

Byssochlamys fulva 가 생성하는 펙틴질 분해 효소에 관한 연구

— Ⅱ. Polygalacturonase 의 精製 및 特性 —

南榮重 · 金南洙 · 洪淳佑*

(農漁村開發公社 食品研究所 · *서울대학교 自然大 微生物學科)

Studies on the Pectolytic Enzymes from *Byssochlamys fulva*

— Ⅱ. Purification and Characterization of Polygalacturonase —

NAM, Young Jung, Nam Soo KIM and Soon Woo HONG*

(Food Research Institute, Agriculture and Fishery Development Corporation,
*Dept. of Microbiology, Seoul National Univ.)

ABSTRACT

Polygalacturonase of *Byssochlamys fulva* was purified and characterized. Specific activity increased from 2.21 units/mg protein to 10.47 units/mg protein through (NH₄)₂SO₄ treatment, Sephadex G-100 gel filtration, and DEAE-Sephadex ion exchange chromatography. Divalent cations, such as Ca⁺⁺ and Cu⁺⁺, increased polygalacturonase activity greatly. Added as 10⁻³M concentration, Ca⁺⁺ ion enhanced enzyme activity 9.8 folds. Optimum temperature was 50°C and optimum pH was 5.0. Activation energy of reaction was 8.69 kcal/mole. Michaelis-Menten constant(K_m) and V_{max} of reaction were 6.27×10⁻³moles/l and 2.85μmoles/min. Polygalacturonase of *Byssochlamys fulva* preferred polygalacturonic acid to pectin as substrate and was presumed as endo-type on the basis of the relationship between viscosity reduction and substrate degradation. Molecular weight of polygalacturonase was estimated as 55,000.

緒 論

最近 *Aspergillus* 屬 등에서 생성되는 펙틴질 분해 효소에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Lanzarini 등(1975)은 *A. usamii* 로부터分泌되는細胞外 효소를 DEAE-cellulose 및 DEAE-Sephadex A-50으로 精製한 후 前者를 使用時는 효소의 回收率을 높일 수 있고, 後者를 使用時는 活性이 좋은 효소를 얻을 수 있다고 報告하

고 있다. 柳等(1976)은 *Aspergillus* 屬이 分泌하는 endo-polygalacturonase 를 Sephadex G-100 을 使用하여 精製한 후, 이 효소의 適正 pH 는 4.5라 하였고, Archer 등(1979)은 딸기의 分解에 關聯된 곰팡이인 *R. stolonifer*, *R. sexualis*, *M. piriformis* 의 polygalacturonase 를 精製한 후, 適正 pH 는 5~6, 分子量은 30,000 에서 60,000 사이라고 주장하였다. Chu 등(1973)은 *B. fulva* 의 8 strain 을 培養한 후, 이들의 펙틴 分解 효소 生成能을 檢討하였다. 이들은 어떠한 strain 에서도, polygalacturonase 의 活性은 항상 나타

나고 있어, polygalacturonase가 *B. fulva*의 주된 펙틴 분해 효소이고, DEAE-cellulose column chromatography를 행한 결과, pH 6.0에서 polygalacturonase는 column에 흡착되지 않으므로, 이들의 등電點(isoelectric point: P_i)은 6.0보다 높다고 보고하고 있다.

前報에서는 *B. fulva*가 생성하는 polygalacturonase 適正 生産條件에 대하여 보고하였다. 本報에서는 *B. fulva*의 polygalacturonase를 精製하고, 精製된 酵素에 대하여, 金屬이온效果, 適正溫度, 適正 pH, 粘度減少效果等を 調査하여 *B. fulva*의 polygalacturonase의 特性을 分析하고자 하였다.

材料 및 方法

實驗 材料

使用 菌株. *B. fulva*(ATCC 10099)를 使用하였다.

使用 培地. Czapek-Dox 培地에 炭素源으로 pectin을 2% 濃度로 添加하였다.

酵素反應基質. Sigma社의 polygalacturonic acid와 pectin을 購入하여 酵素反應의 基質로 하였다.

溫度調節裝置. 酵素反應의 溫度는 Brabenda T 150 電子式 溫度調節器($\pm 0.02^\circ\text{C}$)를 使用하여, 調節하였다.

實驗 方法

準培養(subculture). Agar slant에서 接種棒으로 *B. fulva*의 菌體를 取한 後, 500 ml 三角 플라스크에 있는 100 ml의 液體 培地에 接種後, 25°C 에서 5日間 振盪培養하여 準培養液으로 하였다.

本培養. 準培養液 약 50 ml를 2l 三角 플라스크에 들어있는 400 ml의 液體 培地에 添加 후, L.H. Engineering社(英國)의 實驗工場用 振盪器에서 R.P.M. 120으로 5日間 培養하였다.

