

Rhizopus속이 생성하는 Polygalacturonase의 생산 및 정제

정영건 · 조영제 · 권오진 · 최 칭[†]

영남대학교 식품가공학과

Production and Purification of Polygalacturonase from *Rhizopus* sp.

Yung-Gun Chung, Young-Je Cho, Oh-Jin Kwon and Cheong Choi[†]

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract

Rhizopus oryzae CJ-2114 was selected for its strong polygalacturonase activity among various strains of mold found in soil. It was found that the production of polygalacturonase reached to maximum when the wheat bran medium containing 1% albumin, 1% sorbitol and 0.2% (NH₄)₂ C₂O₄ was cultured for 96 hrs at 30° C. Polygalacturonase was purified 11.13 fold from *Rhizopus oryzae* CJ-2114. The purification procedures include ammonium sulfate treatment, gel filtration on Sephadex G-75, G-150 and DEAE-cellulose ion exchange chromatography. Yield of the enzyme purification was 40.3%. Purified enzyme was confirmed as a single band by the polyacrylamide gel electrophoresis. When the purified enzyme was applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular weight was estimated to be 47,000. The amino acid composition indicated relatively high contents of glutamic acid and glycine.

Key words : *Rhizopus oryzae* CJ-2114, polygalacturonase

서 론

식물체에서 물에 불용성인 protopectin은 식물세포 간 유착기능을 가지며 protopectin의 pectin, pectate로의 가용화는 조직의 연화를 수반하며, 이 가용화된 펙틴질이 pectic enzyme의 작용을 받게 됨으로써 세포분리와 이에따른 식물조직의 액화를 가져오게 된다. Pectic enzyme은 pectin 분자중의 D-galacturonan chain의 glucosidic-1, 4 결합의 분해를 촉매하는 depolymerizing enzyme과 펙틴의 deesterification에 관여하는 효소로 구분되며, 이들중 depolymerizing enzyme은 exo-, endopolygalacturonase, exo-, endopolymethylgalacturonase의 4개군으로 구분된다. 한편 이러한 pectic enzyme은 과실주스와 과실주 가공에 있어서는 품질의

조성과 유지에 불가결한 존재임이 알려져 있고¹⁻⁵⁾, 과채류의 처리가공에 있어 식물조직의 인위적 분해에 사용되므로 더욱 주목받았으며 pectic enzyme 중 polygalacturonase의 작용으로 과실주스의 점도를 저하시키며 과즙에 혼탁성을 주는 펄프입자를 응집하여 이를 여과, 제거 함으로써 과즙의 청징화를 가능하게 하였다⁶⁻⁸⁾. 이와같이 pectic enzyme이 가지는 산업적 중요성 때문에 효소의 대량생산이 요구되게 되었고, 여러 가지 효소원중에서 곰팡이가 생성하는 효소에 대해 Luh와 Phaff⁹⁾, Demain 등¹⁰⁾, Endo 등¹¹⁻¹³⁾이 연구를 진행하여 왔으며, 새로운 기기와 지식이 발달하면서 효소 단백질이 보다 순수하게 정제되어 이로부터 이들 효소의 작용이 점차 규명되기 시작하였으나 효소의 효율적 정제법 등 아직 연구할 소지가 많이 남아 있는 실정이다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

본 연구에서는 토양으로부터 효소생성능이 강한 *Rhizopus oryzae* CJ-2114 를 분리하고 이 균주가 생성하는 polygalacturonase 연구의 일부로서 생산조건 및 정제에 관하여 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균의 분리 및 선별

대구와 경북지역의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 평판배양법에 의해 순수분리를 실시하였다. 분리된 균주의 효소활성을 측정하여 활성이 강한 5균주를 1차 선별하고 2차 효소생성능 실험에서 가장 우수한 1균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Czapek-Dox agar에 1개월에 1회씩 계대배양하여 보관하였다.

