

Cryptococcus laurentii Y-23의 glucoamylase와 exopolygalacturonase의 동시발효에 미치는 유도기질의 영향

김창화 · 백상규 · 윤혜선 · 진익렬 · 유춘발*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과, 대구대학교 공과대학 식품공학과

Effects of Inducible Substrates on the Co-production of Glucoamylase and Exopolygalacturonase from *Cryptococcus laurentii* Y-23

Chang-Hwa Kim, Sang-Kyoo Paik, Hye-Sun Yun, Ingyol Jin and Choon-Bal Yu*

Department of Microbiology, Kyungpook National University

*Department of Food Science and Engineering, Taegu University

Abstract

The production of glucoamylase and exopolygalacturonase from *Cryptococcus laurentii* Y-23 were investigated with the inducible substrates and mineral salts. Soluble starch induced only glucoamylase whereas pectin induced exopolygalacturonase as well as glucoamylase, and glucose did not induce glucoamylase whereas pectic acid induced a little amount of exopolygalacturonase. At the productions of two enzymes by inducible substrates for the 5 day-cultivation, the yeasts started log phase around 12 hours and mostly reached stationary phase around 36 hours. The best productivity of glucoamylase was observed with addition of soluble starch in the cultivation for 72 to 86 hours, and the high productivity of exopolygalacturonase was done by addition of both pectin and soluble starch in the cultivation for more than 72 hours. Without ammonium sulfate in the medium, however, cultural pH was so increased gradually that production of both enzymes were decreased and delayed as well. Mn^{2+} increased both productivities of glucoamylase and exopolygalacturonase with 21% and 18%, respectively.

Key words : amylase, pectinase, yeast

서 론

Glucoamylase(amyloglucosidase, γ -amylase)는 α -amylase, β -amylase 등과 함께 amylase의 일종⁽¹⁾으로 다른 amylase보다 생전분 분해율⁽²⁾이 우수한 것으로 알려져 있어서 알콜발효를 위한 생전분을 이용한 무증자 알콜발효의 연구에 많이 시도된다^(3,4). Exopolygalacturonase(exo-PGase)는 pectinase중에 hydrolase의 일종⁽⁵⁾으로 pectate lyase 등과 함께 쥬스의 탈펙틴화 및 청징화, 발효중인 과일채소의 조직연화 등에 사용된다⁽⁶⁾. 미생물에서 glucoamylase는 효모 *Endomycopsis fibuligera*(현재 *Endomyces fibuligera*⁽⁷⁾) 또는 *Saccharo-*

mycopsis fibuligera⁽⁸⁾)를 포함한 진균류에 의하여 주로 생산되고 세균에 의한 생산은 비교적 드문 것으로 알려져 있다⁽⁹⁾. Exo-PGase는 초기에는 *Aspergillus niger*, *Coniothyrium diplodiella*, *Rhizopus tritici* 등의 곰팡이에 의하여 많이 발견되었다가 그 후 *Erwinia aroideae*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. 등의 세균에서도 발견되었으나⁽¹⁰⁾ 아직까지 효모에서는 알려져 있지 않다. 그러나 효모는 그 균체가 다른 미생물에 비하여 비교적 안전성이 높아 직접적으로도 식품첨가물이나 식이보조제 등으로 많이 활용되고 있는데^(11,12), 이러한 효모들이 다양한 분해효소들을 분비할 경우 식품분야에서 품질향상 또는 공정개선 등을 위하여 그 활용성은 더욱 증가할 것이다.

우리는 토양에서 분리하여 보관중인 *Cryptococcus laurentii* Y-23에서 서로 다른 다당류성 유도기질인 pectin과 starch에 의해 아주 흥미로운 glucoamylase⁽¹³⁾와 exo-PGase⁽¹⁴⁾의 분비특성을 관찰하였다. 향후 이 효

Corresponding author : Choon-Bal Yu, Department of Food Science and Engineering, College of Engineering, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea
Tel : 82-53-850-6533
Fax : 82-53-850-6539
Email : cbyu@taegu.ac.kr

모는 곡류를 사용하는 알콜발효에 활용할 경우 원료로부터 유래한 펙틴질과 미분해성 전분을 동시에 분해함으로써 청징화, 감미 및 알콜수율의 증가도 기대할 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구에서는 여러 식품산업에서 유용하게 응용할 수 있는 이 효소들의 생산과 함께 생리학적 측면에서 두 효소의 유도에 대한 기초자료를 얻고자 발효조에 배양하면서 유도기질 등에 의한 영향 등을 분석하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용된 균주는 토양에서 분리되어 실험실에 보관중인 효모 *Cryptococcus laurentii* Y-23⁽¹⁴⁾을 사용하였다.

