

*Aspergillus niger*와 二種의 Yeast에 의한 Pectin Transeliminase의 生成 및 그 特性

閔 庚 喜, *李 英 子, **金 致 卿

淑明女大 生物學科, *梨花女大 教育大學院 科學教育科, **忠北大 生物學科

Pectin Transeliminase produced by *Aspergillus niger* and two yeast species.

Kyung Hee MIN, Yung Ja LEE and Chi-Kyung KIM

Dept. of Biology, Sookmyung Women's University, *Dept. of Biological Sciences,
Graduate School of Education, Ewha Women's University, and **Dept. of Biology,
Chungbuk National University

ABSTRACT

Pectin transeliminase (PTE) was produced by *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* 4683, and *Aspergillus niger* in the media containing 2% pectin and examined for its characteristics. The production of the enzyme was higher by *Asp. niger* than by the two yeast strains, showing that the PTE activity was proportional to reducing power. The enzyme was proved to reduce pectin and produce 4,5-unsaturated galacturonic acid. The optimum activity of the PTE was found to be at pH 6.0 and 50°C. The activities of these enzyme were stable below 50°C but decreased at the higher temperature. Substrate inhibition of the PTE activities was appeared at high concentrations of pectin. Those PTE activities were increased under 0.6M of KCl and NaCl, but that maximal activities at the concentration of 0.2M MgCl₂.

서 론

펙틴산 분해 효소 중 Pectin transeliminase(PTE)는 1960년 Albersheim¹⁾에 의하여 발견 되었으며 이 효소는 펙틴 분자를 transelimination mechanism에 의하여 분해 함을 확인 하였다. 이 효소의 분해 산물은 말단 galacturonic acid 잔기의 4번과 5번 탄소 사이에 2중 결합을 하고 있는 것이 특징이다. 그 후 이 이중 결합과 methyl ester의 carbonyl의 기능으로 인하여 235nm의 자외선을 최대로 흡수

하게 되며 Thiobarbituric acid에 의하여 적색을 띠게 되는 것이 보고 되었으며^{1,5,6,7,8,9)} Okamoto 등 (1964)⁷⁾은 *Erwinia aroideae*에 의하여 당화형 PTE를 생성 시켰으며 이 효소를 정제하여 PTE의 성질을 규명하였다. 그 결과 기질 분자의 환원성 말단으로 부터 두번째의 glycoside 결합을 분해하는 작용 기작을 가지고 있음을 증명 하였다. 즉 기질의 분해를 계속시켜 보면 4,5-unsaturated digalacturonic acid와 포화 oligouronide가 생성됨을 관찰 함으로서 주요 최종 생성물이 4,5-unsaturated

digalacturonic acid임을 확인 하였다^{7,8,10,15}. 이들 Pectin transesterase(PTE)의 효소학적 연구는 주로 *Bacillus* 속^{4,10,11,13,15}과 *Erwinia* 속^{7,8,12}, 그의 *Clostridium multifementans*¹⁷와 *Xanthomonas campestris*¹⁴ 등의 세균을 재료로 수행되었으며 균류에 의한 PTE의 연구는 *Asp. sojae*¹⁶와 *Asp. fonscaeus*⁶에서 조사 되었을 뿐 효모 유래의 PTE에 관한 연구는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 *Asp. niger*와 2종의 효모에 의한 PTE의 생성유도 및 그의 효소학적 특성을 비교 고찰 하였다.

재료 및 방법

A. 재 료

i) 균주: 본 실험에 사용한 균주는 본 연구실에서 분리 동정한 불완전 균류인 *Aspergillus niger*와 동경대학 응용미생물연구소에서 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Schizosaccharomyces pombe* 4683의 두 효모를 사용하였다.

ii) 기질: PTE에 대한 기질은 Tokyo Kasei 특급 Citrus Pectin을 사용하였다.

