

감귤류 변패의 원인균인 *Penicillium* sp.-L4가 생성하는 식물세포벽 분해효소의 작용양상

김무성* · 최영길^{1,2}

(주)태평양 기술연구원 기반기술연구소, ¹한양대학교 생물학과,
²서울대학교 분자미생물학 연구센터

Profiles of Hydrolytic Enzyme Production of *Penicillium* sp.-L4, a Causative Fungus of Rot in Citrus Fruits. Moo-Sung Kim* and Yong-Keel Choi^{1,2}. Specialty Chemical Institute, Pacific R&D Center, Yongin 449-900, Korea, ¹Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, ²Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea - *Penicillium* sp.-L4, a causative fungus of rot in citrus fruits, was isolated and its mode of hydrolytic enzyme production was investigated. Carboxymethylcellulase (CMCase), polygalacturonase (PGase), extra- & intra-cellular β -glucosidase and cellobiase were produced drastically by addition of substrates in minimal media. Production of the hydrolytic enzymes were induced efficiently by cellobiose and cellobiosaccharides which were the products of cellulose hydrolysis, but repressed by addition of monosaccharide such as glucose, raffinose, galacturonic acid. The relative activity of *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) hydrolysis was higher than that of cellobiose hydrolysis in extracellular enzymes, and reverse is true in intracellular enzymes. Intact enzyme production of *P. sp.-L4* on lemon peel lesion was sequential. β -Glucosidase and CMCase were produced first and followed by PGase. The enzyme productivities and pH in lesions were coincident with optimal pH of each enzyme activities.

식물세포벽은 주성분으로서 cellulose, pectin, xylan, lignin 등과 함께 소량의 chitin, β -glucan, mannan 및 단백질, 그리고 표면의 cutin 등으로 구성되어 있으며, 이들 고분자 물질이 병원균 침입에 대한 일차적인 barrier를 형성하고 있다(1). 일반적으로 병원균에 의한 식물체 감염은 병원균이 식물 환경(pH, sugars, plant factors etc.)을 감지하고 signal transduction에 의해 virulence gene을 활성화시켜 cellulase, pectinase, protease 등의 식물세포벽 분해효소를 생산하거나 독소를 생산함으로써 이루어지는 것으로 추정되고 있다(2, 3). 식물체 감염시 병원균의 작용으로는 phytotoxin의 생산, phytohormone의 생산, ethylene gas의 생성, 유기산 또는 phenolic acid의 생성 등 생리·생화학적 작용(4, 5, 6)과 함께, appressorium, haustorium과 같은 침입기관의 발달(7, 8) 등의 형태학적 변화가 보고되었으나, 대부분의 경우 병원균의 침투에는 cellulase, pectinase, xylanase 등 식물세포벽 분해효소가 기본적으로 작용하는 것으로 알려져 있다(2, 9). 일반적으로 목질부위의 분해에는 cellulose의 분해와 함께 xylan, lignin 등의 분해효소가 주로 관여하는(10, 11) 한편, 과채류의 변패에는 cellulose와 pectin 성분의 분해효

소가 중요한 작용을 하는 것(12, 13)으로 알려져 있다. 그러나 최근 일부 병원균에 있어서 cellulase, pectinase와 함께 세포내·외의 β -glucosidase 활성이 감염능 및 세포사멸에 중요하다는 보고(14, 15), invertase에 의한 초기 병원균 활성화 및 전체적 감염능 증진에 대한 보고(16) 등 병원균과 식물체의 종류에 따라 감염능과 세포벽 분해에 주 작용을 하는 효소의 종류 또는 작용양상은 상이한 것으로 나타나, 식물병원균 감염기작에 대한 이해와 효율적인 감염방지를 위해서는 이들 효소에 대한 각각의 특성 및 작용기작에 대한 연구가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

Lemon, orange, 감귤, 유자 등의 감귤류(*Citrus* L.)는 과육의 식용, juice 생산, pectin 및 flavonoid 성분의 추출 등 다양한 이용성을 가지고 있어 전세계적으로 가장 많이 생산, 소비되는 과실의 하나이나, 주로 열대 및 아열대 지방에서 재배되어 타 지방에서 소비되는 유통경로를 가지고 있어 그 운송 및 저장방법이 중요한 품목이다(17, 18). 본 연구는 저장 중 진균에 의한 감염이 비교적 심한 감귤류 변패의 생물학적 제제에 의한 방제의 일환으로, 변패의 원인균을 분리하여 감염시 주로 작용하는 분해효소의 생성 및 작용 양상을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-331-281-8340, Fax. 82-331-248-8478

E-mail: prdcspch@interpia.net

Key words: *Penicillium* sp. Fungal infection, Hydrolytic enzyme, β -glucosidase

재료 및 방법

사용균주

변패된 lemon에서 분리된 strain No.4 균주를 사용하였다. 분리된 균주는 형태학적 특성에 따라 Samson(19) 및 宇田川(20)의 방법에 의해 동정하였다. 균주는 potato dextrose agar(PDA) 배지에서 26°C, 7-10 일간 배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

배지 및 분해효소 생성

a) 최소배지에서의 효소생성능 실험

Czapek 배지(100 ml 배지/1 L Erlenmeyer flask)에 탄소원으로 glucose, sodium carboxymethyl cellulose (CMC), avicel, polygalacturonic acid(PG), xylan 등을 1%(w/v) 되게 첨가하여 사용하였으며, inducer 및 repressor 실험은 Czapek배지에 탄소원으로 0.5% 씩의 CMC와 PG를 사용한 배지에 glucose, raffinose, sucrose, cellobiose, cellotriose, cellotetraose 등을 각각 0.2% 되게 첨가하였다. 균은 포자(1×10^7) 상태로 접종하고 26°C에서 왕복진탕배양(120 rpm)하였다.