배지

종배양에 사용된 배지는 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose 조성의 YPD 배지⁽¹⁵⁾이며, 본배양에 사용된 배지는 1% soluble starch, 1% pectin, 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate, 1 mM MnCl₂의 조성으로 필요에 따라 각 성분을 적절히 첨삭하여 사용하였다.

배양

종배양은 5 mL의 YPD 배지를 시험관에 넣고 냉장 보관중인 균체 1백균이를 접종하여 배양하였고, 본배양은 50 mL의 배지를 250 mL 삼각플라스크에 넣어 30°C에서 72시간 동안 진탕배양하거나 또는 1L의 배지를 2L mini-jar fermenter에 넣고 본배양 배지량의 1%에 상응하는 종배양액을 접종하여 30°C에서 5일간 배양하였다.

균체량의 측정

균체량은 건조균체량으로 측정하였다⁽¹⁶⁾. 10 mL의 배양액을 Whatman No. 2의 여과지로 여과한 다음

mL의 0.85% 생리식염수로 3회 세척하고 105°C에서 항량을 측정하였다.

Glucoamylase와 exo-PGase의 활성측정

배양액을 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였고, glucoamylase와 exo-PGase의 활성은 모두 다당류에서 유리되는 환원성 단당류를 dinitrosalicylic acid(DNS)⁽¹⁷⁾로 발색반응시켜 정량하였다. 효소활성 측정은 먼저 기질용액 0.45 mL에 조효소액 0.05 mL를 첨가하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 이때 기질용액은 0.2 M McIlbein 완충액⁽¹⁸⁾에 glucoamylase의 활성측정을 위하여 1% soluble starch(pH 5)를 첨가하거나 또는 exo-PGase의 활성측정을 위하여 1% polygalacturonic acid(pH 4.5)를 첨가하여 조제하였다. 효소반응이 끝난 후 0.5 mL의 DNS 용액을 반응액에 첨가하여 효소반응을 정지시키고, 100°C에서 10분간 끓여 발색반응시킨 다음 반응액을 증류수로 3-5배 희석하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucoamylase와 exo-PGase의 활성은 상기의 반응 조건에서 1분 동안 각기 1μmol의 glucose 또는 galacturonic acid를 생산하는 효소의 양(unit)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Glucoamylase와 exo-PGase의 확인

0.2% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄, 1 mM MnCl₂ 조성의 1%의 soluble starch를 첨가한 SYM 배지와 pectin을 첨가한 PYM 배지 200 mL를 각각 1L 삼각플라스크에 넣고 효모를 접종하여 30°C에서 배양하면서 배양 48시간과 72시간경에 glucoamylase와 exo-PGase의 활성을 측정하였다(Table 1). 그 결과, soluble starch를 함유한 SYM 배지에서는 72시간 배양시 61.8 unit의 높은 glucoamylase 활성만이 검출된 반면에 exo-PGase는 0.2 unit으로 거의 활성이 검출되지 않았다. 한편 pectin을 함유한 PYM 배지에서는 18.3 unit의 exo-

Table 1. Activities of glucoamylase and exopolysaccharuronase induced by two substrates

Media	Culture Time	Final pH	Cell Growth (mg/ml)	Glucoamylase (Unit/ml)	Exopolysaccharuronase (Unit/ml)
S	48 h	5.2	45.3	47.3	3.1
	72 h	5.8	50.1	61.8	0.2
P	48 h	6.4	35.2	39.5	15.6
	72 h	6.6	38.8	48.1	18.3

S medium was composed of 1% soluble starch, 0.2% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄ and 1 mM MnCl₂, and P medium was composed of 1% pectin, 0.2% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄ and 1 mM MnCl₂.