배지 및 배양방법

균의 순수분리를 위한 배지는 potato dextrose agar 를, 효소생산을 위하여 밀기울배지를, 균주 보관용 배지로는 Czapek-Dox agar를 사용하였으며, 효소생산을 위해서 2% glucose를 가한 밀기울배지에 공시균의 균사체 및 포자를 5 백금이 접종하여 30°C에서 약 3일간 배양시켰고, 이때 사용한 potato dextrose agar 및 Czapek-dox agar의 조성은 Table 1, 2와 같다.

조효소액의 조제

배양된 밀기울배지에 8배의 0.05M acetate buffer (pH 5.0)를 가하여 균질화한후 4°C에서 24시간 동안 교반하여 효소를 추출하고 8000g로 30분간 원심분리한후 상정액을 모아 여과하여 조효소액으로 사용하였다.

단백질의 정량

표준단백질로써 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 등¹⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였다.

효소활성 측정

Polygalacturonase는 기질인 polygalacturonic acid를 분해하여 oligomer를 생성하므로 이 환원기의 증가량을 측정하여 polygalacturonase의 역가를 측정하였다. 환원기의 정량은 DNS 법¹⁵⁾으로 실시하였으며 이때 효소단위는 효소액 1ml가 1분간에 1 μ mole의 환원기

Table 1. The composition of potato-dextrose-agar (%)

Potato extract*	1000ml
Agar	2.0g
Dextrose	2.0g
pH	7.0

*200g of sliced potato in 1L of tap water was boiled for 30 min. After cooling the extract was filtered through defatted cotton

Table 2. The composition of Czapek-Dox-Agar

Sodium nitrate	2.9g
Potassium chloride	0.5g
Magnesium sulfate, 7 hydrate	0.5g
Dipotassium hydrogen phosphate	1.0g
Ferrous sulfate, 7 hydrate	0.01g
Pectin	20.0g
Agar	20.0g
Distilled water	to 1 liter

(α -D-galacturonic acid)를 생성하는 것을 1unit로 정하였고, pectin esterase의 활성은 Wood 등의 방법¹⁶⁾으로 측정하였다. 즉, 0.05M acetate buffer (pH 5.2)에 pectin을 0.5%로 용해하여 기질용액으로 사용하였으며, 기질과 효소액을 10 : 1로 하고 30°C에서 60분간 반응한 후 반응액 1ml에 2% potassium permanganate용액 0.2ml를 가하고 잘 저어주면서 얼음수조에서 15분간 방치한다. 여기에 0.2ml의 0.5M sodium arsenite 용액 0.2ml 와 0.6ml의 중류수를 가한후 잘 저어주고 1시간 실온에서 반응시킨다.

2ml의 0.02M pentan-2,4-dion용액을 가한후 흔들어서 주고 밀봉한다. 이를 58-60°C에서 15분간 가열한 후 실온으로 냉각하고 412nm에서 흡광도를 측정하였다. Pectin lyase 활성측정은 Hancock 등의 방법¹⁷⁾으로 측정하였다. 즉, 0.05M Tris-HCl buffer (pH 8.2)에 polygalacturonic acid를 0.5% 농도로 용해시켜 기질용액으로 하였으며, 기질용액과 효소액을 10 : 1로 섞어 30°C에서 30분간 반응시킨 후 235nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

Polygalacturonase의 정제

Polygalacturonase의 정제는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 조효소액을 황산암모늄으로 염색한후, 저온실에서 DEAE-cellulose chromatography와 Sephadex G-75, G-150칼럼을 사용하여 정제하였다.