粗酵素液調製. 培養後, 菌體를 일차 濾過하여 건져내고 濾過液을 Sorvall RC-5B 冷凍 高速 遠心 分離機(Dupont社)를 使用하여, SS-34 rotor 상에서 12,000 g로 連續 遠心 分離한 후 그 液을 粗酵素液으로 하였다.

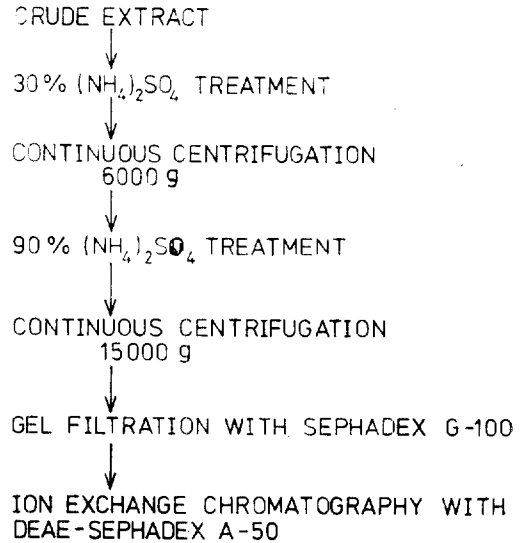


Fig. 1. Purification process of polygalacturonase in *Byssochlamys fulva*

精製. *B. fulva*의 polygalacturonase를 精製하기 위한 過程은 Fig. 1에 表示되어 있다.

粗酵素液을 Mount等(1970)의 方法을 變형하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 30% 濃度로 飽和시킨 후, 잘 저어주면서 5°C 에서 一夜 放置하였다. 6,000 g에서 SS-34 rotor로 연속 원심 분리하고, 上澄液을 취한 후 이를 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 90% 濃度로 포화시키고 잘 저어주면서 二夜방치하였다. 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 처리액을 15,000 g에서 연속 원심 분리한 후 沈澱을 모아 50 ml의 蒸溜水에 녹인 후 증류수에 대하여 5°C 에서 48時間 透析한 다음 酵素活性을 測定하였다.

透析液을 凍結 乾燥하여 부피를 5 ml로 줄인 후, 미리 Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals社)으로 70 cm의 bed 높이로 채워진 column(2.54×90 cm)에 注入하고 0.05M 磷酸 buffer(pH 6.5, 0.02 M NaCl 包含)로 0.5 ml/min의 流速으로 溶出하였다. 9.7 ml씩의 fraction을 얻은 후 polygalacturonase 活性이 나타나는 fraction들을 모아 5°C 에서 24時間 투석을 행한 후 酵素 活性을 測定하였다.

Gel filtration 후 투석이 끝난 液을 동결 건조하여 부피를 5 ml로 줄인 다음, DEAE-Sephadex A-50(Pharmacia Fine Chemicals社)으로 30cm의 bed 높이로 채워진 column(2.54×40 cm)에

넣어주고 0.05M 인산 buffer(pH6.5)로 樹脂 부의 2배 程度되게 씻어준 후 0.05M 인산 buffer 에 0~0.7 M의 NaCl 을 添加하여, gradient elution 을 행하였다. 이때 流速은 0.5ml/min 였고 fraction 당 9.7ml 를 받았다. 효소 활성이 나타나는 fraction 들을 모아 5°C에서 24 시간 투석을 행한후 효소활성을 측정하였다.

이렇게 하여 精製된 酵素液을 사용, 特性 試驗을 하였다.

基質 溶液 調製. 0.05 M 醋酸 buffer(pH5.2, 0.1M NaCl 포함)에 polygalacturonic acid 를 0.5%의 濃度로 넣어 酵素 反應의 基질용액으로 하였다. 粘度 測定에 있어서는 같은 buffer 에 녹인 0.5% pectin 용액을 병용하였고, 運動 變數(kinetic parameter)를 測定하는 시험에서는 基질인 polygalacturonic acid 의 濃度를 0.01% 에서 2.00%(α -D-galacturonic acid equivalent 로 환산시 5.15×10^{-4} moles/l 에서 10.31×10^{-2} moles/l)까지 變化시켰다. 適正 pH 시험에서는 基질용액의 pH는 3.0~9.0 까지 變化시켰으며, pH 3.0, 4.0, 5.0은 醋酸 buffer 로, pH 6.0, 7.0 은 磷酸 buffer 로, pH 8.0, 9.0, 10.0 은 Tris buffer 로 調節하였다.

酵素反應溫度. 適正溫度試驗에서는 효소반응의 온도를, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C로 變化시켰으나 기타의 경우에는 30°C에서 實驗하였다.

酵素活性測定方法.