Table 2. Effect of carbon sources on co-production of glucoamylase and exopolygalacturonase

Carbon Sources (1%)	Final pH	Cell Growth (mg/ml)	Glucoamylase		Exopolygalacturonase	
			Activity ¹	SP ²	Activity ¹	SP ²
None	6.8	7.9	17.8	2.25	0	0
Glucose	3.2	29.7	0	0	0.1	0
Galactose	3.2	41.8	0.8	0.02	3.5	0.08
Mannose	3.2	23.1	0	0	6.4	0.28
Fructose	3.0	26.1	0	0	0	0
Ribose	6.3	19.2	4.1	0.22	0	0
Arabinose	6.3	13.7	0	0	4.8	0.35
Xylose	3.2	26.4	0.2	0.01	0	0
Maltose	3.2	40.1	8.8	0.22	0	0
Sucrose	3.2	20.4	17.3	0.85	0	0
Dextrin	4.0	43.4	76.7	1.76	0	0
Starch	4.0	46.3	72.3	1.56	0	0
Pectic acid	3.6	38.6	0	0	7.3	0.19
Pectin	6.9	34.7	57.3	1.65	21.5	0.62

Activity¹: unit per ml of culture; SP²: Specific productivity, unit per mg of cells. The basal medium was composed of 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate and 1 mM MnCl₂.

PGase 활성과 48.1 unit의 높은 glucoamylase의 활성이 검출되었다. 따라서 glucose의 α -1,4 결합과 α -1,6 결합의 중합체인 starch는 glucoamylase의 생산만을 유도하였지만, starch와는 구성당류 및 입체적 구조가 다르며 필수적으로 galacturonic acid의 α -1,4 결합의 중합체를 포함하는 pectin은 exo-PGase뿐만 아니라 glucoamylase의 생산을 함께 유도하는 것으로 나타났다.

당류에 의한 영향

상기의 결과에 따라 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate, 1 mM MnCl₂ 조성의 기본배지에 본 효소가 동화⁽¹⁴⁾할 수 있는 여러 가지 당류들을 첨가하여 glucoamylase와 exo-PGase의 생산성을 조사하였다(Table 2). 먼저 glucoamylase의 생산성을 살펴 볼 때, glucose는 효소생산을 전혀 유도하지 못하였으나, maltose는 약간의 효소생산을 유도하였고, soluble starch와 dextrin은 높은 생산성을 보임에 따라 두 효소의 생산에는 유도기질의 분자량과 상관성이 있는 것으로 보여진다. 그러나 기본배지에 아무 것도 첨가하지 않은 대조구뿐만 아니라 sucrose 또는 pectin을 첨가할 때에도 비교적 높은 활성이 관찰된 것은 상당히 흥미로운 사실로 보여진다. Exo-PGase의 생산성을 살펴 볼 때, 단당류 중에서는 galactose, mannose, arabinose 등에 의해서도 약간 생산되었고, 다당류의 pectin에 의해서 가장 높은 생산성을 보였으며, 특히 pectin의 효소분해산물에 해당하는 pectic acid에 의해서도 생산이 확인된 점은 Kimura와 Mizushima의 보고⁽¹⁹⁾와 일치하였다.

따라서 두 효소의 생산에는 다당류성 기질들이 모두 가장 효과적이었으나, soluble starch와 dextrin은

glucoamylase만을 유도한 반면에 pectin은 exo-PGase뿐만 아니라 glucoamylase의 생산도 함께 유도하였다. 그리고 glucoamylase가 starch의 분해산물인 glucose에 의해 생산되지 않은 것에 비하여 exo-PGase는 pectin의 분해산물인 pectic acid에 의해서도 생산되었고, 또한 배지에 당을 첨가하지 않은 대조구에서는 glucoamylase의 활성만이 관찰됨에 따라 이 두 효소들의 합성은 상당히 복잡하게 조절되어지는 것으로 추정된다.

Starch와 Pectin의 단독첨가에 의한 영향

효소생산이 유도기질에 의하여 많은 영향을 받음에 따라 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate, 1 mM MnCl₂ 조성의 기본배지에 1% soluble starch를 첨가한 SYM 배지와 1% pectin을 첨가한 PYM 배지를 각각 1.5 L씩 jar-fermenter에 넣고 5일간 배양하면서 여러 생리학적 특성들을 관찰하였다.