세포외 효소로는 배양액을 원심분리(Hitachi, CR 20B2; 10,000×g, 30 min)하여 상등액을 그대로 사용하였으며, 세포내 효소로는 원심분리된 pellet을 acetate buffer(pH 5.0, 0.1 M) 또는 증류수로 3회 세척한 후 glass bead와 함께 시료에 따라 5-15 분간 간헐적으로 sonication(Ultrasonic, W-225R)시키고 원심분리한 후 상등액을 사용하였다.

b) 과피감염시의 효소생성능 실험

Lemon 과피에 cork borer와 knife로 직경 5 mm, 깊이 2-3 mm의 표피 제거부위를 만든 후, 중심부위에 포자(1×10^6)를 접종하고 증류수로 적신 filter paper disc ($\phi 5$ mm)를 덮은 뒤 12 시간 간격으로 4회 증류수를 첨가하면서 26°C에서 7-10 일간 배양하였다. 배양 후 과피의 lesion 부위만을 접종부위부터 균일한 길이로 4 등분하고 막자사발에서 갈아 으갠 후, 동일한 중량의 acetate buffer(pH 4.5, 0.1 M) 또는 증류수에 현탁하고 여과(0.2 μ m)하여 20 배량의 동일한 buffer 또는 증류수로 diafiltration(Amicon, Stirred Cell 8400; M.W. cut off 5,000)한 후 효소용액으로 사용하였다.

효소 안정성 및 최적작용 pH 실험

효소의 안정성은 조제된 효소 용액을 26°C에서 4 일간 incubation시킨 후 잔존여가를 측정하여 확인하였으며, 효소의 최적 작용 pH는 기질용액에 acetate buffer(final concentration 0.1 M)를 사용하여 pH를 3-6으로 조정하고 각 pH에서의 효소활성을 비교하였다.

효소역가측정

β -Glucosidase activity는 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(PNPG)를 기질로 하여 측정하였다. 0.5

ml의 PNPG 용액(2 mM, 0.1 M acetate buffer, pH 4.5)에 효소용액 0.1 ml을 넣고 30°C 항온수조에서 10 분간 반응시킨 후, 0.9 ml의 1 M Na_2CO_3 를 첨가하여 반응을 정지시키고 spectrophotometer(Hitachi, U-3210)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 상기조건하에서 1 μ M의 nitrophenol을 형성하는 효소의 양으로 정의하였다. Cellobiase activity는 glucose oxidase-peroxidase 반응 kit(Sigma)를 이용하여 효소반응으로 유리된 glucose의 양을 430 nm에서 측정하였다. 1 unit는 상기조건하에서 1 μ M의 glucose를 형성하는 효소의 양으로 정의하였다. CMCase, PGase, avicelase 및 xylanase는 각각 CMC, PG, avicel 및 xylan을 기질로 하여 3,5-dinitro-salicylic acid(DNS)를 이용한 환원당 측정법(21)을 변형하여 사용하였다. 0.5 ml의 기질용액(0.5%, 0.1 M acetate buffer, pH 4.5)에 효소용액 0.1 ml을 넣고 30°C 항온수조에서 30 분간 반응시킨 후(avicelase 및 xylanase 측정의 경우는 shaking 하면서 반응), 0.9 ml의 DNS 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 상기조건하에서 분당 1 μ M의 환원당을 형성하는 효소의 양으로 정의하였다.

시약

Cellobiose, cellotriose, cellotetraose, PNPG, PG(from orange), xylan(from oat spelt) 및 DNS는 Sigma사 제품을, CMC(low viscosity)는 Fluka사 제품을, Avicel은 Merck사 제품을 사용하였으며 기타 시약은 모두 1급 시약을 사용하였다. Glucose 측정용 kit는 Sigma 510-A를 사용하였다.

결과 및 고찰

변패의 원인균 분리

감귤류 변패의 원인균을 획득하고자 변패된 lemon, orange, 감귤(제주 조생종)에서 5종의 진균을 분리하였고, 이중 과피에 재감염시켰을 때(Table 1) 감염속도가 가장 빠른 strain No. 4를 선택하였다. 분리된 strain No. 4는 PDA 및 Czapek agar 배지에서 ascus 또는 sporangium을 형성하지 않고 conidiospore를 형성하였으며 균일한 septum을 가졌다. 또 배지에서 초기 밀집된 녹색의 colony에서 배양 말기 녹색갈색의 색깔을 나타내었으며, metula 및 짧은 phialide를 가지는 등 전형적인 *Penicillium*속 균주의 특성을 나타내어 *Penicillium*속 균주로 판단되었으며 이후 *Penicillium* sp.-L4라 명명하고 사용하였다(Fig. 1). 한편, 변패의 대상과실로는 orange 및 조생종 감귤에 비해 비교적 과피가 두껍고 균일한 품질의 획득이 용이하여 실험상 오차를 줄일 수 있을 것으

Table 1. Formation of lesions^a on lemon peel by infection of isolated fungal strains

Fungal strains	diameters of lesion (mm)
No. 1 <i>Penicillium</i> sp.	35
No. 2 <i>Penicillium</i> sp.	43
No. 3 <i>Penicillium</i> sp.	18
No. 4 <i>Penicillium</i> sp.	71
No. 5 <i>Alternaria</i> sp.	^b NG

^aSpores (1×10^6 spores) of each strain were inoculated at spot on lemon peel and the infected lemons were incubated for 7 days at 26°C. ^bNG; No growth.

