한국식물병리학회지 10(3) : 215-221(1994)
Korean J. Plant Pathol. 10(3) : 215-221(1994)

잿빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*가 분비하는 Polygalacturonase의 부분정제와 특성

나유진 · 김재원 · 정영륜* · 허남응 · 조광연[1]
경상대학교 자연과학대학 미생물학과, [1]한국화학연구소 스크리닝 안전성센터

Partial Purification and Properties of Polygalacturonase Produced by *Botrytis cinerea*

Yoo Jin La, Jae Won Kim, Young Ryun Chung*, Nam Eung Huh and Kwang Yun Cho[1]
Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
[1]Screening & Toxicology Center,
Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-343, Korea

ABSTRACT : Polygalacturonase (PG) produced by *Botrytis cinerea* in the culture broth containing citrus pectin as a carbon source was partially purified and characterized. PG was produced on a range of carbon sources such as starch, glycerol, cellobiose, and Na^+-PGA with total activities of 34.8, 32.0, 29.2, 27.8 units, respectively. The specific activity was highest with 2316.7 units on Na^+-PGA. Proteins of culture filtrate were concentrated with polyethylene glycol and acetone and applied to a hydroxyapatite column. Among three active fractions collected from the column, the fraction containing the highest PG activity was resolved by a Q-sepharose column. The active fraction from the Q-sepharose column was further purified by HPLC Mono Q column. The partially purified enzyme was analyzed by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Among a few protein bands revealed, the amount of the protein of which molecular weight estimated to be 43 kDa coincided with the PG activity. The partially purified PG had optimal temperatures between 35~55℃ and pH between 4.5~5.5.

***Key words* : Polygalacturonase, partial purification, *Botrytis cinerea*.**

*Botrytis cinerea*에 의해 발병되는 잿빛곰팡이병은 딸기, 토마토, 오이 등 과채류, snap bean, chickpea 등 콩과 식물과 거베라 등 여러 가지 화훼식물에 발생되는 다범성 병으로, 작물의 생육기간 뿐만 아니라 이들의 저장 중에도 발생하여 많은 피해를 주는 세계적으로 중요한 병이다. 특히 이 병원균은 딸기, 토마토, 귤, 배, 사과의 수분이 많은 과육에 쉽게 침입하여 병을 일으키므로 운송, 저장중에 더욱 큰 피해를 준다. 이외에도 작물의 유묘, 잎, 줄기 등을 침입하는데 주로 습도가 높고 서늘한 기온(10~20℃)에서 발병이 심한 것으로 알려져 있다(1, 7). 우리나라에서도 딸기 및 토마토의 비닐하우스 재배시 가장 문제가 되는 병으로 이 병에 의한 생산손실이 많아 큰 문제가 되고 있다(5).

*B. cinerea*는 기주식물의 침입시 식물세포벽의 주요 구성분인 pectin질을 분해하는 pectinase를 분비하는 것으로 알려져 있다(1, 7). 일반적으로 식물 세포벽은 cellulose, hemicellulose, pectin, ligin 등으로 구성되어 있는데, 식물체의 부위, 나이에 따라 성분비율에 차이가 있다. 이 중에서도 pectin질은 세포의 middle lamella, 1차 세포벽의 중요한 구성분으로서 세포의 유지에 필수적인 역할을 한다. Pectin질은 galacturonic acid의 polymer로 이루어진 다당류를 일컫는 것으로 크게 pectic acid, pectin, protopectin 등의 3종류로 나누어 지는데, pectic acid는 D-galacturonic acid가 α-1,4-glycosidic bond로 연결되어 있으며 pectin은 pectic acid의 carboxyl기 일부가 methyl-ester화 되어 있고, protopectin은 식물의 조직속에 들어 있는 불용성 pectic 성분이다(3, 15).

