

수박의 이상 발효(피수박)와 내생세균의 존재와의 연관성

최재율* · 최춘환 · 육진아 · 안길환¹ · 황용수
충남대학교 식물자원학부, ¹충남대학교 식품공학과

Relationship between the Production of Fermentational Off-flavor and Presence of Microbial Endophytes in Bloody Watermelon

Jae Eul Choi*, Chun Hwan Choi, Jin Ah Ryuk, Gil-Hwan An¹ and Yong Soo Hwang

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

¹Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received on October 20, 2004)

The bloody watermelon exhibiting dark red and fermentation off-flavor results in a great economic loss. As an effort to clarify the cause of the bloody watermelon, relationship between the fermentational off-flavor and the presence of endophytic bacteria was studied. The number of endophytes was $2.2\text{-}37.0 \times 10^3$ cfu/g fw (fresh weight) in normal watermelons, compared to $1.26\text{-}1.75 \times 10^6$ cfu/g fw in bloody ones. Seventeen bacteria among 56 isolates from bloody watermelons could induce bloody watermelons. The bacteria responsible for bloody watermelons were mainly Gram negative: aerobic *Pseudomonas* spp and some anaerobic bacteria. The results in this study strongly suggested that the bloody watermelons were produced by abnormal fermentation and growth of endophytic Gram negative bacteria.

Keywords : Bloody watermelon, Endophytic bacteria, Fermentation, Watermelon

성숙단계의 수박에서 발생하는 생리장애에는 피수박, 육질악변과, 공동과, 황대과, 열과 등이 알려져 있으며, 그 중에서도 피수박은 상품가치를 크게 손상시켜 수박재배 농가의 소득에 막대한 피해를 주고 있다. 피수박은 증상이 가벼울 때는 과육 부분의 일부가 수침상의 진한 적색을 띠고 세포가 붕괴한 것처럼 보이며, 더 진행되면 과육부 전체가 물러지고 암자색을 띠며 맛이 자극적이고 발효된 냄새가 난다(Komura 등, 1971; 이 등, 1990; 김 등, 1999).

현재까지 알려진 피수박의 원인은 두 가지 요인이 있는데 하나는 병리적인 원인에 의한 것이고 다른 하나는 생리적인 원인이라고 하였다. 병리적인 요인은 오이녹반모자이크바이러스(CGMMV)가 대목에 감염된 것이 접수인 수박에 전염이 되어 과일이 물렁물렁해지고 조직의 일부가 알콜 발효가 되어 자극적인 맛을 내는 증상이고

(Komura 등, 1971; 이 등, 1990; 김, 1999), 생리적인 요인은 과일의 비대 초기의 건조가 계속되면 과육부의 중앙 부근이 담백색으로 변하고 수침상으로 되며 종종 젤리증상을 동반하는 경우가 많다(김, 1999). 그러나 아직까지 이러한 장애의 원인에 대하여 정확히 밝혀진 바 없다.

최근에 최 등(2003)은 참외 발효과는 참외 내생 세균에 의해 유발되고 이 세균은 오이, 호박에는 발효과와 유사한 증상이 나타나고 수박에는 피수박과 유사한 증상이 유발된다고 하였다. 이러한 결과는 내생 세균이 피수박의 발생원인 중의 하나일 수 있다는 가능성을 제시한 논문이다.

식물의 조직에는 식물병원성 세균 뿐만 아니라 비병원성인 세균이 다량 존재한다는 것은 많이 알려진 사실이다. 병원성 세균은 식물체 내에서 $10^7\text{-}10^{10}$ cfu/g fw의 밀도로 비병원성인 내생세균보다 높은 밀도로 정착한다고 하였다(Kliji 등, 1991; Yang 등, 2001). 알팔파, 단옥수수, 목화, 감자 등의 내생 세균은 $10^2\text{-}10^6$ cfu/g fw 밀도로 분리되며(Massol-Deya 등, 1995), 내생 미생물은 발아하는 유근(Kirchhof 등, 2001), 2차 근, 기공(Sturz와 Christe, 1996), 상처 부위(Nei와 Li, 1979)로 침입하여, 세포 내 또

*Corresponding author
Phone)+82-42-821-5729, Fax)+82-42-822-2631
E-mail)chioje@cnu.ac.kr

는 세포 간극(Liu 등, 1997) 등에 정착하여 살아간다고 하였다.