B. 방 법

i) 배양방법: PTE의 생산 유도를 위하여 pectin 2.0%, glucose 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, MgSO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.05%의 액체 배지를 사용하여 각 균의 포자를 한 백금이 정도 접종 시키어 30°C에서 rotary(200rpm) shaker로 진탕 배양 하였다.

ii) 조(粗)효소 조제: 3일간 배양한후 전배양액을 14000rpm으로 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 0.05M phosphate buffer (pH 5.5)에서 투석하였다. 다시 이것을 동결 건조하여 조(粗)효소로 사용 하였다.

iii) PTE 효소 활성 측정 방법: 효소 활성의 측정은 1.5%로 희석시 조효소액 0.25ml을 0.25%의 펙틴용액 0.5ml에 가하고 여기에 0.05M 인산 완충액(pH 5.5) 0.5ml를 혼합하여 효소 반응액으로 하였다. 이 효소 반응액을 40°C 항온(恒溫)수조에 2시간 동안 반응 시켰다. 이 반응액 중 1.0ml를 취하여 1M HCl 1.0ml를 가하고 다시 0.01M Thiobarbituric acid¹⁸ 2.0ml를 첨가하여 30분간 100°C에서 가열하였다. 이때 4,5-unsaturated galacturonate가 존재하면 적색으로 발색 되는데 이것을 냉각 시킨후 spectrophotometer 550nm에서 효소의 활성을 측정 하였다.

iv) 환원당의 정량: 반응액 중에 형성된 환원당의 정량은 Somogyi-Nelson^{20,21} 방법에 의하여 측

정 하였다.

v) 단백질 정량: 본 실험에서 단백질 정량법은 Folin법²¹을 사용 하였다.

vi) PTE 반응 생성물의 흡광 spectrum: 펙틴에 PTE를 반응시켜 형성되는 생성물은 Thiobarbituric acid에 의하여 적색으로 발색되는데 이 산물의 光 흡수 spectrum은 spectrophotometer ANA-72 type 으로 측정 하였다.

결과 및 고찰

1) 균류에 의한 PTE의 생성

펙틴 2%가 포함된 액체 배지에서 *Sac. cerevisiae*, *Schizo. pombe*, *Asp. niger* 3종의 균을 48시간 배양하는 동안 효소의 생산량을 측정하기 위하여 12시간 간격으로 적당량의 배양액을 채취하여 조제된 조효소에 의하여 측정된 PTE의 생성은 Fig. 1과 같다. 배양시간이 경과 함에 따라 PTE의 생성은 점점 증가 하였으며 48시간 후 *Asp. niger*가 두종의 yeast보다 많은 약 3~4배의 PTE가 생성되었다. *Sac. cerevisiae*와 *Schizo. pombe*의 경우는 24시간 후에는 PTE의 생성이 증가되지 않았으며 *Sac. cerevisiae*가 *Schizo. pombe* 보다는 다소 PTE의 생성이 좋았다. 배양시간에 따라 3종의 균류에 의하여 변화된 배양액의 pH는 Table 1과 같다. *Sac. cerevisiae*나 *Schizo. pombe*의 경우는 배양액의 최초 pH 6.0은 24시간 배양하였을때 3.5~3.6, 48시간 후에는 3.2로 떨어졌다. 반면에 *Asp. niger*의 경우는 접종시의 배양액의 pH는 역시 6.0이었

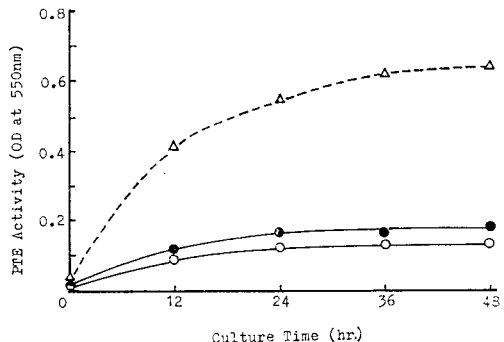


Fig. 1. Production of pectin transesterase by *Asp. niger* (△...△), *Sac. cerevisiae* (●—●), and *Schizo. pombe* (○—○) during the culture period.

