

온주밀감 부패 곰팡이의 분리 및 동정

고영환*, 김세재

제주대학교 식품공학과*, 생물학과

Collection and Identification of Molds from Citrus Oranges during Post-Harvest Storage

Young Hwan Ko* and Se Jae Kim

*Dept. of Food Science and Technology, Dept. of Biology

Cheju National University, Cheju, Chejudo, 690-756

ABSTRACT

Long term-storage of citrus oranges after harvest has been hindered mainly by molds. The goal of this research was to collect and identify those molds, which would help find a way to extend shelf-life after harvest. During the period of 1994 to 1995, fourteen different strains were isolated and purified from putrefied fruit (*Citrus unshiu* var.) that was stored at room temperature under open air. The storage disease was caused by the following molds: *Penicillium italicum*, 25.8%; *Monilia candida*, 19.8%; *Alternaria citri*, 18.1%; *Mucor hiemalis*, 11.0%; *Phomopsis citri*, 6.6%; *Botrytis cinerea*, 5.5%; *Phoma citricarpa*, 3.8%; *Glomerella cingulata*, 3.8%; *P. digitatum*, 1.1%; other molds, 4.5%. Most of the strains showed pectinolytic activity at different degrees. These data suggest the possible connection of pectinolytic activity and putrefaction. These citrus fruit-putrefying molds will be used as target strains for the control of microorganisms during post-harvest storage.

이 논문은 한국식품과학회지(1996) 28권 6호에 게재되었음.

서 론

수확후 감귤의 품질변화는 다른 과일과 마찬가지로 효소작용 등 내적요인과 외부로부터 침입한 미생물에 의한 외적요인으로 나눌 수 있다. 감귤 저장 중 부패를 일으키는 주요 미생물은 곰팡이이다. 그러나 국내 감귤에 대한 연구가 매우 미약한 실정이다. 권⁽¹⁾은 제주감귤의 상온저장 중 병해를 조사하여

그 발생빈도가 회색곰팡이병, 흑부병, 파란곰팡이병, 녹색곰팡이병, 흑반병, 축부병 순이었다고 보고한 바 있다. 그 이후의 후속적 연구는 더 이상 진행된 바 없이 단편적인 연구에 그쳤다. 조 등⁽²⁾은 자동종자 추출물을 제주산 부패감귤로부터 분리된 *Penicillium*속 곰팡이에 처리하여, 최소저해 농도가 250-500 ppm임으로, *Penicillium*속 곰팡이의 억제에 효과적이라고 한 바 있으나, 부패곰팡이의 다양성에 비추어 볼 때, 감귤저장 병해의 억제를 위해서는 보다 많은 연구가 필요하다고 하였다. 윤⁽³⁾은 제주산 온주밀감의 CA(O₂ 10%, CO₂ 2%)저장으로 대기하의 저장에서보다 부패율을 1/3정도로 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 이와같은 제반의 연구들은 감귤의 수확 후 저장에 관한 중요한 자료로 활용된다. 한편 저장감귤의 부패 관련 미생물은 지역특이적이고 다양할 것으로 예측되나, 실질적으로 저장연구에 사용될 수 있도록 확보된 균주가 거의 없다.

본 연구에서는 권⁽¹⁾이 보고한 자료를 보충하고 발전시키는 측면에서 온주밀감의 저장중 부패와 관련된 곰팡이를 가능한 한 다양하게 수집하였고, 감귤의 과피 특성에 비추어 공통된 생리적 성질을 찾아내고자 하였다. 이는 효과적인 부패방지법을 도출해 내는 자료로 활용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

균주의 순수분리

1994년 10월에서 1995년 2월에 걸쳐 상온에서 대기에 노출 저장된 온주밀감 중, 부패과일을 제주도내의 각 지역으로 부터 182개 수집하였다. 한 개의 과일에 서로 다른 병반이 두 종류 이상 육안 관찰되는 부패과일은 제외시켰다. 과일의 병반부위를 멸균된 파스테르 피펫을 사용하여 원반형으로 도려내어, malt extract(ME, Difco, USA) 한천배지 위에 올려 놓고 28°C에서 2-3일간 배양하였다. 균주를 순수분리하기 위하여 위와같이 배양된 균체를 tween 20을 0.02% 함유한 구연산 완충액(0.05M, pH 4.8)에 현탁시키고, 평판도말 배양하여, 독립균락을 취하였다. 순수분리 여부를 계대배양으로 확인하였다.