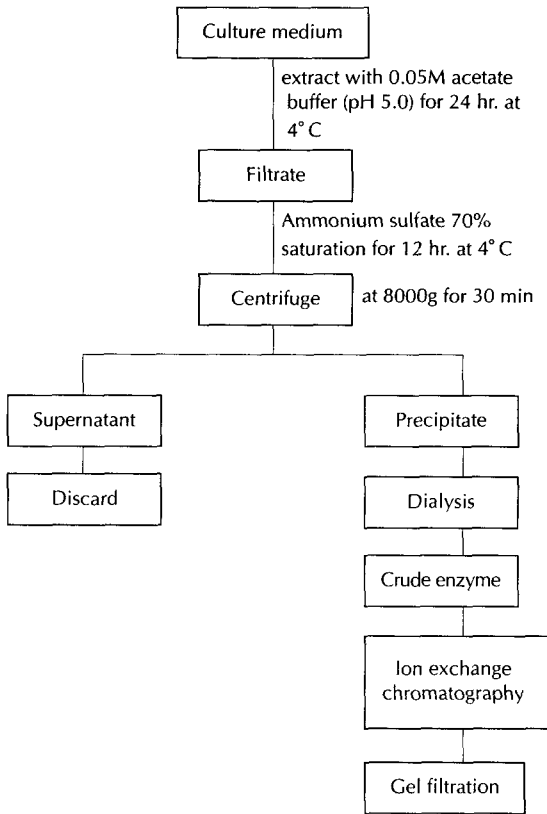


Fig. 1. Purification procedure of polygalacturonase from culture medium of *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

Polyacrylamide gel electrophoresis

전기영동은 Davis 법¹⁸⁾에 의해 7.5% polyacrylamide gel로써 튜브당 3mA로 실온에서 약 4시간동안 수행되었다. 전기영동후 gel은 1% Amido black 10-B로써 염색하였고, 7% acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

전기영동에 의한 분자량 측정은 Weber와 Osborn¹⁹⁾의 방법에 의하여 실시하였으며 정제된 효소는 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M phosphate buffer (pH 7.0)에 용해한 후 전기영동 하였다. 전개후 Rf치에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin(M. W. : 66,000), egg albumin(M. W. : 45,000), pepsin(M. W. : 347,000), trypsinogen(M. W. : 24,000), β-lactoglobulin(M. W. : 18,400), lysozyme(M. W. : 14,300)을 사용하였다.

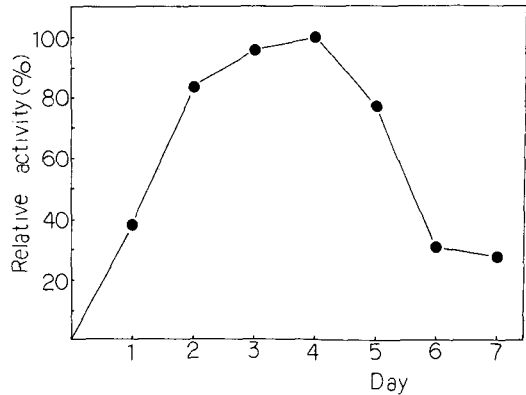


Fig. 2. Effect of culture time on production of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

효소의 결정화

정제된 효소를 소량의 0.05M acetate buffer (pH 5.0)에 용해하여 냉동용기속에서 효소액을 냉각하는 동안 -20° C에서 저장한 차가운 아세톤을 유백색의 혼탁이 생성될때까지 서서히 가한후 파라핀으로 밀봉하여 4° C에서 방치하고, 결정화시켜 Scanning electron microscopy에 의해 그 구조를 확인 하였다.

아미노산 분석

효소의 아미노산 조성은 시료에 6N-HCl을 가하고 질소가스로 충전, 밀봉시켜 105° C에서 20시간 가수분해한 다음 완전히 중화시킨 후 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

결과 및 고찰

Polygalacturonase 생성균주분리 및 동정

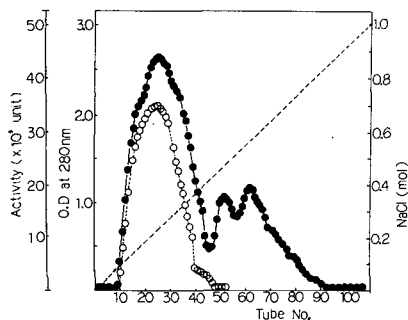
대구와 경북지역에서 채취한 토양으로부터 분리한 75균주를 대상으로 펙틴질 분해력이 강한 1 균주를 분리, 선정 및 동정한 결과 *Rhizopus oryzae*로 추측되었으며 영국의 CAB institute에 의뢰한 결과 *Rhizopus oryzae*로 확인된 바 본 균주를 *Rhizopus oryzae* CJ-2114로 명명하였다.