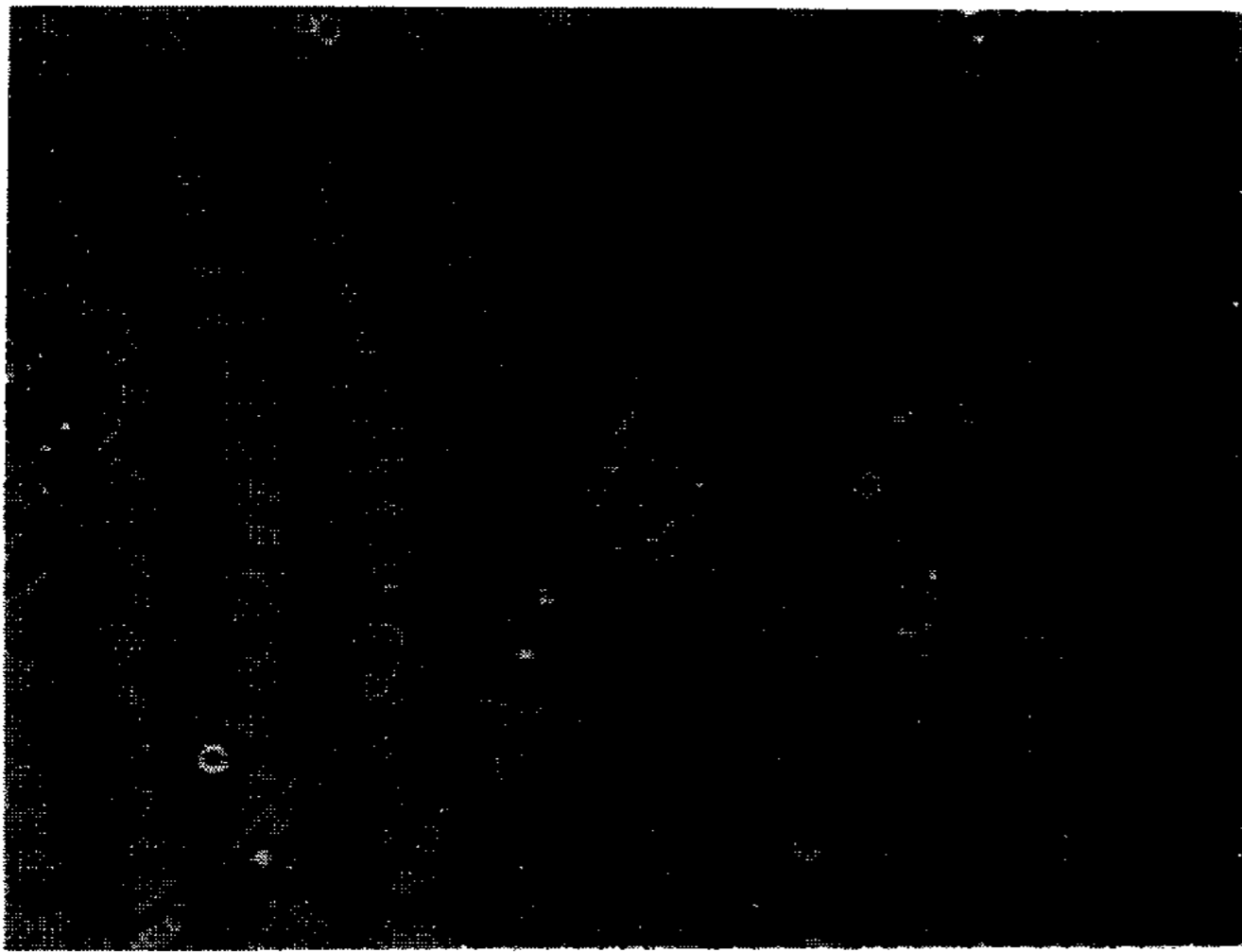


Fig. 1. Microscopy for morphology of *Penicillium* sp.-L4. Conidiospore and phialide, a typical sporulating organ of *Penicillium*, were illustrated in the microscopy (Magnification, $\times 800$).

로 판단된 lemon을 선정하여 사용하였다.

분해효소 생성양상

a) 최소배지에서의 효소생성능

최소배지에서 각 기질에 따른 분해효소 생성은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 CMCase, PGase, 및 β -glucosidase, cellobiase 등의 활성이 비교적 급격히 높아지는 것으로 나타났으며, 고분자 기질보다는 이당류인 cellobiose에 의해 가장 높은 활성을 나타내었다. 특히 직접 cellobiose를 생성하는 cellulase 뿐 아니라 PGase 및 xylanase 등의 분해효소들이 cellobiose에 의해 induction 되는 것으로 나타나, cellobiose가 cellulase system 뿐 아니라 전체적인 분해효소 생성 system에 관여하는 것으로 추정되었다. Cellobiose 분해에 관련되는 효소인 cellobiase와 β -glucosidase는 세포내, 외에서 전체적으로 비슷한 양상의 증가를 보였으나 상대적으로는 세포내에서 cellobiase의 활성이 높은 반면 세포외에서는 β -glucosidase의 활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 3).