Table 1. The pH change during the culture period

strain	pH at time of cultivation (h.)				
	0	12	24	36	48
<i>Sac. cerevisiae</i>	6.0	4.5	3.5	3.4	3.2
<i>Schizosac. pombe</i>	6.0	4.5	3.6	3.3	3.2
<i>Asp. niger</i>	6.0	5.8	5.5	5.3	4.0

으나 배양시간이 경과 하여도 효모처럼 쉽게 변하지 않고 서서히 감소되어 48시간 후에 4.0이 되었다.

Fig. 1과 Table 1을 상호 비교 하여 볼때 배양액의 pH의 하락과 PTE의 생성량과의 상관관계가 발견되었다. 즉 PTE의 생산이 비교적 낮은 효모의 경우 양배액의 pH가 급격히 하락했고 반대로 *Asp. niger*의 경우 배양액 중의 pH의 하락이 완만했기 때문에 PTE의 생성이 높았던 것이 아닌가 추정 할 수 있다. PTE의 생산능의 차이는 균류에 따라 다르겠지만 이와같은 추정은 후에 PTE의 최적 pH가 5~6이라는 사실로 PTE의 활성뿐 아니라 생성 유도도 pH의 영향을 받는다고 추리를 할 수 있다.

2) 펙틴의 분해과정 : 세 종류의 균류에 의하여 펙틴이 분해되는 과정을 규명하기 위하여 1.5%의 조효소액 3ml와 0.25% 펙틴 용액 2ml, 그리고 0.05M phosphate buffer (pH 5.5) 3ml를 혼합하여 40°C 수조에서 반응 시켰다. 12시간 간격으로 0.2 ml의 혼합액을 취하여 Thiobarbituric acid 방법으

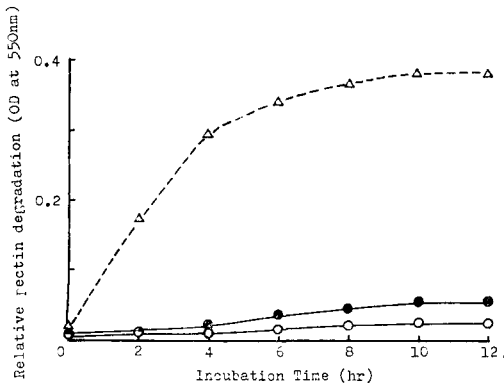


Fig. 2. Relative degradation of pectin by *Asp. niger* (△···△), *Sac. cerevisiae* (●—●), and *Schizosac. pombe* (○—○).

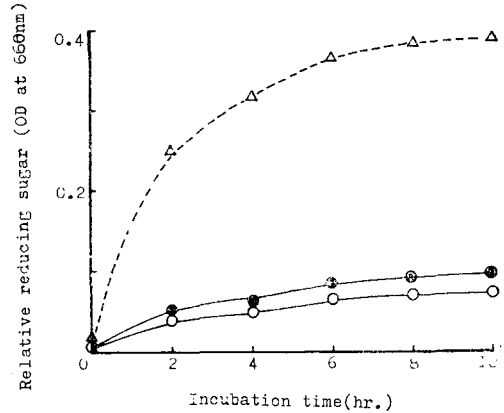


Fig. 3. Production of reducing sugar from pectin by *Asp. niger* (△···△), *Sac. cerevisiae* (●—●), and *Schizosac. pombe* (○—○). Reaction mixtures consisted of 3ml of enzyme solution, 2ml of 0.25% pectin and 3ml of 0.05M phosphate buffer, pH 5.5. Reaction mixtures were incubated at 40°C and each 1.0ml of them was removed at various time intervals for the test of reducing power by Somogyi-Nelson method.