Pectin질을 분해하는 효소로는 pectin의 methoxyl group을 제거하는 pectinesterase, protopectin을 분해하여 가용성 pectin을 생성하는 protopectinase, pe-

*Corresponidng author.

ctin depolymerizing 효소로 가수분해 반응에 의하여 poly(methyl)galacturonic acid chain을 분해하는 poly (methyl)galacturonase(PG, PMG), 그리고 transelimination에 의한 poly(methyl)galacturonate lyase (PGL, PMGL) 등을 들 수 있다(15). 몇 가지 중요한 진균의 PGL, PG에 대한 연구는 구성 아미노산의 서열분석, 유전자상의 특성에 대하여도 연구가 이루어 졌으나 식물병원성 진균의 pectin질 분해효소에 관해서는 병원성발현에 있어 중요하게 생각되는 데도 불구하고 연구가 많지 않다. 그러나, 최근에 들어서야 *Sclerotinia sclerotiorum*, *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum* 등의 pectin질 분해효소에 관한 몇 연구결과가 보고되었다(8, 10, 12, 16). 그 중에서도 PG에 대한 연구로 *F. oxysporum*에서 endo-PG와 exo-PG가 순수분리되어 각각 분자량이 44 kDa과 76 KDa으로 밝혀졌으며, 최적활성 pH는 모두 4.5인 것으로 보고되었고 *S. sclerotiorum*이 생산하는 exo-PG로서 분자량이 68 kDa과 140 kDa인 것과 endo-PG로 분자량 40 kDa인 효소가 각각 보고된 바 있다(13, 18).

본 연구에서는 *B. cinerea*의 중요 발병 기작으로 생각되는 pectin질 분해효소 중 polygalacturonase를 부분 정제하였으며 이를 이용하여 몇 가지 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 효소생산. 병원균은 이병된 오이에서 분리된 *B. cinerea* KC-1을 한국화학연구소에서 분양받아 Potato Dextrose Agar(PDA)에서 계대배양하여 사용하였으며, 효소생산을 위한 액체배지는 citrus pectin(Sigma) 0.5 g, $NaNO_3$ 1 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $CaCl_2$ 0.1 g, Yeast extract 0.05 g을 증류수 1 l에 첨가하여 준비하였다. 균배양은 위의 액체 배지 500 ml를 2 l 삼각플라스크에 넣고 살균 후 PDA배지에서 5일 동안 배양한 *B. cinerea* 균사 disc(직경 5 mm) 40개를 접종하여 20℃에서 12일간 진탕배양 하였고 배양액을 filter paper로 걸러서 균사체를 제거한 후 효소의 정제에 이용하였다.

효소활성 측정 및 단백질 정량. Polygalacturonase를 측정하기 위하여 기질로 Na^+-polygalacturonic acid(0.5%, w/v)를 사용하였으며, 0.1 M sodium acetate(NaOAc) 완충용액(pH 5)에 잘 섞어서 용해시킨뒤 반응전에 40℃ 수조에서 5분간 처리한 후 조효소 용액을 첨가하여 40℃에서 20분간 반응시켰다. 이때 전체 반응액은 기질용액 1.9 ml에 조효소액 0.1 ml를 첨가하여 2 ml로 조절하였으며, 대조구로는 30분간 끓인 조효소 용액을 첨가한 것과 효소반응 정지 직전에 조효소용액을 첨가하여 처리한 것을 사용하였다. 반응이 끝난 후 준비된 DNS용액(3,5-dinitrosalicylic acid 5.3 g, NaOH 9.9 g, Rochelle salt: potassium sodium tartrate 153 g, phenol 3.8 ml, $Na_2S_2O_5$ 4.15 g, distilled water 708 ml) 5 ml를 첨가하여 끓는 물에서 10분간 방치한 후 상온에서 식힌 다음 이를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 D-galacturonic acid(50, 100, 150, 200, 250, 300 μg)를 표준물질로 하여 얻은 곡선으로 결정하였다. 효소 unit의 정의는 위의 반응 조건에서 1분 동안 1 μmole의 galacturonic acid를 생성하는 효소량을 1 unit(U)로 하였다. 단백질량의 측정은 Bradford 방법(4)에 의하여 Bio-rad사 시약을 지시한 방법대로 사용 정량하였고 표준곡선은 bovine serum albumin(5, 10, 15, 20, 25, 30 μg)을 사용하여 준비하였다.

