

Dicyma sp. YCH-370이 생산하는 효모세포벽 용해효소

I. 생산균주의 분리 및 효소의 정제

정희철 · 함병권 · 배동훈¹ · 하세가와 토루² · 유주현*

연세대학교 식품생물공학과 및 생물산업소재연구센터

¹단국대학교 식품공학과 및 연세대학교 생물산업소재연구센터

²일본 대판발효연구소

The Yeast Cell Wall Lytic Enzyme Produced by *Dicyma* sp. YCH-37. I. Isolation of the Strain and Purification of the Enzyme. Hee-Chul Chung, Byoung-Kwon Hahm, Dong-Hoon Bai¹, Toru Hasegawa² and Ju-Hyun Yu*.

Department of Food and Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ¹Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan 330-714 and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ²Institute for Fermentation, Osaka, Japan

— The strain YCH-37, which produces yeast cell wall lytic enzyme, was isolated from soil. From the microscopic observation, morphological and cultural characteristics, this strain was identified to fungus, *Dicyma* sp. So, we named this strain as *Dicyma* sp. YCH-37. The lytic enzyme effectively lysed *Salmonella typhimurium* among intact living bacteria and *Torulopsis*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces* among intact living yeast, as well as autoclaved yeast strains. The yeast cell wall lytic enzyme was successively purified to 204 folds with 13% yields through yeast glucan affinity adsorption and DEAE-cellulose column chromatography. The enzyme was identified to monomeric protein with molecular weight of 25,000 daltons from the results of SDS-PAGE and gel filtration. The optimum pH and temperature for the yeast lytic activity were 8.0 and 50°C, respectively. The enzyme was stable up to 40°C, and between pH 4.0~pH 10.0.

미생물은 다양한 효소 및 생리활성물질을 생산한다. 미생물이 생산하는 효소는 식품 및 의약, 환경보호 분야에서 다양하게 응용되고 있으며, 현재도 이를 이용한 많은 연구가 진행되고 있다.

효모세포벽의 구성성분으로는 mannan, protein, glucan, chitin, lipid 등이 있으며, 이들 성분들의 함량비는 효모의 종류에 따라 약간씩 차이를 보이고 있으나, 대체로 서로간의 polymer network를 형성하여 0.1~0.4 μm의 두께로 단단한 구조를 이루고 있다(1). 맨 바깥층의 mannoprotein층은 안쪽의 glucan층과 phosphate를 매개로 연결되어 있으며, mannoprotein층에는 disulfide 결합도 존재한다(2-4). Glucan은 β-1,3-glucan과 β-1,6-glucan으로 주로 이루어져 있고, mannan은 α-1,2-, α-1,3, α-1,6-mannan으로 구성되어 있으며, protein은 2.1%의 높은 함량비율을 가지는 pseudokeratin형으로 구성되어 있다(1, 4). 빵효모 세포벽중의 glucan과 mannan 함량은 각각 11~12%와 14~15% 정도이며 세포벽이 전체세포건조중량의 30% 가량을 차지한다. 따라서 효모의 세포벽을 분해하기 위해서는 glucanase(5, 6), protease(3, 7), 혹은 phosphomannanase(8) 등을 사용하여야 한다. 효모의 세포벽을 용해시키는 효모세포벽 용해효소생산균에는 *Rhizopus* 속(9), *Arthrobaacter luteus*

(10, 11), *Oerskovia* 속(3, 7), *Basidiomycete* 속(12), *Rhizoctonia* 속(13), *Micromonospora* 속(5), *Corticium* 속(14, 15), *Penicillium* 속(16), Fungi imperfecti(6), *Streptomyces* 속(11), *Bacillus circulans*(11), *Cytophaga* NCIB 9497(17) 등이 있으며 이들로부터 생산되는 효소들은 대개 β-1,3-glucanase나 protease, phosphomannanase의 활성을 가짐으로써 효모를 용해시킨다. 지금까지 발견된 효모세포벽 용해효소들은 대부분 glucose에 의해 catabolite repression을 받는 것으로 알려져 있으며, 또한 yeast glucan이나 건조효모를 배지에 첨가하여야만 효소가 생산되는 유도효소로 알려져 있다. 이들 효소들은 효모세포벽의 구성을 밝히거나 효모 엑기스제조 및 유전공학, 세포융합, 효모의 세포내 유용성분 추출 등에 사용될 뿐만 아니라, 병원성 효모의 생육억제 및 식품의 저장성을 높이는 데도 사용될 전망이다. 따라서 본 연구에서는 이러한 용도에 사용할 목적으로 토양으로부터 효모세포벽 용해효소를 생산하는 *Dicyma* sp. YCH-37을 분리하였고, 그 효소를 분리 정제하여 효소의 물리화학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

기질효모의 조제

효모세포벽 용해효소를 생산하는 균주의 screening과 효모세포벽 용해효소의 활성측정을 위하여 기질효

*Corresponding author.

Key words: Yeast cell wall lytic enzyme, *Dicyma* sp., purification

모인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11290을 YM 배지 (1.0% glucose, 0.5% bactopectone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, pH 6.2)를 이용하여 30°C에서 24시간 진탕배양하였다. 6,000×g(Hitachi 20PR-52D, Rotor RPR12-2)에서 10분간 원심분리하여 균체를 모은 다음 0.9%(w/v) NaCl 용액으로 2회 세척하고 -20°C에서 보관하면서 효소활성 측정에 이용하였고, 가열처리된 기질효모는 100°C에서 30분간 방치 후 사용하였다.

효모세포벽 용해효소 생산균주의 분리방법

-20°C에서 보관중인 기질효모를 screening 배지 (1% glucose, 1% sucrose, 1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄, pH 7.0)에 1.5%(w/v)가 되게 현탁하고 가압증기살균하여 plate를 만들었다. 토양 1g을 생리식염수에 현탁하여 2시간 방치 후, 그 상등액을 제조된 plate에 도말하여 30°C에서 5일 동안 배양시킨 다음, colony 주위에 clear zone을 형성하는 균주를 분리하였다.

균주의 동정

분리한 곰팡이에 대한 현미경 관찰과 형태적 특징 및 배양상의 특징을 검토하여 결정하였다.