균주의 분류 및 동정

균주의 분류 및 동정은 기본적으로 Ainsworth 등^(4,5,6), Carlile 등⁽⁷⁾ 그리고 Laskin 등⁽⁸⁾의 방법과 분류표에 준해서 이루어졌다. 순수분리된 균주의 생육특성을 조사하기 위하여, ME 한천배지 이외에도, potato dextrose agar(Difco, USA), Sabouraud dextrose agar(Difco, USA)를 사면배양용 배지로 사용하였다. 사면배양시 균총의 색, 기균사의 발달 유무, 색소의 생산 유무, 생육속도, 균락의 밀면, 표면구조 등을 조사하였다. 균체의

미세구조를 관찰하기 위하여 현미경을 사용하였다. 사면배양한 균체의 구조를 가능한 한 온전하게 유지하면서 lactophenol(lactic acid 100ml, phenol 100g, glycerol 200ml, water 100ml)을 사용하여 광학현미경(XSP-24, 강남)으로 검경하였으며 유성, 무성 번식기관의 형태, 규격, 격벽 등 형태학적 특성을 분류 동정에 적용하였다.

펙틴 분해능 검정

자당 3.0% 대신에 펙틴과 자당을 각각 1.5%씩 함유한 Czapek-Dox broth⁽⁹⁾를 배양액으로 사용하여 실온에서 균체의 생육이 왕성할 때까지 액침배양 후, 0.2 μm 제균용 필터로 여과하여 얻은 무세포 여액을 펙틴분해능 검정용 효소액으로 사용하였다. 0.45% 펙틴 기질 용액은 citrus pectin 1.350g과 NaCl 2.6298 g을 0.05M(pH4.8) 구연산 완충액 300ml에 용해 시켜서 만들었다. 펙틴기질 용액 9.5 ml에 효소액 0.5 ml를 섞고 pH 4.8, 30°C에서 10분간 반응 후 점도를 Ostwald viscometer(size 75) (Witeg Glasgerate, W. Germany)로 측정하여 다음 식과 같이 상호 비교용 상대효소 역가를 계산하였다⁽¹⁰⁾.

$$\text{Relative Activity} = \frac{(t_0 - t)}{(t_0 - t_s)}$$

단, t_s : 기질의 용매와 불활성화 시킨 효소의 혼합액이 걸린 시간

t_0 : 기질 용액과 불활성화 시킨 효소의 혼합액이 걸린 시간

t : 기질 용액과 효소의 혼합액이 걸린 시간

결과 및 고찰

제주지역의 자연환경에 노출된 부패 온주밀감으로부터 14종의 곰팡이를 순수분리하였다(Table1). 그 중에서 11개의 분리주는 분류, 동정되었고, 3개 분리주는 미동정 균주이다. 동정된 분리주중 CPM02, CPM12, CPM15는 기 보고된 연구 문헌^(11,12)과 감귤상의 병반특성에 따라 각각 *Phoma citricarpa*, *Phomopsis citri*, *Glomerella cingulata*로 분류 동정되었고, 나머지 8개 균주는 형태 및 생리적 특성에 따라 분류, 동정되었다. *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*은 보편적인 감귤부패균이나^(11,12), *Alternaria alternata*, *Mucor hiemalis*, *Monilia candida*, 그리고 *Rhizopus sp.*가 부패 감귤로부터 분리된 것은 본 연구가 처음이다. 이중 *Alternaria alternata*는 들연변이 유발물질을 생산하는 것으로 알려져 있어서^(13,14), 가공과정 중에 부패과일이 섞이지 않도록 주의가 요구된다.

분리균주들이 수확 후 신선감귤에 병반을 일으켰을 때의 특징과 발생빈도를 Table 2에 요약하였다. 푸른 곰팡이에 의한 부패 과일의 발생빈도가 25.8%로 가장 높았으며, *Monilia candida*, *Alternaria citri*, *Mucor hiemalis*, *Phomopsis citri*, *Botrytis cinerea* 순이었다. 그 중에서 *Monilia candida*에 의한 백색 부패과일과 *Mucor hiemalis*에 의한 갈색 부패과일은 발생 빈도가 높음에도 불구하고 제주감귤을 대상으로한 권의 연구⁽¹⁾에서는 관찰되지 않았던 것이다. 그 이유로는 시료 채취상의 지역적,

Table 1. Identity of mold isolates from putrefied citrus oranges.

Isolate	Identity	Isolate	Identity
CPM01	<i>Alternaria alternata</i>	CPM11	Unidentified
CPM02	<i>Phoma citricarpa</i>	CPM12	<i>Phomopsis citri</i>
CPM03	Unidentified	CPM15	<i>Glomerella cingulata</i>
CPM04	Unidentified	CPM16	<i>Botrytis cinerea</i>
CPM05	<i>Alternaria citri</i>	CPM17	<i>Monilia candida</i>
CPM07	<i>Rhizopus sp.</i>	CPM18	<i>Penicillium italicum</i>
CPM09	<i>Mucor hiemalis</i>	CPM19	<i>Penicillium digitatum</i>

Table 2. Frequency of disease occurrence on citrus oranges by molds.