유채로부터 분리한 내생세균은 유채와 토마토의 생육을 증진시키고, 시들음병을 억제시켰으며(Nejad와 Johnson, 2000), Shishido와 Chanway(1999)는 전나무로부터 전나무의 생육을 촉진하는 내생 세균을 분리하였다고 하였다. Pratella 등(1993)은 여러 가지 원예작물에 존재하는 내생 세균은 수확 후에 발생하는 *Monilinia laxa*와 *Rhizopus stolonifer*의 생물학적 방제에 효과적이었다고 하였다.

이러한 결과는 내생 세균의 일부는 잠재 감염하여 발병 환경이 좋을 때는 식물에 병을 발생시키나 일부의 내생 세균은 병원균의 생육을 억제시켜 생물학적 방제나 생육 촉진 효과를 나타내는 것을 의미한다. 그러므로 식물 내생균의 종류에 따라 식물에 해를 주는 세균과 식물에 유익한 세균이 공생하는 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 수박 재배에 심각한 피해를 주고 있는 피수박에 대한 원인을 밝히고자 정상 수박과 피수박의 내생 세균의 밀도를 조사하고, 수박으로부터 분리한 내생 세균과 피수박 발생과의 관계를 밝히기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

내생세균의 분리. 본 시험에 사용한 정상 수박과 피수박은 수박재배농가로부터 수집하였다. 수박의 표면에 70%의 ethanol을 분무하여 표면 살균하고 멸균한 칼로 표피를 제거한 다음, 과육을 0.5×0.5×0.5 cm 크기로 잘라 멸균한 tube에 넣고 마쇄하였다. 과육의 채취 및 마쇄 작업은 clean bench에서 실시하였다. 마쇄한 조직은 멸균수를 가하여 10⁻¹~10⁻⁵배로 희석한 다음 King's B agar 배지(bacto peptone 20 g, K₂HPO₄·3H₂O 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, agar 15 g, glycerol 15 ml, 증류수 1 l)가 들어있는 petri dish에 100 μl씩을 가하여 표면에 골고루 도달한 다음, 27°C의 항온기에서 암 상태로 2~3일간 배양한 후 colony 수를 측정하였다. 색과 크기가 다른 colony를 선별하여 KBA 배지에서 순수 분리한 후 15% glycerol을 첨가하여 -80°C에서 보관하면서 피수박 유발 및 세균의 특성 시험에 사용하였다.

피수박 유발 검정. 수박으로부터 분리한 내생 세균을 KB 배지에서 24시간 진탕 배양한 다음에 멸균수로 10⁸ cfu/ml의 농도로 희석하여 접종원으로 사용하였다. 건전한 수박을 구입하여 표면 살균하고 멸균한 cork borer를 사용하여 구멍을 뚫은 후 접종원을 넣고 바세린으로 접종부위를 막았다. 대조구로는 멸균수를 접종하였다. 접종

한 수박은 상온에서 2~3일간 보관한 다음 접종 부위를 잘라서 피수박 증상의 발생 유무를 조사하였다.

내생균의 세균학적 특성 검정. 피수박으로부터 분리한 세균의 특성검정은 Schaad(1988) 및 Holt 등(1994)의 방법에 의해 실시하였다.