효소활성 측정법

효모세포벽 용해효소의 활성측정은 Hayashi 등의 방법(18)을 변형하여 사용하였다. -20°C에 보관중인 기질을 100°C에서 30분간 방치한 후 660 nm에서 흡광도가 1.0 부근이 되도록 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 균체를 현탁하였다. 이 균체현탁액 2 ml에 효소액 200 μl를 첨가하여 40°C에서 60분간 반응시킨 다음, 660 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 이 때 효소활성도 1 unit는 위의 조건에서 1분 동안 흡광도를 0.001 감소시키는 효소의 양으로 정하였다.

효소생산을 위한 균주의 배양법

PDA medium(Difco) 사면배지(10 ml)에 분리균주를 접종하고 30°C에서 7일간 배양하여 포자가 충분히 형성 되도록 하였다. 여기에 살균된 0.7% NaCl, 0.07% Tween 80 용액을 10 ml 첨가한 다음 vortexing하여 포자현탁액을 제조하였다. 이 포자현탁액을 효소생산 최적배지 (1.0% glucose, 0.6% soybean meal, 0.15% K₂HPO₄, pH 8.0)에 1%(v/v)가 되도록 접종하여 30°C에서 5일 동안 진탕배양하였다.

효소의 분리 및 정제

기질효모의 세포벽 성분인 glucan을 정 등의 방법(19)으로 분리한 후 affinity adsorption을 실시하였다. affinity adsorption을 거친 조효소액을 PEG 20,000으로 농축한 후, 0.2M NaCl 농도의 50 mM glycine-NaOH

완충액(pH 9.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose 수지에 흡착시킨 다음, 0.2~1.0M의 NaCl 농도구배로 효소를 용출시켰다.

단백질의 정량과 전기영동

단백질 농도는 UV-1201 UV-VIS Spectrophotometer DNA/Protein program pack(Shimadzu Co.)을 이용하여 측정하였다. 단백질 전기영동은 Laemmli의 방법(20)에 준하여 행하였다.

분자량 측정

효소의 분자량을 측정하기 위하여 superose(6 prep grade) gel filtration column을 이용하여 native한 효소의 분자량을 측정하였다. 각 표준 분자량 marker 단백질로는 bovine serum albumin(Mw. 66,000 Da.), carbonic anhydrase(Mw. 29,000 Da.), lysozyme(Mw. 14,300 Da.)을 사용하여 용출되는 시간에 대한 분자량과의 관계로부터 효소의 분자량을 산출하였다. 또한 효소의 subunit 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 행하였다. 각 표준분자량 marker 단백질로는 bovine serum albumin(Mw. 66,000 Da.), albumin egg (Mw. 45,000 Da.), trypsinogen(Mw. 24,000 Da.), β-lactoglobulin(Mw. 18,400 Da.), lysozyme(Mw. 14,300 Da.)을 사용하여 이동도(Rf치)에 대한 분자량과의 관계로부터 분자량을 산출하였다.

결과 및 고찰

효모세포벽 용해효소 생산균주의 분리

토양으로부터 분리한 균주들을 사용하여 효모세포

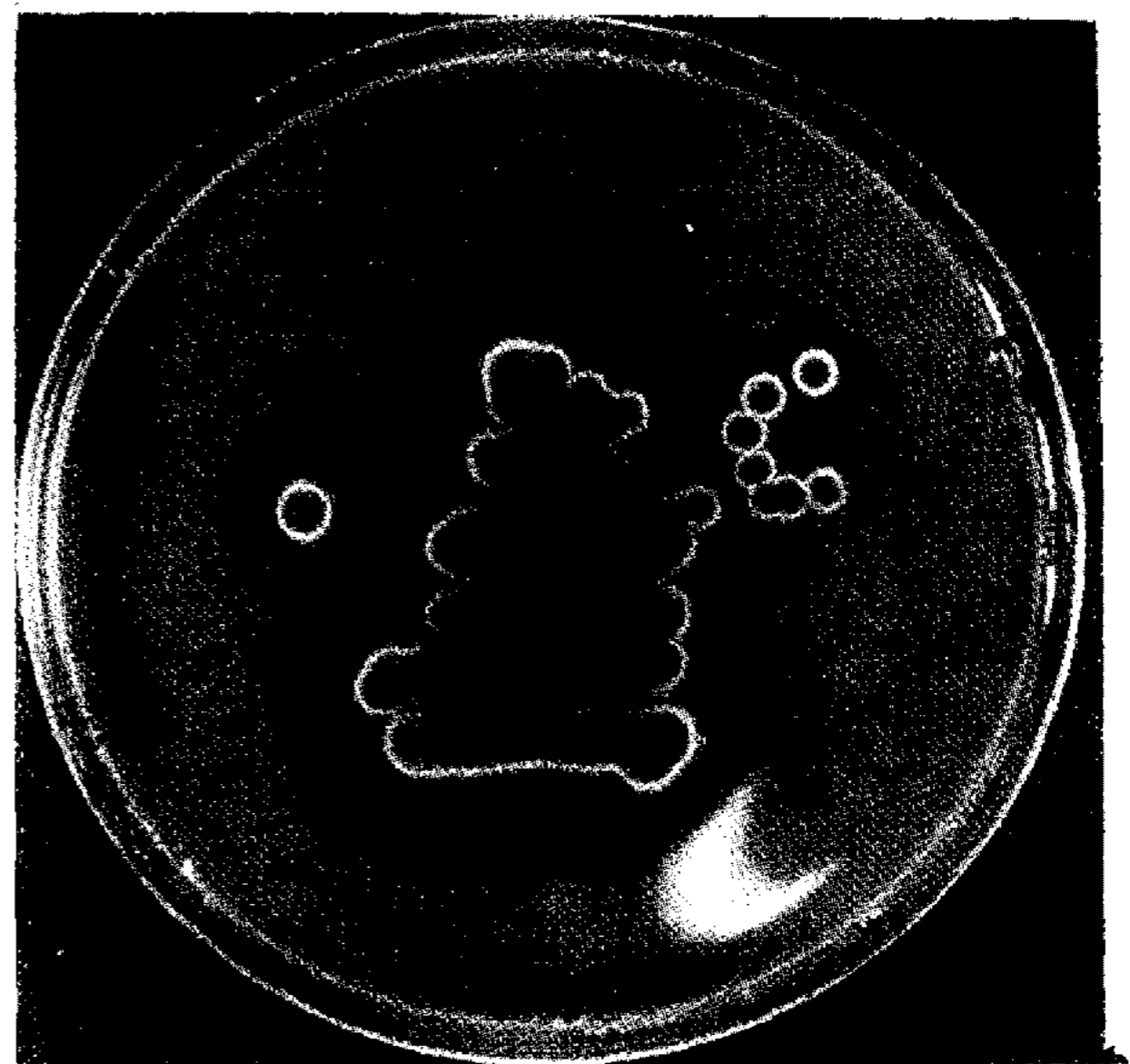


Fig. 1. Lysis of yeast cell by the *Dicyma* sp. YCH-37 on agar plate.