탄소원별 효소생산. 탄소원을 달리하였을때 생성되는 효소의 양을 측정하기 위해서 상기의 배지에서 citrus pectin 대신 glucose, sodium polygalacturonic acid(Na^+-PGA), starch, sucrose, galactose, maltose, sorbitol, carboxy methyl cellulose(CMC), cellobiose, glycerol을 0.5%(w/v) 첨가하고 균을 배양한 후 위에서와 같은 방법으로 효소생산량을 측정하였다. 균사 생장량은 여과지로 배양액을 걸른 뒤 균사를 말린 후 무게를 측정하였다.

효소의 부분정제. Pectin을 함유한 배지에서 12일간 배양한 균배양여액을 dialysis tubes에 넣고 polyethylene glycol(PEG) 분말을 이용하여 농축하였다. 이 농축된 조효소액을 다시 10 mM NaOAc 완충용액(pH 5.0)으로 투석한 후 acetone을 첨가하여 농도가 20%되게 하였다. Acetone처리 후 얼음에서 30분간 정치시킨후 10,000 g에서 30분간 원심분리하였고 상등액을 회수한 후 다시 acetone을 가하여 60%가 되도록 하여 얼음에서 30분간 정치 후 재차 원심분리하였다. 생성된 침전물을 0.1 M NaOAc 완충용액(pH 5.0)에 녹여서 $CaCl_2$가 1 mM이 되도록 첨가한 후 재차 원심분리 하였다. 생성된 침전물을 0.1 M NaOAc 완충용액(pH 5.0)에 녹여서 $CaCl_2$가 1 mM이 되도록 첨가한 후 0.3 mM $CaCl_2$와 1 mM $MgCl_2$를 포함하는 10 mM phosphate buffer(pH 3.0)로 평형화한 hydroxyapatite column에 주입하였다. 단백질을 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$를 포함하는 350 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 phosphate의 농도구배를 주면서 용출하였고, hydroxyapatite column에서 분리한 효소 활성분획을 centri-prep으로 농축하여 10

mM Na^+-phosphate 완충용액(pH 6.4)으로 평형화한 Q-sepharose column에 주입하고 1 M NaCl을 포함한 같은 완충용액으로 농도구배를 주면서 단백질을 용출하였다. 효소 활성분획만을 Centricon(Amicon사)으로 농축하고 10 mM Na^+-phosphate 완충용액(pH 4.5)으로 평형화한 Mono Q FPLC column에 주입하였고 1 M NaCl을 포함한 같은 완충용액으로 농도를 높여주면서 단백질을 용출하였다. 효소의 정제는 4℃ 저온실에서 수행하였다.

Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE). 단백질의 분리정도를 확인하기위해 Laemmli 방법(9)에 따라 10% SDS-PAGE를 하였다. 이때 표준단백질로서 rabbit muscle phosphorylase b(MW 94 kDa), bovine serum albumin (MW 67 kDa), ovalbumin(MW 43 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase(MW 30 kDa), soybean trypsin inhibitor(MW 20 kDa), bovine milk α-lactalbumin(MW 14 kDa)를 사용하였다.

온도와 pH에 따른 효소의 활성조사. 온도가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Q-sepharose column에서 분리된 활성분획을 반응온도를 각각 달리하여 20분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. pH 변화에 따른 효소의 활성은 각 pH 범위의 완충용액을 달리하여 사용하였다. pH 3.0과 5.0 사이에서는 0.1 M citrate완충용액, pH 4.0과 5.0의 범위는 0.1 M acetate 완충용액, pH 6.0과 7.0 범위는 0.1 M Tris-malate 완충용액, pH 7.0과 8.0은 0.1 M phosphate 완충용액, pH 8.0과 8.6은 0.1 M Tris 완충용액을, 그 이상에서는 0.1 M glycine 완충용액을 사용하여 활성을 측정하였다.