Ethanol 함량 측정. Ethanol 함량은 다음의 방법으로 측정하였다. Ethanol 측정 solution [0.1 M Potassium diphosphate buffer(pH 9.0)와 NAD 용액(100 μl), ADH 용액(20 μl)을 혼합(10 ml)하여 냉장 보관] 1 ml을 cell에 넣고 Abs(A1)을 측정하였다. Sample을 10 μl 첨가하여 혼합한 다음 30초 간격으로 8분간 측정하여 가장 높은 Abs 값을 A2 값으로 하였다. ΔA(A2-A1) 값을 standard curve에 대입하여 ethanol 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

내생 세균 밀도. 수박의 내생 세균 밀도를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 정상 수박의 내생 세균은 최저 2.2 × 10³ cfu/g fw, 최고 3.7 × 10⁴ cfu/g fw의 밀도로 분리되어 개체 간에 차이가 컸다. 피수박의 내생 세균은 최저 1.26 × 10⁶ cfu/g fw, 최고 1.75 × 10⁶ cfu/g fw의 밀도로 분리되었다. 정상 수박에서 분리된 세균의 colony의 직경은 대부분이 1~2 mm이었으나 피수박에서 분리된 세균의 대부분은 정상 수박에서 분리한 것 보다 colony의 직경이 컸다.

이상과 같이 정상 수박의 세균 밀도는 10⁴ cfu/g fw를 넘지 않았으나 피수박의 경우는 10⁶ cfu/g fw 이상으로 피수박과 내생 세균의 밀도와 관련이 있을 것으로 예상되었다. 최근에 최 등(2003)은 건전한 참외의 세균밀도는 10² cfu/g fw에 불과하였으나 발효과의 세균밀도는 10⁵~10⁶ cfu/g fw로 월등히 높아 발효과의 발생은 내생 세균의 밀도와 관련이 있다고 하였다. 단옥수수 뿌리와 줄기에서 분리된 내생 세균은 토양과 종자로부터 감염되었을 것이라고 하였다(McInroy와 Kloepper, 1991). 수박에 존재하는 내생세균도 토양 또는 공기 중에 있는 세균이 감염된 것으로 추정된다.

내생 세균에 의한 발효 증상 유기. 건전한 수박에 cork borer로 구멍을 뚫고 내생 세균 현탁액을 접종하여 3일

Table 1. Population of endophytic bacteria between normal and fermentation-like disordered watermelons

Degree of blood fruit	Bacterial population (cfu/g fresh wt)
None	16.6(2.2~37.0) × 10 ^{3a}
Severe	1,505(1,260~1,750) × 10 ³

^aNumbers in parenthesis indicate the ranges of three replications.

Table 2. The occurrence of fermentation-like disorder by artificial inoculation of bacteria isolated from affected watermelon fruits 3 days after inoculation

Isolate	Infected	Isolate	Infected
CW20301	+++ ^a	CW20313	-
CW20302	-	CW20314	++
CW20303	+++	CW20315	++
CW20304	+++	CW20316	-
CW20305	+++	CW20317	++
CW20306	++	CW20318	-
CW20307	+++	CW20319	+++
CW20308	+++	CW20320	++
CW20309	++	CW20321	+++
CW20310	++	CW20322	+++
CW20311	-	CW20323	-
CW20312	-	CW20324	++

^a-, Not affected; ++, Mildly affected; +++, Severely affected.

후에 피수박 유발정도를 조사한 결과 CW20301, CW20303, CW20304, CW20305, CW20307, CW20308, CW20319, CW20321, CW20322 균주들은 심하게 피수박 증상을 유발시켰으며, CW20306, CW20309, CW20310, CW20314, CW20315, CW20317, CW20320, CW20324의 균주들은 약한 증상으로 나타났다. 그러나 CW20302, CW20311, CW20312, CW20313, CW20316, CW20318, CW20323 균주들은 피수박을 유발하지 않았다(Table 2). 피수박으로부터 분리한 내생 세균의 접종에 의한 피수박 증상은 자연 발생한 피수박 증상과 동일하였다(Fig. 1). 내생 세균을 접종하여 피수박이 유발된 표피에는 자연발생한 피수박 표피에서와 같이 수침상의 증상이 나타났다. 또한 참외의 발효과에서와 같은 불쾌한 냄새가 발생하였다.