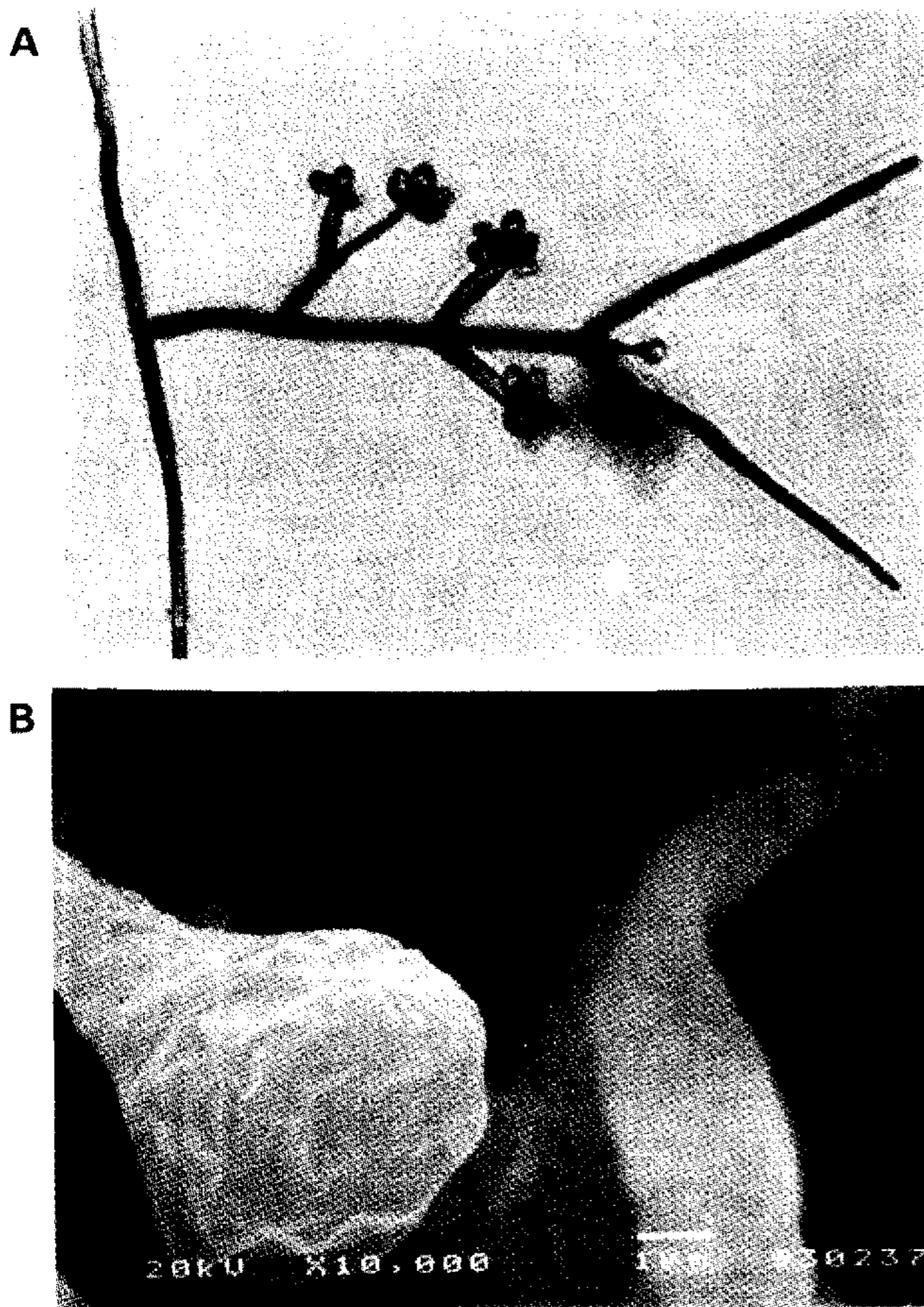


Fig. 2. The morphology of the *Dicyma* sp. YCH-37. A, X400; B, X10,000

벽 용해효소의 생산력이 강한 균주를 분리하여 strain YCH-37로 선정하였다. 이 균주를 효모가 현탁되어 있는 agar plate 배지에 접종한 후 5일간 배양시킨 결과, Fig. 1에서와 같이 균체주위에 clear zone이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과로부터 본 strain YCH-37 균주는 효모세포벽 용해효소를 생산하는 균주라는 것을 확인할 수 있었다.

균주의 특징 및 동정

분리한 균주의 형태적 특징을 Fig. 2와 Table 1에 나타내었다. PDA, MEA 배지에서 생육시켰을 경우 흰색 혹은 무색의 균사가 성장한 후 암녹색의 포자가 나타났으며, plate 뒷면은 황토색이었고, 배양중에 갈색색소를 형성하였다. 균사는 격벽을 가지고 있었으며 포자는 타원형 혹은 원형의 무성포자로 크기는 4.5~5.5 μm 정도였고, 균사는 나뭇가지 형태로 성장하였다. 이런 형태의 균주로는 *Cladosporium* 속, *Nodulisporium* 속, *Dicyma* 속 등이 있으며 이들은 무성생식을 하는 분류상 Deutromycetes의 일종으로 현미경적 관찰을 비교한 결과, *Dicyma* 속과 가장 흡사하여 *Dicyma* sp. YCH-37로 명명하였다.