결 과

탄소원별 PG 생성량. Glucose 외에 10종의 탄소원을 달리하여 PG 생성량을 조사한 결과 Table 1과 같았다. Total activity는 starch를 첨가하였을 때가 34.8 units로 가장 높았고 다음이 glycerol, Na^+-PGA, CMC, sorbitol, citrus pectin, sucrose 순이었다. Glucose와 maltose를 첨가하였을 때는 균사생장량은 많았으나 효소생산은 4.2 units로 아주 낮았다. Specific activity는 Na^+-PGA를 첨가하였을 때 2,316.7 units /mg으로 가장 높았고, 그 다음으로 citrus pectin과

Table 1. Polygalacturonase activity of culture filtrates of *B. cinerea* grown for 12 days on a range of carbon sources

Carbon source	Total Act. (U)	U/ml	Total Protein (mg)	Sp. Act. (U/mg)	Rel. Sp. Act. (%)	Biomass produced (mg, dry wt.)
Glucose	4.2	0.08	0.066	63.6	2.7	621
Citris Pectin	18.6	1.42	0.031	600.0	25.9	335
Na^+-PGA	27.8	2.36	0.012	2316.7	100.0	333
Starch	34.8	2.96	0.072	483.3	20.9	342
Sucrose	18.1	1.53	0.076	238.2	10.3	463
Galactose	25.0	2.12	0.306	81.7	3.5	368
Maltose	4.2	0.08	0.168	25.0	1.1	358
Sorbitol	25.0	2.12	0.279	89.6	3.9	174
CMC	27.8	2.36	0.170	163.5	7.1	122
Cellobiose	29.2	2.48	0.253	115.4	5.0	357
Glycerol	32.0	2.72	0.177	180.8	7.8	218

Table 2. Purification of polygalacturonase produced by *B. cinerea*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp. activity (U/mg)	Total activity recovery (%)	Purificaion folds
Crude	60	1851.4	30.9	100	1.0
PEG concentration	52	1620.8	31.2	87.5	1.01
60% acetone concent.	15	1073.8	71.6	58.0	2.32
Hydroxyapatite column	4.32	908.7	210.3	49.1	6.82
Q-sepharose column	1.00	766.2	766.2	41.4	24.83
Mono Q column	0.013	46.3	3561.5	2.5	115.32

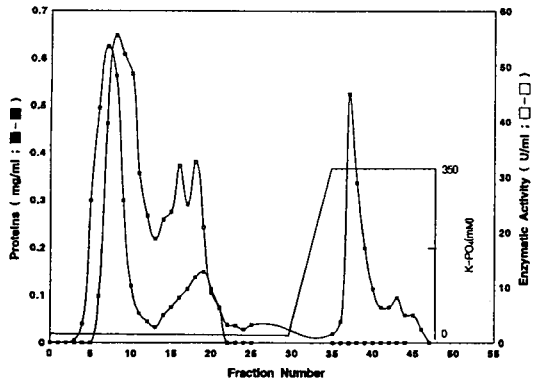

Fig. 1. Chromatography of polygalacturonase produced by *B. cinerea* on hydroxyapatite column. The polygalacturonase activity was determined by measuring the amount of galacturonic acid produced by the enzyme.

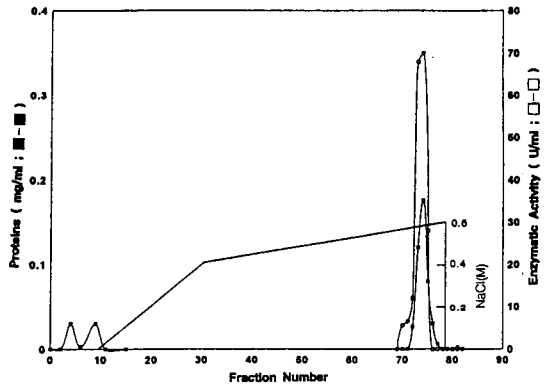

Fig. 3. Chromatography of polygalacturonase produced by *B. cinerea* on Mono Q column. The polygalacturonase activity was determined by measuring the amount of galacturonic acid produced by the enzyme.

