

Bacillus sp. HSA-925 Pectate Lyase의 정제 및 특성

박성희 · 김태호 · 김종국 · 홍순덕*
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification and Characterization of a Pectate Lyase from *Bacillus* sp. HSA-925

Park, Sung-Hee, Tae-Ho Kim, Jong-Guk Kim and Soon-Duck Hong*

Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

Abstract — Purification and characterization of pectate lyase from *Bacillus* sp HSA-925. *Bacillus* sp. HSA-925 isolated from soil produced constitutively an extracellular pectate lyase when cultivated in LB broth. The pectate lyase(EC 4.2.2.2) was purified from the culture broth by precipitation with ammonium sulfate, followed by column chromatography on CM-cellulose C-50 and repeated gel filtration on Sephadex G-75. The enzyme had a molecular weight of 32-33 kDa. The activity was maximum at pH 9.5 and 45°C. The enzyme activity was stable at 55°C for 15 min and between pH 7-12. The activation energy, Km and V_{max} for the pectate lyase were 5.8779 kcal/mol, 6.33×10⁻² mol/ml and 2.09×10² μmol/min respectively. The enzyme was activated by Ca²⁺, Cu²⁺ and inhibited by Li⁺, Hg²⁺, EDTA.

Pectate lyase(EC 4.2.2.2)는 pectin질이 탈에스테르되어 생성되는 polygalacturonic acid를 유리 카복실기쪽으로부터의 α-1.4 결합을 끊어 주는 반응을 촉매하는 효소로서 1966년 Bateman 등(1)이 연구 발표한 이래 다른 pectin효소와 함께 식물 soft-rot disease 발생의 중요한 역할을 하는 효소로 밝혀졌다(2). 또 이 효소는 콩과 식물에 공생하는 구근을 형성하는 세균들에 있어서 기주식물들과 일정한 유전적 조절을 통해 발현이 조절되는 효소라고 추정되기도 하는 등(3, 18) 식물의 방어 기작과도 밀접한 관련이 있는 효소이다. 뿐만 아니라 근래에 와서는 식물체에서 유래된 수질오염원들중 pectin질들을 제거하는 주요 효소로서 일차적 처리제제로 사용되기도 하고 생화학 적 펄프제조에도 응용되고 있는 효소이기도 하다(4).

이 효소는 세균뿐만 아니라 효모(5), 곰팡이(6, 7), 방선균(8, 9, 19)등 다양한 미생물에서 생산하는 것으로 알려졌다. 세균에서 생성되는 이 효소에 관해서는 Keen등(10)에 의해 그람 음성균인 *Erwinia chrysanthemi*에서 이 효소를 생산하는 유전자가 크로닝된 이래 분자 유전학적 수준까지 비교적 상세히 알려졌다

(11-14). 그러나 그람 양성균이 분비하는 pectate lyase에 관해서는 보고가 많지 않으며(15, 16) 분자유전학적 연구는 거의 전무한 실정이다.

이에 우리는 그람 양성균의 pectate lyase에 관해 체계적인 연구의 일환으로 토양으로부터 pectate lyase를 분비하는 그람 양성균중 *Bacillus*속의 균을 선택적으로 분리하고자 시도하여 이제까지 보고된 것들에 비해 상당히 강력하게 분비하는 *Bacillus*속 균주를 분리하였고 우선, 이 효소를 정제하고 생화학적 연구를 한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균의 분리 및 배양조건

대구 근교의 다양한 토양으로부터 균원시료를 분리하여 pectate lyase 분비 검정 배지인 YCP 배지(ammonium sulfate 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, caseamino acid 0.3%, yeast extract 0.2%, polygalacturonic acid 0.7% : pH 8.0)를 사용하여 희석, 도말하여 20시간 배양 후 2N HCl 용액을 주가시킨 후 10분이 지난 다음, 효소활성에 의해 colony 주위의 투명대가 생기는 것을 positive로 간주하여 replica를 통해 반복적으로 실행하여 활성이 강한 균주를 분리 선별한 다음

Key words: Pectate lyase, Pectinase
*Corresponding author

효소활성을 측정하여 활성이 강한 균주를 선별하였다. 통상적 배양 혹은 계대배양을 위해서는 LB배지 (glucose 0.1%, NaCl 0.5%, yeast extract 0.5%, polypeptone 1% ; wt/vol)를 사용하였다. 선별된 균주는 형태, 생리적 특성을 검토하여 Bergey's manual에 준하여 분류 동정하였다.

효소생성 및 효소단백질의 정제

Bacillus sp. HSA-925는 pectate lyase를 구성적(constitutive)으로 생성하므로 따로 효소생성배지를 사용하지 않았으며 LB배지에 접종하여 37°C에서 30시간 배양하여 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 ammonium sulfate 55%에서 침전하여 원심분리 후 침전물을 제거한 상등액을 다시 ammonium sulfate를 70% 되게 첨가하여 분별침전한 뒤 원심분리한 침전물에 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)완충용액으로 녹여 하룻밤 투석하였다. 이 투석액을 carboxymethyl cellulose C-50 column(1.8×25 cm)에 동일 완충용액으로 통과시켰으며 이때 유속은 30 ml/hr 되게 하여 4 ml씩 분획하였고, 여기서 모은 효소분획을 모아 농축한 것을 다시 Sephadex G-75 column(1.3×85 cm)에 시간당 15 ml 유속으로 3 ml씩 분획한 다음 다시, 여기서 모은 효소를 농축하여 마지막으로 Sephadex G-75에 동일조건으로 2 ml씩 분획하여 정제하였다.

효소의 활성 측정

Pectate lyase의 활성측정은 탈메틸화된 polygalacturonate가 이 효소에 의해 끊어지면 분자내 이중결합을 가지고 있는 Δ -4,5-D-galactouronate를 생산, 그 결과 235 nm에서 흡광도가 증가되는데 이를 근거로 Yoshimitsu(4), Liao등(17)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다.

효소용액 1.3 ml, 0.2 M Tris-HCl(pH 8.5) buffer 0.5 ml, 3 mM CaCl₂ 0.2 ml와 기질로서 sodium polypectate(sodium salt, 98%)를 1% 되게 증류수에 녹여 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 상등액을 1 ml 가해서 반응시켜 spectrophotometer(shimazu UV-260)로 235 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소활성 unit는 1분당 1 μ mol의 galacturonic acid를 생성하는 효소의 양을 의미한다.

단백질의 정량

단백질 정량은 Lowry법에 준하여 다음과 같이 실험하였다. 20% sodium potassium tartarate와 1% CuSO₄·5H₂O를 동량 혼합한 액에 0.1 N NaOH로 용해한 2% Na₂CO₃ 용액을 1 : 50 비율로 혼합한 액

2.25 ml에 단백질 용액(BSA, sigma) 0.5 ml을 가한 것에 folin 용액을 0.3 ml 넣고 충분히 교반한 후 실온에서 20분간 정치한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또 단백질 정제 과정의 분획들의 단백질량은 280 nm에서 흡광도로 측정하였다.

전기영동 및 분자량 측정

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 12.5% polyacrylamide slab gel로 Tris-Glycine-SDS buffer(pH 8.3)을 사용하여 20 mA/110 V로 전기영동한 뒤 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 isopropanol 10%, acetic acid 10%(v/v) 혼합용액으로 탈색하였다. 이렇게 하여 표준단백질로 얻은 이동상대치에 의해 분자량을 측정하였고, native protein의 분자량을 측정하기 위해서는 Sephadex G-75 column(1.3×85 cm)을 사용하였다.

결과 및 고찰

균의 생리학적 성상

선별된 균주는 간형이고 호기성이었으며, 영양배양 상태 세포의 그람(gram) 염색성은 양성이었고, 내열성 포자를 형성하는 한편 catalase를 생성하였고 sulfate를 환원하지 못하는 등의 생리적 특성을 보여(Ta-

Table 1. Morphological and biochemical properties of the isolated strain HSA925

Shape	rods
Spore(endo)	+
Gram stain	+
Aerobe	+
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	+
Casein hydrolysis	+
Nitrate reduced to nitrite	+
Sulfate actively reduced to sulfide	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Citrate utilization	+
V.P reaction	+
M.R reaction	-
Indol production	-
Acid from D-glucose	+
L-arabinose	+
D-mannitol	+
Gas from glucose	-

ble 1) *Bacillus* 속의 특성을 보였기에 *Bacillus* sp. HSA-925라고 명명하였다(Fig. 1).