Table 1. Characteristics of the isolated strain YCH-37

Cultural characteristics (MEA, PDA)	
Colony color	Greenish black (reverse: yellowish brown)
Colony size (7 day culture)	20~30 mm
Colony surface	Velvety
Growth temperature	20°C (++), 30°C (++), 37°C (+)
Colony margin	Distinct
Mycellium color	White or translucent
Microscopic characteristics	
Hypae septate	○
Conidia form	Ellipsoidal
Conidia size	4.5~5.5 μm

Table 2. Susceptibilities of various strains to the yeast cell wall lytic enzyme

Strain	KCCM No.	Degree of lysis (% reduction in O.D.)	
		Living cell	Heat-treated cell
Gram negative bacteria			
<i>Escherichia coli</i>	35447	0	ND*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11952	5	ND
<i>Salmonella typhimurium</i>	11806	35	ND
Gram positive bacteria			
<i>Bacillus subtilis</i>	11314	0	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>		0	ND
Yeasts			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32016	44	63
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12224	8	64
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11290	7	52
<i>Saccharomyces uvarum</i>	32021	5	53
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	11293	4	62
<i>Saccharomyces lipolytica</i>	12495	27	60
<i>Hansenular anomala</i>	11473	20	41
<i>Torulopsis candida</i>	35524	40	48
<i>Candida utilis</i>	21191	12	50
<i>Candida albicans</i>	11474	69	72
<i>Candida albicans</i>	11282	0	62
<i>Candida rugosa</i>	35430	8	62
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	11302	52	61
Molds			
<i>Aspergillus niger</i>	11239	0	ND
<i>Penicillium chrysogenum</i>	34768	0	ND

ND*: not determined

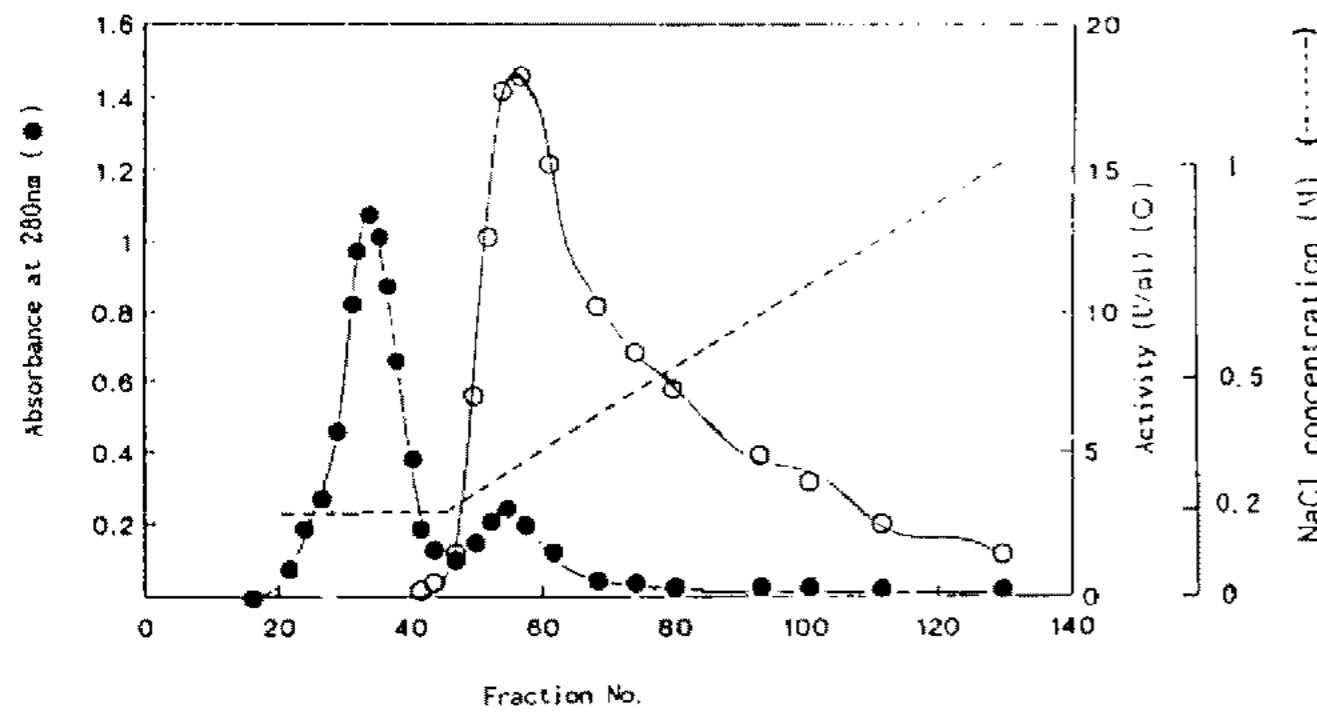


Fig. 3. Column chromatogram of the yeast cell wall lytic enzyme on DEAE-cellulose.

Column measured 5.6×8.5 cm. The flow rate was 32 ml/hr and fractions of 10 ml were collected.

Table 3. Purification of the yeast cell wall lytic enzyme produced by *Dicyma* sp. YCH-37

Steps	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Culture broth	37980.0	26000.0	0.69	100	1
Affinity adsorption	137.4	6738.5	49.10	26	72
DEAE cellulose chromatography	22.5	3162.0	140.00	13	204

효소의 용균 spectrum

본 효소의 용균 spectrum을 알아보기 위하여 각각의 세균과 효모, 곰팡이들을 배양한 후, 생리식염수로 세척하였다. 세척된 균체를 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 현탁하여 660 nm에서의 흡광도가 0.5~0.6이 되도록 조절한 다음, 15U의 효소액을 반응액 3 ml에 첨가하여 40°C에서 최대 용해될 때까지 반응시켰다. 각 균주의 용해정도는 Table 2와 같았다. 기질균체로는 생세포와 가압증기살균 처리된 세포를 사용하였다. 생세포를 기질로 사용하였을 때 세균의 경우 식중독의 원인균으로 알려진 *Salmonella typhimurium*은 약 35% 정도 용해됨을 확인하였고, 나머지 세균에 대해서는 용해효과가 없었다. 효모의 경우 본 실험에 기질로 사용하였던 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11290이 7% 용해되는 것에 비해 *Candida albicans* KCCM 11474, *Zygosaccharomyces rouxii* KCCM 11302 균주들은 50% 이상 용해됨을 확인하였고, 곰팡이의 경우 plate에 곰팡이를 접종하여 저지환 생성여부를 검토하였으나 용해되지 않았다. 가압증기살균 처리된 세포를 기질로 사용하였을 때 세균 및 곰팡이의 경우 모두 용해되지 않았으나, 효모의 경우 생세포를 기질로 하였을 때 거의 용해가 되지 않았던 균주들을 포함하여 모든 효모가