로 생성된 4,5-unsaturated galacturonide의 양을 550nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 2). 이 결과에서 *Asp. niger*는 반응 10시간 까지 계속 펙틴을 분해하여 4,5-unsaturated galacturonide의 생성이 증가되었다. 그러나 효모의 경우는 모두 반응 12시간동안 펙틴의 분해가 매우 완만하였다. 다시 말해서 효모와 *Asp. niger* 유래의 PTE 생성은 현격한 차이가 있었음을 확인 할 수 있었다. 한편 이들 조효소에 의하여 펙틴이 분해 될 때에 환원당을 어느 정도 생성 시키는 가를 고찰 하고 저 위 방법과 같이 배양을 하면서 12시간마다 각각 1ml의 배양액을 채취하여 Somogyi-Nelson 방법^{19,20)}에 의하여 환원당을 정량한 결과는 Fig. 3과 같다.

배양 시간에 따라 세 종류의 균 모두 환원당의 생성량은 증가했으나 *Schizo. pombe*와 *Sac. cerevisiae*는 *Asp. niger* 보다 훨씬 적은량의 환원당이 펙틴으로 부터 생성되었다. 펙틴으로 부터 환원당이 생성된다는 사실은 펙틴의 비 환원 말단이 균에 의하여 생성된 PTE의 작용을 받아 절단되면서 남은 Oligo galacturonic acid가 다량 생성 되든가 또는 polygalacturonase에 의한 것으로 추정할 수 있다. Fig. 1, 2, 3을 비교하여 볼때 펙틴이 분해된 양

과 그 결과 생성된 환원당의 양이 많은 *Asp. niger* 에 있어서는 PTE의 생성량도 많았으며 *Sac. cerevisiae*와 *Schizosac. pombe*에서는 펙틴의 분해량, 환원당의 생성량 그리고 PTE의 생성량이 모두 적었다. 이 결과로 보아 세가지 균류에 의한 펙틴의 환원력은 PTE의 생성력과 비례된다는 사실을 발견하였다.

3) PTE 생성물의 흡광 spectrum ; Macmillan와 Vaughn⁹⁾은 *Clostridium multifementans*를 재료로 하여 얻은 PTE의 pectin분해 산물에 대하여 자외선 spectrum을 측정할 결과 235nm에서 최대치를 나타내었으며 또한 그들은 TBA 반응으로 550nm에서 최대치를 나타냄을 관찰하였다. 그들은 효소 반응의 생성물이 Thiobarbituric acid 반응에 의하여 550nm에서 최대 흡수대를 나타내는 것은 4,5-unsaturated galactronic acid로 O-(4-deoxy β -L-threo-hexo-pyranose-4-enyluronic acid)-(1 \rightarrow 4)-D-galacturonic acid에 의한 것이라고 보고 하였다. 본 연구에서도 펙틴의 분해 산물을 Thiobarbituric acid로 반응시켜 생긴 적색 물질의 흡광 spectrum을 조사 하였다. Fig. 4의 결과와 같이 550nm에서 최대의 흡광도를 나타내었다. 그러므로 본 실험에 사용한 세 종류의 균류에 의한 펙틴의 분해 산물은 4,5-unsaturated galacturonic acid임을 확인 할 수 있었다. 다시 말해서 polygalacturonic acid의 분해는 transe-elimination 반응에 의하여 일어남을 알 수 있었다.

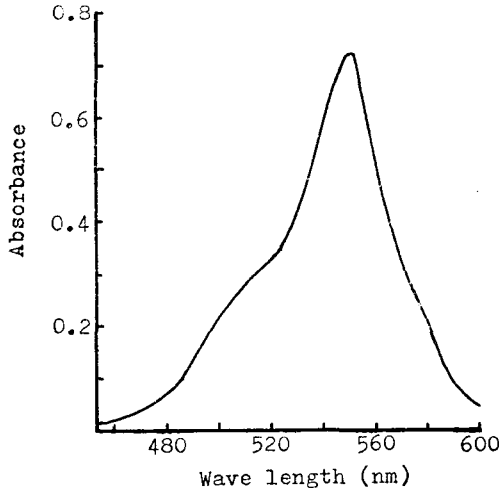


Fig. 4. Absorption spectrum of thiobarbituric acid reaction products. This products of degradation of pectin by PTE showed maximum spectrum at 550 nm.