還元기(Reducing group) 測定: Dinitrosalicylic acid method(Miller, 1959)

基質 10ml 에 酵素液 1ml 를 加한 후 各時間別(2, 5, 10, 20, 30, 60分)로 환원기의 生成을 보았다. 효소 반응액에 2N HCl 1ml 를 가하여 反應을 中止시키고, 13,000 g에서 10分間 冷凍 遠心 分離한 후, 上澄液 1ml 를 試驗管에 넣고 3ml 의 DNS 시약을 가한 후, 水槽 위에서 5分間 끓여준 후, 室溫으로 냉각하고, 부피를 20ml 로 해준다. 550nm 에서 물을 100%로 맞춘 후 試料의 %T 를 읽는다. 標準品으로 α -D-galacturonic acid 를 0~2.0 mg/ml 의 濃度로 만들어준 후, 표준 용액 1ml 에 DNS 시약 3ml 를 가한 후 위와같이 반응시킨 후 %T 를 읽는다. 이때 分當 1μ mole 의 환원기(α -D-galacturonic acid equi-

valent)가 生成되는 것을 1 unit 로 定義하였고, 酵素 活性은 酵素液 1ml 가 나타내는 unit 수로 하였다.

粘度 減少

Oswald-Cannon 粘度計(#100)로 測定後, Roboz等(1951)의 方法으로 %粘度變化를 측정하였다.

$$\% \text{粘度變化} = \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_i} \times 100, \%$$

여기에서,

V_t : 물과 불활성화 된 효소액의 flow time

V_0 : 기질용액과 불활성화된 효소액의 flow time

V_i : 효소 반응액의 flow time

反應 始作時의 粘度率을 100%로 하였을 때 相對粘度는 100% - %粘度變化로서 表示하였다.

蛋白質 定量. Lowry等(1951)의 方法에 의하여 측정하였다. 즉, 酵素液을 적당히 稀釋한 후 0.4 ml 를 취하고 Folin 試藥 A(50 volumes of 2% Na_2CO_3 in 0.1N NaOH with 1 volume of 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1% Na^+K^+ tartrate)를 2ml 加한 후 常溫에서 15分間 靜置한 다음 0.2ml 의 Folin 試藥 B(2.0N Folin-phenol 2배 희석액)를 넣어준다. 상온에서 30분간 정치한 후 750nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 標準品으로 bovine serum albumin(Sigma 社)을 0~1.0mg/ml 濃度로 만들어 사용한다.

分子量 測定. Pharmacia Fine Chemicals 社의 단백질 분자량 측정용 kit 로 檢量線을 작성한 후, 精製 酵素를 溶出し켜 효소 활성이 나타나는 fraction 을 檢량선과 비교하여 분자량을 測定하였다. 이때 column 과 사용樹脂는 gel filtration 시 사용한 것을 썼으며 流速은 0.28 ml/min, 各 fraction 의 부피는 7.0 ml 였다.

結 果

粗酵素液의 단백질 濃度는 0.583 mg/ml 였고, polygalacturonase 의 固有 活性度(specific activity)는 2.21 units/mg protein 이었다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分別을 통하여 固有 活性度는 7.37 units/mg protein 으로서, 粗酵素液의 3.33 배가 되었다.