저분자 당에 의한 효소생성의 유도 및 억제효과를 알아본 결과(Table 2), 단당류인 glucose, raffinose에 의해서

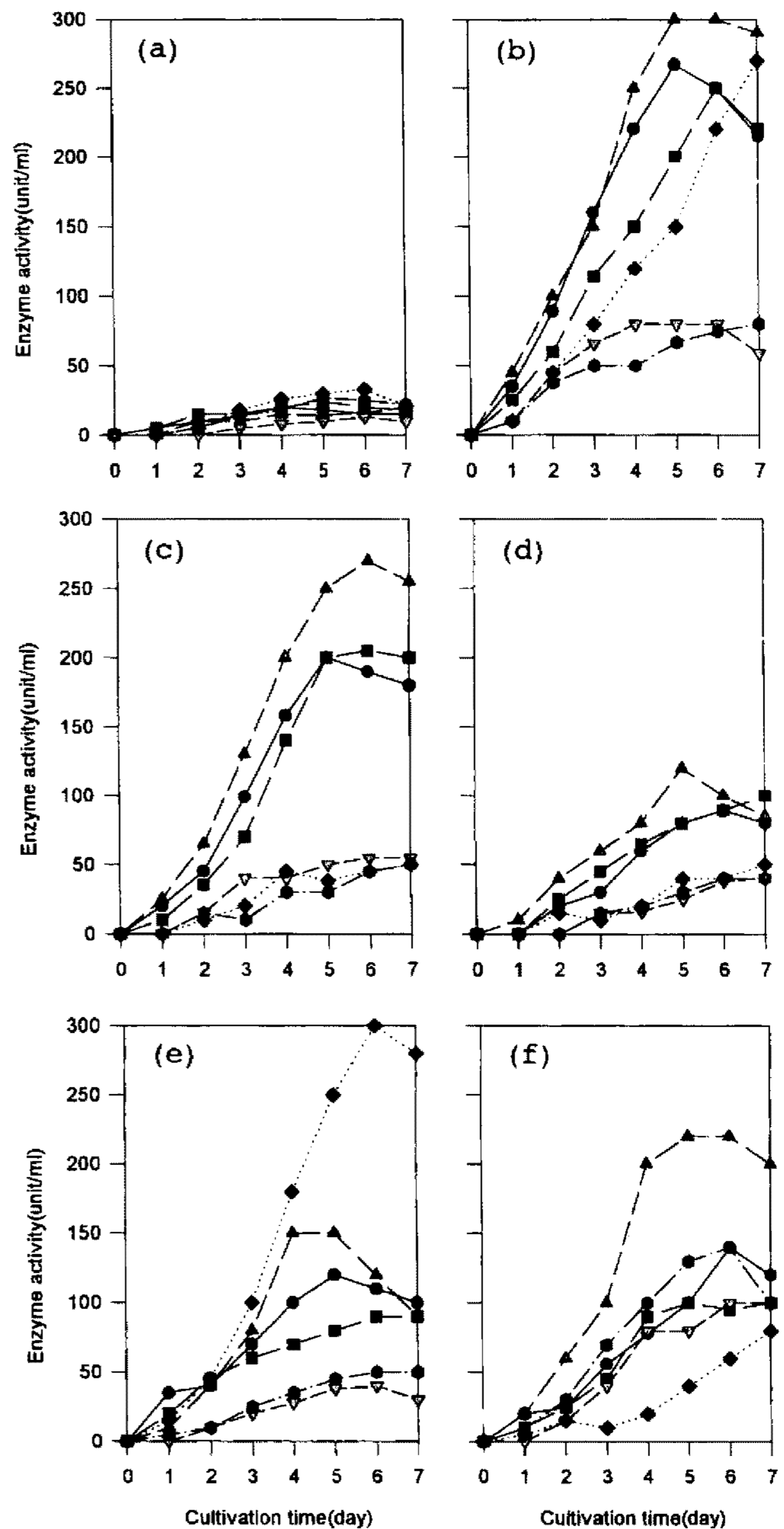


Fig. 2. Effects of carbon sources on the production of hydrolytic enzyme of *Penicillium* sp.-L4.

Cells were cultivated in Czapek media containing 1%(w/v) of each carbon sources. (a) Glucose (b) Cellobiose (c) Carboxymethylcellulose (CMC) (d) Avicel (e) Polygalacturonase (PG) (f) Xylan. Symbols for enzyme activities: ●—● β -Glucosidase, ■—■ Cellobiase, ▲—▲ CMCase, ▼—▼ Avicelase, ◆—◆ PGase, ○—○ Xylanase.

는 전체적인 효소생성이 억제를 받는 것으로 나타났고 PGase의 분해산물인 galacturonic acid에 의해서는 비교적 PGase의 생성이 크게 억제되었다. 또 cellobiose 뿐 아니라 cellobiose와 cellobiose에 의해서도 전체적인 효소 생성이 증가되어 cellulose 분해산물이 효율적으로 효소를 유도할 수 있는 것으로 판단되었다. 이와 함께 이당