발효취는 조직의 ethanol 수준과 밀접한 관련이 있으므로 피수박 증상을 유발하는 균주에 의해서도 ethanol의 생산이 유도되는가를 검토한 결과, 대조구의 ethanol 함

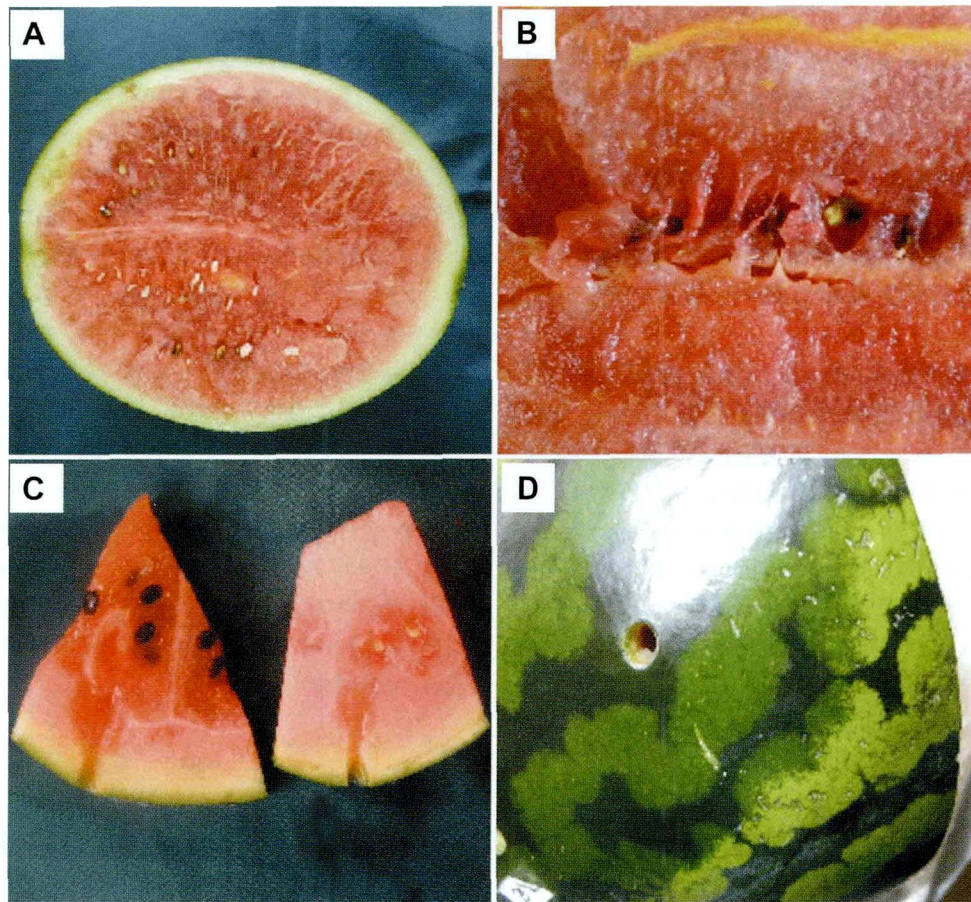


Fig. 1. Symptoms of blood fruit of watermelon in the field and induced by inoculation with endophytic bacteria. **A** and **B** : Natural symptoms of watermelon. **C** : Artificial symptoms of watermelon (left) and control (sterilized water inoculated, right), **D** : Symptom formed on the fruit surface by artificial inoculation.

Table 3. Ethanol production by inoculating microorganisms causing bloody watermelon

Inoculation strain	Ethanol (μ l/l watermelon juice)
None	66.4 \pm 4.3 ^a
CW20308	150.3 \pm 4.2
CW20321	223.8 \pm 5.2

^aStandard deviation.

량은 66.4 \pm 4.3 μ g/l에 불과하였으나 CW20308과 CW20321을 접종한 경우에는 각각 150.3 \pm 4.2와 223.8 \pm 5.2 μ g/l의 수준으로 ethanol이 증가하였다(Table 3). 이 결과는 이상 발효 참외에서 관찰된 결과와 매우 유사하며 피수박 증상도 내생 세균의 증식에 의한 발효증상에 의하여 일어나는 것으로 확인되었다.