배양시간 및 영양원에 따른 polygalacturonase의 생성

Rhizopus oryzae CJ-2114의 균주에 의한 polygalacturonase의 생성은 수분이 60% 함유된 밀기울 배지를 사용하여 40° C에서 배양시간별로 측정한 결과 Fig. 2

Table 3. Effect of various source on polygalacturonase production

Source	Component	Relative activity (%)
Control	—	100.00
Carbon (1%)	Galactose	47.15
	Arabinose	37.07
	Glycerin	80.74
	Lactose	69.77
	Glucose	94.64
	Fructose	35.83
	Sorbitol	104.82
	Mannitol	30.91
	Maltose	63.38
	Mannose	72.79
Organic nitrogen (1%)	Starch	95.51
	Casein	72.25
	Polypepton	108.96
	Glycine	33.48
	Albumin	113.89
Inorganic nitrogen (0.2%)	Urea	80.07
	Ca(NO ₃) ₂	23.85
	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	107.28
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	62.60
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	66.97
	NH ₄ C(CH ₂ OH) ₃	45.91
	KNO ₃	41.43
	NH ₄ Cl	45.58
	(NH ₄) ₂ SO ₄	57.22

**Fig. 3. DEAE-cellulose ion exchange chromatography of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.**

● —● protein, ○ ·····○ activity

와 같이 배양시작 후 96시간이 지났을때 효소활성이 가장 높았으며 140시간이 지났을때는 활성이 급격히 감소하여 약 30%까지 감소하는데 이 결과는 Lee와

Charles²⁰⁾가 *Rhizopus* sp.의 polygalacturonase가 배지에 glucose 첨가시 98시간 배양후 활성이 최대에 도달하였다는 보고와 유사하였다. 탄소원이 polygalacturonase 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 탄소원을 밀기울배지 제조시 2% 수용액 상태로 첨가시킨뒤 배양시켜 효소활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 유 등²¹⁾은 *Verticillium* sp.의 polygalacturonase가 탄소원의 첨가에 의해 뚜렷한 활성촉진이 없었다고 보고하였으며 본 실험에서도 glucose와 sorbitol을 첨가하였을때만이 활성을 유지하였고 나머지는 효소활성이 감소하였다. 이는 휴지기에서 효소생성 중단과 함께 균체의 세포내 소화와 유해물질의 축적등으로 효소활성이 억제되는데 원인이 있는것으로 추측하였다. 효소활성에 미치는 유기 질소원의 영향을 알아보기 위하여 각종 유기 질소원을 1% 농도로 첨가하여 배양시킨 결과 albumin에 의해 가장 많은 효소활성 증대가 발생하였으며 polypepton에 의해서도 약간의 활성증대가 관찰되었다(Table 3). 무기질소원을 배지에 첨가하였을때 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 배지에 0.2% 농도로 첨가하여 배양시킨 결과 (NH₄)₂C₂O₄에 의해 활성이 촉진되었을 뿐 나머지는 모두 감소되었다(Table 3).

Polygalacturonase의 정제

배양된 밀기울배지에 8배의 0.05M acetate buffer (pH 5.0)를 가하여 균질화 시켜준뒤 4°C에서 24시간동안 교반하여 효소를 추출하고 여과한 후 8000g에서 30분간 원심분리하고 그 상등액에 황산암모늄을 70% 포화되게 가하여 효소단백질을 응집, 침전시켰으며, 이 침전물들은 원심분리로서 회수하고 4°C에서 0.05M acetate buffer (pH 5.0)에 대하여 투석을 행하였고 투석한 후 효소액중의 불용성물질은 원심분리하여 제거하였다. 투석액에는 pectinesterase가 공존하고 있었다.