Pathogenic growth pattern on citrus fruit	Number of putrefied citrus oranges	Occurrence (%)	Molds isolated and identified
Blue mold	47	25.8	<i>Penicillium italicum</i>
White mold	36	19.8	<i>Monilia candida</i>
Black rot	33	18.1	<i>Alternaria citri</i>
Brown rot	20	11.0	<i>Mucor hiemalis</i>
Stem-end rot	12	6.6	<i>Phomopsis citri</i>
Gray mold	10	5.5	<i>Botrytis cinerea</i>
Black spot	7	3.8	<i>Phoma citricarpa</i>
Brown spot	7	3.8	<i>Glomerella cingulata</i>
Green mold	2	1.1	<i>Penicillium digitatum</i>
Undetermined	8	4.5	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , & the Unidentified
Total	182	100.0	

시기적 제한성에 따른 시료감귤의 한계로 추론된다. 권은 선과일을 일정한 장소에 보관하면서 부패과일을 조사하였고, 본 연구에서는 자연상태하에서 이미 부패된 온주밀감을 대상으로 하여 가능한 한 다양한 곰팡이를 수집하는데 중점을 두었다. 갈부병(brown rot)을 일으키는 곰팡이로 *Phytophthora parasitica*, *P. citrophthora*, *P. citricola* 등 *Phytophthora*속 곰팡이도 알려져 있다⁽¹²⁾.

온주밀감 생과의 pH는 3.2 내외이며, 이를 과피와 과육으로 분리하면, 과피가 약 25%, 과육이 75%이었고(자료제시 생략), 은 등⁽¹⁵⁾에 의하면 습량기준(wet basis)으로 과피의 0.94%가 펙틴이라고 하였다. 따라서 수분함유량을 제외한 건물량을 기준으로 한다면, 과피중의 펙틴함량은 매우 높은 편이다. 한편 감귤자체의 생리적인 방어기능⁽¹⁶⁾과 과피가 갖고 있는 물리적 특성을 고려할 때, 과피는 1차적인 방어막이라 할 수 있다. 외부로부터 침입한 미생물이 과피를 뚫고, 부패를 유도하기 위해서는 과피의 주요 구성분인 펙틴질의 분해를 고려할 수 있다. 따라서 감귤부패 미생물은 산성하에서 펙틴을 분해할

수 있으면서 숙주인 감귤의 생리적 방어기능을 극복할 수 있는 종으로 한정될 것이다. 이러한 측면에서 분류 동정된 11개 균주를 대상으로 펙틴분해효소 생산여부를 검정하였다(Table 3). 모든 곰팡이가 pH4.8에서 0.45% 펙틴을 분해할 수 있는 효소를 생산하였다. 감귤부패균의 번식을 억제하기 위해서는 수확후 저장조건이나, curing등 전처리도 중요하나, 곰팡이의 밀도와 관련된 수확시기와 감귤과피의 상해여부를 염두에 두어야 할 것이다.

자몽종자 추출물⁽²⁾, 지방산⁽¹⁷⁾ 그리고 농약⁽¹⁸⁾을 항진균제로 활용하려는 시도가 진행되고 있고, 세균과 효모를 부패곰팡이 억제용 생물제제로 이용하려는 연구⁽¹⁹⁾ 및 펙틴분해효소 유전자에 대한 antisense RNA를 이용하여 과일 품종개량을 통한 저장방법의 개선 연구⁽²⁰⁾가 이루어지고 있는데, 본 연구에서 수집된 곰팡이는 이와 같은 목적에 유용할 것이다. 또한 부패의 주 원인균이 세균이나 효모가 아니라 곰팡이인 점을 고려한다면, 효과적인 저장방법이 고안될 수 있다. 현재, 저자들은 이에 대한 연구를 진행하고 있다.

Table 3. Pectinolytic activity of cell-free culture filtrate.

Isolate	Relative Activity*	Isolate	Relative Activity*
<i>Mucor hiemalis</i>	0.43	<i>Glomerella cingulata</i>	0.22
<i>Penicillium digitatum</i>	0.70	<i>Alternaria alternata</i>	0.36
<i>Penicillium italicum</i>	0.61	<i>Phomopsis citri</i>	0.22
<i>Monilia candida</i>	0.35	<i>Botrytis cinerea</i>	0.24
<i>Alternaria citri</i>	0.57	<i>Phoma citricarpa</i>	0.35
<i>Rhizopus sp.</i>	0.44		

* Relative Activity : maximum ; 1.00, minimum ; 0.00.