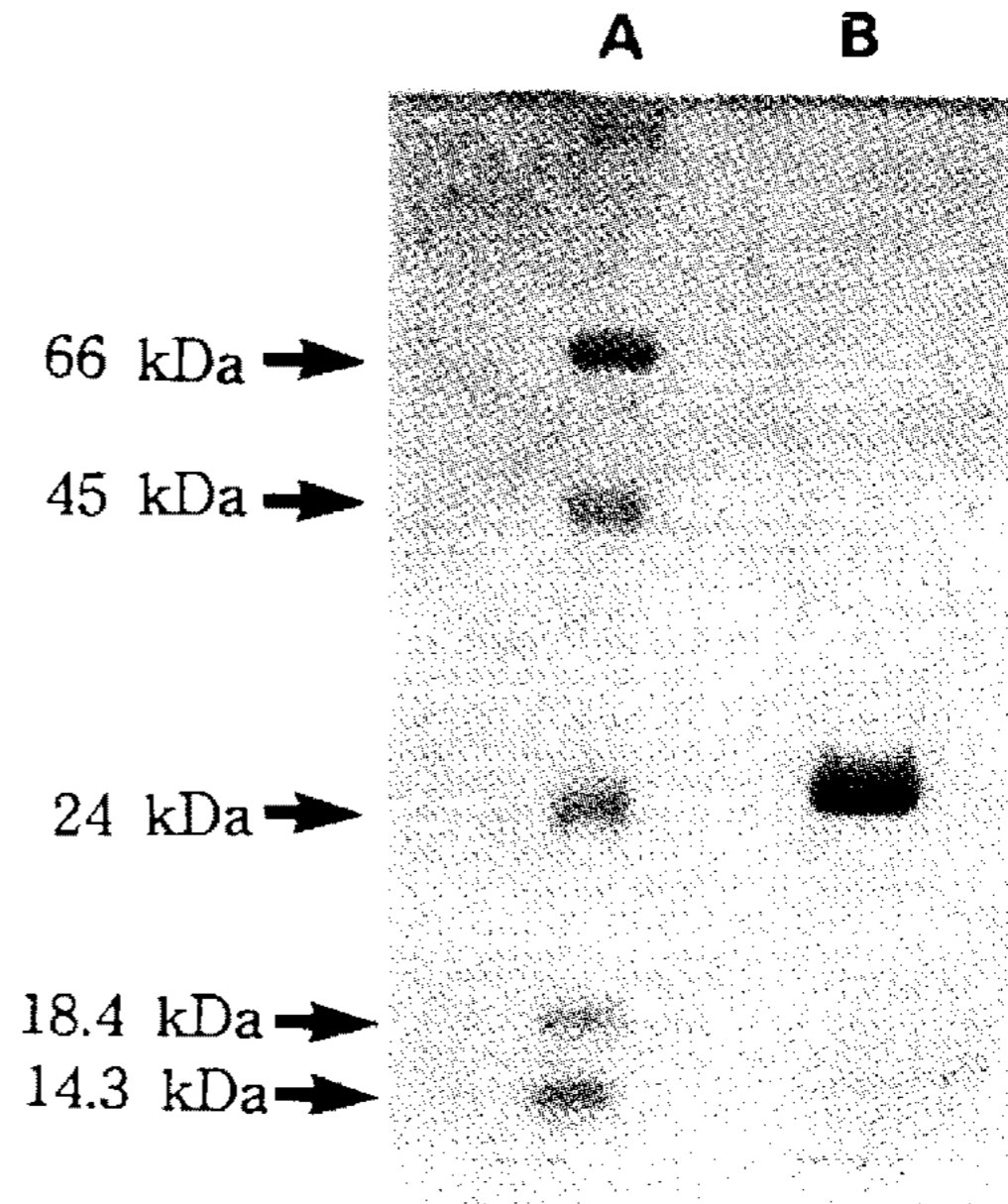


Fig. 4. SDS-PAGE of the yeast cell wall lytic enzyme. A, molecular weight markers; B, purified enzyme