Fig. 1. Electromicrograph of *Bacillus* sp. HSA925.

이 균주는 pectin이나 polygalacturonic acid를 첨가한 배지와 LB broth 배지에 액체 배양을 통한 효소 유도성 생성유무를 검토한 결과 pectate lyase를 구성적으로 합성하였다. 따라서 효소정제를 위해 pectin이나 polygalacturonic acid를 첨가한 별도배지를 사용하지 않고 LB broth를 그대로 사용할 수 있었다.

효소의 정제

Ammonium sulfate 분별침전 : LB broth 배지에 진탕하면서 배양한 배양액 2850 ml을 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 ammonium sulfate를 55% 되게 첨가하여 침전시킨 뒤 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 버리고 상등액을 모아 ammonium sulfate를 70% 되게 추가하여 동일 조건으로 원심분리하여 모은 분별 침전물에 소량의 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer를 가해 용해시켜 동일 buffer를 사용 투석하여 column chromatography를 위한 농축액을 얻을 수 있었으며, 이때 조효소액의 비활성은 23.37 unit/mg이었고 이는 배양 상등액이 0.83 unit/mg의 비활성을 보이는 것과 비교해 볼 때, 분별 침전에 의해 이 효소외의 다른 단백질이 상당량 제거됨을 알 수 있었다.

CM-cellulose C-50 column chromatography : 농축 조효소 용액을 50 mM Tris HCl(pH 7.5) buffer로 평형화된 CM-Cellulose C-50 column을 사용하여 분리정제하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 농축 효소용액을 column에 흡착시키고, 160 ml의 50 mM

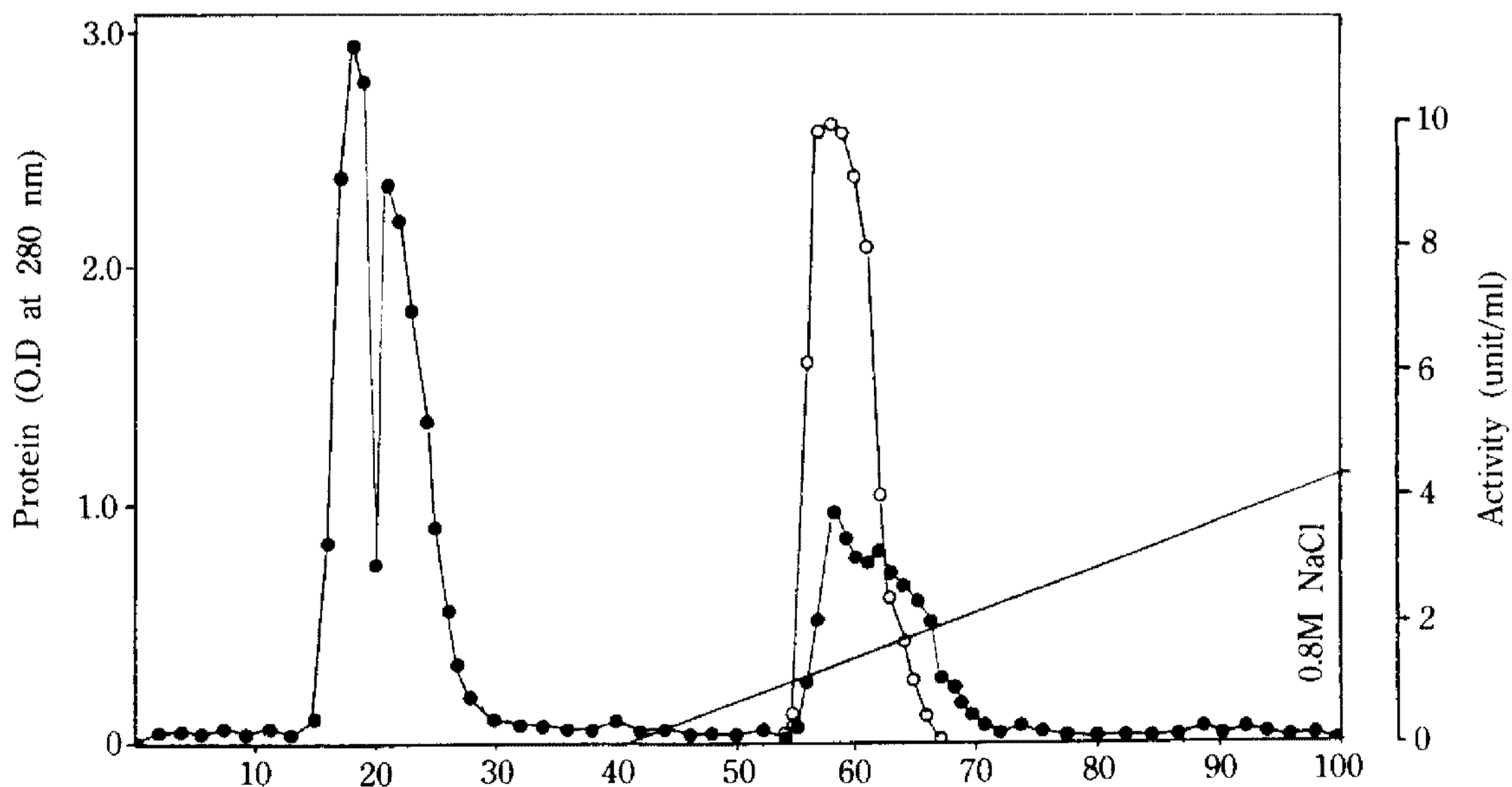


Fig. 2. Column chromatography of the pectate lyase on CM-cellulose. The column(1.3×25 cm) was eluted with a linear gradient from 0 mM to 800 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) at a flow rate of 30 ml/hr; 4 ml fractions were collected.

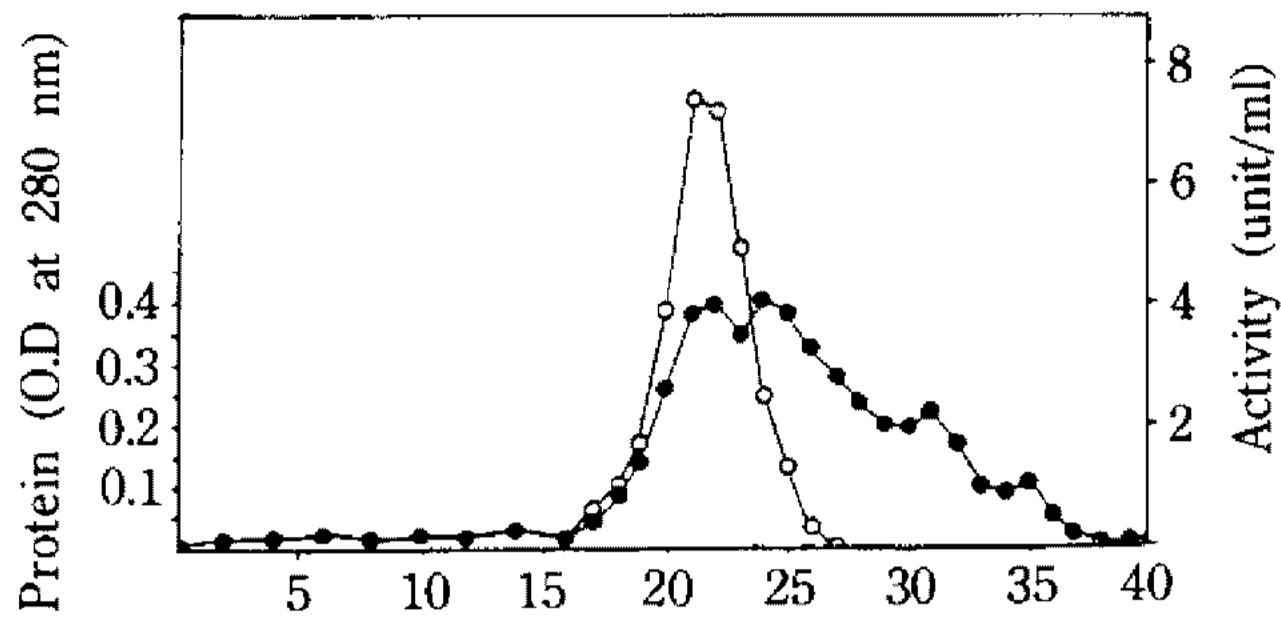


Fig. 3. Column chromatography of the pectate lyase on Sephadex G-75(1st).