수박을 자른 후 냉장고 저장 중에도 피수박과 같은 증상을 흔히 볼 수 있다. 이러한 현상은 건전한 수박에도 피수박을 유발할 수 있는 세균이 잠재감염이 되었으나 이러한 균의 증식을 억제하여 피수박이 유발되지 않으나 저장성의 약화 등으로 잠재감염된 피수박 유발균의 증식에 알맞은 환경이 주어지면 이들 세균들이 급격히 증식하여 10⁶ cfu/g fw 이상이 되면 피수박 증상이 나타나는 것으로 생각된다. 이러한 추정에는 피수박의 세균밀도가 10⁶ cfu/ml 이상이고, 10⁶ cfu/ml 이상의 내생세균을 0.5~1.0 ml 주입하면 2~3일 이내에 피수박이 유발된다는 본 실험결과에서도 증명되었으며, 유사한 결과가 참외의 발효과에서도 이미 보고되었다(최 등, 2003).

Misaghi와 Donndelinger(1990)는 병징을 보이지 않는 목화의 뿌리, 줄기, 꽃봉오리 및 다래로부터 *Erwinia* spp., *Bacillus* spp., *Clavibacter* spp., *Xanthomonas* spp. 등과 같은 식물 병원 세균을 분리하였고, Hickey 등(1998)은 병징이 없는 사과나무 줄기 조직에서 내생하는 *E. amylovora*는 병원성이 확인되어 latent canker blight라고 할 것을 제안하기도 하였다. 이와 같이 내생 세균에는 병원성 미생물도 포함되지만 이들은 식물의 생육 증진이나 생물적 방제 등의 역할을 한다는 결과도 보고되었다(Misaghi와 Donndelinger, 1990; Pratella 등, 1993). 따라서 수박에서도 피수박을 유발하는 세균을 억제시키는 내생 세균이 존재할 것으로 생각된다.

피수박으로부터 분리한 내생세균의 특성. 수박으로부터 분리한 내생 세균을 배양하여 colony 형태와 색 등에 따라 순수 배양한 균주의 주요 특성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 24균주 중 Gram 음성균이 17균주, Gram 양성균이 7균주로 Gram 음성균의 비율이 높게 나타났

Table 4. Grouping of bacteria isolated fermentation-like disordered watermelon on the basis of bacterial characteristics

Characteristics	Bacterial group			
	I	II	III	IV
Gram stain	- ^a	-	-	+
Grows anaerobically	-	+	-	+
Grows aerobically	+	+	+	+
Endospore forming	-	-	-	-
Fluorescent pigment	-	-	+	-
No. of isolate	7	5	5	7
No. of bacteria with symptom incidence	7	5	5	-

^a- : negative reaction, + : positive reaction.

다. 호기적으로 증식하는 균주와 혐기적으로 증식하는 균주는 각각 12균주였다. 그러나 내생포자를 형성하는 균은 분리되지 않았다.

내생 세균 중에서 피수박을 유발하는 균주는 모두 Gram 음성이고, Gram 양성 세균은 피수박 증상을 유발하지 않았다. Gram 음성세균에는 호기성 세균과인 세균으로 구분되었으며 호기성세균에는 형광색소를 생산하는 *Pseudomonas* 속 세균이 5균주가 포함되었다

현재까지 피수박의 원인은 오이녹반모자이크바이러스(CGMMV)의 감염에 의해 발생하는 병적인 원인과 과일의 비대 초기의 건조가 계속되면 나타나는 생리적인 원인이라고 하였다. 수박에 CGMMV가 감염되면 과일의 꼭지부분에 갈색의 줄무늬가 나타나고 과피에 농록색의 작은 흑과 모자이크가 보이기도 하며, 과육은 씨앗의 주변이 적자색을 띠고 곳곳에 황색 섬유상의 줄이 생기면서 연화해서 산패(酸敗) 냄새를 낸다고 하였다. 그러나 본 연구의 재료로 사용한 피수박은 CGMMV의 병징이 없는 것이었다. 자연 유발된 피수박은 참외 발효과의 특성과 유사한 증상이 나타났다. 또한 본 연구결과에서는 내생세균에 의하여 피수박이 유발되며, 최 등(2003)은 참외발효과로부터 분리한 세균에 의해서도 피수박이 유발된다고 하였다. 따라서 피수박을 이상 발효 수박이라고 명명할 것을 제안한다.