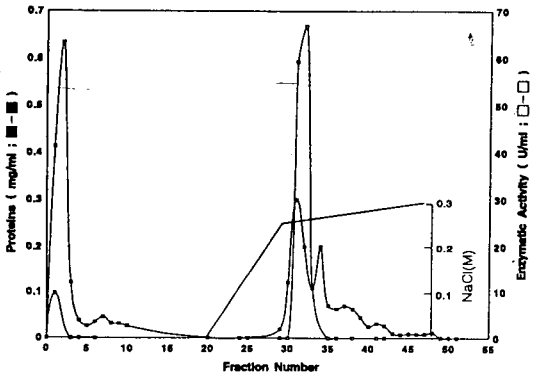

Fig. 2. Chromatography of polygalacturonase produced by *B. cinerea* on Q-sepharose column. The polygalacturonase activity was determined by measuring the amount of galacturonic acid produced by the enzyme.

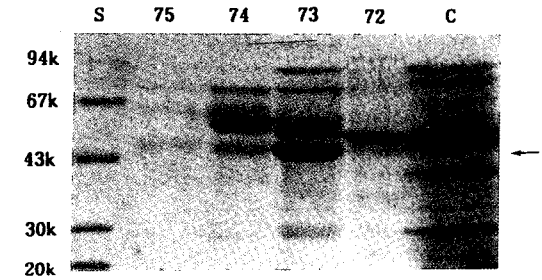

Fig. 4. Analysis of polygalacturonase produced by *B. cinerea* by SDS-PAGE. Fractions obtained from Mono Q column chromatography were used. S: standard molecules, C: active fraction pooled from Q-sepharose column, 72, 73, 74, 75: the number of fractions from Mono Q column. The arrow indicates the band expected to be polygalacturonase.

starch로서 각각 600 units/mg과 483.3 units/mg이었다. Maltose와 glucose의 경우 specific activity도 각각 25 units/mg과 63.6 units/mg으로 Na^+-PGA의 것에 비해 1.1%와 2.7% 밖에 되지 않았다. 그러나, 균사 생장량은 glucose와 sucrose를 탄소원으로 넣었을 때 더 많았다.

PG의 부분정제. 배양여액을 농축하기 위하여 배양여액을 dialysis bag에 넣은 후 역삼투를 하였다. 역삼투에 의해서는 단백질의 회수율이 87.5%로 높았고 이를 효소의 정제에 사용하였다. 조효소 용액의 PEG를 제거하기 위해 냉각된 acetone을 저어주면서 최종 농도가 60%가 되도록 가하여 주었고 이때 침전된 단백질에서 약 58%의 효소활성이 회수 되었으며(Table 2) 이를 hydroxyapatite column에 주입하였다. 효소의 활성은 column을 세척하는 과정에서 회수되었으며, 3개의 peak로 분리되었다(Fig. 1). 그 중에서 가장 활성이 높은 분획만을 모으고 이를 Centri-prep을 이용하여 농축한 결과, 효소의 활성은 대부분 회수되고 hydroxyapatite에 결합된 단백질을 제거할 수 있어 조효소 용액에서 보다 약 6.82배 더 정제되었다(Table 2). 농축한 활성 분획을 다시 Q-sepharose column에 주입하고 세척한 후 NaCl의 농도를 높여 주면서 단백질을 용출하였고, NaCl 0.25 M 농도의 분획에서 효소활성을 회수하였다. Fig. 2에서 보듯이 효소활성은 하나의 peak를 형성하였고 약 24.83배 정제되었다. 효소활성 분획을 취하여 이를 다시 농축하고 HPLC Mono Q column으로 분리하였다. Fig. 3에서와 같이 효소의 활성은 단일 peak를 보였