The column(1.3×85 cm) was eluted with 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) at a flow rate of 15 ml/hr; 3 ml fractions were collected.

Tris-HCl(pH 7.5) buffer로 용출할 때까지 효소 활성이 없는 비흡착 단백질이 용출되었고, 0 M에서 0.8 M 농도까지 NaCl 용액으로 직선구배 chromatography한 결과 0.1 M-0.15 M NaCl 사이에서 활성 부분이 용출되었고 이 때의 활성 분획의 비활성은 31.3 unit/mg이었다.

첫번째 Sephadex G-75 column chromatography: 전 단계의 활성 부분을 모아 투석하여 동결건조한 다음 5 ml의 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 녹이고 동일 buffer로 평형화된 Sephadex G-75 column으로 용출한 결과 Fig. 3과 같이 두개의 단백질 분획이 나왔고 활성 부분(No.18-23)의 비활성은 39.9 unit/mg이었다.

두번째 Sephadex G-75 column chromatography: 전 단계의 활성 부분을 다시 동결 건조 농축하여 3 ml의 동일 buffer로 녹여 Sephadex G-75 column에 한번 더 용출한 결과 Fig. 4와 같이 최종적으로 활성 부분이 단백질 분획 패턴과 일치하는 결과를 보여 이 분획이 효소 분획임을 알 수 있었고 이 때의 활성 분획(No.38-45)의 비활성은 75.6 unit/mg였다.

이와같은 과정을 통해 정제된 효소의 정제 여부를 확인하기 위해 12.5% SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동을 해 본 결과 Fig. 5와 같이 단일 밴드를 보여 단일 분리·정제되었음을 알 수 있었다.

이상 ammonium sulfate 분별침전, CM-cellulose column chromatography, Sephadex G-75 column chromatography(1st), Sephadex G-75 column chromatography(2nd)의 과정을 통해 약 91배 정도의 정제도를 보였고 회수율이 23% 가량이었다(Table 2).

분자량 측정

SDS-polyacrylamide 전기영동 상에서 본 정제된

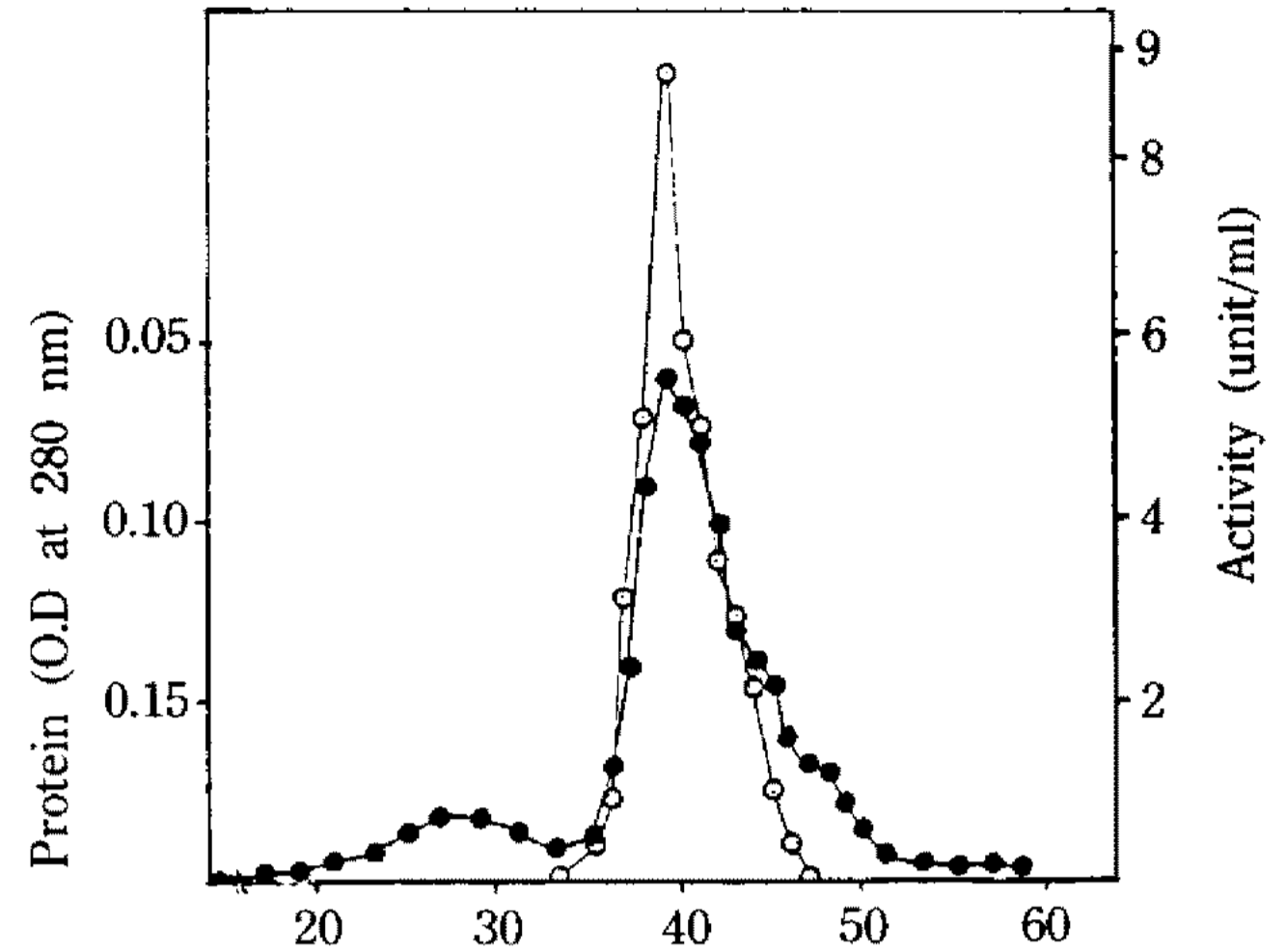


Fig. 4. Column chromatography of the pectate lyase on Sephadex G-75(2nd).

The column(1.3×85 cm) was eluted with 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) at a flow rate of 15 ml/hr; 2 ml fractions were collected.

Table 2. Purification of pectate lyase from *Bacillus* sp HSA925

Steps	Total activity (Unit)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Crude	1570	0.83	100	1
Ammonium Sulfate	825	23.37	53	28
CM-Cellulose C-50	569	31.3	36	37
Sephadex G-75(1st)	383	39.9	24	48
Sephadex G-75(2nd)	363	75.6	23	91

효소의 이동도를 size marker와 비교 도식화하여 분자량을 측정해 본 결과 Fig. 5와 같이 약 32-33 kDa로 측정되었고, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 equilibrate된 Sephadex G-75 column chromatography를 통한 측정에도 같은 크기를 보이는 바 본 pectate lyase는 단일 subunit로 구성된 단백질임을 알 수 있었다(Fig. 6).

이 결과는 *Thermonospora fusca*의 56 kDa(19), *Strept. nitrosporeus* 39 kDa(8), *Bacillus macerans* 35 kDa(4)보다는 작고, *Erwinia aroideae*의 28 k~32 kDa(20)이나 *Aspergillus japonicus* 32 kDa(5), *Aspergillus sojae* 32 kDa(20)과 비슷한 크기를 보였고, 모두가 단일 subunit로 구성된 효소라는 공통점을 갖고 있었다.

