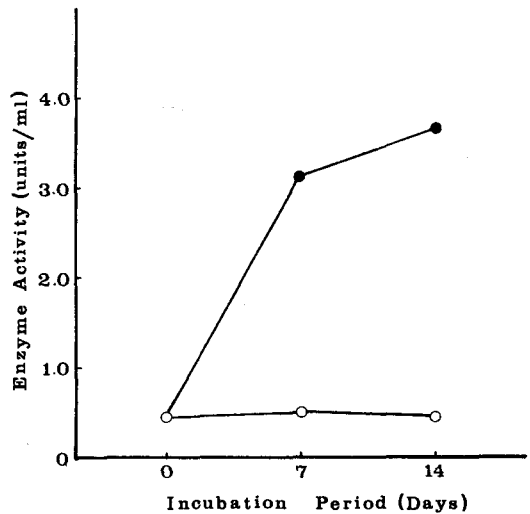
Exo-PMG의 활성과정은 exo-PG와 같은 경향을 보여 접종하기 직전의 활성은 0.42 units/ml였으나 배양 7일째에 3.11 units/ml로 급격히 증가하였으며, 14일째에는 3.64 units/ml로 활성의 증가를 나타내었다. 건전과의 활성은 배양 7일째와 14일째에 각각 0.48, 0.45 units/ml로 낮은 활성을 보였으며, 부패과의 활성과는 현저한 차이를 보였다(Fig. 2).

3) Polygalacturonate-*trans*-eliminase와 pectinmethyl-*trans*-eliminase

PGTE의 생산과정은 배양 7일째에 0.46 units/ml의 활성을 보였으며, 배양 14일째에 0.59 units/ml로 배양일수가 늘어남에 따라 약간 증가하는 경향이었으나 그 활성은 낮았다. PMTE의 생산과정은 배양 일수가 늘어남에 따라 7일째에 1.32 units/ml로 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 배양 14일째에는 1.14 units/ml로 그 활성이 약간 감소하는 경향이었던으나 큰 차이는 없었으며, PGTE의 활성과 비교하여 다소



**Fig. 1.** The activity of Exo-polygalacturonase extracted from rotten (●) and sound (○) apples during incubation at 27°C.



**Fig. 2.** The activity of Exo-polymethylgalacturonase extracted from rotten (●) and sound (○) apples during incubation at 27°C.

높게 나타났다. 건전과에서는 이들 두 효소의 활성이 전연 나타나지 않았다(Fig. 3).

**Pectin질의 변화**

Fig. 4는 세포벽을 구성하는 pectin성분을 용해성에 따라 가용성 pectin, 불용성 pectin, 총 pectin의 함량을 측정한 결과이다. 부패과에서 총 pectin의 함량은 배양일수가 늘어남에 따라 7일째와 14일째에

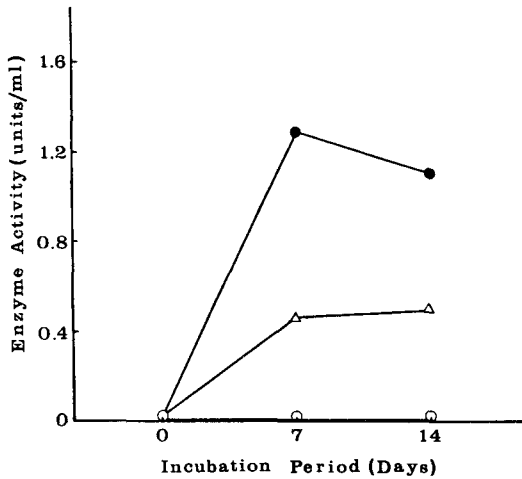


Fig. 3. The activity of polygalacturonate-trans-eliminase(-△-) and pectinmethyl-trans-eliminase(-●-) extracted from rotten and sound(-○-) apples during incubation at 27°C.

각각 26.29 및 25.97 mg/100 mg-AIS로 약간 감소하는 경향이었고, 건전과와 비교하여 그 함량은 약간 적었으나 큰 변화는 없었다. 수용성 pectin의 함량은 점종하기 직전의 사과에서 7.27 mg/100 mg-AIS으로 총 pectin의 26.2%를 차지하였으나 부패 7일째와 14일째에는 각각 10.21 및 11.50 mg/100 mg-AIS로 38.84와 44.28%의 증가를 나타낸 반면 건전과에서는 배양일수가 늘어남에 따라 7.29 및 7.50 mg/100 mg-AIS로 나타나 부패과와 비교하여 큰 차이를 나타내었다. Versene-soluble pectin은 수용성 pectin의 변화와 같은 경향을 보여 점종하기 직전의 사과에서는 5.15 mg/100 mg-AIS였으나 부패가 진행됨에 따라 7일째와 14일째에는 각각 6.89 및 7.31 mg/100 mg-AIS으로 총 pectin의 26.21와 28.15%로 증가하였다. 그러나 건전과에서는 배양 7일과 14일에 각각 5.05 및 5.50 mg/100 mg-AIS로 약간 감소하는 경향은 있었으나 부패과의 함량보다 7-8% 적었다. 불용성 pectin은 부패가 진행됨에 따라 7일째에는 9.19 mg/100 mg-AIS, 14일째에는 7.16 mg/100 mg-AIS으로 총 pectin의 27.57%로 27.66% 감소하였다. 건전과에서는 배양 직전에 15.32 mg/100 mg-AIS에서 배양 14일째에 14.28 mg/100 mg-AIS로 약간 감소하는 경향이었고 부패과와 비교하여 24.78% 더 높았다.