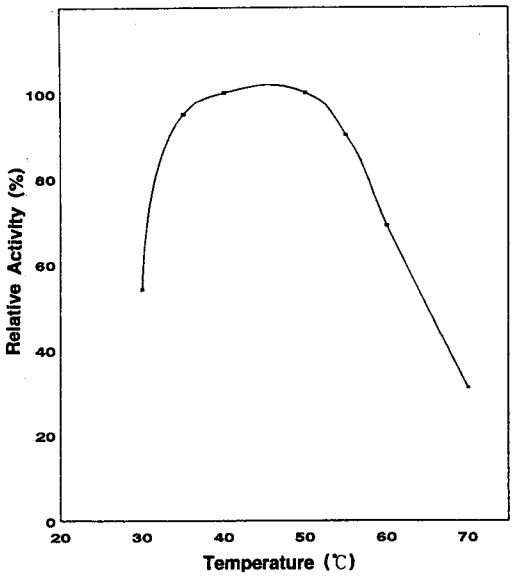

Fig. 5. Effect of temperature on polygalacturonase activity of *B. cinerea*. Partially purified PG from Q-sepharose column was used.

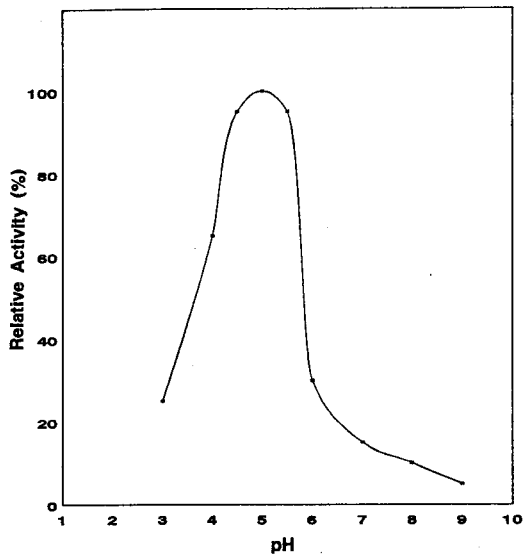

Fig. 6. Effect of pH on polygalacturonase activity of *B. cinerea*. Partially purified PG from Q-sepharose column was used.

으며 처음 조효소 용액에서 보다 약 115배 더 정제되었다. 이때 각 분획을 10% SDS-PAGE로 분석하여 본 결과 72, 73, 74번 분획에서 PG활성과 단백질의 양이 비슷한 양상을 보이는 43 KDa의 band를 확인하였다(Fig. 4). 이상의 정제과정을 Table 2에 나타내었다.

온도와 pH가 PG의 활성에 미치는 영향. 온도가 PG의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 40~50℃에서 최고의 활성을 나타내었으며, 35℃와 55℃에서도 효소의 활성이 최고 활성의 90% 이상을 나타내었다. 60℃ 이상에서는 활성이 감소하기 시작하여 70℃에서는 활성의 70%정도가 감소하였다(Fig. 5). pH가 PG의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 5.0에서 최고의 활성을 보였으며 pH 4.5~5.5 사이에서도 효소의 활성이 90%이상 유지되었으나, pH 6 이상에서는 활성이 급격하게 감소되어 pH 7 이상에서는 최고 활성의 20% 이하였다(Fig. 6).