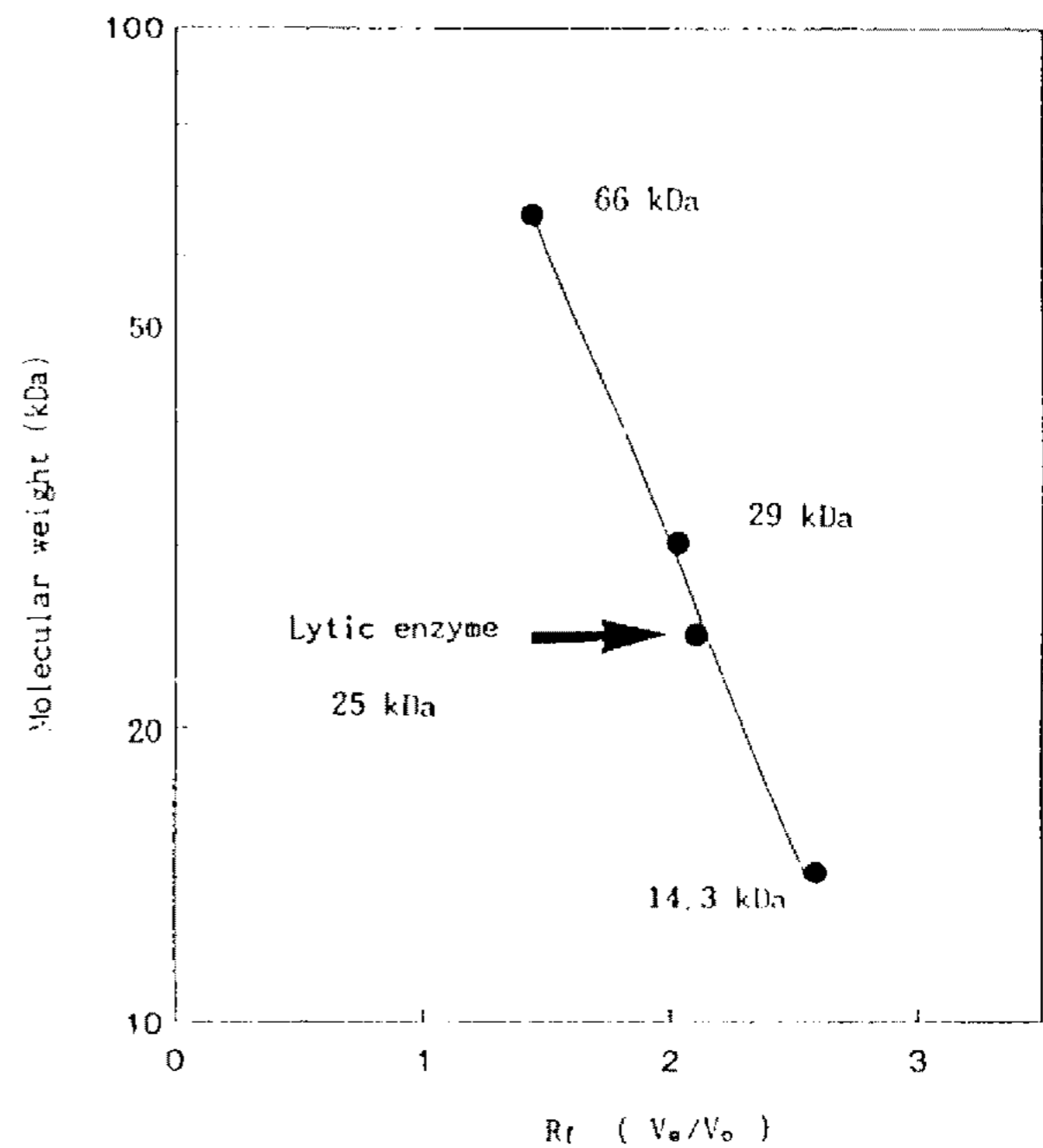


Fig. 5. Molecular weight determination of the yeast cell wall lytic enzyme by superose gel filtration. 66 kDa, bovine serum albumin; 29 kDa, carbonic anhydrase; 14.3 kDa, lysozyme

40% 이상 용해됨을 확인할 수 있었다. 특히 *Hansenula*, *Torulopsis* 등은 김치의 장기 보존시에 상층에 생육하는 균주로 김치의 연부에 관여하는 것으로 알려져 있다 (21).

효소의 분리 및 정제

Dicyma sp. YCH-37이 생산하는 효모세포벽 용해효소를 분리, 정제하기 위하여 균주를 앞에서 검토한 효

소생산 최적조건으로 5일간 배양하여 3 L의 배양액으로부터 총 26,000 units의 효소를 얻었다. Yeast glucan을 이용하여 affinity adsorption을 행하여 정제도가 72배로 향상된 조효소액을 얻었으며, 이 조효소액을 PEG 20,000으로 농축 후 상기의 방법으로 DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 정제된 효소를 얻을 수 있었다(Fig. 3). 이 효소액의 최종 정제도, 수율은 각각 204배, 13%였다(Table 3). 정제한 효소의 순도검정을 위하여 활성분획을 모아 PEG 20,000으로 농축 후, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하였다. 전기영동 gel은 12.5%를 사용하였고 20 mA에서 3~4시간 전기영동한 후, 0.05% coomassie bril-

liant blue R-250(Sigma Co.)으로 염색한 결과 Fig. 4에 나타난 것과 같이 약 25,000 daltons의 위치에서 단일 단백질 band를 확인하였다(Fig. 4).

Superose column을 이용하여 gel filtration을 행한 결과, 본 효소는 분자량 약 25,000 daltons의 위치에서 용출되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이 결과는 앞에서 행한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 결과와 일치하였으며, 이상의 결과로 본 효소는 분자량 25,000 daltons의 monomer임을 확인하였다.

효소활성과 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향
정제된 효소의 효소반응에 있어서의 최적 pH를 측

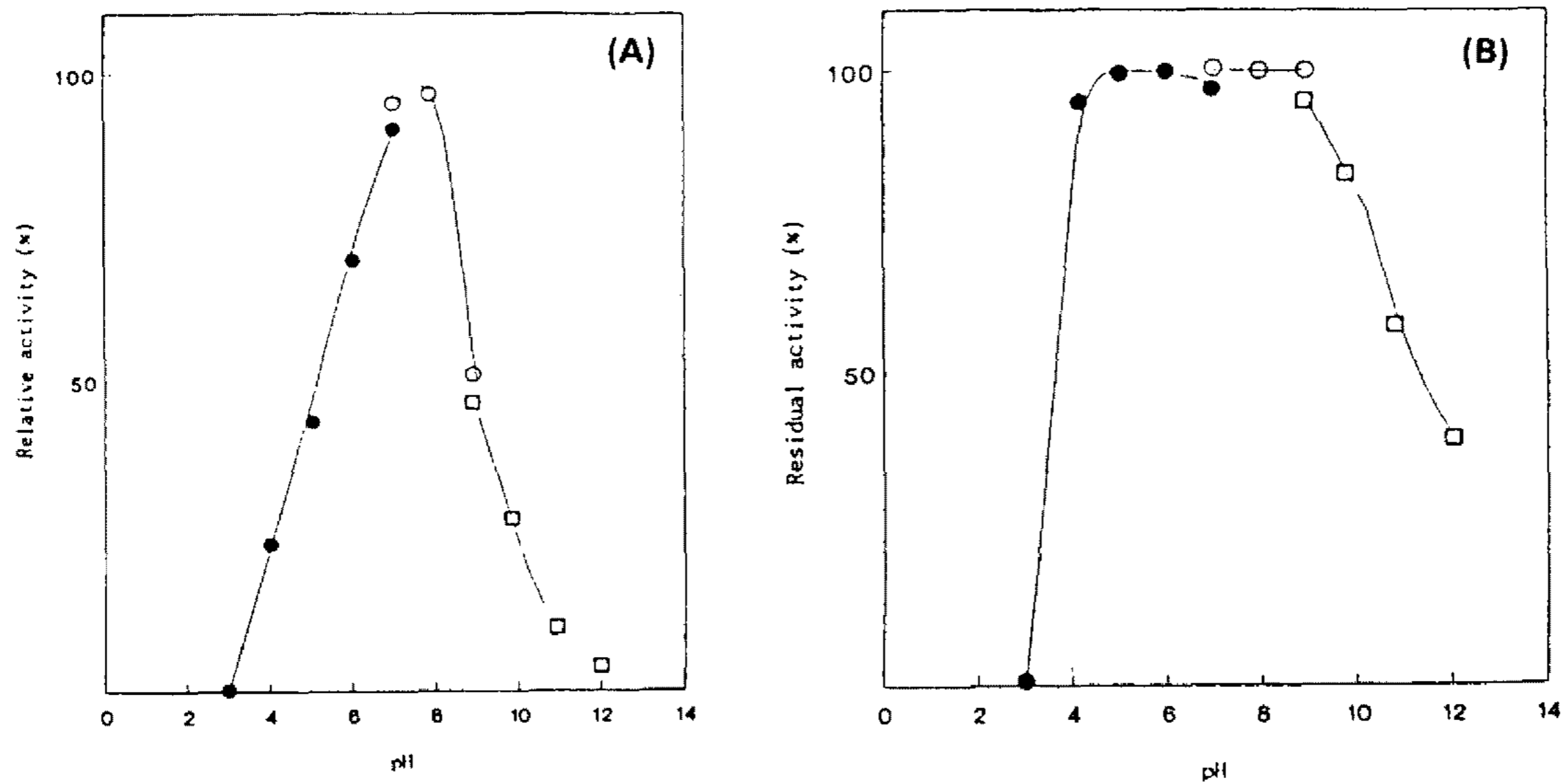


Fig. 6. Effect of pH on yeast cell wall lytic activity (A) and stability (B). ●, 50 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 3.0~7.0); ○, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0); □, 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0~12.0).

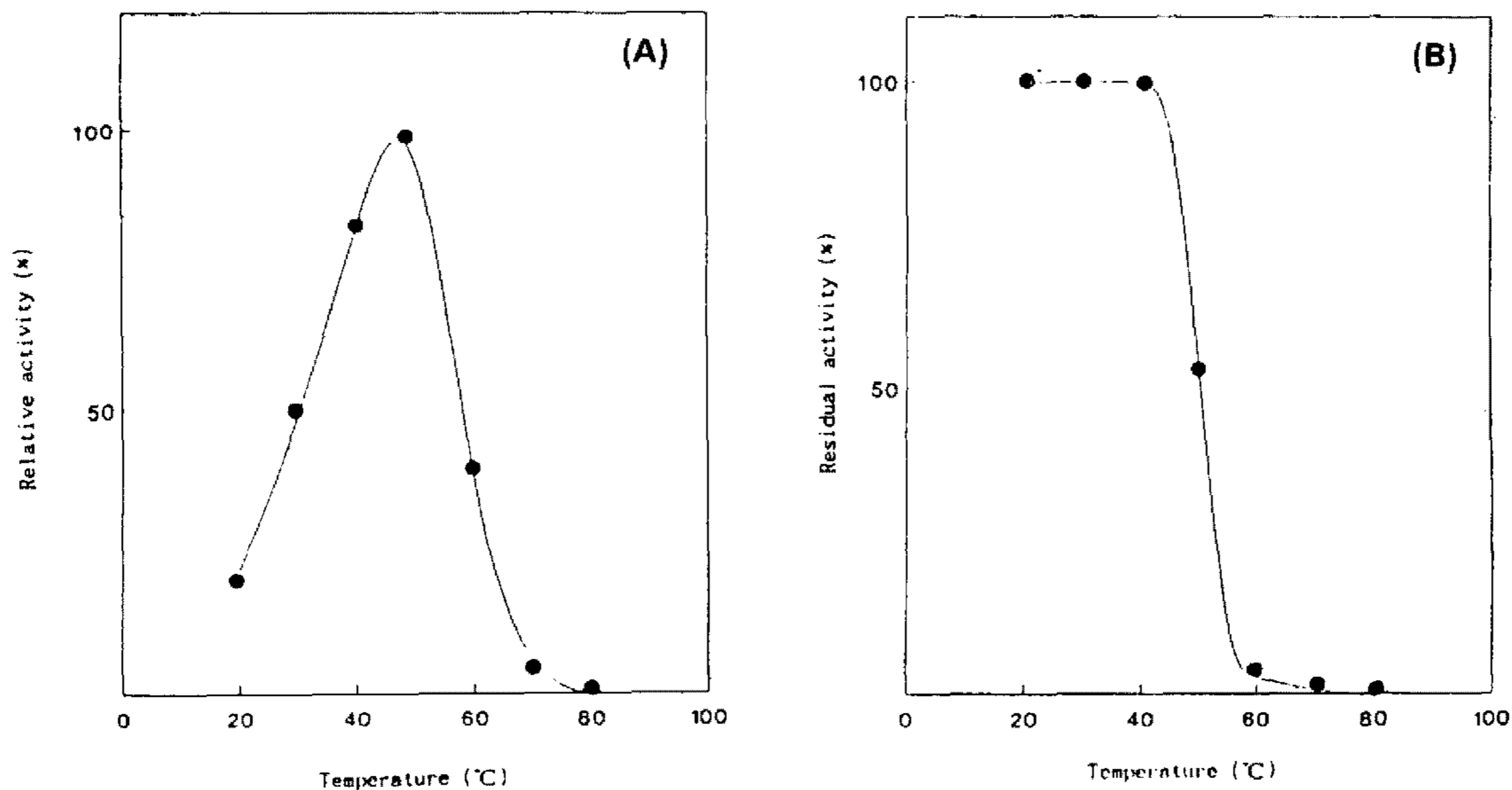


Fig. 7. Effect of temperature on yeast cell wall lytic activity (A) and stability (B).

정하기 위해 기질효모 현탁액의 pH를 3.0~11.0으로 각각 다르게 조절한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 본 효소는 pH 8.0에서 최적활성을 나타내었다(Fig. 6A). 효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 위에서 사용한 각 pH 별 완충액에 효소용액을 가해 효소액의 pH를 각각 다르게 조절한 후, 25°C에서 24시간 방치한 다음 효소의 잔존활성을 측정한 결과, Fig. 6B에 나타난 바와 같이 pH 4.0~10.0 범위에서 안정하였다.

효소활성의 최적온도를 측정하기 위하여 20~80°C 범위에서 효소활성을 측정한 결과, 효모세포벽 용해활성의 최적온도는 50°C였다(Fig. 7A). 효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 20~80°C의 각 온도별로 60분간 처리한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 효모세포벽 용해 활성은 40°C까지 100% 안정성을 유지하였으나 50°C에서는 50% 잔존활성을 나타냈으며, 60°C 이상에서는 급격한 감소를 나타내었다(Fig. 7B).

이상의 연구결과로부터 *Dicyma* sp. YCH-37이 생산하는 효모세포벽 용해효소는 25,000 daltons의 분자량을 가지며, 반응최적 pH와 온도는 각각 pH 8.0, 50°C이고, pH 4.0~10.0의 범위와 40°C까지의 온도에서 안정한 효소임을 확인할 수 있었다. 현재까지 알려진 효모세포벽 용해효소의 분자량 및 물리·화학적 성질과 비교한 결과, 본 균주가 생산하는 효모세포벽 용해효소는 기존의 효소와는 다른 새로운 효소임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 효소의 작용기작 및 그 응용에 관하여는 추후에 보고할 예정이다.

요 약

효모세포벽 용해효소를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리하였다. 본 균주에 대한 현미경 관찰 및 형태학적, 배양상의 특징을 검토한 결과 *Dicyma* sp.로 동정되어, 본 균주를 *Dicyma* sp. YCH-37로 명명하였다. 세포에 아무런 처리도 가하지 않은 생균상태의 세균, 효모, 곰팡이에 대한 용균 spectrum을 측정한 결과, 세균 중에서는 *Salmonella typhimurium*을, 효모 중에서는 *Torulopsis candida*, *Hansenula anomala*, *Zygosaccharomyces rouxii* 등을 잘 용해시켰으며, 가압증기살균 처리된 효모는 모두 용해시킬 수 있었다. 배양상등액을 yeast glucan을 이용한 affinity adsorption 및 DEAE-cellulose column chromatography로 정제한 결과, 13%의 수율과 204배의 정제도로 정제되었다. SDS-PAGE, gel filtration을 통해 분자량은 약 25,000 daltons임을 확인하였으며, 용균활성의 최적 pH와 온도는 각각 8.0과 50°C이고, pH 4.0~10.0, 40°C까지 안정하였다.

감사의 말

본 논문은 연세대학교 생물산업소재 연구센터의 연

구비 지원에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

1. Kollar, R., E. Petrakova, G. Ashwell, P.W. Robbins, and E. Cabib. 1994. Architecture of the yeast cell wall. *J. Biol. Chem.* **270**: 1170-1178.
2. Anna Kockova-Kratochvilova. 1990. Yeast and Yeast-like organisms, Pp. 123-126. 1st ed. VCH.
3. Obata, T., H. Iwata, and Y. Namba. 1977. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. CK lysing viable cells. *Agri. Biol. Chem.* **41**: 2387-2394.
4. Kidby, D.K. and R. Davies. 1970. Invertase and disulfide bridges in the yeast wall. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 327-333.
5. Monreal, J., F. De Uruburu, and J.R. Villanueva. 1967. Lytic action of $\beta(1-3)$ -glucanase on yeast cells. *J. Bacteriol.* **94**: 241-244.
6. Yamamoto, S., J. Fukuyama, and S. Nagasaki. 1974. Production, purification, crystallization, and some properties of yeast cell lytic enzyme from a species of Fungi Imperfecti. *Agri. Biol. Chem.* **38**: 329-337.
7. Scott, J.H. and R. Schekman. 1980. Lyticase: Endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J. Bacteriol.* **142**: 414-423.
8. William, L., J.R. McLellan, and J.O. Lampen. 1968. Phosphomannanase (PR-factor), an enzyme required for formation of yeast protoplasts. *J. Bacteriol.* **95**: 967-974.
9. Yamamoto, S., T. Shiraishi, and S. Nagasaki. 1972. Crystalline enzyme which degrades the cell wall of living yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 1802-1809.
10. Kaneko, T., K. Kitamura, and Y. Yamamoto. 1973. Susceptibilities of yeast to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*. *Agri. Biol. Chem.* **37**: 2295-2302.
11. Tanaka, H. and H.J. Phaff. 1965. Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls. *J. Bacteriol.* **89**: 1570-1580.
12. Tsujisaka, Y., N. Hamada, and R. Kobayashi. 1981. Purification and some properties of an *exo*- β -1,3-glucanase from Basidiomycete species. *Agri. Biol. Chem.* **45**: 1201-1208.
13. Kobayashi, R., T. Miwa, S. Yamamoto, and S. Nagasaki. 1980. Purification and characterization of a yeast cell lytic enzyme of a species of *Rhizoctonia*. *J. Ferment. Technol.* **58**: 319-326.
14. Uehara, S., K. Hasegawa, and K. Iwai. 1979. On cell wall lytic enzymes produced by *Corticium centrifugum*. *Agri. Biol. Chem.* **43**: 1991-1992.
15. Sugimori, T., Y. Uchida, and Y. Tsukada. 1972. Distribution of yeast cell wall lytic activity among microorganisms. *Agri. Biol. Chem.* **36**: 669-675.
16. Arai, M., R. Yamamoto, and S. Murao. 1976. Purification and some properties of red yeast cell wall lytic enzyme. *Agri. Biol. Chem.* **40**: 27-32.
17. Bacon, J.S.D., A.H. Gordon, D. Jones, I.F. Taylor, and D.M. Webley. 1970. The separation of β -glucanases

- produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls. *Biochem. J.* **120**: 67-78.
18. Hayashi, K., T. Kasumi, N. Kubo, and N. Tsumura. 1981. Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agr. Biol. Chem.* **45**: 2289-2300.
 19. Chung, C.K., C.J. Kim, and J.S. Lee. 1988. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S to Zymolyase-20T. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 136-141.
 20. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
 21. Han, H.U., C.R. Lim, and H.K. Park. 1990. Determination of microbial community as an indicator of *Kimchi* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**: 26-32.

(Received 15 April 1996)