考 察

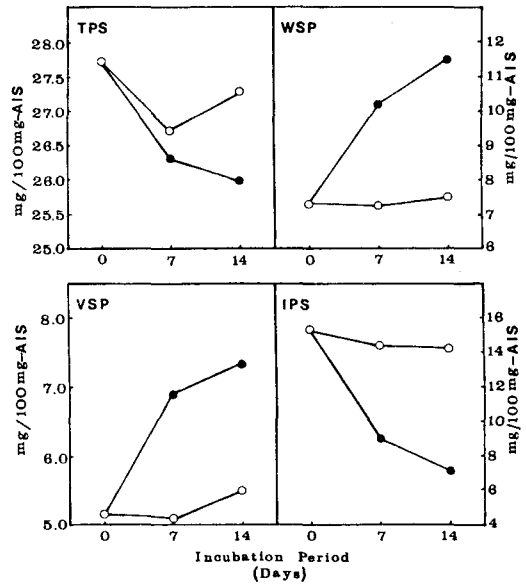


Fig. 4. Changes in the contents of pectic substances of alcohol-insoluble substances extracted from rotten (-●-) and sound(-○-) apples during incubation at 27°C.

Abbreviations: TPS : total pectic substance  
 WSP : water-soluble pectin  
 VSP : versene-soluble pectin  
 IPS : insoluble pectic substance

대부분의 식물 병원균은 기주를 침입함에 있어서 각피층, 세포중엽 및 세포벽을 분해하는 효소를 생산하고 생장에 필요한 양분을 흡수하여 균사가 생장함으로서 조직을 붕괴시킨다(Barmore 등, 1981; Ishii 등, 1972).

본 실험에서 사용한 사과 겹무늬썩음병균이 사과에 침입하여 생장할 때 생산하는 4종의 효소중 펙틴질의 주 chain인 rhamnogalacturonan을 순차적으로 분해하는 exo-polygalacturonase(PG)와 exopolymethylgalacturonase(PMG)는 specific activity가 부패 7일에 각각 21.15와 24.65 units/mg protein으로서 높게 나타났으며, polygalacturonate-trans-eliminase와 pectinmethyl-trans-eliminase는 부패 7일에 각각 5.6과 7.9 units/mg protein으로 그 활성이 낮았다. Barmore 등(1981)은 *Penicillium digitatum*에 부패된 과실에서 exo-PG를 분리, 정제하여 실험한 결과 이 효소에 의한 pectin질의 말단적 분해로 세포중엽의 pectin성분을 절단하여 균사침입을 용이하게 하며, Spalding 등(1972, 1973)은 *P.*

*expansum*에 의해 부패된 사과로부터 정제한 pectin Lyase가 메틸화된 pectin을 특징적으로 분해하여 세포를 연화시키는 효소라고 하였다. 본 실험에 있어서 *exo*-type의 효소 활성이 높게 나타난 것으로 미루어 볼 때 펙틴질을 말단절단(*terminal cleavage*)하는 이들 두 효소는 기주 침입에 있어서 세포조직의 연화와 붕괴에 직접 관여하는 것으로 생각된다.

부패가 진행되는 동안 사과의 pectin질은 가용성 함량이 총 pectin의 72.4% 이상을 차지하였고 불용성 pectin은 감소하였다. Cole 등(1961)도 이와 상응한 결과를 보고하였는데 *Penicillium expansum*에 의하여 부패된 사과 과실에서 불용성 pectin 물질이 70% 감소되었으며 Wallner, Bloom(1977)과 Knee 등(1978)도 *in vitro*에서 사과에 polygalacturonase를 처리한 결과 불용성 물질은 감소하고 가용성 polyuronide의 함량은 증가한다고 하였다. 과실내의 이러한 pectin질의 변화는 pectin질 분해효소인 *exo*-PG, *exo*-PMG 등에 의해 세포중엽과 세포벽에 존재하는 pectin질이 분해됨으로써 나타난 결과일 것이다(Conway 등, 1988). 따라서 과실이 부패됨에 따라 가용성 pectin질의 함량이 증가하는 것은 병원균이 불용성 pectin질을 분해하여 가용화시킴으로서 세포중엽의 결합력을 감소시켜 조직을 연화시킴과 동시에 균사침입을 용이하게 하는 것으로 생각된다. 앞으로 이들 효소를 더욱 순화하여 병발생과의 상호 관계를 구명할 필요가 있다고 사료된다.