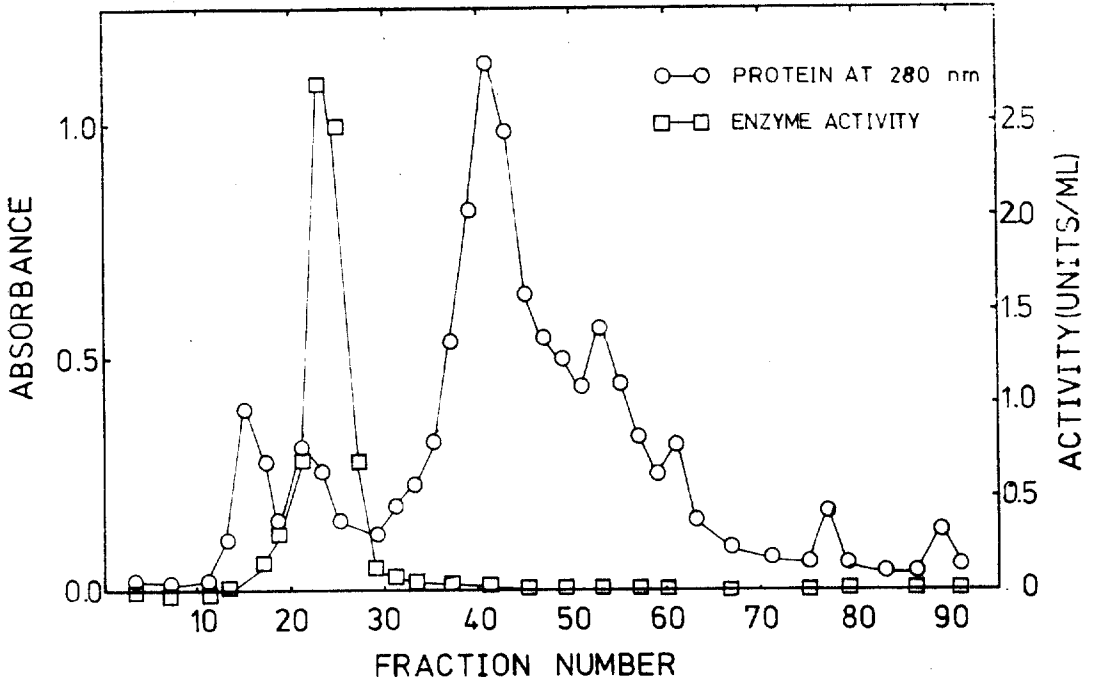


Fig. 2. Gel filtration chromatogram with Sephadex G-100 column chromatography

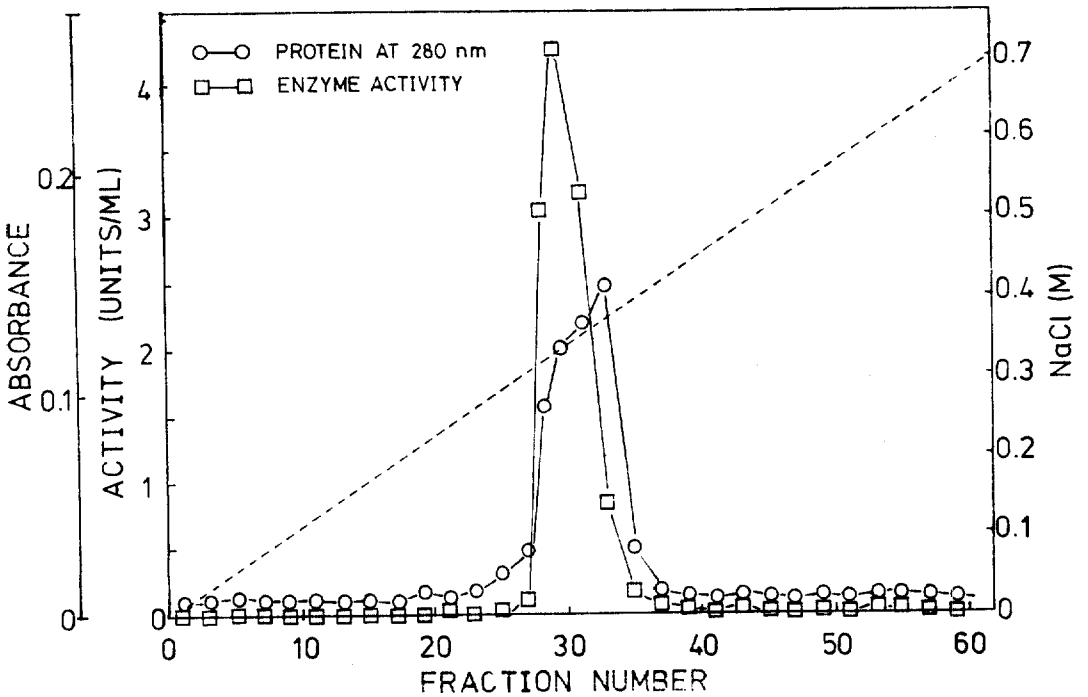


Fig. 3. Ion exchange chromatogram with DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

Table 1. Purification of polygalacturonase from *Byssochlamys fulva*

Fraction*	Volume ml	Protein mg/ml	Activity units/ml	Specific activity units/mg	Purification fold
Crude extract	4600	0.583	1.29	2.21	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ treatment	125	0.983	7.24	7.37	3.33
Gel filtration	120	0.122	2.47	20.25	9.16
Chromatography on DEAE-Sephadex	113	0.035	0.81	23.14	10.47

a See materials and methods section for preparation of fractions

Sephadex G-100 을 이용한 gel filtration 을 통하여 固有 活性度는 20.25 units/mg protein 로 增加하였으며, 이 값은 粗酵素液의 고유 활성도의 9.16 倍였다(Fig. 2). Gel filtration 을 행한 酵素液은 DEAE-Sephadex 이온 교환 chromatography 를 통하여, 固有 活性도가 23.14 units/mg protein 이 되었다. (Fig. 3).

이상을 要約하면 Table 1 과 같다.

B. fulva 의 polygalacturonase 活性에 미치는 2 價金屬이온들의 效果를 살펴보기 위하여 이들을 10⁻³M 濃度로 基質溶液에 添加하였다(Table 2). Table 2 에서 보는 바와 같이 Ca⁺⁺ 이온 添加시의 活性을 100%로 하였을 때 Cu⁺⁺, Fe⁺⁺, Zn⁺⁺ 이온 첨가 시의 活性은 64.5, 17.0, 10.2%였고, Mg⁺⁺, Cd⁺⁺ 이온을 添加하였을 때는 酵素 活性은 나타나지 않았다. 基質 溶液에 2가 금속 이온들은 첨가하지 않았을 때의 酵素活性은 10.2% 였다. 이 상에서 알 수 있듯이 Ca⁺⁺ 이온등은 효소 활성을 크게 增進시키는 반면, Cd⁺⁺ 이온등은