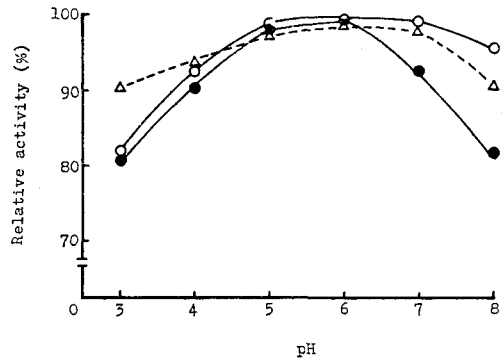


Fig. 5. Effect of pH on the activity of PTE by *Asp. niger* (△··△), *Sac. cerevisiae* (●—●), and *Schizosac. pombe* (○—○). The reaction mixture containing 0.25ml of enzyme solution, 0.5ml of 0.25% pectin solution and 0.5ml of phosphate and citrate buffers (pH 3 to 8) was incubated at 40°C for 2 hrs.

4) 효소 활성에 미치는 최적 pH ; 세가지 균류에 의하여 생성된 PTE의 특성을 규명 하기 위하여 몇가지 실험을 실시 하였다. 우선 최적 pH를 알기 위하여 1.5% 조효소액 0.25ml와 0.25% 펙틴 용액 0.5ml의 혼합액에 0.5M phosphate buffer와 citrate buffer 0.5ml를 가하여 여러가지 pH를 조절 하였다. 40°C 수조에서 2시간 반응시킨후 PTE의 활성을 시험한 결과는 Fig. 5와 같다.

세가지 균류에 의하여 생성된 PTE의 활성은 모두 pH의 변화에 큰 영향을 받지 않았다. 특히 효모균 보다는 *Asp. niger*에 의하여 생성된 PTE가 더욱 pH의 영향이 적었다. 어느 균의 PTE 이든간에 일반적으로 pH 5.0~6.0에서 높은 활성을 나타내었으며 최적 pH는 6.0이었다. 이 사실은 Ishi와 Yokotsuka¹⁶⁾가 보고한 *Asp. sojae* 유래의 PTE의 최적 pH와 동일하였으나 Edstrom과 Phaff⁶⁾가 보고한 *Asp. fonsecaeus*의 PTE의 최적 pH 5.0과는 차이가 있었다. 한편 *Bacillus polymyxa* 세균이 생성하는 endo-PTE의 최적 pH 8.5~9.5에 비하면 현저한 차이가 난다⁴⁾.

5) 효소 활성에 미치는 온도의 영향 : 세가지 균류에 의하여 생성된 PTE의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사 하기 위하여 "pH에 대한 효소 활성의 영향"에서와 같이 반응액을 조제했다. 반응액의 pH는 5.5로 조절하여 각기 다른 온도에서 1시

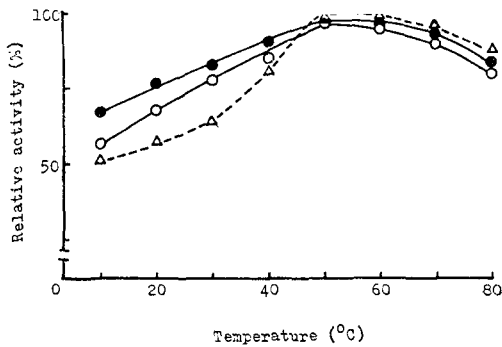


Fig. 6. Effect of temperature on the activities of PTE produced by *Sac. cerevisiae* (●—●), *Schizosac. pombe* (○—○), and *Asp. niger* (△···△).