### 摘 要

사과 겹무늬썩음병균 *Botryosphaeria dothidea*에 의해 부패된 사과과실에서 pectin질 분해효소를 추출하여 그들의 활성과 pectin 성분의 변화를 조사하였다. 본 병원균은 *exo*-polygalacturonase(*exo*-PG), *exo*-polymethylgalacturonase(*exo*-PMG), polygalacturonate-*trans*-eliminase(PGTE)와 pectinmethyl-*trans*-eliminase(PMTE)를 생산하였다. 부패된 사과 과육에서 *exo*-PG와 *exo*-PMG는 접종 후 7일째 specific activity가 각각 21.15 및 24.65 units/mg protein으로 높게 나타났다. PGTE와 PMTE의 활성은 7일째 각각 5.60과 7.90 units/mg protein으로 나타났으나 *exo*-type의 효소보다는 그 활성이 낮았다. 수용성 pectin은 부패가 진행됨에 따라 14일째에

11.50 mg/100 mg-AIS이었고, versene-soluble pectin 역시 7.31 mg/100 mg-AIS로 나타나 건전과와 비교하여 각각 4.23 및 2.16 mg/100 mg-AIS 증가하였다. 부패과의 총 가용성 펙틴 함량은 총 pectin의 72.4%로서 건전과와 비교하여 24.8% 더 높았다. 불용성 pectin 함량은 부패가 진행됨에 따라 15.32 mg/100 mg-AIS에서 7.16 mg/100 mg-AIS로 현저하게 감소하였으며, 총 pectin 함량은 큰 변화가 없었다.

### 參考文獻

- Barmore, C. R. and G. E. Brown. 1979. Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruit decay caused by *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* **69**: 675-678.
- Barmore, C. R. and G. E. Brown. 1981. Polygalacturonase from citrus fruit infected with *Penicillium italicum*. *Phytopathology* **71**: 328-331.
- Ben-Arie, R., Kisler, N. and C. Frenkel. 1979. Ultrastructural changes in the cell wall of ripening apple and pear fruits. *Plant. Physiol.* **64**: 197-202.
- Blumankrantz, N. and G. Asobe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Ann. Biochem.* **54**: 484-489.
- Cole, M. and R. K. S. Wood, 1961. Types of rot, rate of rotting and analysis of pectic substances in apples rotted by fungi. *Ann. Bot. N. S.* **25**: 417-434.
- Conway, W. S. and Sams, C. E. 1983. Calcium infiltration of Golden Delicious apples and its effect on decay. *Phytopathology* **73**: 1068-1071.
- Conway, W. S., Gross, K. C., Boyer, C. D. and Sams, C. E. 1988. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increase apple cell wall calcium. *Phytopathology* **78**: 1052-1055.
- 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 *Stemphylium* leaf of alfalfa. *Phytopathology* **55**: 346-355.
- Hancock, J. C. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* **56**: 975-979.
- Hasegawa, S. and J. K. Crawford. 1969. Polygalacturonase content of dates and its relation to maturity and softness. *J. Food. Sci.* **34**: 527-529.

- Ishii, S. and T. Yokotsuka. 1972. Purification and properties of endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1885-1893.
- Knee, M. 1978. Metabolism of polymethylgalacturonate in apple fruit cortical tissue during ripening. *Phytopathology* **17**: 1261-12643.
- Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- McClendon, J. H. 1964. Evidence for the pectic nature of the middle lamella of potato tuber cell walls based on chromatography of macerating enzymes. *Amer. J. Bot.* **51**: 628-633.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- 朴錫熙, 金起弘, 李昌垠. 1991. 사과 겹무늬썩음病菌 *Botryosphaeria dothidea*에 의한 Pectin質 分解酵素의 생산. *韓國菌學會誌* **9**(2): 143-147.
- Spalding, D. H. and A. A. Abdul-Baki. 1972. In vitro and in vivo production of pectin lyase by *Penicillium expansum*. *Phytopathology* **63**: 230-235.
- Spalding, D. H., wells, J. M. and D. W. Allison. 1973. Catabolite repression of polygalacturonase, pectin lyase and cellulase synthesis in *penicillium expansum*. *Phytopathology* **63**: 840-844.
- Wallner, S. J. and H. L. Bloom. 1977. Characteristics of tomato cell wall degradation in vitro implication for the study of fruit softening enzymes. *Plant Physiol.* **60**: 207-210.
- Yamaki, S., Machida, Y. and N. Kakiuchi. 1979. Changes in cell wall polysaccharides and monosaccharides during development and ripening of Japanese pear fruit. *Plant Cell Physiol.* **20**(2): 311-321.