Fig. 1은 상기의 기본배지에 효소 유도기질로써 soluble starch만 첨가한 SYM배지에서 배양한 결과로서 균체량은 배양 12시간경부터 급격히 증가하여 36 시간경에 정상기에 도달하였다. pH는 대수기 직전부터 대수기 중기(24시간경)까지 급속히 감소하다가 다시 완만하게 증가하는 경향을 보였는데, 이때 대수기 직전부터 일어난 급격한 pH 감소는 균체들이 증식할 때 요구되는 상당량의 질소원으로 배지의 ammonium sulfate중의 ammonia기가 이용됨에 따라 상대적으로 잔류하던 sulfate기에 의하여 감소되는 것으로 생각된다. Glucoamylase의 활성은 대수기 중기 이후부터 급격히 증가하여 72-84시간경에 조효소 1 mL당 80.9-81.8 unit으로 최고치를 보였으나, 5일간의 배양기간중 exo-PGase

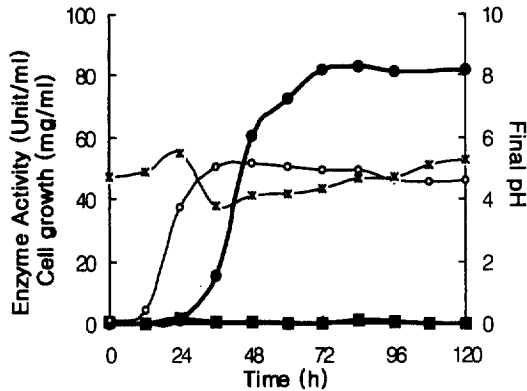


Fig. 1. Effect of soluble starch on the enzyme production.

The yeast was cultured in a Jar-fermenter with 1.5 liter of SYM medium, which was composed of 1% soluble starch, 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate and 1 mM MnCl₂. Glucoamylase -●-; Exopolygalacturonase -■-; Cell growth -*; Final pH -○-.

활성은 전혀 나타나지 않았다. 대수기 말기인 배양 36 시간경의 glucoamylase의 비활성은 균체량 1 mg당 0.31 unit이었으나, 정상기 초기인 48시간경에 1.17 unit, 그리고 72시간경에는 1.66 unit로 나타나 대수기 이후의 세포중식율이 정지된 이후 효소량이 증가하는 것으로 나타났다.

Fig. 2는 기본배지에 pectin만을 첨가한 PYM배지에서 배양한 결과로서 균체량은 배양 12시간경부터 급격히 증가하여 soluble starch를 첨가할 때와 달리 24 시간경에 정상기에 도달하였고 균체량도 비교적 낮았으며, 또한 배양액의 pH 변화가 Fig. 1과 유사한 경향이었으나 대수기 말기 무렵의 pH 감소폭은 Fig. 1보다 적었다. 효소생성성을 살펴 볼 때, glucoamylase의 활성은 대수기 초기인 12시간경부터 급격히 증가하다가 36시간경(44.7 unit/mL)부터 72시간경(55.7 unit/mL) 이후에는 뚜렷한 증가가 없었으나, exo-PGase의 활성은 glucoamylase와 달리 정상기부터 나타나 배양시간이 경과함에 따라 계속적으로 완만하게 증가하는 경향을 보였다.

따라서 Fig. 1과 2의 결과로 볼 때 이미 Table 2에서 부분적으로 언급한 바 있듯이 soluble starch를 첨가할 경우 5일간의 배양 전기간을 통하여 exo-PGase의 생산을 전혀 유도하지 못하였으나, pectin을 첨가할 경우 균이 정상기에 이르러 exo-PGase를 생산하는 것만 아니라 그보다 더 빠른 대수기 초기에 이미 또 다른 효소인 glucoamylase를 다량 생산하는 것으로 확인되었다.

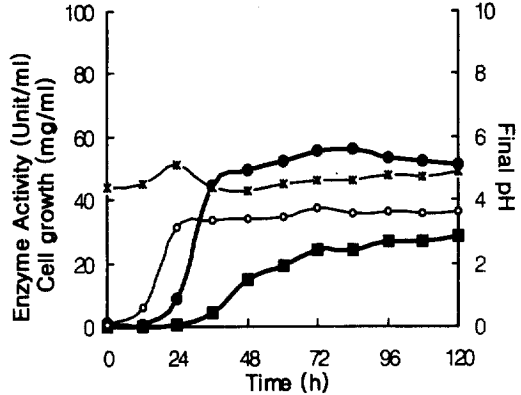


Fig. 2. Effect of pectin on enzyme production.