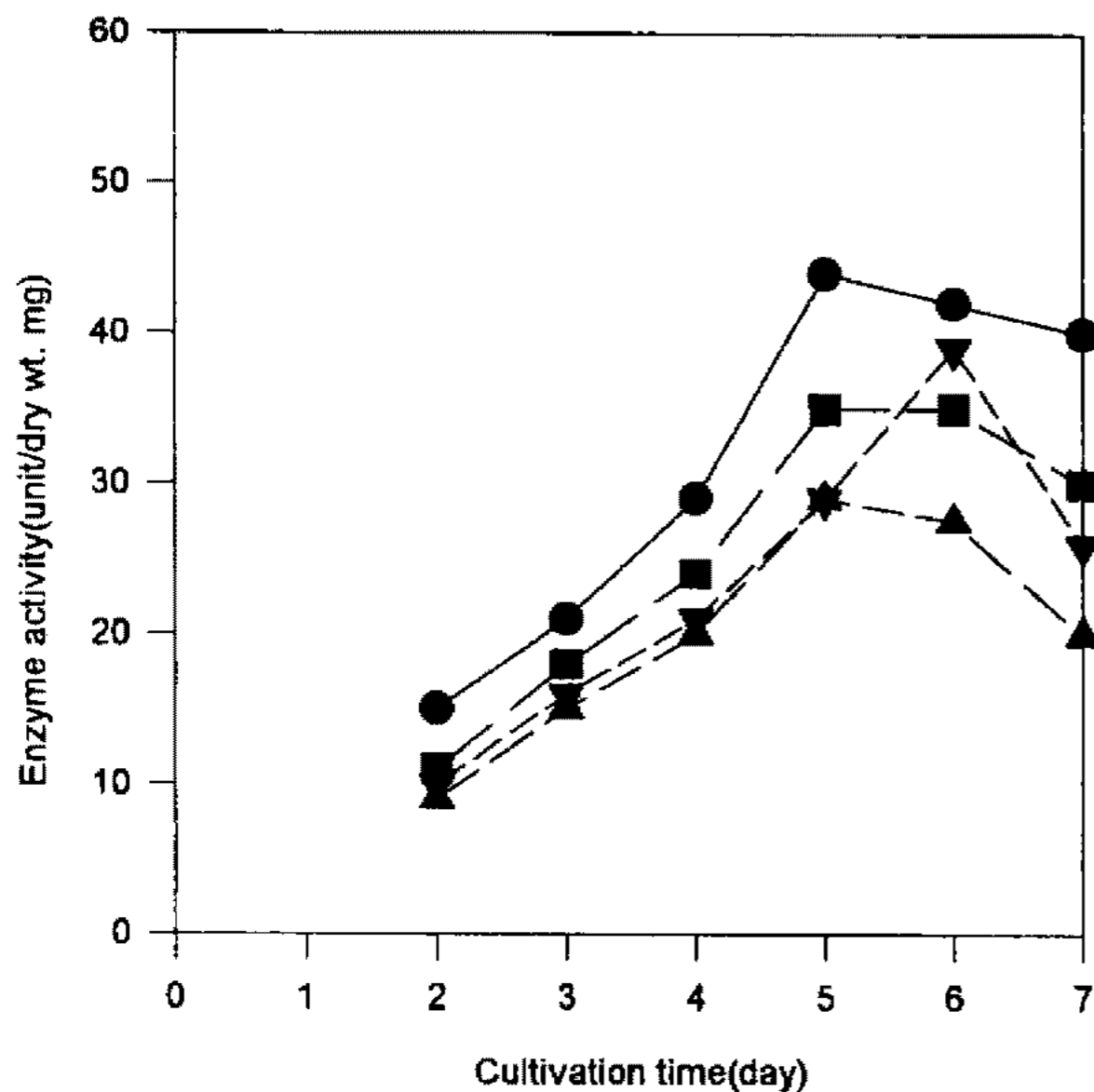


Fig. 3. Production of extra- and intra-cellular β -glucosidase and cellobiase by *Penicillium sp.-L4*.

Cells were cultivated in Czapek media containing 0.5%(w/v) CMC and PG. β -Glucosidase activity was measured as PNPG hydrolyzing activity. Symbols: ●—● Extracellular β -glucosidase, ■—■ Extracellular cellobiase, ▲—▲ Intracellular β -glucosidase, ▼—▼ Intracellular cellobiase.

류인 cellobiose가 비교적 높은 농도인 1%에서도 효소생성을 억제하지 않는 것(Fig. 2)으로 보아 cellulose 분해산물과 같은 기질의 억제작용 또는 catabolite repression도 받지 않는 것으로 보였다. 한편 sucrose 첨가배지에서는 효소활성과 균 성장이 모두 좋지 않아 *Acremonium*의 경우(16)와 같이 일부 균에서 invertase에 의해 sucrose가 초기에 당 공급원으로 사용되는 현상은 보이지 않았다.

b) 과피 침투시 효소생성 양상

실제 lemon 과피 침투시 *P. sp.-L4* 균주의 분해효소 작용을 살펴보기 위하여 직접 균을 감염시킨 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이, 감염 및 세포벽 분해가 시작되는 부위인 lesion 1에서 β -glucosidase와 CMCase activity가 높고 PGase activity가 낮은 반면 lesion 2, 3으로 갈수록 비율이 반전되어서, 감염된지 오래되어 조직붕괴(tissue maceration)이 많이 진행된 lesion 4에서는 β -glucosidase와 CMCase에 비해 PGase의 activity가 급격히 높아지는 현상을 나타내었다. 이러한 현상으로 보아 β -glucosidase와 CMCase의 작용, 특히 β -glucosidase의 작용이 감염시 균의 초기 침투에 중요하고, 이어서 생성되는 PGase가 조직붕괴에 주로 작용하여, 전체적으로 이들의 상승작용에 의해 균의 감염이 가속화 되는 것으로 판단된다.