DEAE-cellulose column chromatography

투석한 효소액을 DEAE-cellulose 칼럼(3×50cm)에 주입시킨 후 약 1.5배의 상기 buffer로 비활성단백질을 씻어낸 다음 흡착된 단백질을 0~1.0 M NaCl의 linear salt gradient로 용출하였다(Fig. 3). 이때의 유속은 0.72ml/min이었고 7ml씩 분획하였으며, 활성분획은 모아서 농축하였다. DEAE-cellulose column chromatography한 결과 약 0.27M NaCl 정도에서 활성 단백질이

Table 4. Purification procedure of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme solution	850.08	1,300,850.00	1,530.27	100.00	1.00
Ammonium sulfate	308.66	909,197.66	2,945.67	69.89	1.92
DEAE-cellulose	216.33	793,236.00	3,666.79	60.98	2.31
Sephadex G-75	102.93	667,255.00	6,482.61	51.29	4.24
Sephadex G-150	30.78	524,160.00	17,027.03	40.29	11.13

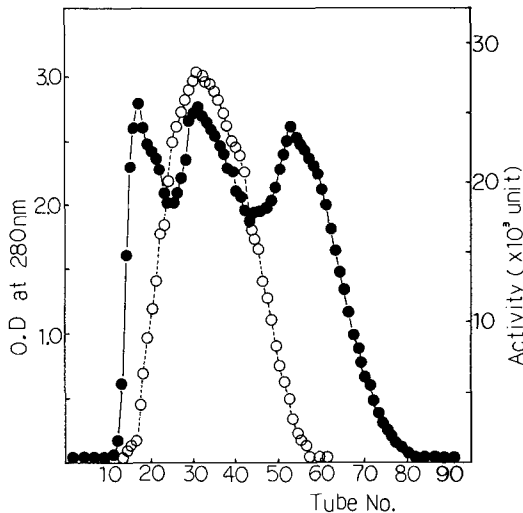


Fig. 4. Sephadex G-75 gel filtration of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

●—● protein, ○·····○ activity

용출되었으며 활성부위의 효소액중에는 pectinesterase의 활성이 검출되지 않았다.

Sephadex G-75 gel filtration

DEAE-cellulose를 통과시킨 활성단백을 Amicon membrane ultrafiltration system으로 농축하여 Sephadex G-75칼럼(2×75cm)에 주입시킨후 0.51ml/min의 유속으로 5ml씩 분획하였으며(Fig. 4), 3개의 protein peak가 검출되었으나 완전히 분리되지는 않았다.

Sephadex G-150 gel filtration

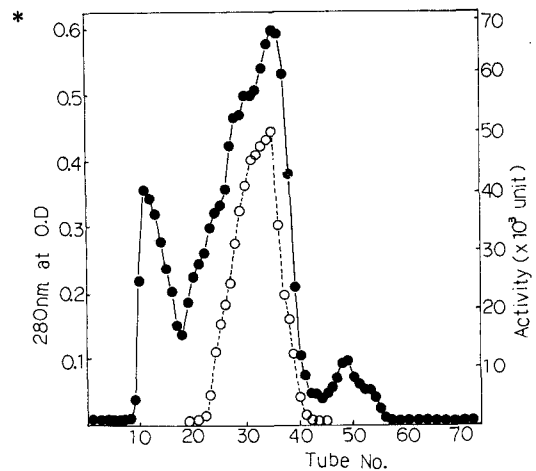


Fig. 5. Sephadex G-150 gel filtration of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

●—● protein, ○·····○ activity

Sephadex G-75를 통과시킨 효소액을 Sephadex G-150칼럼(2×90cm)에 주입시킨 후 1.6ml/10min의 유속으로 6ml씩 분획하였으며, 활성분획은 모아서 농축한뒤 동결건조하였다(Fig. 5).

이상과 같이 정제한 결과 효소의 비활성역가는 17027.03unit/mg이었고 수율은 40.29% 정제배수는 11.13배였다(Table 4).

Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 효소단백질을 Davis 법¹⁰⁾에 따라 polyacrylamide gel로써 disc gel electrophoresis 행하여 본 결과 Fig. 6에서와 같이 단일밴드로 나타났다.