효소학적 특징

효소활성에 대한 pH의 영향: 정제된 효소의 pH 영향을 알아보기 위하여 정제된 효소를 100 mM po-

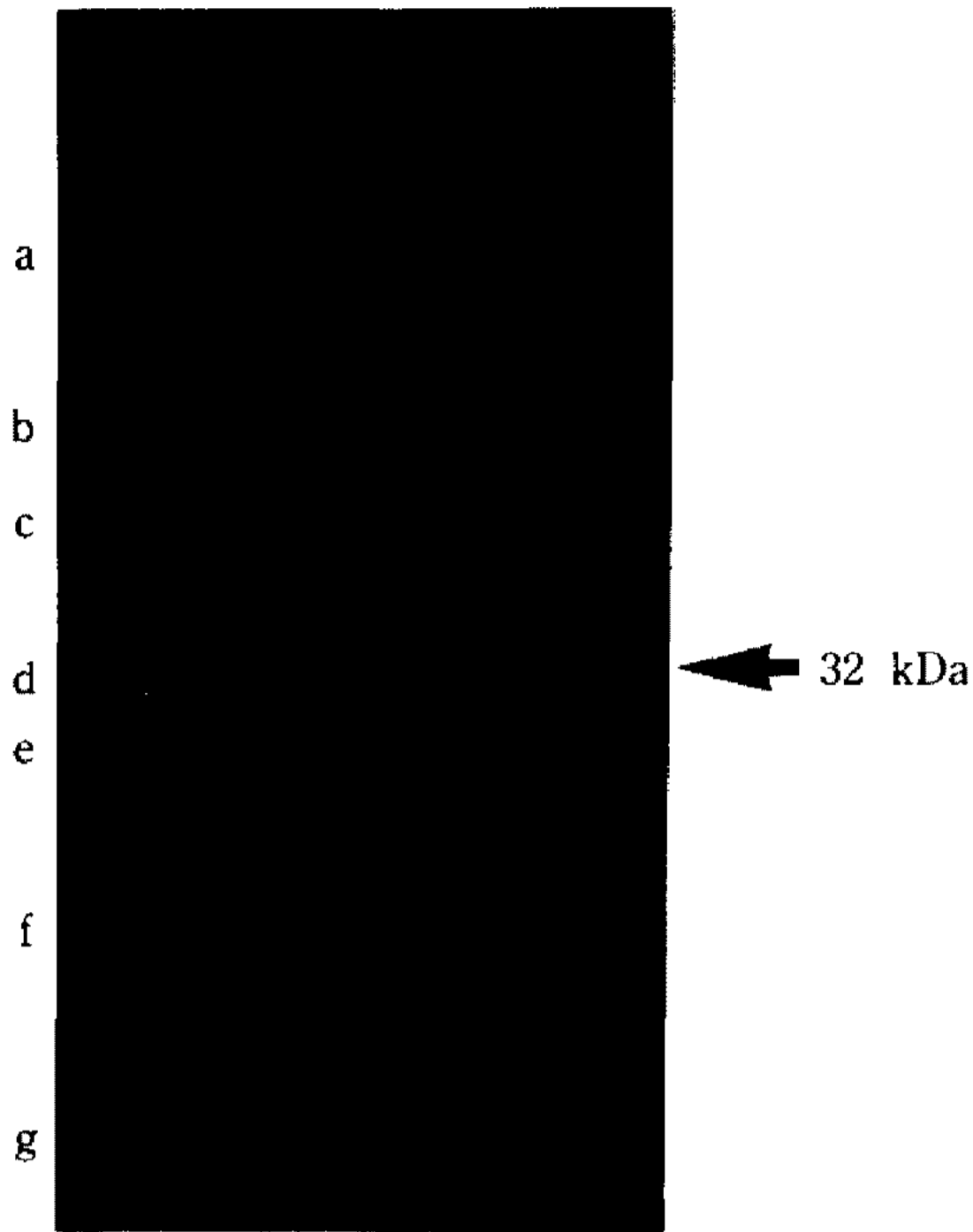


Fig. 5. The band of the pectate lyase in SDS-slab gel electrophoresis from the homogeneous preparation. Albumin, Bovine(a, 66 kDa), Albumin, Egg(b, 45 kDa), Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase(c, 36 kDa), Carbonic anhydrase(d, 29kDa), Trypsinogen(e, 24 kDa), Trypsin inhibitor(f, 20.1 kDa) and α -Lactalbumin(g, 14.2 kDa) were used as size standards in 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

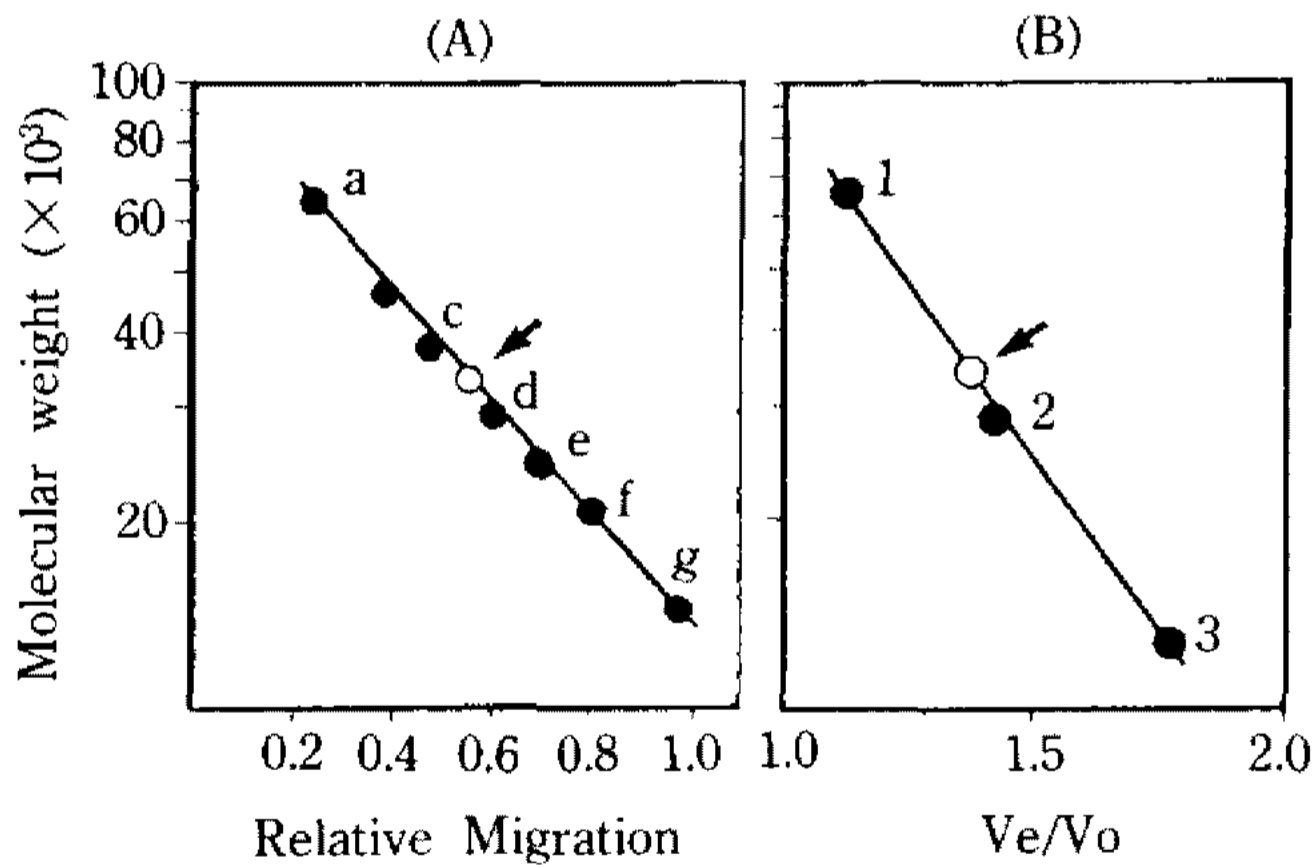


Fig. 6. Electropherogrammatic determination of the molecular weight of *Bacillus* sp. HSA-925 pectate lyase(A) and chromatographic determination of the native enzyme molecular weight by Sephadex G-75 column(B). Albumin, Bovine(a, 66 kDa), Albumine, Egg(b, 45 kDa), Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase(c, 36 kDa), Carbonic Anhydrase(d, 29 kDa), Trypsinogene(e, 24 kDa), Trypsin inhibitor(f, 20.1 kDa) and α -Lactalbumin (g, 14.2 kDa) were used as size standars in 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis. Albumin, Bovine(1, 66 kDa), Carbonic Anhydrase(2, 29 kDa) and Cytochrome-C(3, 12.4 kDa) were used as size standars in Sephadex-75 gel chromatography.