요 약

진한 적색과 이상 발효 증상을 나타내는 피수박은 막대한 경제적 손실을 주고 있다. 본 연구는 피수박의 발생 원인을 밝히기 위하여 이상 발효와 내생 세균과의 연관성을 검토하였다. 수박의 내생 세균 밀도는 정상 수박의 경우 2.2~37.0 \times 10³ cfu/g fw에 불과하였으나 피수박의 경

우는 $1.26\sim 1.75 \times 10^6$ cfu/g fw로 정상 수박에 비해 밀도가 매우 높았다. 피수박에서 분리한 56균주에서 17균주가 피수박을 유발하였다. 피수박과 관련이 있는 세균은 대부분이 Gram 음성으로 호기성인 *Pseudomonas* spp.와 혐기성 세균이었다. 따라서 피수박은 Gram 음성인 내생세균의 증식에 의한 이상 발효가 원인이라고 추정된다.

참고문헌

- 최재을, 차선경, 김진희, 육진아, 황용수. 2003. 이상발효 참외로부터 분리한 내생 세균의 특성 및 발효 증상 유기. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44(3): 292-296.
- Hickey, K. D., Orolaza, H., Zewet, N., vander Zwet, T. and Momol, M. T. 1998. The presence of endophytic *Erwinia amylovora* bacteria in symptomless apple tissue on orchard trees. *Acta Hort.* 489: 453-458.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, J. P. H., Staley, A. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA. pp 964.
- 김병수, 양동훈, 이호철. 1999. 수박, 성공적 재배와 경영. 농민신문사. 322 p.
- Kirchhof, G., Eckert, B., Stoffels, M., Baldani, J. I., Reis, V. M. and Hartmann, A. 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 157-168.
- Klijin, N., Weerkamp, A. H. and de Vos, W. M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA-specific and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3390-3393.
- Komura, Y., Tochihara, H., Fukatsu, R., Nagai, Y. and Yoneyama, S. 1971. Cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) in water and its relationship to the fruit deterioration known as 'Konyaku' disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 37: 34-42.
- 이기운, 이봉춘, 박호철, 이용수. 1990. 한국에서 수박에 발생한 오이 녹반 모자이크 바이러스(Cucumber Green Mottle Mosaic Virus)병에 대하여. *한국식물병리학회지* 6: 250-255.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. and Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.
- Massol-Deya, A. A., Odelson, D. A. Hickey, R. F. and Tiedje, J. M. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: *Molecular microbial ecology manual*, ed. by A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn, pp. 1-8. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- McInroy, A. J. and Kloeppe, J. W. 1991. Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. *Bull. SROP* 14: 328-331.
- Misaghi, I. J. and Donndelinger, C. R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Nejad, P. and Jhonson, P. A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological-Control* 18: 208-215.
- Pratella, G. C., Mari, M., Guizzardi, M. and Folchi, A. 1993. Preliminary studies on the efficiency of endophytes in the biological control of the postharvest pathogens *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 3: 361-368.
- Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *Bacteriol. Commit. Amer. Phytopath. Soc. St. Paul, MN, USA.* 164 pp.
- Shishido, M. and Chanway, C. P. 1999. Spruce growth specificity after treatment with plant growth-promoting *pseudomonas*. *Can. J. Bot.* 77: 22-31.
- Sturz, A. V. and Christie, B. G. 1996. Endophytic bacteria of red clover as agent of allelopathic clover-maize syndromes. *Soil Biol. Biochem.* 28: 583-588.
- Yang, C., Crowley, D. E. and Menge, J. A. 2001. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 129-136.