고 찰

잿빛곰팡이병균 *B. cinera*가 pectin질 분해효소를 분비하여 식물세포벽을 분해한다는 그전의 연구(6, 7, 11)와 같이 본 실험결과 이 병균이 몇 종류의 동위효소로 이루어진 PG를 분비함이 확인되었다. 탄소원별 생성량은 Na^+-PGA를 탄소원으로 하였을때 specific activity가 가장 높았고 그 다음으로 citrus pectin, starch이었는데(Table 1), *Sclerotinia sclerotiorum*을 이용한 실험에서는 citrus pectin을 첨가하였을 때가 Na^+-PGA보다 PG활성이 더 높다고 하였다(14). Mankarios 등에 의한 *B. alli*를 이용한 실험에서는 본 실험과 같은 경향으로 Na^+-PGA가 더 좋은 탄소원이었다(11). 그 외 glucose와 maltose를 첨가하면 균사생장은 많았으나 PG생성량은 거의 없었는데, 이들 물질에 의하여 다른 병원균과 마찬가지로 catabolite repression에 따른 효소생산의 억제로 생각된다(2). 기질에 따라 조금씩 차이는 있지만, Na^+-PGA뿐만 아니라 citrus pectin, starch, cellobiose, glycerol 등에 의해서도 PG가 생성되는 것은 PG 합성의 유도가 Na^+-PGA나 citrus pectin에 의해서만 되는 것이 아니고 다른 물질에 의해서도 가능하며 단지 Na^+-PGA에 대한 PG의 친화력이 다른 것들에 비하여 높다 할 수 있다. Riou 등도 *S. sclerotiorum*의 pectin 분해효소가 CMC, cellobiose 등을 탄소원으로 하였을때 constitutive하게 생산된다고 하였다(13).

병균 배양여액을 농축한 조효소액을 hydroxyapatite column을 이용하여 분리한 결과 PG활성을 보이는 부분이 3개의 peaks로 분리되었는데(Fig. 1), 이것은 PG가 적어도 3개 이상의 동위효소로 존재할 가능성을 시사해 준다. 3개의 peaks 중에서도 가장 활성이 높고 단백질 양이 많은 앞부분을 취하여

Q-Sepharose column을 실시한 결과 PG활성 부분은 Q-Sepharose column에 붙어 있었고(Fig. 2), column에 붙지 않은 앞부분에서도 소량의 PG활성이 나타났었다. 이것은 hydroxyapatite column에서 분리되어진 3 peaks 중 뒷쪽 2 peaks가 pooling시 함께 붙어 나와서 나타난 것으로 이러한 사실이 PG의 동위효소 존재에 대한 간접적인 증거라고 생각된다. Q-Sepharose column실시 후 얻어진 활성부분을 Mono Q column을 통과시켜 다시 활성부분을 분리하여 활성순위와 SDS-PAGE의 단백질 band를 서로 비교하였을 때, 분자량 43 kDa 부분의 band가 분리하고자 하는 단백질인 것으로 추정되나 더 정제를 해야 할 것으로 생각된다. 이상의 순수분리 과정 중 CM-cellulose column, S-sephadex column, Ultrogel AcA 34를 이용한 gel filtration, affinity column으로 green gel, blue gel, heparin agarose column도 시도하였으나 PG를 순수하게 분리할 수 없었다. *B. cinerea*를 pectin 배지에서 12일간 배양하면 pH 3.0 정도가 되는데, 이때 분비된 단백질들이 이온교환 Chromatography시에 비슷한 결합 양상을 보이므로 순수 분리하기 어렵다고 생각된다. 따라서 순수 분리하기 위하여는 Na^+-PGA를 이용한 affinity column을 제조하여 시도하는 것이 가장 바람직하다고 판단되어 이를 수행중에 있다.

조효소 용액을 이용한 최적 온도 조사에서 잿빛곰팡이병균의 PG는 다른 병원균과 유사하게 40~45℃에서 최고활성을 보였다. pH별 활성실험에서 PG는 알칼리성보다는 pH 4~5의 산성에서 더 활성이 높게 나타났는데 Urbanek 등(17)의 결과와 비슷하였으며, 병균 배양시 배지의 pH가 3.0정도의 낮은 곳에서도 계속 활성이 유지되며 안정한 것도 이 사실을 뒷받침한다(미발표 자료). 이 병균의 PG도 기주식물조직의 침입시 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 효소의 순수분리와 여러개 동위효소 중 어느것이 병원성과 직접 관련이 있는가 또는 이들의 복합작용에 의하여 병이 발생되는가 등에 대한 더 자세한 연구가 필요하다.