Table 2. Effects of the divalent cations on the polygalacturonase activity in *Byssochlamys fulva*. Salts were added to the substrate solution in the concentration of 10⁻³M

Ionic species ^a	Relative activity, % ^b
Ca ⁺⁺	100
Cu ⁺⁺	64.5
Fe ⁺⁺	17.0
Zn ⁺⁺	10.2
Mg ⁺⁺	— ^c
Cd ⁺⁺	—
No salt	10.2

a Salts were added as chloride forms

b Enzyme activity in the substrate solution supplemented with Ca⁺⁺ ion was taken as 100%

c Not detectable

오히려 酵素 活性을 억제함을 알 수 있었다.

B. fulva 의 polygalacturonase 의 適正 作用 pH 를 알기 위하여, 基質溶液의 pH 를 變化시켜 가며, 實驗한 結果 適正 作用 pH 는 5.0 부근이라는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

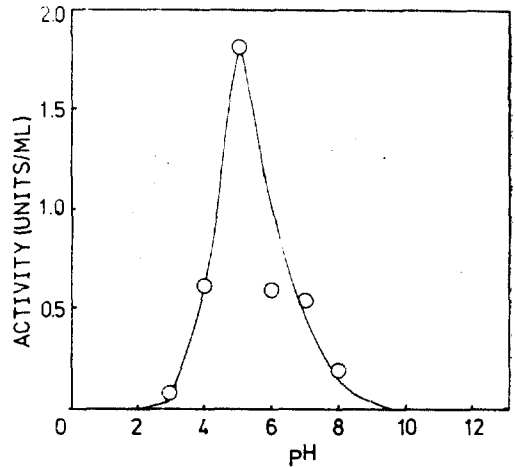


Fig. 4. Effect of pH on the polygalacturonase activity in *Byssochlamys fulva*

Fig. 5 에는 溫度 變化에 따른 酵素活性의 變化가 나타나 있다. 溫度상승과 함께 酵素反應速

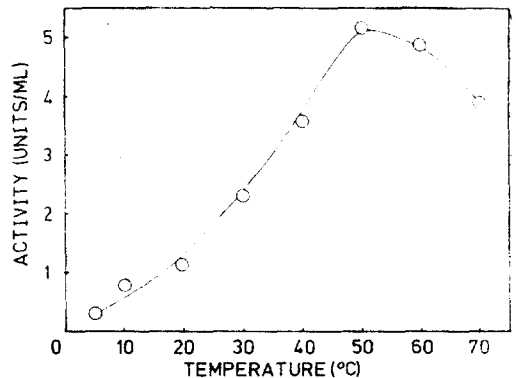


Fig. 5. Effect of temperature on the polygalacturonase activity in *Byssochlamys fulva*

도는 對數的으로 增加하여, 50°C에서 最高 活性인 5.19 units/ml 를 나타내고 있고, 그 보다 溫度가 높으면 酵素反應速度는 점진적으로 減少하여, 50°C 이상에서는 酵素의 不活性化가 進行되고 있음을 알 수 있었다. 이로 미루어 볼 때 *B. fulva*의 適正作用溫度는 50°C라고 推定할 수 있었다.

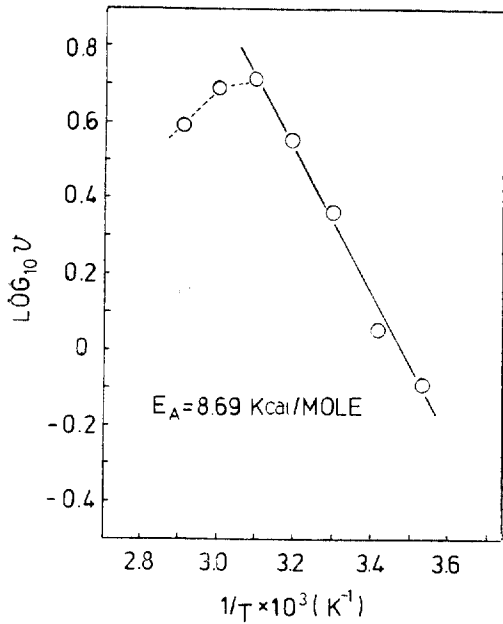


Fig. 6. Activation energy of the polygalacturonase reaction

*B. fulva*가 生成하는 polygalacturonase 반응시의 活性化 에너지(activation energy)를 算出하기 위하여, 溫度와 酵素 反應速度와의 關係를 Arrhenius plot 한 結果(Fig. 6), 이 효소반응의 活性化 에너지는 8.69 kcal/mole 임을 알게 되었다.