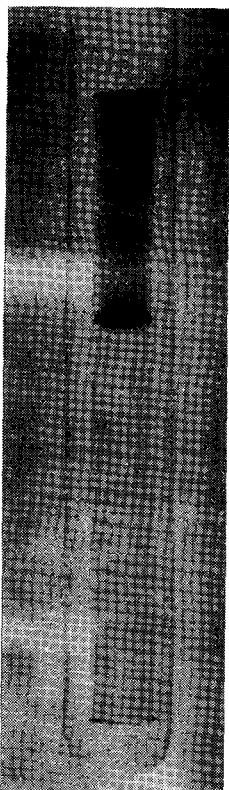


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

분자량 측정

Weber와 Osborn의 방법¹⁹⁾에 따라 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 47,000 정도로 측정되었다. 또한 gel filtration에 의한 분자량 측정에서도 유사한 결과를 얻어 이 효소는 monomeric 상태로 존재하는 것으로 추측되었다. 이 등²³⁾은 *Aspergillus* sp.의 polygalacturonase가 35,000, 유 등²¹⁾은 *Verticillus* sp.의 polygalacturonase가 38,000, Lee와 Charles²⁰⁾은 *Rhizopus* sp.의 polygalacturonase가 32,000이라고 보고하였으며 본 균주가 생산하는 polygalacturonase가 높았다.

효소의 결정화

정제된 효소를 4°C에서 결정화시켜 scanning electron microscopy에 의해 그 구조를 확인한 결과는 Fig. 8과 같다. *Rhizopus oryzae* CJ-2114가 생성하는 polygalacturonase의 결정구조는 표면이 거친 기둥 모양을 형성하고 있었다.

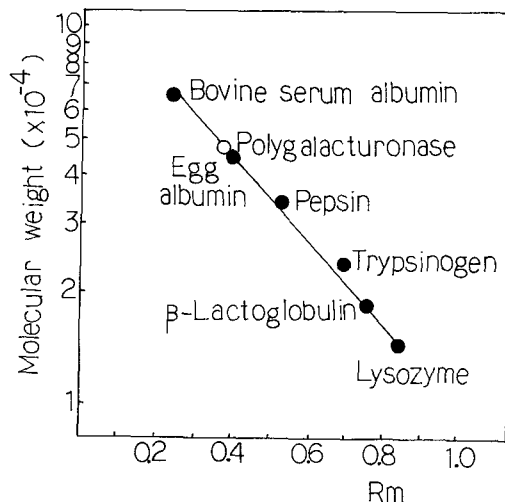


Fig. 7. The calibration curve for determination of the molecular weight of polygalacturonase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.



Fig. 8. Scanning electron microphotograph of crystal polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

아미노산 분석

정제 효소단백질의 아미노산 조성은 Table 5에서 보는 바와 같이 17종류로서 glutamic acid와 glycine이 각각 198.74mg, 143.31mg으로 가장 많이 함유되었고 methionine과 cystine의 함량이 가장 적게 나타났다. 조 등²²⁾은 *Penicillium* sp.의 polygalacturonase에 glutamic acid와 glycine의 함량이 가장 많으며 methionine의 함량이 적었다고 보고하였으며 본 효소도 이와 비슷한 조성을 나타내었으나 phenylalanine의 함량이 다소 많이 포함되어 있었다.

요 약

Rhizopus oryzae CJ-2114의 polygalacturonase 생성

Table 5. Amino acid composition of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114

Amino acid	Content (mg/g enzyme)
Aspartic acid	53.04
Threonine	43.42
Serine	84.56
Glutamic acid	198.74
Proline	27.77
Glycine	143.31
Alanine	30.32
Cystine	trace
Valine	54.38
Methionine	4.69
Isoleucine	37.65
Leucine	61.92
Tyrosine	17.20
Phenylalanine	26.41
Histidine	78.08
Lysine	52.87
Arginine	17.28

을 위한 최적조건은 수분이 60% 함유된 밀기울 배지에 1% albumin, 0.2% (NH₄)₂C₂O₄, 1% sorbitol을 첨가하여 96시간 배양시 최대활성을 나타내었으며, Sephadex G-75 및 G-150을 사용한 gel filtration과 DEAE-cellulose에 의한 이온교환 크로마토그래피를 통하여 이 효소를 11.13배 정제할 수 있었고, 수율은 40.3%였다. 정제효소는 polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 단일밴드로 확인되었으며 분자량은 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의하여 47,000정도로 측정되었다. 효소의 결정구조는 표면이 거친 기둥모양을 형성하고 있었으며 아미노산 조성은 17종류로써 glutamic acid 함량이 198.74mg/g enzyme로 가장 많았다.