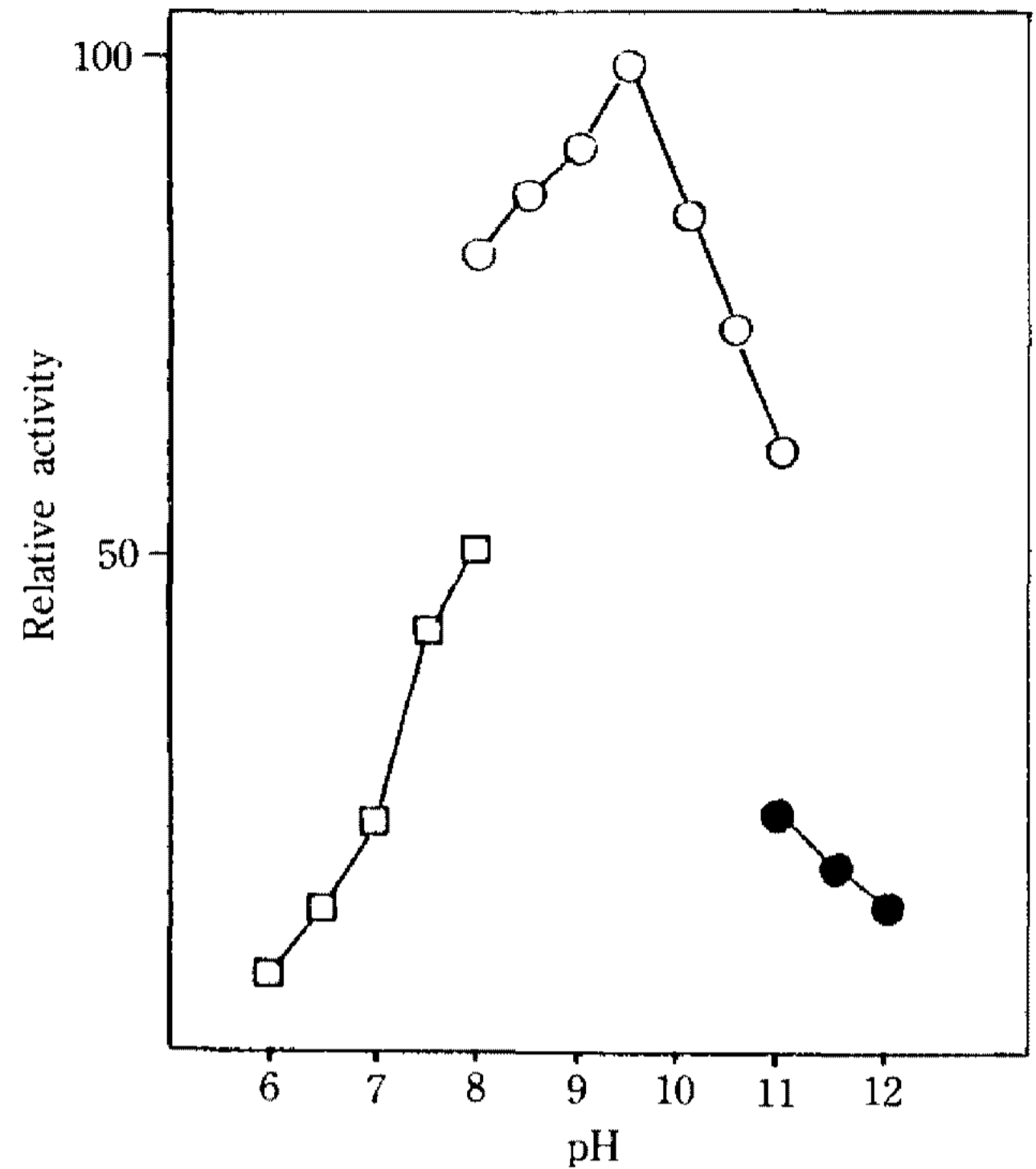


Fig. 7. Effect of pH on activity of the pectate lyase. Buffers used were potassium phosphate($\square-\square$), Tris-HCl($\circ-\circ$), and Glycine-NaOH($\bullet-\bullet$).

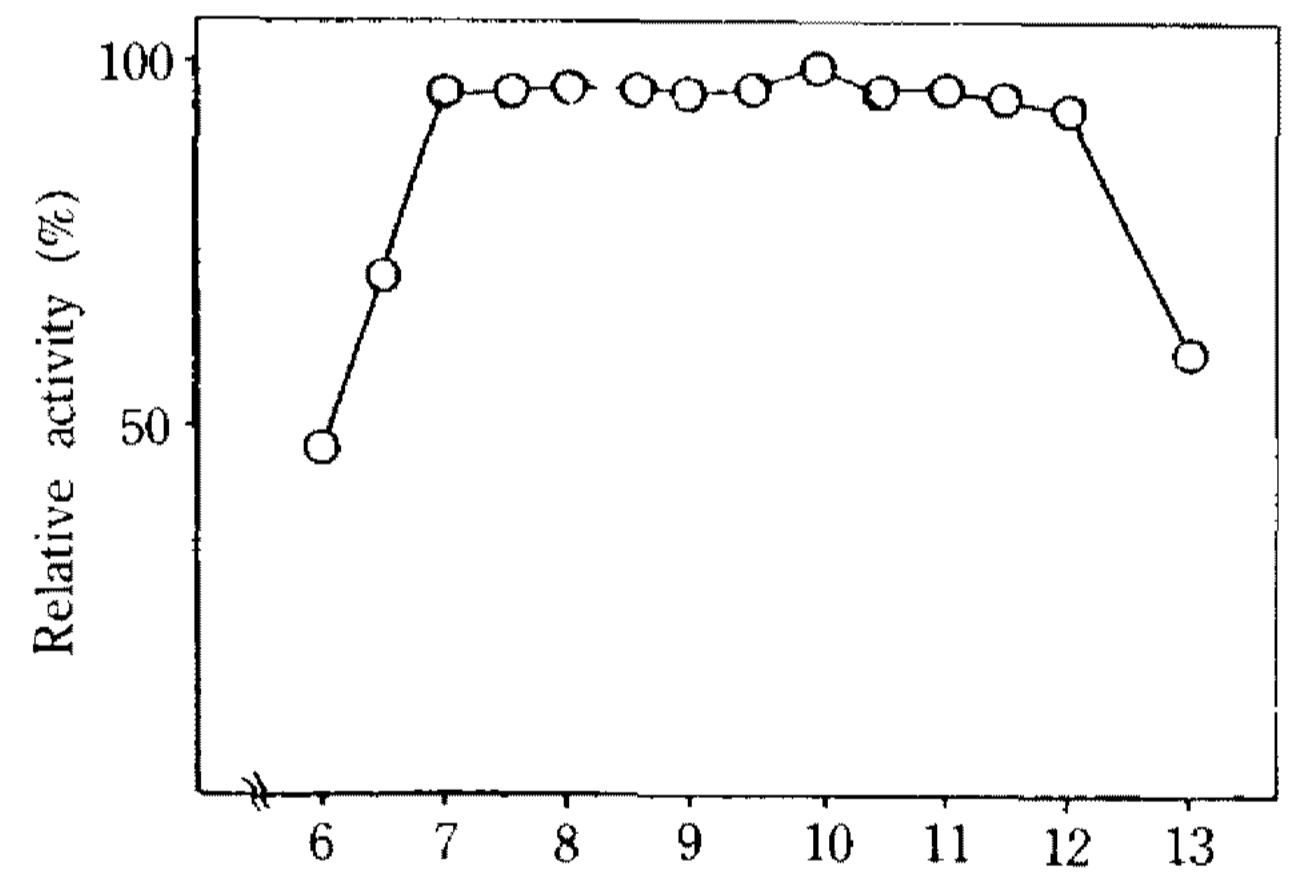


Fig. 8. Effect of pH on stability of the pectate lyase. The enzyme solution was incubated at various pH for 2 hrs at 25°C. The remaining activity was measured under the standard condition. Buffers used were potassium phosphate($\square-\square$), Tris-HCl($\circ-\circ$), and Glycine-NaOH($\bullet-\bullet$).

tassium phosphate buffer를 이용하여 pH 6에서 8까지, 100 mM Tris-HCl buffer로 pH 8에서 11까지, 100 mM Glycine-NaOH buffer를 이용하여 pH 11에서 13까지 여러 단계로 맞춰 활성을 조사한 결과 Fig. 7과 같이 pH 9.5에서 최대활성을 보였다. 또 동일 완충용액과 정제효소를 1 : 1로 섞어 2시간 가량 방치한 후 잔존활성을 측정된 결과 pH 7에서 12까지의 범위에서

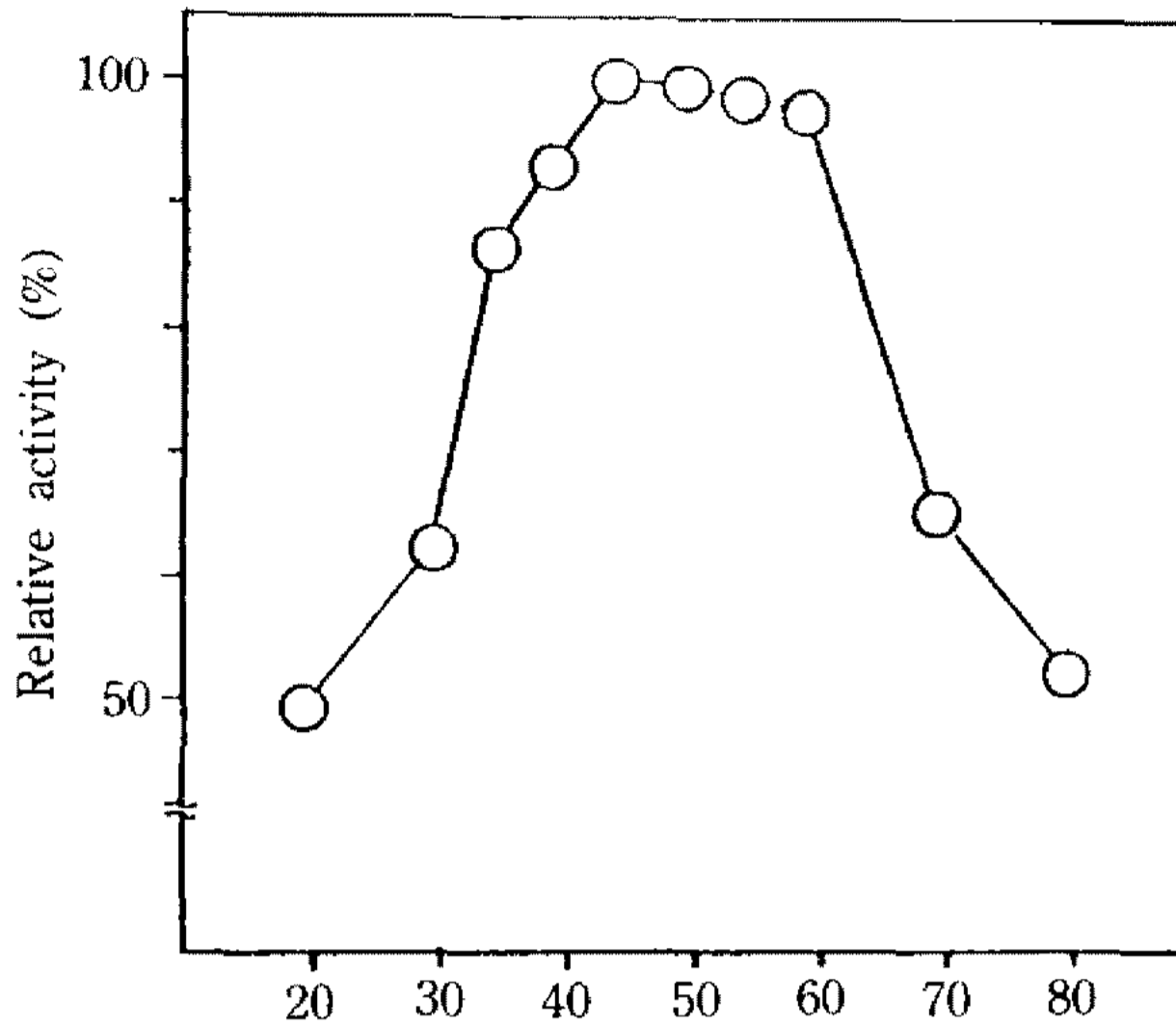


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of pectate lyase.

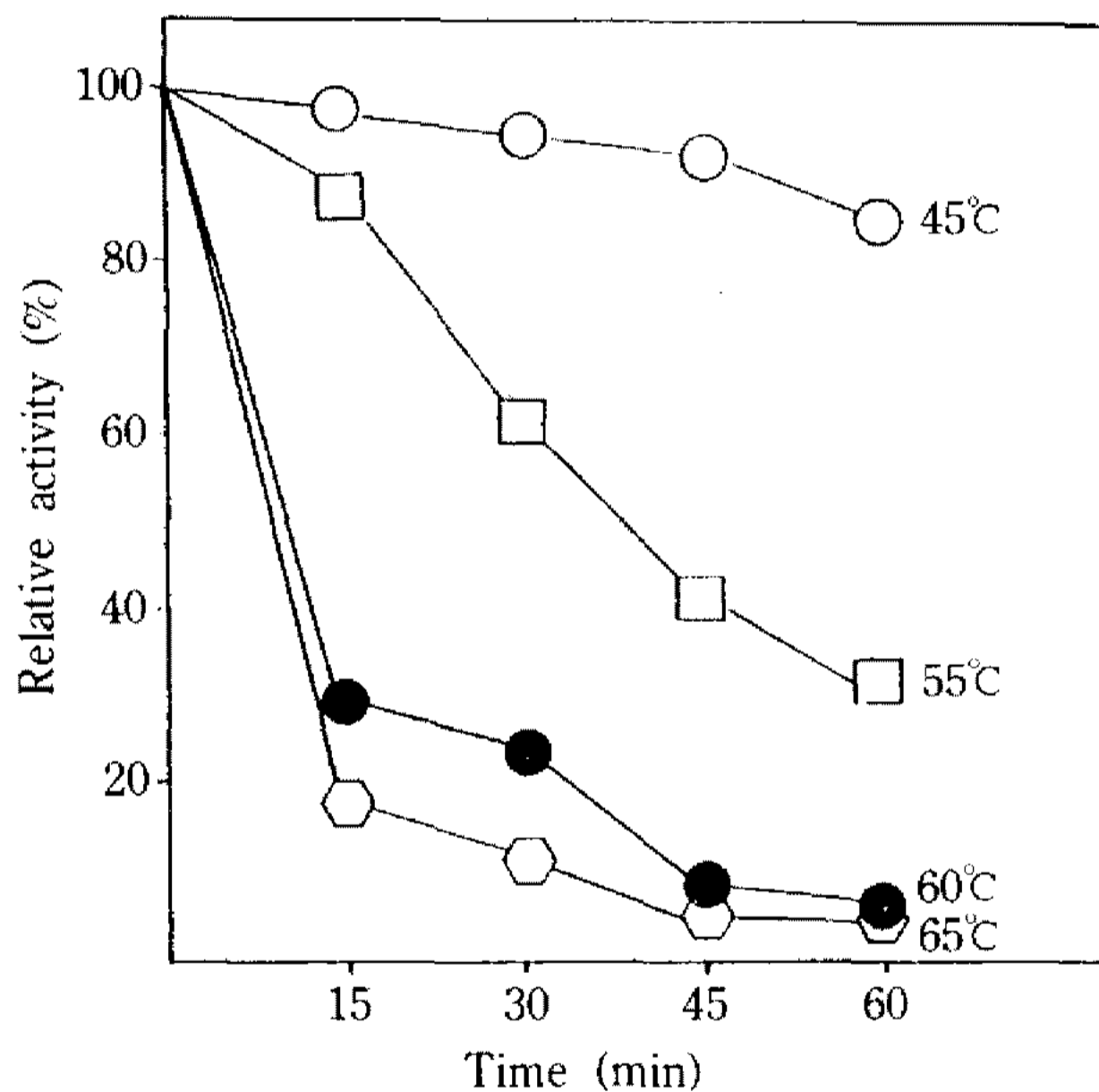


Fig. 10. Heat stability of the pectate lyase. The enzyme solution was preincubated at 45°C (○), 55°C (□), 60°C (●) and 65°C (◊) for various intervals. After preincubation, the residual enzyme activity was measured.

매우 안정하였고, pH 6에서는 50% 이상의 활성이 저하되는 특징을 보였다(Fig. 8). 이 결과는 *Aspergillus japonicus*(5)가 pH 7.0에서 최대활성과 pH 3~5에서 안정한 것과 *Erwinia* sp.가 pH 8.0~8.5에서 최대활성을 보이는 것(20)에 비해 높은 pH에서 최대활성을 보였고 *Thermonospora fusca*(19)의 pH 10.45에서 최대활성을 보인 것에 비해서는 낮은 pH에서 최대활성을 보였다. 또 *Bacillus macerans*(4)는 pH 9.0에서 최대활성을, *Strep. nitrosporeus*(8)는 9.3~9.5에서 최

Table 3. Effect of the metal ions on the pectate lyase activity of *Bacillus* sp. HSA-925

Ion	Metal	Relative activity(%)
Ca ²⁺	CaCl ₂ ·2H ₂ O	181.4
Cu ²⁺	CuCl ₂	129.7
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ OO) ₂	126.7
Fe ³⁺	FeCl ₃ ·6H ₂ O	119.8
Mn ²⁺	MnSO ₄ ·6H ₂ O	116.7
Na ⁺	NaCl	102.5
K ⁺	KCl	96.9
Co ²⁺	CoCl ₂ ·6H ₂ O	101.0
Ba ²⁺	BaCl ₂ ·2H ₂ O	87.5
Mg ²⁺	MgCl ₂ ·6H ₂ O	78.7
Cd ²⁺	CdCl ₂	62.9
Li ⁺	LiCl	53.5
Hg ²⁺	HgCl ₂	43.8
EDTA		0
None		100.0

*Reaction mixtures containing 1 mM of each compound were under the standard condition.

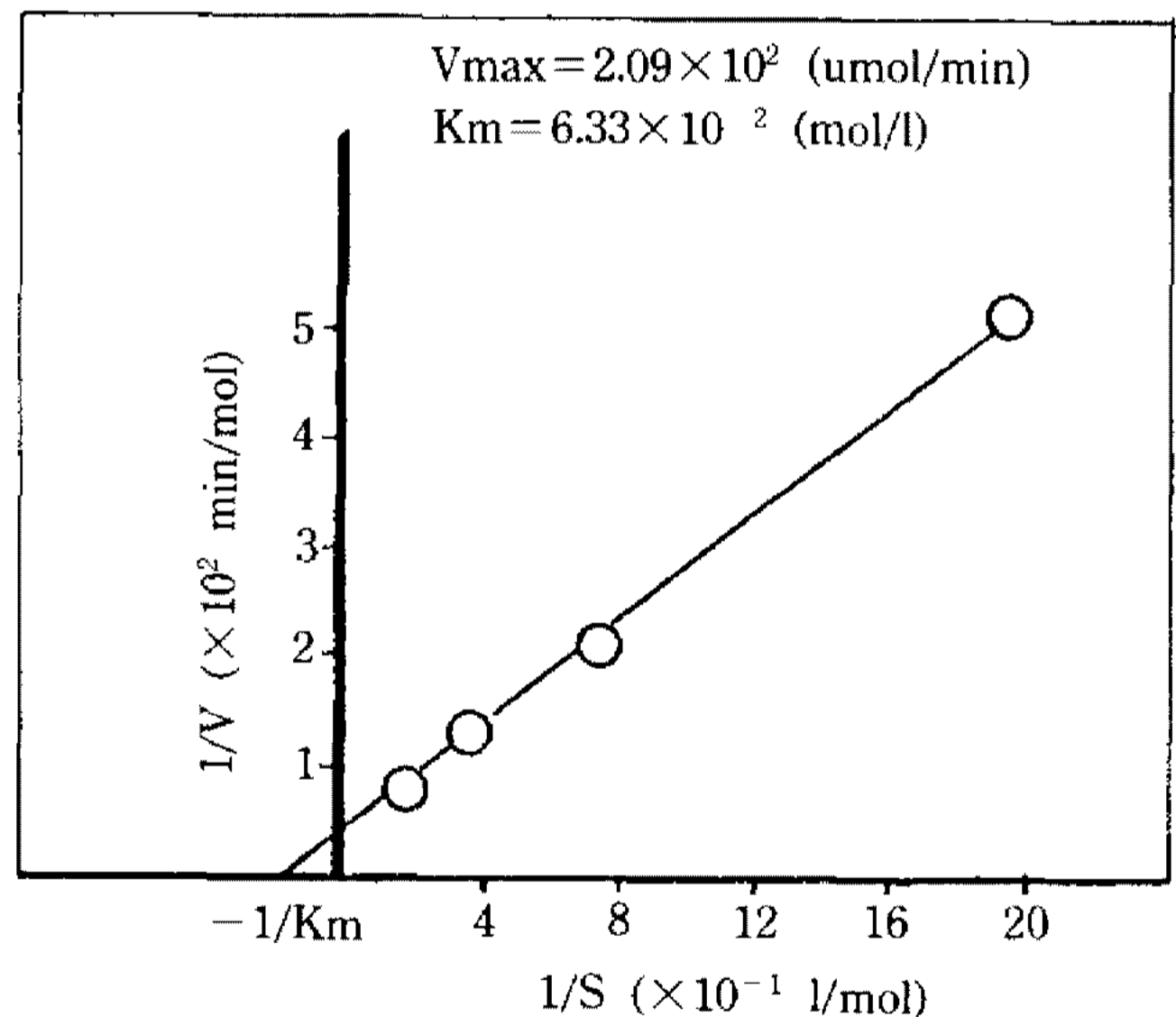


Fig. 11. Lineweaver-Burk plots of initial rate of hydrolysis of poly-galacturonic acid (Na-salt) by the pectate lyase at different substrate levels.

대활성을 보인데 비해서는 비슷하거나 약간 높은 pH에서 활성을 보였다.

효소활성에 대한 온도의 영향: pH 9.5로 조절하고 각 온도별로 활성을 측정한 결과 Fig. 9와 같이 45°C에서 최대의 활성을 보였고, 마찬가지로 pH를 9.5로 고정된 후 45, 55, 60, 65°C에서 각기 15, 30, 45, 60분간 처리한 후 40°C에서 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 10과 같이 45°C에서는 안정하였으나 55°C에서 60

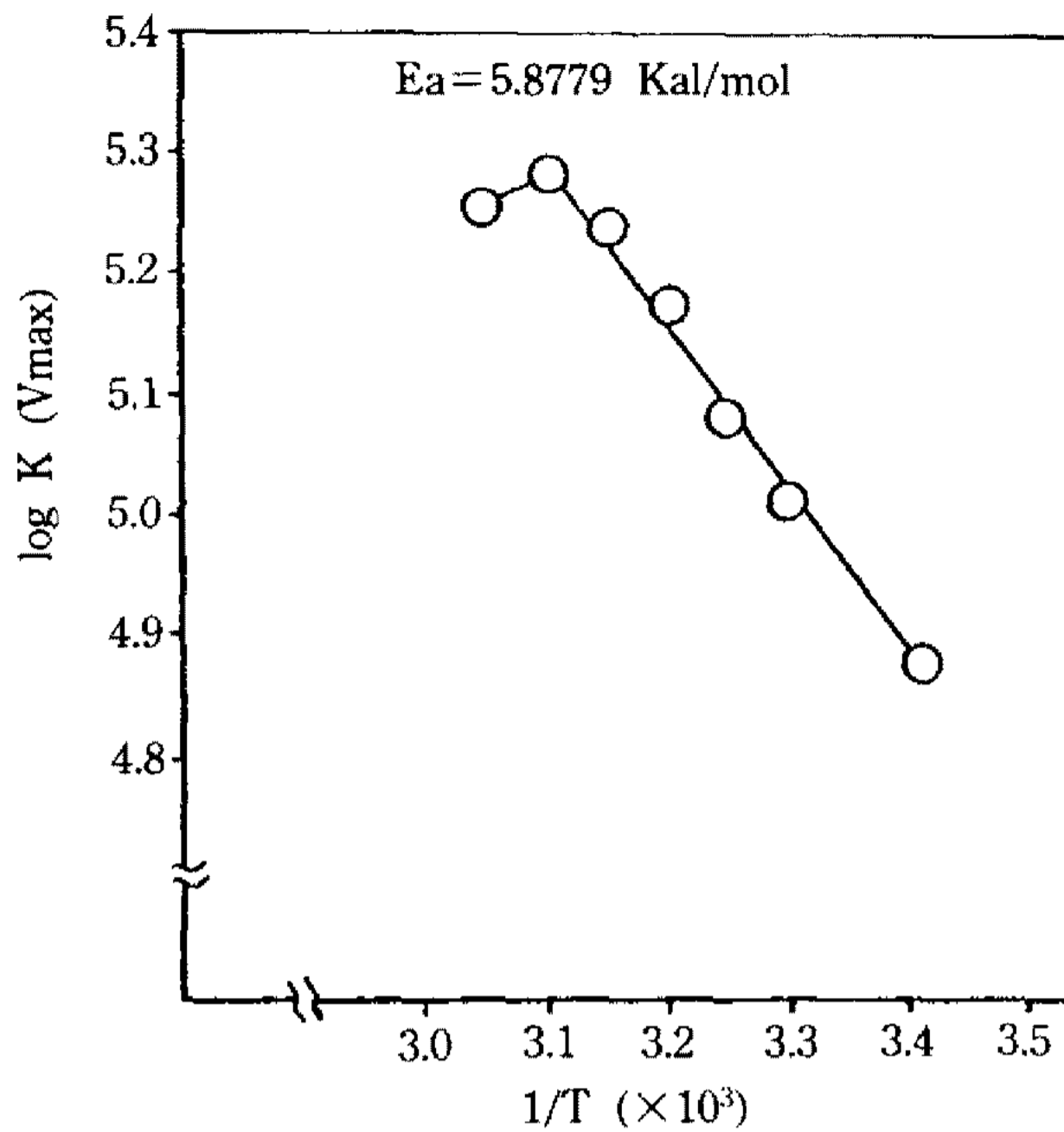


Fig. 12. Arrhenius plot of the effect of temperature on the pectate lyase.

The data include initial velocity determination at temperatures between 20°C and 55°C, plotted against reciprocals of temperature. The K represents the rate constant of a reaction and E_a is the activation energy given Arrhenius equation.

분 처리로 효소활성의 65% 가량이 실활되는 등 비교적 불안정하였다. 이는 *Thermomonospora fusca*(19)와 *Bacillus macerans*(4)가 60°C에서 최대활성을 보이는 것보다는 낮은 온도에서 최대활성을 보인 것이며, *T. fusca*에 비해서는 열안정성이 낮고 *B. macerans*(55°C에서 10분간 안정)와는 비슷한 안정성을 보였다.

금속이온의 영향: 본 효소활성에 미치는 금속염의 영향을 알아보기 위해 반응액에 여러가지 금속염을 최종농도가 1 mM 되게 첨가하여 활성을 조사한 결과 Table 3과 같이 Ca^{2+} 에 의해 활성이 촉진되며, Li^+ 과 Hg^{2+} 에 의해서는 활성이 저해되는 것으로 나타났다. 또 1 mM EDTA에서도 완전히 저해되었다. 이는 대부분의 세균유래의 endo-pectate lyase들이 Ca^{2+} 이온에 의해 활성이 촉진되는 점에서 같은 결과를 보였으나 비교가 되는 *Bacillus macerans* 효소(4)가 Mg^{2+} 에 의해서 활성이 강하게 촉진되는데 비해 오히려 저해를 받았고, Cu^{2+} 나 Pb^{2+} 에 의해서 활성이 촉진되는 등 약간 다른 결과를 보였다.

Pectate lyase의 K_m 치

Polygalacturonic acid(Na salt)를 기질로 하여 이 효소의 반응속도에 대한 기질농도를 조사하였다. 반응조건으로는 pH 9.5, 반응온도 45°C로 하여 각각의

기질농도에서 효소반응시킨 후 Michaelis-Menten 식으로 환산하고 Lineweaver-Burk 방식으로 plot하였다. Fig. 11에서와 같이 K_m 치 6.33×10^{-2} (mol/l)이었고 V_{max} 는 2.09×10^2 (μ mol/min)였다.

Pectate lyase의 활성화에너지

이 효소의 활성화 에너지를 알아보기 위해 20°C에서 55°C까지 반응온도에서 반응시켜 Arrhenius 방식으로 plot한 결과 약 $E_a = 5.8779$ Kcal/mol이었다(Fig. 12). 이는 *Thermomonospora fusca*(19)의 10.7 kCal/mol보다 상대적으로 낮은 활성화 에너지를 요구하는 것을 의미한다.

요 약

토양에서 분리한 *Bacillus* sp. HSA-925는 세포외로 pectate lyase(EC 4.2.2.2)를 분비하며 LB broth에서 배양한 배양액으로부터 ammonium sulfate 침전, CM-cellulose C-50 column chromatography와 두 차례의 Sephadex G-75에 의한 여과등의 과정을 거쳐 pectate lyase를 정제하였다. 이 효소는 32-33 kDa의 분자량을 가지며 pH 9.5, 45°C에서 최대활성을 가진다. 이 효소활성은 pH 7-12, 55°C, 15분 동안 안정성을 보이며 pectate lyase의 활성화 에너지, K_m 치, V_{max} 는 각각 5.8779 Kcal/mol, 6.33×10^2 mol/ml, 2.09×10^2 μ mol/min이며, Ca^{2+} , Cu^{2+} 에 의해 활성화되며, Li^+ , Hg^{2+} , EDTA에 의해 저해된다.

감사의 말씀

이 연구는 1992년도 교육부 학술조성 연구비로 수행되었기에 감사드리는 바입니다.

참고문헌

- Bateman, D.F. and R.L. Millar. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathol.* **4**: 119-1462.
- Alan C. and T.K. Noel. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409.
- Lim, S.T., M.H. Chung, Y.W. Park, and H.D. Yun. 1991. Molecular cloning of the pectate lyase gene from *Rhizobium fredii* USDA193. *Mol. Cells* **1**: 151-156.
- Yoshimitsu M. 1991. Purification and characterization of endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 25-30.

5. Inoue, S., Y. Nagamatsu, and C. Hatanaka. 1984. Preparation of cross linked pectate and its application to the purification of endopoly galacturonase of *K. fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 633-640.
6. Ishii S. and T. Yokotsuka. 1975. Purification and properties of pectin lyase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 313-321.
7. Aitor A., G. Ane, H. Fernando, M.D. Moragues, J.B. Dominguez, M.J. Llama, and J.L. Serra. 1989. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. *App. Env. Micro.* **55**: 1612-1616.
8. Sato, M. and A. Kaji. 1977. Action pattern of pectate lyase from *Streptomyces nitrosporeus*. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 2199-2203.
9. Sato, M. and A. Kaji. 1975. Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces fradiae* IFO 3439. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 819-824.
10. Keen, N.T., D. Dahlbeck, B. Staskawicz, and W. Belser. 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**: 825-831.
11. Keen, N.T., D. Dahlbeck, B. Staskawicz, and W. Belser. 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**: 825-831.
12. Kotoujansky, A., A. Dioloz, M. Boccara, Y. Bertheau, T. Andro, and A. Coleno, 1985. Molecular cloning of *Erwinia chrysanthemi* pectinase and cellulase structural genes. *EMBO. J.* **4**: 781-785.
13. Reverchon, S., H-C-Pattat, and N. Robert-Baudouy. 1985. Cloning of genes encoding pectolytic enzymes from a genomic library of the phytopathogenic bacterium, *Erwinia chrysanthemi*. *Gene.* **35**: 121-130.
14. Van G, F., A. Toussaint, and E. Schoonejans, 1985. In vivo cloning of the pectate lyase and cellulase genes of *Erwinia chrysanthemi*. *EMBO. J.* **4**: 787-792.
15. Kaji, A., I. Fujikawa, S. Iwahara, and M. Sato. 1972. Protolytic enzymes with the macerating activity produced by *Bacillus* sp. F-11. *Agr. Chem. Soc. Japan.* **46**: 509-516.
16. Yu J.H., Y.S. Park, J.M. Kim, I.S. Kong, and Y.J. Chung. Cloning of pectate lyase gene of alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 and its expression in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 316-319.
17. Ching, H.L. 1989. Analysis of pectate lyase produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Appl. Envi. Microbiol.* **55**: 1677-1683.
18. Chang M.H., Y.W. Park, and H.D. Yun. 1991. Marker exchange mutagenesis of pectate lyase gene in *Rhizobium fredii*. *Kor. J. Appl. Microbiol. chnol.* **19**: 222-227.
19. Fred, J.S. 1987. Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.*, **169**: 2774-2780.
20. Shuwsei K, T. N, K. Izaki, and H Takahashi. 1974. Purification and propertises of a pectin trans-Eliminase in *Erwina aroideae* fromed in the presence of nalidixic acid.

(Received December 17, 1993)