酵素의 反應 速度와 基質濃度와의 關係를 살펴보기 위하여, 基質의 濃度を 變化시켜 가며, 反應 速度의 變化를 測定한 것은 Fig. 7에 나타나 있다. α -D-galacturonic acid equivalent로 나타났을 때 4.62×10^{-2} moles/l의 基質濃度까지는 Michaelis-Menten 式에 따른 酵素 反應速度의 增進을 보이고 있으나, 基質濃도가 그 보다 높으면, 酵素 反應速度는 오히려 감소하고 있다.

酵素 反應의 逆動變數를 測定하기 위하여, 酵素 反應速度와 基質濃度와의 關係를 Lineweaver-

Burk plot 한 結果(Fig. 8) K_M 은 6.27×10^{-3} moles/l, V_{max} 는 2.85 μ moles/min 로 나타났 다.

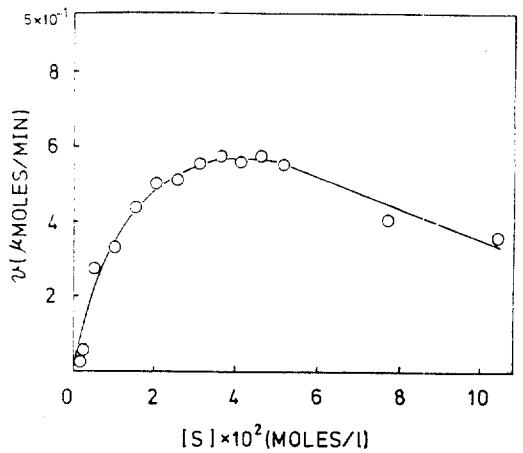


Fig. 7. Effect of the variation in substrate concentration on the reaction rate of polygalacturonase

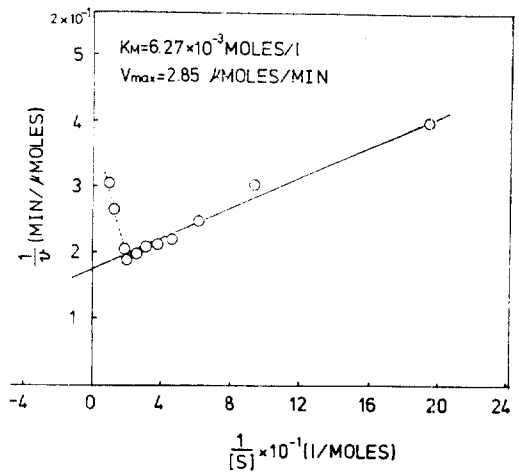


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of the polygalacturonase reaction

Fig. 9는 基質로서 0.5% polygalacturonic acid 및 0.5% pectin 을 使用했을 때의 相對 粘 度의 減少를 본 것이다. 5분까지는 相對 粘 度가 급격히 감소하였으나, 그 이후에는 完만한 減少 傾向을 보이다가, 30분이 경과하면 상대 점도의 감소가 그다지 나타나고 있지 않았다. 5분 경과 시의 相對 粘 度는 0.5% polygalacturonic acid 를 基質로 使用했을 때는 19%, 0.5% pectin 을 基質로 使用했을 경우에는 59%로서 *B. fulva*의 polygalacturonase 는 pectin 과도 일부 作用하고

있는 것을 發見했다. 이로 미루어, 이 酵素는 넓은 基質 特異性을 지닌 것을 알 수 있었다.

相對粘度 減少와 基質의 分解 程度를 比較하기 위하여 0.5% polygalacturonic acid를 使用하여 實驗한 結果는 Fig. 10에 나타나 있다. 10分 경과시 相對粘度가 50% 減少하는데 對해 分解는 6.5% 밖에 일어나지 않았다.

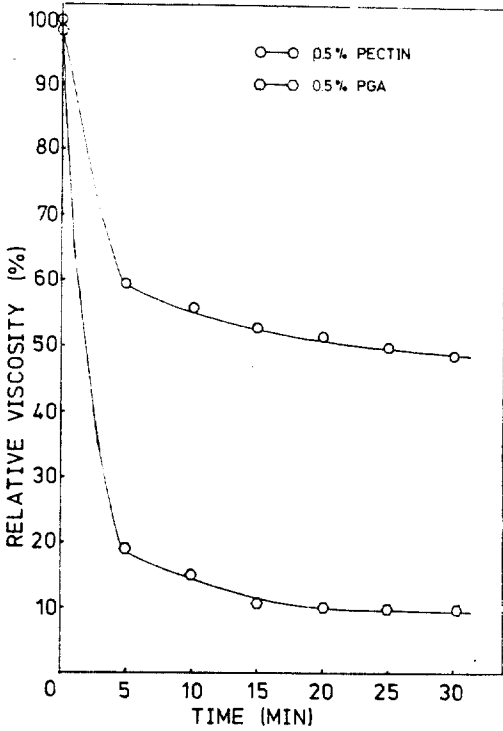


Fig. 9. Viscosity changes during the polygalacturonase reaction in *Byssochlamys fulva*

Fig. 11은 精製 酵素의 分子量을 구하기 위하여, bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A, ribonuclease A를 使用하여 gel filtration을 했을 때, 이들의 해당 fraction과 分子量과의 關係를 semilog scale로 圖示한 것이다.