The yeast was cultured in a Jar-fermenter with 1.5 liter of PYM medium, which was composed of 1% pectin, 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate and 1 mM MnCl₂. Glucoamylase -●-; Exopolygalacturonase -■-; Cell growth -*; Final pH -○-.

Starch 및 Pectin의 혼합첨가와 Ammonium sulfate에 의한 영향

두 효소의 유도기질인 starch와 pectin의 동시첨가 및 ammonium sulfate의 유무에 따른 영향을 조사하기 위하여 1% soluble starch, 1% pectin, 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate, 1 mM MnCl₂ 조성의 배지와 여기에 0.5% ammonium sulfate를 제거한 배지에서 5일간 배양하면서 여러 생리학적 특성들을 비교하였다.

Fig. 3은 효소 유도기질로써 soluble starch와 pectin을 첨가하여 배양한 결과이다. 균체량은 배양후 36시간까지 급격히 증가하다가 약간 감소후 다시 증가하는 역-sigmoid형의 곡선을 취하였으며, 배양액의 pH는 배양 전기간을 통하여 앞의 다른 배양 때보다 훨씬 낮은 상태를 유지하였다. Glucoamylase의 활성은 배양 12시간경부터 증가하여 36시간경(54.5 unit/ml)에는 이미 높은 수준에 달하였으나 그 후 뚜렷한 증가는 보이지 않았다. 그러나 exo-PGase는 108시간(38.4 unit/mL)까지 계속 증가하였고, 그 활성에 있어서도 pectin만을 첨가한 결과(Fig. 2)보다 높은 생산성을 보였는데, 이러한 원인이 단순히 균체량의 증가 때문인지는 더 조사해 볼 필요성이 있을 것으로 생각된다.

Fig. 4는 ammonium sulfate를 첨가하지 않은 조건으로 배양한 결과이다. 균체량은 배양 36시간경 이후에 약간 감소하였다가 증가하므로써 Fig. 3의 결과와 동일한 경향을 보였으나, Fig. 3의 결과보다 균체량은 낮았다. 배양액의 pH는 대수기 초기부터 균체량의 증가

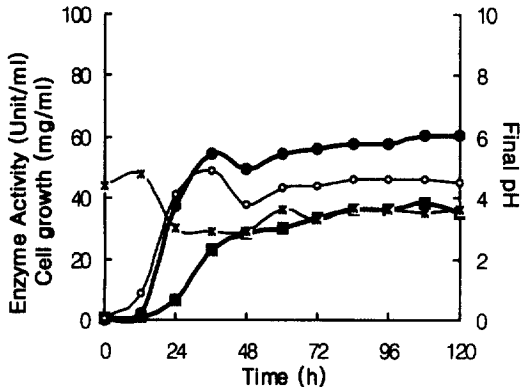


Fig. 3. Effect of mixed inducible substrates on enzyme production.

The yeast was cultured in a Jar-fermenter with 1.5 liter of medium, which was composed of 1% soluble starch, 1% pectin, 0.3% yeast extract, and 1 mM MnCl₂, and 0.5% ammonium sulfate. Glucoamylase -●-; Exopolygalacturonase -■-; Cell growth -*; Final pH -○-.

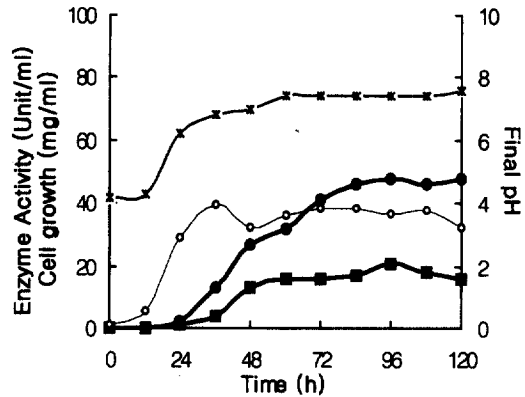


Fig. 4. Effect of mixed inducible substrates on enzyme production.

The yeast was cultured in a Jar-fermenter with 1.5 liter of medium, which was composed of 1% soluble starch, 1% pectin, 0.3% yeast extract, and 1 mM MnCl₂. Glucoamylase -●-; Exopolygalacturonase -■-; Cell growth -*; Final pH -○-.