요 약

수확 후 감귤의 장기저장은 주로 곰팡이에 의한 부패로 어려움을 겪어왔다. 본 연구에서는 감귤부패 곰팡이를 수집, 동정함으로써 수확후 저장성을 증대하는데 기여하고자 하였다. 1994년 가을부터 1995년 봄에 걸쳐 대기중에 노출된 채로 상온에 저장 중 부패된 온주밀감으로부터 14개의 상이한 균주를 분리하였다. 저장 중 각 곰팡이에 의한 병해의 발생빈도는 *Penicillium italicum* 25.8%, *Monilia candida* 19.8%, *Alternaria citri* 18.1%, *Mucor hiemalis* 11.0%, *Phomopsis citri* 6.6%, *Botrytis cinerea* 5.5%, *Phoma citricarpa* 3.8%, *Glomerella cingulata* 3.8% 그리고 *P. digitatum* 1.1% 순이었고, 기타 곰팡이가 4.5%를 차지

하였다. 한편 생리적 특성상 동정된 모든 균주가 펙틴분해 효소를 생산하였다. 이러한 연구결과는 감귤의 부패와 곰팡이의 펙틴분해능간에는 연관성이 있음을 시사한다. 수집된 곰팡이 균주는 감귤의 부패를 방지하는 연구에 이용될 것이다.

감사의 글

본 연구는 생명공학연구소의 지원으로 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 권오균 : 감귤 저장병해에 관한 연구. 제주대학교 논문집, 12, 29(1980)
2. 조성환, 이현철, 서일원, 김재욱, 장영상, 신재익 : Grapefruit 종자 추출물을 이용한 밀감의 저장 효과. 한국식품과학회지, 23(5), 614(1991)
3. 윤창훈 : 제주산 온주밀감의 CA 저장에 관한 연구. 한국농화학회지, 34(1), 14(1991)
4. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. and Sussman, A. S. : A taxonomic review with keys : Ascomycetes and fungi imperfecti In The Fungi, an advanced treatise, Academic Press Inc., New York, USA, Vol. VA(1973)
5. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. and Sussman, A. S. : A taxonomic review with keys : Basidiomycetes and lower fungi In The Fungi, an advanced treatise, Academic Press Inc., New York, USA, Vol. VB(1973)
6. Ainsworth, G.C. and Sussman, A.S. : The fungal population. In The Fungi, an advanced treatise, Academic Press Inc., New York, USA, Vol. III(1968)
7. Carlile, M.J. and Watkinson, S.C. : The Fungi. Academic Press Inc., San Diego, USA(1994)
8. Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. : Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses. In Handbook of microbiology, CRC Press Inc., West Palm Beach, USA, Vol. II(1978)
9. Harrigan, W.F. and McCance, M.E. : Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press Inc., New York, USA(1976).
10. Barrow, G.M. : Physical Chemistry, 3rd ed., McGraw-Hill Inc., Tokyo, Japan, p. 532(1973)
11. Iba, Y., Yamada, Y. and Nishiura, M. Studies on the cold storage of Satsuma mandarin : I. Effect of storage temperature and humidity on the decay of fruits in cold storage. The Bulletin of the Fruit Tree Research Station, series B, No.1, 59(1974)
12. Menge, J.A. : Diseases of Citrus(Citrus spp.). The American Phytopathological Society Press, USA(1994)
13. Davis, V.M. and Stack, M.E. : Mutagenicity of stemphyloxin III, a metabolite of *Alternaria alternata*. Appl. Environ. Microbiol., 57, 180(1991)
14. Stack, M.E., Mazzola, E.P., Page, S.W., Pohland, A.E., Hight, R.J., Tempesta, M.S. and Corley, D.G. : Mutagenic perylenequinone metabolites of *Alternaria alternata*: altertoxins I, II, and III. J. Nat. Prod., 49, 866(1986)
15. 은종방, 정영민, 우건조 : 감귤과육 및 과피의 식이섬유와 플라보노이드 검색 및 정량. 한국식품과학회지, 28(2), 371(1996)
16. Huang, Y., Deverall, B.J. and Morris, S.C. : Promotion of infection of orange fruit by *Penicillium digitatum* with a strain of *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology, 81(6), 615(1991)
17. Lisker, N. and Poster, N. : Antifungal activity of lauricidin and related compounds. J. Food. Safety, 4, 27(1982)
18. Holmes, G.J. and Eckert, J.W. : Relative fitness of imazalil-resistant and-sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. Plant Disease Journal, 79(10), 110(1995)
19. Janisiewicz, W. J. and Bors, B. : Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3261(1995)
20. Ju, R., Tian, Y., Shen, Q., Liu, C. and Mang, K. : Cloning of polygalacturonase(PG) cDNA and inhibition effects of its antisense RNA on the expression of PG gene in transgenic tomato plants. Chin. J. Biotechnol., 10, 67(1994)