감사의 글

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 지방대학육성비 지원 학술연구조성비에 의한 연구의 일부이며, 이에 감사 드립니다.

문헌

1. Brady, C. J., Mac Alpine, G., Mcglasson, W. B. and Ueda, Y. : Polygalacturonase in tomato fruits and in-

duction of ripening. *Austr. J. Plant Physiol.*, **9**, 171 (1982)

2. Brown, M. R. and Ough, C. S. : A comparison of activity and effect of two commercial pectic enzyme preparations on white grape musts and wines. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **32**, 272(1981)

3. Buescher, R. W. and Hobson, G. E. : Role of calcium and chelating agents in regulating the degradation of tomato fruits tissue by polygalacturonase. *J. Food Biochem.*, **6**(3), 147(1982)

4. Minquez, M. M. Z. : Evolution of pectic components and pectinolytic enzymes during the ripening and storage of Hojiblanca olives, *Grasasy Aceites*, **33**, 327(1982)

5. Pressey, R. and Avants, J. K. : Pectic enzymes in long keeper tomatoes. *Holt. Sci.*, **17**(3), 398(1982)

6. Rokhlenko, S. G., Vanyushkina, L. D., Panikhina, S. L. and Tokhmakhchi, N. S. : Effects of enzyme preparations on wine stability. *Appl. Biochem. Microbiol.* **16**, 220(1980)

7. Kawabe, S. and Usami, S. : Immobilization of papain with citrus inner-peel pectin. *J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.*, **30**, 140(1983)

8. Wordsack, C., Baum, F., Leuchtenberger, A. and Ruttloff, H. : Production of pectolytic enzyme. *German Democratic Republic Patent*, 149(1983)

9. Phaff, M. J. and Luh, B. S. : The preparation of pure di and trigalacturonic acid, *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 231(1952)

10. Phaff, H. J. and Demain, A. I. : The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.*, **218**, 855(1956)

11. Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of mold. Part 8. Purification and properties of endopolygalacturonase I. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 535(1964)

12. Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of mold. Part 4. Purification and properties of endopolygalacturonase II. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 543(1964)

13. Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of mold. Part 5. Purification and properties of endopolygalacturonase III. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 551(1964)

14. Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)

15. Miller, G. L. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**(1), 426(1959)

16. Wood, P. J. and Siddiqui, I. R. : Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methylesterase activity *Anal. Biochem.*, **39**, 418(1971)

17. Hancock, J. G. and Miller, R. L. : Relative important of polygalacturonase transesterase and other pectolytic enzyme in southern Anthracnose, Spring black stem, and Stemphylium leaf spot of alfalfa. *Phytopathology.*, **55**, 346(1965)

18. Davis, B. J. : Disc electrophoresis II. Method and ap-

- plication of human serum proteins. *Ann New York Acad. Sci.*, **121**, 404(1964)
19. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determination sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** (16), 4406(1969)
 20. Lee, S. C. and Charles, A. W. : Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, an elicitor of Casbene. Synthetase activity in Castor bean seedlings. *Plant Physiol.*, **67**, 633(1981)
 21. 유주현, 진효상, 변유량, 오두환 : *Verticillium* sp.가 생산하는 protopectin 용해효소에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **10**(3), 197(1982)
 22. 조영제, 임성일, 이우제, 최청 : *Penicillium* sp. CB-20이 생성하는 polygalacturonase의 생산 및 정제. 한국산업미생물학회지, **17**(5), 440(1989)
 23. 이봉기, 유주현, 양용, 조세훈, 유준 : *Aspergillus* sp.가 생성하는 pectic enzyme에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **4**(2), 63(1976)

(1992년 1월 4일 접수)