와 함께 계속적으로 증가하여 정상기 이후에는 pH 6.8-7.6의 높은 수준을 유지하였다. Fig. 4의 결과를 앞의 Fig. 1-3의 결과와 비교하여 볼 때 배지내의 ammonium sulfate는 배양액의 pH 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. Glucoamylase의 활성은 배양 96시간경 (48 unit/mL)까지 계속 증가하는 경향을 보인 반면에 exo-PGase는 배양 48시간 이후에는 뚜렷하게 증가하지 않았고 두 효소의 생산성도 아주 낮았다.

결과적으로 Fig. 4와 같이 배지에 ammonium sulfate가 첨가되지 않을 경우 Fig. 3의 결과와 달리 배양액의 pH는 계속 증가하는 경향을 보였고, 유⁽¹⁴⁾는 Y-23의 exo-PGase의 생산이 pH 4 이외의 영역에서 현저히 감소한다고 하였는데, Fig. 4에서 exo-PGase의 생산성 감소도 ammonium sulfate의 부재에 따른 배양 pH의 증가, 이로 인한 효소의 최적생산 조건 변경, 그리고

더불어 질소원도 부족했기 때문일 것으로 생각된다. 또한 전체적인 경향을 볼 때 glucoamylase의 생산성은 배지에 starch만을 사용할 때 가장 높은 것으로 나타났으며, exo-PGase의 생산성은 starch와 pectin을 함께 첨가할 때 가장 높은 것으로 나타났다.

무기염에 의한 영향

두 효소의 생산에 관계하는 무기염을 조사하기 위하여 1% soluble starch, 1% pectin, 0.3% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate, 1 mM MnCl₂ 조성의 기본배지에 여러가지 무기염을 첨가하여 두 효소의 생산성을 비교하였다(Table 3). 효소의 생산에 가장 효과적인 무기염은 Mn²⁺으로 glucoamylase와 exo-PGase의 생산성을 대조구에 비하여 각각 21%와 18% 증가시켰고, Ca²⁺은 각각 10%와 11% 증가시켰으나, 그

Table 3. Effect of mineral salts on co-production of glucoamylase and exopolygalacturonase

Mineral Salts (1 mM)	Final pH	Cell Growth (mg/ml)	Glucoamylase		Exopolygalacturonase	
			Activity ¹	SP ²	Activity ¹	SP ²
None	3.9	38.5	46.7	1.21	26.1	0.63
Na ⁺	4.2	41.2	47.3	1.15	27.8	0.61
Ca ²⁺	4.1	42.9	51.4	1.20	29.1	0.68
Fe ²⁺	3.4	34.7	41.5	1.19	23.5	0.61
Mg ²⁺	3.8	42.6	52.7	1.24	24.3	0.52
Mn ²⁺	3.8	45.1	56.4	1.25	30.9	0.68
Zn ²⁺	3.7	39.4	48.1	1.22	25.8	0.65

Activity¹: unit per ml of culture; SP²: Specific productivity, unit per mg of cells. Each mineral salt as chloride was added into the basal medium, which was composed of 1% soluble starch, 1% pectin, 0.3% yeast extract and 0.5% ammonium sulfate.

박의 무기염은 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 두 효소의 생산성을 증가시킨 Mn^{2+} 은 이미 각각 정제된 glucoamylase⁽¹³⁾와 exo-PGase⁽¹⁴⁾의 활성을 증가시킨 바 있고, Table 3의 결과에서도 효소 비생산성의 뚜렷한 증가가 없는 것으로 보아 배양액내에 존재하는 Mn^{2+} 은 세포내에서 효소의 생합성능을 증가시켰다기 보다 단순히 각 효소들의 활성을 증가시키는 촉진제(activator)로서 역할을 한 것으로 추정된다.