요 약

잿빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*가 citrus pectin이 첨가된 배양액에서 생성하는 펙틴질 분해효소 중 polygalacturonase(PG)를 부분적으로 정제하고 이 효소의 최적 온도, pH를 조사하였다. 배양액 중의 탄소원을 달리하여 배양하였을 때 효소의 total activity는 starch, glycerol, cellobiose, Na^+-PGA를 첨가하였을 때 각각 34.8, 32.0, 29.2, 27.8 units로 높았고, specific activity는 Na^+-PGA를 첨가한 곳에서 2316.7 units로 가장 높았다. 효소를 정제하기 위하여 PEG와 acetone을 이용하여 조효소 용액을 농축하고 hydroxyapatite, Q-sepharose, Mono Q column에 통과시켜 활성분획을 얻었다. Hydroxyapatite column에서는 활성부분이 3개의 peak로 나타났고 Q-sepharose column에서는 1개의 peak를 형성하였다. 이것을 Mono Q column을 이용하여 다시 분획하여 10% SDS-PAGE를 한 결과 약 43 kDa의 활성 band를 확인하였다. PG의 최적활성 온도는 35~55℃이었고 최적 pH는 4.5~5.5이었다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 과학기술처에서 시행한 선도기술개발사업(G7)과 1994년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-'94-4405)의 일부 지원에 의해 이루어졌습니다.

참고문헌

1. Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology (3rd ed.). Academic Press, Inc., New York, 803 pp.
2. Aguilar, G. and Huitron, C. 1987. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enz. Microb. Technol.* 9 : 690-696.
3. Alexander, M. 1977. Introdution to soil microbiology. John Wiley & Sons, Inc., New York, 467 pp.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
5. 정영륜. 1993. 시설원예 작물의 잿빛곰팡이병 방제용 미생물농약개발. 경상남도 농촌진흥원 위탁연구보고서.
6. Cooper, R. M., Wardman, P. M. and Skelton, J. E. M. 1981. The influence of cell walls from host and non-host plants on the production and activity of polygalactunide-degrading enzymes from fungal pathogens. *Physiol. Plant Pathol.* 18 : 239-255.
7. Jarvis, W. R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Research Branch, Canada Dept. of Agri., Ottawa, 195 pp.
8. Kohn, L. M. 1993. Comparison of pectic enzymes produced by different clones of *Sclerotinia sclerotiorum*. Sixth International Congress of Plant Pathology (Abst.), Montreal, Canada, p. 219.

9. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structual protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
10. Leone, G., Schoffelmeer, E. A. M. and Heuvel, J. V. d. 1990. Purification and characterization of a constitutive polygalacturonase associated with the infection process of French bean leaves by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* 68 : 1921-1930.
11. Mankarios, A. T. and Friend, J. 1980. Polysaccaride-degrading enzymes of *Botrytis allii* and *Sclerotium cepivorum*. Enzyme production in culture and the effect of the enzymes isolated onion cell walls. *Physiol. Plant Pathol.* 17 : 93-104.
12. Pérez Artés, E. and Tera, M. 1990. Purification and characterization of pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37 : 107-124.
13. Riou, C., Freyssinet, G. and Fevre, M. 1991. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Env. Microb.* 57(5) : 1478-1484.
14. Riou, C., Freyssinet, G. and Fevre, M. 1992. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Env. Microb.* 58(2) : 578-583.
15. Sakai, T. 1992. Degradation of pectins. In: *Microbial Degradation of Natural Products*, ed. by G. Winkelmann, pp. 57-81. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
16. Skare, N. H., Paus, F. and Paa, J. 1975. Production of pectinase and cellulase by *Cladosporium cucumerinum* with dissolved carbohydrates and isolated cell walls of cucumber as carbon sources. *Physiol. Plant.* 33 : 229-233.
17. Urbanek, H. and Jadwiga, Z. S. 1975. Polygalacturonase of *Botrytis cinerea* E-200 pers. *Biochem. Biophys. Acta* 377 : 402-409.
18. Waksman, G., Keon, J. P. R. and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochem. Biophy. Acta* 1073 : 43-48.