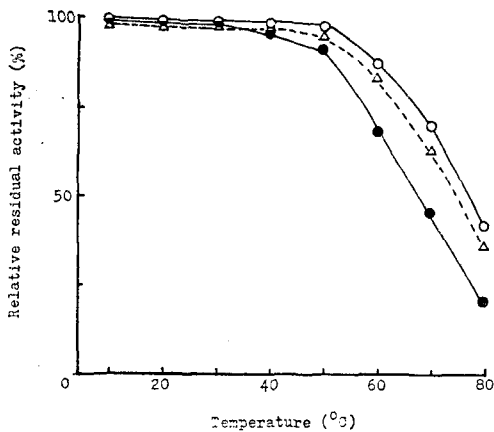


Fig. 7. Thermal stability curves of fungal PTE. The reaction mixtures consisted of the same as in Fig. 2 except that each 0.25ml of PTE solutions of *Sac. cerevisiae* (●—●), *Schizosac. pombe* (○—○), and *Asp. niger* (△···△) was previously heated at each temperature indicated on abscissa for 1 hour.

간 반응 시킨후 PTE의 활성을 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. 세가지 유래의 PTE는 50°C에서 70°C 사이에서 높은 활성을 나타내었으나 최적 온도는 50°C이었다. 이 결과로 효모 유래의 PTE와 *Asp. niger*가 생성하는 PTE의 활성은 대등소이 했으나 10°C에서 40°C 사이의 저 온도에서는 *Asp. niger*의 PTE 활성이 낮은것이 특징이었다.

6) 온도에 대한 PTE의 안정성 : 이들 PTE가 온

도에 의하여 불활성화 되는 정도를 조사 하기 위하여 1.5%의 조효소액 0.25ml을 각각 여러가지 온도에서 2시간 처리하였다. 그후 PTE의 활성을 측정 하기 위하여 0.25% 펙틴 0.125ml과 0.05M phosphate buffer (pH 5.5) 0.125ml을 가하여 1시간 동안 40°C에서 반응 시킨 뒤에 0.2ml의 반응액을 취하여 Thiobarbituric acid 방법으로 잔유 활성을 측정 한 결과는 Fig. 7과 같다. 50°C를 기점으로 보다 높은 온도 처리에 의하여 PTE의 활성은 감소하기 시작하여 80°C의 처리에서 그 활성이 48% 이하로 떨어졌다. 이 같은 경향은 세가지 균류의 경우 비슷한 현상을 보여 주었으나 특히 *Sac. cerevisiae*의 PTE가 다른 균류의 PTE보다 더 쉽게 불활성화 되었다. 다시 말해서 이 세가지 균류의 PTE의 활성은 50°C까지는 비교적 안정성이 있고 50~60°C에서 PTE의 생성 및 활성이 강함것으로 보아 세가지 시험 균류의 PTE의 최적 온도는 50°C란 것이 판명 되었다.

7) 기질에 의한 PTE 활성의 억제 : 세 균류 유래의 PTE의 활성에 대한 기질 농도의 영향을 시험하였다. 1.5%의 효소액 0.1ml에 0.05M phosphate buffer (pH 5.5) 0.4ml, 그리고 여러가지 다

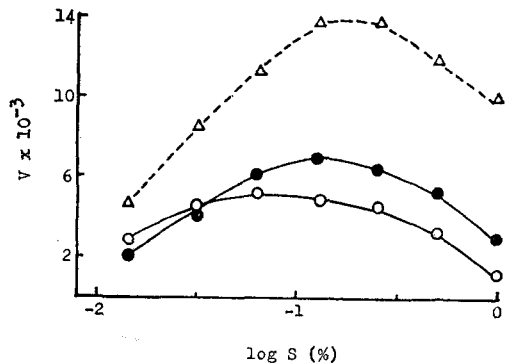


Fig. 8. Inhibition of fungal PTE activities by higher substrate concentrations.

The reaction mixtures consisted of 0.1ml of enzyme solution, 0.4ml of 0.05M phosphate buffer, pH 5.5 and 0.5ml of various substrate concentrations. Incubation was carried out at 40°C for 2 hrs. The initial velocities of PTE from *Sac. cerevisiae* (●—●), *Schizosac. pombe* (○—○) and *Asp. niger* (△···△) represent optical density at 550nm per min.