요 약

Cryptococcus laurentii Y-23의 glucoamylase와 exopolysaccharonase(exo-PGase)의 생산에서 당류성 유도기질들과 무기염들이 미치는 영향을 조사하였다. 당류들에 의한 영향을 조사한 결과, soluble starch와 dextrin은 높은 glucoamylase의 생산만을 유도하였으나 pectin은 exo-PGase와 glucoamylase의 생산을 함께 유도하였으며, glucose는 glucoamylase의 생산을 유도하지 못하였으나 pectic acid는 약간의 exo-PGase의 생산을 유도하였다. 발효조에서 5일간 배양하면서 유도기질들에 의한 효소생산성 등을 조사한 결과, 균은 대략 배양 12시간경부터 대수기가 시작되어 대부분 36시간경에 정상기에 도달하였다. Glucoamylase의 생산성은 배지에 soluble starch만 첨가하였을 때 배양 72-86 시간경에 가장 높았고, exo-PGase의 생산성은 pectin만 첨가하는 것 보다 pectin과 soluble starch를 동시첨가하였을 때 더 높았으며, 또한 배지에 ammonium sulfate가 존재하지 않을 경우 배양 pH가 계속 증가되어 두 효소의 생산성이 현저히 감소하였다. 무기염에 의한 영향을 조사한 결과, Mn^{2+} 은 무첨가 대조구에 비하여 glucoamylase와 exo-PGase의 생산성을 각각 21%와 18%씩 증가시켰다.

문 헌

- Berry, D.R. and Paterson, A. Enzymes in the food industry, pp. 307-326. In: Enzyme Chemistry; Impact and application. C.J. Suckling. (ed.), Chapman and Hall, London (1990)
- Ueda, S. and Saha, B.C. Behaviour of *Endomycopsis fibuligera* glucoamylase towards raw starch. *Enz. Microbiol. Technol.* 5: 196-198 (1983)
- Sills, A.M., Zygora, P.S.J. and Stewart, G.G. Characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased productivity of amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 124-128 (1984)
- Oh, S.H., Kwon, H.J. and O, P.S. Screening of a potent, raw naked barley saccharifying enzyme producer and its application on the uncooked alcohol fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15: 408-413 (1987)
- Neukom, H. ber den Abbau von Pektinstoffen. *Schweiz Landwirt Forsch.* 2: 112-117 (1963)
- Rombouts, F.M. and Pilnik, W. Research on pectic depolymerase in the sixties, *CRC. Critical Review in Food Tech.* 3: 1-5 (1972)
- Kreger-van Rij, N.J.W. Genus 24. *Saccharomycopsis Schönning.* 3rd ed, pp. 399-406. In: The yeast; a taxonomic study, Kreger-van Rij N.J.W. (ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1984)
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and identification.* 2nd ed., p. 354. Cambridge University, Cambridge (1983)
- Vihinen, M. and Mäntsälä, P. Microbial amyolytic enzymes. Vol. 24, Issue 4, pp. 329-418. In: Critical reviews in biochemistry and molecular biology. CRC Press, London (1989)
- Hatanaka, C. and Imamura, T. Production of an exopolysaccharonase liberating digalacturonic acid by a *Pseudomonas*. *Agr. Biol. Chem.* 38: 2267-2268 (1974)
- Ogden, K. and Tubb, R.S. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* which grows efficiently on starch. *Enz. Microb. Technol.* 7: 220-224 (1985)
- Grassin, C. and Fanquembergue, P. Application of pectinases in beverages. pp. 453-462. In: Progress in Biotechnology 14: Pectins and pectinases. J. Visser and A.G.J. Voragen. (ed.), Elsevier, Amsterdam (1992)
- Unpublished data.
- Yu, C.B. Purification and properties of the exopolysaccharonase produced by *Cryptococcus laurentii*. Ph.D. Thesis, Kyungpook Natinal Univ., Taegu, Korea (1990)
- Walt, J.P. van der and Yarrow, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. 3rd ed., p. 51. In: The yeast: a taxonomic study, Kreger-van Rij N.J.W. (ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1984)
- Kim, C.H., Lee, T.H., Yu, C.B., and Jin, I.Y. Isolation, identification and production of a yeast producing an extracellular proteinase. *Korean J. of Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 316-320 (1996)
- Bernfeld, P. Amylase; alpha and beta. Vol. 1, pp. 149-158. In: Methods in Enzymology, Colowick S.P. and Kaplan N.O. (ed.), Academic Press, New York (1955)
- Gomori, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. Vol. 1, p. 141. In: Methods in Enzymology, Colowick S.P. and Kaplan N.O. (ed.), Academic Press, New York (1955)
- Kimura, H. and Mizushima, S. Induction of pectinase in *Acrocyndrium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 20: 33-45 (1974)

(1999년 11월 10일 접수)