효소 안정성 및 최적작용 pH

Lesion 부위별 효소활성도의 차이가 실제 효소 생성량의 차이인지 또는 장기간 배양에 의한 효소의 안정성 저

Table 2. Effects of carbohydrates^a on the production of hydrolytic enzymes of *Penicillium sp.-L4*.

Carbohydrates added	Enzyme activity ^b (units/ml)			
	CMCase	PGase	β -glucosidase ^c	Cellobiase
No added	150	183	105	90
Glucose	20	23	30	28
Raffinose	27	30	43	33
Galacturonic acid	33	15	55	40
Sucrose	50	55	65	70
Cellobiose	220	255	155	143
Cellotriose	245	260	193	145
Cellotetraose	225	243	178	143

^aEach carbohydrates (0.2%, w/v) were added to Czapek medium containing 0.5%(w/v) CMC and PG as carbon sources. ^bEnzyme activities were measured after 72 hrs cultivation. ^cPNPG hydrolyzing activity was measured.

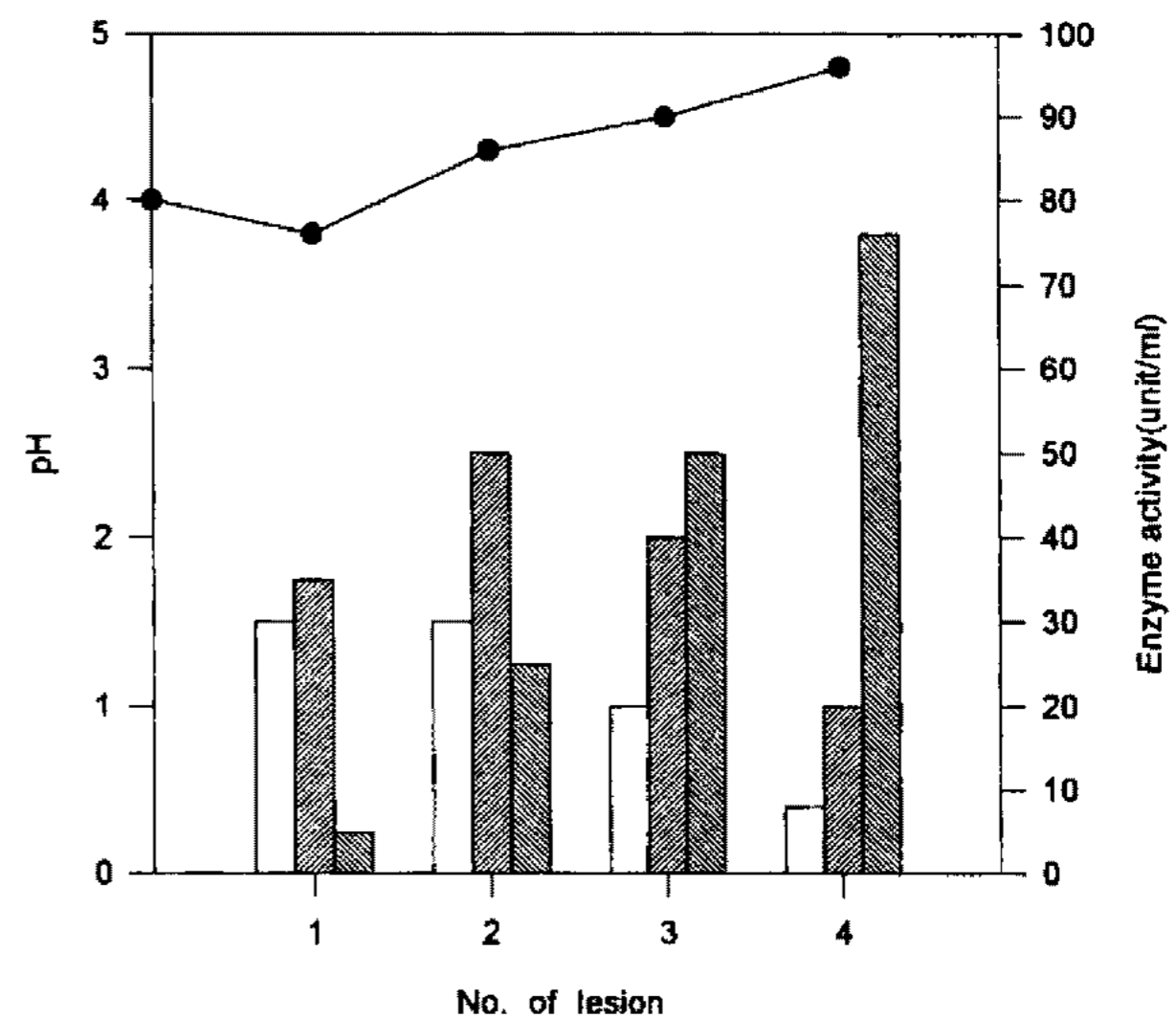


Fig. 4. Profiles of hydrolytic enzyme production by *Penicillium sp.-L5* in lesions of lemon peel.

Spores (1×10^6) of *Penicillium sp.-L4* were inoculated on a spot on lemon peel, and the infected lemon was incubated at 26°C for 7-10 days. Symbols: ●—● pH, □ β -Glucosidase, ▨ CMCase, ▩ PGase.

하에 의한 것인지 확인하기위해 각 부위의 효소안정성을 실험한 결과, Table 3에 나타난 바와 같이 전체적으로 약 30-50%의 활성이 저하되었으나 이는 각 lesion에 따른 효소활성도의 차이, 특히 PGase의 큰 차이에 비해서는 상당히 적은 것이었다. 따라서 과피 침투시기별 각 부위의 효소 활성도 차이는 효소안정성에 의한 것이라기 보다는 효소생성량의 차이인 것으로 판단되었다.

효소의 최적작용 pH는 Table 4에 나타난 바와 같이 β -glucosidase 경우 산성인 pH 3-4에서 가장 활성이 좋았으며 CMCase, PGase의 순서로 최적 pH가 점차 상승하였다. 이들 최적 pH는 lesion 자체의 pH와 효소 생성량의 관계와도 일치하는 것으로서(Fig. 4) lesion 부위별 효소의 activation과 productivity가 비례하는 것으로 나타

Table 3. Stabilities of hydrolytic enzymes produced in lesions by *Penicillium sp.-L4*

Lesion	Enzyme	Residual enzyme activity ^a (%)
Lesion 1	CMCase	60
	PGase	53
	β -glucosidase ^b	73
	Cellobiase	70
Lesion 4	CMCase	65
	PGase	70
	β -glucosidase ^b	48
	Cellobiase	48

^aEnzyme solutions extracted from lesions of lemon peel were incubated for 4 days at 26°C. ^bPNPG hydrolyzing activity was measured.

Table 4. Relative activities for optimal pH of hydrolytic enzymes^a produced in lesion by *Penicillium sp.-L4*

pH	β -Glucosidase ^b	CMCase	PGase
3	100	90	70
4	100	100	88
5	93	94	100
6	85	85	100

^aEnzyme solutions were extracted from total lesions of lemon peel. ^bPNPG hydrolyzing activity was measured.

났다. 일반적으로 진균에 의한 식물 또는 과실의 감염 및 변패는 세포벽의 구성분인 cellulose, pectin, xylan 등의 분해효소가 주로 작용하는 것으로 생각되어 왔다. 그러나 분해효소의 종류, 생성량 및 작용순서 등은 각 병원균 및 기주 식물의 종류와 감염 부위에 따라 많은 차이를 보이고 있어, Mount 등(22)에 의하면 *Erwinia carotovora*의 감자조직 감염시 endopolygalacturonate trans-eliminase가 조직붕괴와 세포사멸의 주원인이라 하였으며, Lisker 등(23)에 의하면 *Rhizoctonia solani*의 bean 감염시 polygalacturonase, cellulase, pectin lyase의 순서로 작용한다는 보고가 있는 반면, Bateman(24)은 같은 *Rhizoctonia solani*의 bean 감염시 감염능에는 pectinase보다 cellulase가 주로 관여한다고 하였으며, 최 등(25)은 *Botrytis cinerea*에 있어서 pectinase의 생성과 감염능 간에 상관관계가 나타나지 않는다고 보고하는 등 종에 따라 상이한 결과가 보고 되었다.

본 실험에서 β -glucosidase가 *Penicillium sp.-L4*의 감염 초기에 주로 생성된다는 결과는 최근 외생균근류(ectomycorrhizal fungi)인 *Pisolithus tinctorius*의 식물체 침투시 β -glucosidase가 초기에 중요하게 작용한다는 보고(14) 및 *Botrytis cinerea*의 apple 감염시에 β -glucosidase가 감염능을 결정짓는다는 보고(15)와 일치하는 것으로서, *Penicillium sp.-L4*의 감염시 β -glucosidase가 key enzyme으로 작용하며 이 효소의 조절이 전체적인

분해효소의 생성과 감염기작에 중요할 것으로 판단된다. 이는 일반적으로 β -glucosidase가 cellobiose의 분해 뿐 아니라 cellooligosaccharides 및 salicin, arbutin, PNPG, ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside), laminariobiose 등 다양한 기질에 작용할 수 있고(26), 식물체의 구성분으로서 존재하면서 분해하기 어려운 aryl-compound 또는 water insoluble material의 분해촉매로서 작용이 용이하다는 특성(27, 28)에 의해, 감염 초기 β -glucosidase에 의해 생성된 저분자 당이 energy source로 작용하여 포자발아 또는 균 성장과 cellulase, pectinase 등의 분해효소 생성을 유도하는 것으로 추정할 수 있다. 또 β -glucosidase는 cellulase의 작용에 의해 생성된 산물을 가수분해하여 glucose화 함으로서 cellobiose에 의한 cellulase의 활성억제를 방지함과 동시에, 효소와 기질의 농도에 따라서는 가수분해 작용 뿐 아니라 transglycosidation 작용에 의해 새로운 물질을 형성하며(28, 29, 30), 이 때 형성된 물질이 inducer로 작용하여 cellulase, pectinase 등 이차적인 분해효소의 생성을 유도할 수 있을 것으로 추정된다.

요 약

감귤류 저장시 발생하는 변패의 원인균으로서 *Penicillium sp.-L4*를 분리하여 이균이 lemon 감염시에 생성하는 식물세포벽 분해효소의 작용양상을 조사하였다. 최소배지에서 carboxymethylcellulose(CMCase), polygalacturonidase(PGase) 및 extra- & intracellular β -glucosidase, cellobiase 등의 활성이 기질에 의해 급격히 높아졌다. 이들 효소의 생성은 모두 cellobiose, cello-triose, cellotetraose 등의 cellulose 분해산물에 의해 효과적으로 유도되었으며 단당류인 glucose, raffinose, galacturonic acid 등에 의해 억제 되었다. 세포외 효소에서는 상대적으로 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) 분해능이 cellobiose 분해능보다 높은 반면, 세포내 효소에서는 반대되는 것으로 나타났다. 실제 *Penicillium sp.-L4*의 lemon 과피 침투시의 효소는 초기에 β -glucosidase 및 CMCase가 주로 생성되었으며 이어서 PGase가 생성되어, 균의 감염초기에 β -glucosidase의 작용이 중요하며 CMCase와 PGase의 순서적 작용에 의해 전체적인 감염과 조직붕괴에 상승효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 각 효소의 최적작용 pH와 효소가 최대로 생성되는 lesion 부위의 pH는 일치하는 경향을 보였다.

감사의 글

본 연구의 일부는 서울대학교 분자미생물학 연구센터의 지원을 받아 수행하였다.

참고문헌

1. Goodwin, T. W. and E. I. Mercer. 1983. The plant cell wall. Pp 55-91. In *Introduction to plant biochemistry*(2nd ed.), Pergamon Press, Great Britain.
2. Baron, C. and P. C. Zambryski. 1995. Notes from the underground: highlights from plant-microbe interactions. *Trends Biotechnol.* **13**: 356-362.
3. 山口 勇, 植草 秀敏. 1996. 植物病原糸狀菌による宿主植物の認識と感染. 防菌防微. **24** 119-129.
4. Bashan, B., R. S. Levy, M. Cojocar and Y. Levy. 1995. Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exerohilum turcicum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**: 225-235.
5. Dutton, M. V. and C. S. Evans. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in soil environment. *Can. J. Microbiol.* **42**: 881-895.
6. Flaishman, M. A., C.-S. Hwang and P. E. Kolattukudy. 1995. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Collectrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**: 103-117.
7. Gilbert, R. D., A. M. Johnson and R. A. Dean. 1996. Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **48**: 335-346.
8. Landecker, E. M. 1982. Fungi as parasites of plants. Pp 466-478. In *Fundamentals of the fungi*(2nd ed.), Prentice-Hall, USA.
9. Cairney, J. W. G. and R. M. Burke. 1994. Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. *Mycol. Res.* **98**: 1345-1356.
10. Mishra, C., M. Rao, R. Seeta, M. C. Srinivasan and V. Deshpande. 1984. Hydrolysis of lignocellulose by *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 370-373.
11. Peltonen, S. 1995. Comparison of xylanase production by fungal pathogens of barley with reference to *Bipolaris sorokiniana*. *Mycol. Res.* **99**: 717-723.
12. Fisher, M. L., A. J. Anderson and P. Albersheim. 1973. Host-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **51**: 489-491.
13. Wallner, S. J. and H. L. Bloom. 1977. Characteristics of tomato cell wall degradation *in vitro*. *Plant Physiol.* **60**: 207-210.
14. Cao, W. and D. L. Crawford. 1992. Purification and some properties of β -glucosidase from ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. *Can. J. Microbiol.* **39**: 125-129.
15. Sasaki, I. and H. Nagayama. 1996. β -Glucosidase from *Botrytis cinerea*: Its involvement in the pathogenicity of this fungus. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 54-56.
16. Lam, C. K., F. C. Belanger, J. F. White Jr. and J. Daie. 1995. Invertase activity in *Epichloe/Acremonium* fungal endophytes and its possible role in choke disease. *Mycol. Res.* **99**: 867-873.
17. Lam, L. K. T., J. Zhang and S. Hasegawa. 1994. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technol.* **48**: 104-109.
18. Verheij, E. W. M. and R. E. Coronel. 1992. Plant resources of southeast asia. Pp 119-140, 325-326. In *Edible fruits and nuts*(ed.), Prosea, Indonesia.
19. Samson, R. A., E. S. Hoekstra and C. A. N. Van Oorschot. 1981. *Introduction to food-born fungi*(ed.), Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherland.
20. 宇田川 俊一. 1991. 眞菌の分離と分類, 同定-Penicillium 屬. 防菌防微. **19**: 657-665.
21. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Biochem.* **28**: 353-360.
22. Mount, M. S., D. F. Bateman and H. G. Basham. 1970. Induction of electrolyte loss, tissue maceration, and cellular death of potato tissue by an endopoly-galacturonate trans-eliminase. *Phytopathology.* **60**: 924-931.
23. Lisker, N., J. Katan and Y. Henis. 1975. Sequential production of polygalacturonase, cellulase, and pectin lyase by *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* **21**: 1298-1304.
24. Bateman, D. F. 1964. Cellulase and the Rhizoctonia disease of bean. *Phytopathology.* **54**: 1372-1377.
25. 최인실, 정영륜, 조광연. 1995. 잿빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea* 균주의 분리기 주별 표현형적 특성, 병원성 및 약제저항성 변이. 한국균학회지. **23**: 246-256.
26. Funaguma, T. and A. Hara. 1988. Purification and properties of two β -glucosidase from *Penicillium herquei* Banier and Sartory. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 749-755.
27. Sengupta, S. and S. Sengupta. 1990. β -Glucosidase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 309-314.
28. Woodward, J. and A. Wiseman 1982. Fungal and other β -D-glucosidase; their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 73-79.
29. Gusakov, A. V., A. P. Sintisyn, G. H. Goldstein and A. A. Kylosov. 1984. Kinetic and mathematical model of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by cellobiase. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 275-282.
30. Tanaka, T. and S. Oi. 1985. Interaction of the β -transglycosylase of *Trichoderma longibrachiatum* with cellulose. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 939-944.

(Received 7 November 1996)