Table 2. Effect of concentration of various salts on the activity of fungal PTE

Salt	Strain	Relative activity (%)						
		Final concentration (M)						
		Control	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-1}	4×10^{-1}	6×10^{-1}
KCl	<i>S. cerevisiae</i>	100	101	102	114	114	120	132
	<i>Asp. niger</i>	100	103	114	128	151	189	192
NaCl	<i>S. cerevisiae</i>	100	102	107	120	125	132	144
	<i>Asp. niger</i>	100	101	102	116	116	121	131
MgCl ₂	<i>S. cerevisiae</i>	100	105	113	123	126	120	108
	<i>Asp. niger</i>	100	110	112	120	129	122	113

른 농도의 기질 용액 0.5ml을 가하여 40°C에서 반응시켜 최초 반응 속도 (initial velocity)를 측정하였으며 그 단위는 1분간에 550nm의 파장에서 optical density (O. D.)로 표시 하였다. 이 실험 결과는 Fig. 8과 같다. *Asp. niger*의 PTE의 최초 반응 속도는 효모의 PTE 보다 현저히 높았다. 기질 농도가 저 농도에서 0.125%까지는 최초반응 속도는 증가 하였으나 0.25% 이상의 기질 농도에서는 이 효소의 활성은 오히려 억제 되기 시작하여 1% 기질 용액에서는 현저히 억제 되었다. *Sac. cerevisiae*, *Schizo. pombe* 두가지 효모의 경우도 0.125% 이상의 기질 용액 속에서도 PTE의 활성은 억제 되었지만 1% 기질 용액에서는 그 억제가 더욱 심하였다. 다만 *Asp. niger*와 다른 것은 기질 농도에 의한 효소 활성의 억제 폭이 훨씬 완만했다는 점이다. Albersheim등⁵⁾은 fungal pectinase를 사용하여 비슷한 결과를 얻었다.

8) PTE 활성에 미치는 여러가지 염농도의 영향 몇 가지 염 즉 KCl, NaCl, MgCl₂의 여러가지 농도가 효소의 활성에 미치는 영향을 시험하였다. 1.5% 효소액 0.25ml에 0.25% 펙틴 0.25ml 그리고 각 염을 농도 별로 첨가 하여 40°C에서 1시간 반응시킨후 효소의 활성을 측정했다(Table 2).

*Sac. cerevisiae*와 *Asp. niger*만을 비교하여 보았으며 KCl이나 NaCl의 경우 0.6M까지는 농도가 높아짐에 따라 그들 PTE의 활성도 증가함을 알수 있었다. 그러나 MgCl₂의 경우는 저농도에서는 계속 그 활성이 증가 하다가 0.2M에서 효소 활성이 최대를 이루었다. 그 이상 0.6M까지는 오히려 억제하는 경향을 관찰할 수 있었다. 다시 말해서 PTE 활성에 미치는 최적 MgCl₂의 농도는 0.2M로서 *Sac. cerevisiae*의 경우 126%가 증가 하였고

*Asp. niger*의 경우는 129%나 그활성이 촉진 되었다.

논문 요약

1. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* 4683, *Aspergillus niger*의 세 종류의 균류를 2% 펙틴이 함유된 액체 배지를 사용하여 30°C에서 진탕 배양 하여 pectin Transeliminase (PTE)를 생성 시켰다.
2. *Asp. niger*의 PTE의 생성은 두 종류의 효모 균보다 월등히 높았다. 이들 효소의 환원력을 측정할 결과 *Asp. niger*의 PTE는 효모의 그것에 비하여 대단히 높았다. 즉 환원력은 PTE 활성에 비례함을 알 수 있었다.
3. PTE 효소에 의한 펙틴의 분해 산물은 4,5-unsaturate galacturonic acid임이 확인되었다.
4. 세가지 균류의 효소 활성의 최적 pH는 6.0이었고 최적 온도는 50°C이었으며 온도에 의한 효소의 불활성도는 10°C에서 50°C까지는 거의 없었으나 60°C 이상에서는 점차 증가 하였다.
5. 기질에 의한 PTE의 활성을 조사한 결과 *Asp. niger*의 경우 0.125%의 펙틴을 포함한 용액 속에서는 그 활성이 촉진되었으나 그 이상의 기질 농도에서는 효소 활성이 오히려 억제 현상을 나타내었다. 두 종류의 효모균에서도 유사한 결과가 나타났다.
6. 효소 활성에 미치는 KCl, NaCl, MgCl₂의 염의 최적 농도를 규명한 결과 KCl과 NaCl은 최저 2×10^{-4} M에서 6×10^{-1} M까지의 농도에서는 *Asp. niger*와 *Sac. cerevisiae* 유래의 PTE의 활성은 계속 증가 하였다. 반면 MgCl₂의 경우는 0.2M에서 효소활성이 최적이었다.