精製 酵素를 溶出し fraction 31에서 polygalacturonase 活性이 가장 크게 나타나고, Fig. 11에 의하여 계산시에 分子量이 55,000程度인 것으로 밝혀졌다.

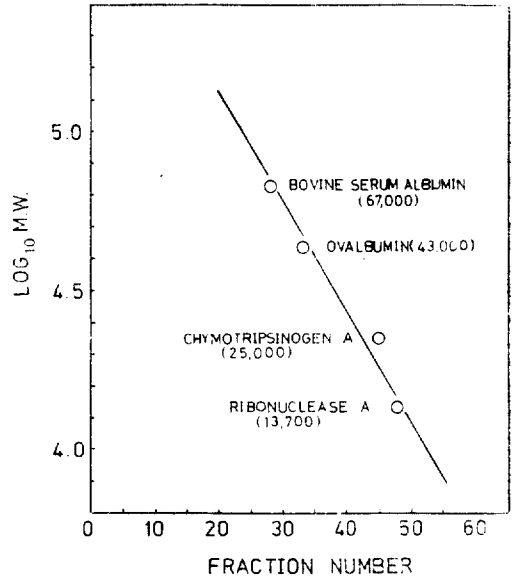


Fig. 11. Calibration curve for the determination of molecular weight of the polygalacturonase in *Byssochlamys fulva*. Marker proteins were added to the top of the Sephadex G-100 column and eluted under the flow rate of 0.28ml/min.

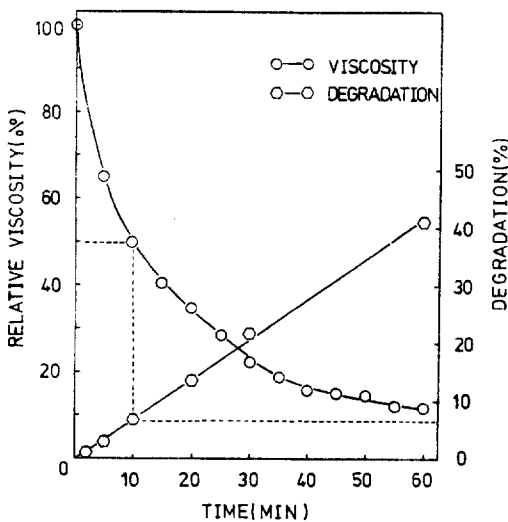


Fig. 10. Relationship between viscosity reduction and substrate degradation substrate: 7.5ml, enzyme solution: 0.5ml

考 察

Ulrich(1975)는 양과로부터 DEAE-cellulicse와 hydroxyapatite 處理를 하여 endc-polygalacturonase를 8.17倍 精製하였고 Basham等(1975)은 *R. stolonifer*의 endo-polygalacturcnae

를 16배 精製하였다고 보고하였다. 本 實驗에서는 10.47배 精製되었고, Fig. 2, Fig. 3에서처럼 酵素活性이 나타나는 곳이 한 곳 밖에 없으므로, *B. fulva*의 polygalacturonase는 한 가지 種類로만 存在하는 것이 밝혀졌다.

柳等(1976)과 Preiss等(1963)은 Ca^{++} 이온이 polygalacturonase와 pectintranseliminase의 活性에 간여한다고 報告하였는데, 本 實驗에서도 Ca^{++} 處理區의 酵素 活性이 鹽을 添加하지 않은 것보다 10 여배 가량 높아 이들과 비슷한 結果를 보이고 있다.

*B. fulva*가 生成하는 polygalacturonase의 適正 作用 pH는 5.0 근처이고, 이 結果는 柳等(1976), Schulz(1972), Ulrich(1975), Demain等(1956), Heinrichova(1976)의 結果와 비슷하나, Wright(1960)가 rumen protozoa가 만들어주는 polygalacturonase의 適正 作用 pH는 7.0이라고 한 사실과는 차이를 보여주고 있다. 한편,

適正 作用溫度는 菌株에 따라 차이가 나서, 柳等(1976)은 40°C, Heinrichova(1976)는 70°C라고 報告하고 있다. *B. fulva*의 polygalacturonase의 適正 溫度는 50°C였고, 70°C에서의 酵素 活性이 30°C에서의 효소 활성보다 1.5 배 정도 높아 熱 抵抗性이 있는 것으로 여겨진다.

polygalacturonase에 관한 kinetic 研究는 Albersheim等(1971)이 實施하고, Michaelis-Menten式에 따른다고 報告하고 있으나 本 實驗에서는 基質 濃度가 4.62×10^{-2} moles/l 보다 높으면, 基質에 依한 酵素 反應 阻害(substrate inhibition)가 일어남을 알 수 있었다.

*B. fulva*의 polygalacturonase를 使用하여 粘度減少와 基質의 分解程度를 비교한 결과, 相對 粘度가 50% 減少할 때 6.5%의 基質의 分解가 있었는데, MacMillan等(1964)과 Nagel等(1961)의 結果와 견주어 볼 때 *B. fulva*의 polygalacturonase는 endotype이라고 推定할 수 있었다.

適 要

*B. fulva*가 分泌하는 polygalacturonase를 精製하고 精製 酵素에 대하여 特性 試驗을 行하였다.

粗 酵素液의 固有 活性度는 2.21 units/mg protein 이었으나, $(NH_4)_2SO_4$ 處理, Sephadex G-100 gel filtration, DEAE-Sephadex 이온 교환 chromatography를 통해 23.14 units/mg protein으로 되어 10.47배 精製되었다. Ca^{++} , Cu^{++} 등의 二價 金屬 이온들이 酵素 活性을 크게 增進시켰으며 $10^{-3}M$ 濃度로 添加시 Ca^{++} 이온은 酵素 活性을 9.8배 증가시켰다. *B. fulva*의 polygalacturonase의 適正 作用 pH는 5.0, 適正 作用溫度는 50°C이고 酵素 反應의 活性化 에너지는 8.69 kcal/mole 이었다. 酵素反應의 K_m 은 6.27×10^{-3} moles/l, V_{max} 는 2.85 μ moles/min 이었다. *B. fulva*의 polygalacturonase는 基質로서 pectin 보다 polygalacturonic acid를 選好하며, 10分 경과 시 相對 粘度 減少가 50%인 반면 基質의 分解는 6.5% 밖에 일어나지 않아서 endo-type라고 推定할 수 있었다. *B. fulva*의 polygalacturonase의 分子量은 55,000 정도였다.

引 用 文 獻

1. Albersheim, P., and A.J. Anderson, 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Pro. Nat. Acad. Sci.* 68(8), 1815~1819.
2. Archer, S.A., and A.H. Fielding, 1979. Polygalacturonase isoenzymes of fungi involved in the breakdown of sulphited strawberries. *J. Sci. Food Agric.* 30, 711~723.
3. Basham, H.G., and D.F. Bateman, 1975. Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. *Phytopathol.* 65, 141~153.
4. Chu, F.S., and C.C. Chang, 1973. Pectolytic enzymes of eight *Byssochlamys fulva* isolates. *Mycologia* 65, 920~924.
5. Demain, A.L., and H.J. Phaff, 1956. Hydrolysis of the oligogalacturonides and pectic acid by yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem* 218, 875~883.
6. Heinrichova, K., 1976. Isolation, characterization and mode of action of exo-D-galacturonase from carrot. Collection Czechoslov. *Chem. Commun.*

42. 3214~3221.
7. Lanzarini, G., and A. Zamorani, 1975. Some simple methods for the purification of pectic enzymes from *Aspergillus usarii*. *J. Sci. Food Agric.* **26**, 197~205.
 8. 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.
 9. MacMillan, J.D., Phaff, H.J., and R.H. Vaughn, 1964. Purification and properties of a polygalacturonic acid trans-eliminase produced by *Clostridium multifementans*. *Biochem.* **3**, 564.
 10. Miller, G. L., 1959. *Analytical Chem.* **31**, 426~428.
 11. Mount, M.S., Bateman, D.F., and H.G. Basham, 1970. Induction of electrolyte loss, tissue maceration, and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans-eliminase. *Phytopathol.* **60**, 924~931.
 12. Nagel, C.W., and R.H. Vaughn, 1961. The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem, Biophys.* **93**, 344.
 13. Nagel, C.W., and R.H. Vaughn, 1961. The degradation of oligogalacturonides by the polygalacturonase of *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem Biophys.* **64**, 328.
 14. Preiss, J., and G. Ashwell, 1963. Polygalacturonic acid metabolism in bacteria. *J. Biol. Chem.* **238**(5), 1571~1576.
 15. Roboz, E., Barratt, R.W., and E.L. Tatum, 1951. Breakdown of pectic substances by a new enzyme from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **195**, 459~471.
 16. Schulz, F.A., 1972. Untersuchungen über die Bildung Pektinolytischer und Zellulolytischer Enzyme durch *Gloesporium perennans*. *Phytopathol. Z.* **74**, 97~108.
 17. Ulrich, J.M., 1975. Pectic enzymes of *Pseudomonas cepacior* and penetration of polygalacturonase into cells. *Physiol. Plant Pathol.* **5**, 37~44.
 18. Wright, D.E., 1960. Pectic enzymes in rumen protozoa. *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 251~254.
 19. Yu, J., Lee, B., Yang, R., Cho, S., and J. Lew, 1976. Studies on the pectic enzymes produced by *Aspergillus* sp. Part II. Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus* sp(A-2). *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **4**(2), 63~69.