References

1. Albersheim, P., Neukom, H. and Deuel, H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. Arch. Biochem. Biophys. 90, 46-51.
2. Yu, J.H., Lee, B.K., Yang, R., Cho, S. H. and Lew, J. (1976). Studies on pectic enzymes produced by *Aspergillus* sp. Kor. J. Appl. Micro. Bioeng. 4, 57-69.
3. Macmillan, J.D., Phaff, H.J. and Vaughn, R.H. (1964). The pattern of action of an exopolygalacturonic acid transeliminase from *Clostridium multif fermentans*. Biochem. 3, 572 ~578.
4. Nagel, C.W. and Vaughn, R. H. (1960). The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. Arch. Biochem. Biophys. 93, 344~352.
5. Albersheim, P. and Killias, U. (1962). Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. Arch. Biochem. Biophys. 97, 107~115.
6. Edstrom, R. D. and Phaff, H. J. (1963). Purification and certain properties of pectin transeliminase from *Aspergillus fONSECAEUS*. J. Biol. Chem. 239, 2403~2415.
7. Okamoto, K., Hatanaka, C. and Ozawa, J. (1964). Mechanism of acting of saccharifying pectate transeliminase. Agr. Biol. Chem. 237 ~241.
8. Okamoto, K., Hatanaka, C. and Ozawa, J. (1964). A saccharifying pectate transeliminase of *Erwinia aroideae*. Agr. Biol. Chem. 28, 331.
9. Macmillan, J.D. and Vaughn, R.H. (1964). Purification and properties of a polygalacturonic acid transeliminase produced by *Clostridium multif fermentans*. Biochem. 3, 564~572.
10. Nagel, C.W. and Anderson, M.M. (1965). Action of a bacterial transeliminase on normal and unsaturated oligogalacturonic acids. Arch. Biochem. Biophys. 112, 322~330.
11. Becker, G.E. and Pappenheimer, A.M. (1965). Lyase activity of inducible S8-depolymers from *Bacillus palustris*. Biochim. Biophys. Acta. 343~348.
12. Nasuno, S. and Starr, M.P. (1966). Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. J. Biol. Chem. 241, 5298~5306.
13. Nagel, C. W. and Hasegawa, S. (1966). Kinetics and site of attack of oligogalacturonic acids by an endopeptic acid transeliminase. Arch. Biochem. Biophys. 590~594.
14. Nasuno, S. and Starr, M.P. (1967). Polygalacturonic acid transeliminase of *Xanthomonas campestris*. Biochem. J. 104, 178~185.
15. Dave, B.A. and Vaughn, R.H. (1971). Purification and properties of a polygalacturonic acid transeliminase produced by *Bacillus pumilus*. J. Bacteriol. 166~174.
16. Ishii, S. and Yokotsuka, T. (1972). Purification and properties of pectin transeliminase from *Aspergillus niger*. Agr. Biol. Chem. 36, 146~153.
17. Hatanaka, C. and Ozawa, J. (1969). Enzymatic degradation of pectic acid. Part XIII. A new exopolygalacturonase producing digalacturonic acid. Agr. Biol. Chem. 764~772.
18. Weissbach, A. and Hurwitz, J. (1959). J. Biol. Chem. 234. 705~709.
19. Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195, 19.
20. Nelson, N. (1944). J. Biol. Chem. 153, 375.
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent.