

Protopectinase 생산균주, *Rhizopus* sp. R2의 분리 및 감자조직의 단세포화를 위한 최적조건

이승철 · 고보성 · 김향미 · 김기운 · 황용일*

경남대학교 공과대학 식품공학과

식물조직을 분해하여 단세포화하는 효소, protopectinase를 생산하는 다수의 미생물을 토양에서 분리하였다. 이들 분리된 미생물의 배양액에서 얻어진 조효소를 감자조직에 처리하여 단세포화된 감자세포를 확인할 수 있었다. 이들 미생물 중에서 비교적 높은 protopectinase의 효소활성을 보이는 균주를 선택하여 형태관찰 결과로부터 *Rhizopus* sp.임을 알 수 있었다. 선별된 균주 *Rhizopus* sp. R2의 배양액에서 얻어진 protopectinase를 이용하여 감자조직의 단세포화를 시도하여 40°C, pH 4 하에서 최적의 효소반응 조건을 보였다.

KEY WORDS □ Protopectinase, *Rhizopus* sp., 단세포화

식물의 세포벽은 cellulose가 주성분이며, hemicellulose, pectin substance 등이 함유되어 있다. 이들 세포벽 구성 탄수화물들은 식물체의 생육시기와 밀접한 관계를 유지하여 조직의 경도를 조절한다. 일반적으로 야채류는 생육초기는 연하고, 성숙함에 따라 단단하게 되고 노화하면 외피 등에 큐티클층을 형성하여 한층 단단해진다. 과일의 경우 일반적으로 생육초기는 단단하고, 성숙함에 따라 부드러워져 수확기에는 연화의 조짐을 보이며 먹기에 적당하게 된다(5). 세포벽 구성 탄수화물의 대사에 관여하는 효소들은 식물성 식품소재의 가공공정에 이용될 수 있으며, 특히 cellulase, pectinase 등은 주스 가공과 펄레와 같은 다량의 수용성 고형분 함유 식품의 제조에 있어 수율 향상과 함께 가공공정의 효율성을 제공하고 있다(4).

펙틴질은 식물조직 중에 폭넓게 분포하며, galacturonic acid와 methoxylation된 유도체들을 주성분으로 하는 heteropolysaccharide이다. 펙틴질은 세포벽에서 운할작용 또는 점착 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 과일의 숙성, 식품가공에서의 역할, 영양성 섬유로서의 기능 등이 밝혀져 있다. Campbell과 Palmer(1)는 펙틴질을 화학적, 물리적 성상에 따라 protopectin, pectin(pectinate), pectic acid(pectate) 등으로 나누었는데(Fig. 1), 이들은 서로 밀접한 관계를 갖는다. Protopectin은 불용성으로 펙틴의 모체가 되며, 식물세포에 있어 세포와 세포간의 중첩부(middle lamella)의 주성분을 이루고 있으며, 식물체가 숙성됨에 따라 일부가 가용성 펙틴으로 전환된다. Protopectin은 펙틴에 비해 매우 큰 분자량을 가지며, 카르복시기와 세포벽의 다른 성분들의 수산기와 에스테르 결합을 형성한다. Protopectin을 제한 가수분해하여 식물조직을 단세포화하며 수용성 펙틴을 생산하는 효소를 pectin-releasing enzyme, protopectin-solubilizing enzyme, 또는

protopectinase(PPase)라 명하며, 여러 연구에 의해 그 작용기작과 종류가 분류되었다(7, 9, 10, 11). PPase의 기원은 매우 다양하며 특히 식물의 부패에 관여하는 미생물에 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 그 작용부위는 cellulose와 결합된 펙틴의 중성당 결사슬을 분해하거나, homogalacturo-

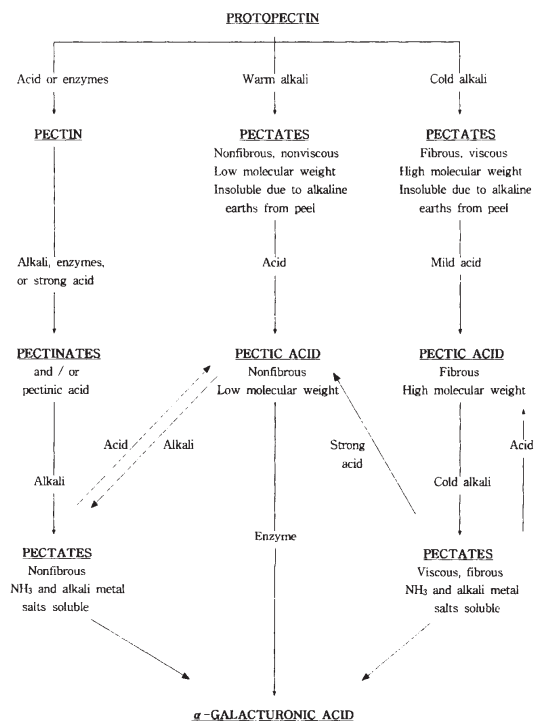


Fig. 1. Interrelationship of the pectic substances.

*To whom correspondence should be addressed

nan 부분을 분해한다(3). PPase는 최근 식품, 의약품에서의 pectin 생산(6, 8), 식물성 식품소재의 조제를 위한 단세포화(13, 14), 식물세포의 protoplast 생산(3, 12) 등에 응용성을 가진다고 보고되었으나, 국내에서의 연구는 미미한 실정이다.

한편, 현재까지 알려진 PPase 생산균주는 주로 곰팡이로 *Aspergillus niger*, *Asp. saitoi*, *Asp. sojae*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus* sp. 등이다. Takahashi 등(13)이 *Rhizopus* sp.에서 공업적으로 활용가능한 PPase의 분리를 보고한 반면, 이를 제외한 여타 분리 균주들은 높은 pectinase와 cellulase의 활성을 지니고 있어 단세포화 반응시 세포의 부분적인 파괴가 동반된다. 이외에도 *Saccharomyces fragilis*, 고초균 등에서 PPase 활성에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 과일 및 채소류를 PPase 처리함으로써 이용성을 높이고 저장성이 뛰어난 단세포화 원료물을 제조하는 가공식품화를 목적으로, 이러한 다양한 응용성을 지닌 PPase를 생산하는 곰팡이를 토양으로부터 탐색하였다. 또한 이들 분리균주가 배양액에 PPase를 생산함을 효소의 정량적인 활성측정과 더불어 얻어진 조효소액을 이용한 감자전분의 단세포화를 통하여 확인하였으며, 이들 효소에 의한 감자조직의 단세포화를 위한 반응최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용된 pectinase, cellulase, hemicellulase, carboxymethyl cellulose, locust gum, pectin 등은 Sigma사에서 구입하였으며, 식물의 단세포 제조를 위한 비교 표품 PPase는 일본의 Yakult 사의 MACEROZYME R-10을 구입하여 사용하였다. 미생물의 생육배지용 시약은 Difco사에서 구입하였으며, 기타 시약은 특급품을 사용하였다.

PPase 생산균주의 분리

PPase 생산 균주를 탐색하기 위하여 경남 마산 청과 시장과 마산 부근의 야산 등에서 토양을 채취하였다. 채취한 토양시료를 생리 식염수로 3단 희석하여 분리용 배지(왕겨-mineral 배지; 왕겨추출물 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, KH_2PO_4 0.3%, KCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01%, agar 2%, pH 5.5)에 상기 시료 현탁액을 도말하여 30°C에서 2일 동안 배양한 후 형태적으로 *Rhizopus* sp.의 특징을 보이는 곰팡이를 1차 선별하였다. 1차 분리된 균주는 potato dextrose agar 배지(PD 배지; pH 5.5)에서 다시 배양하여 형태와 특성을 조사하였다. PPase 생산균주의 확인은 1차적으로는 배양액에 이용하여 식물세포 조직에 대한 단세포 생산을 정시적으로 확인하였으며, 2차적으로 protopectin의 분해에 의하여 유리된 pectin을 정량적으로 확인하였다.

조효소 제조

분리균주로부터의 효소액의 조제는 각각의 균주를 PD액 배지에서 전배양한 배양액을 접종하여 왕겨배지(왕겨: 수돗물=60:40, 30분간 증기멸균)에서 30°C로 4일간 정치 배양하였다. 배양 후 배지의 2.5배에 해당하는 40°C 온수를 가

하여 교반하여 탈지면을 이용하여 여과한 후 원심분리하여 상등액을 얻어 조효소액으로 이용하였다. 이후 상등액의 55%에 해당하는 아세톤을 서서히 첨가하여 하룻밤 정치한 후 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물은 동결건조기에서 건조하여 건조분말상태로 회수하여 조효소로 이용하였다.

PPase에 의한 단세포화 활성 측정

PPase에 의한 식물조직의 단세포화 활성은 감자의 직경변화를 통한 붕괴도측정법(13)을 이용하여 상대적인 활성도를 측정하였다. 측정은 PD 액배배지의 배양액에 직접 이용하는 방법과 조효소 건조 분말을 50 mM citrate buffer(pH 4.0)에 용해하여 이용하는 방법에 대해 각각 실시하였다. 배양액을 직접 이용한 경우는 배양액을 10% 구연산 용액을 이용하여 pH 4로 보정한 후 50 ml에 감자를 직경 $1 \times 1 \times 1$ cm로 절단하여 다섯조각 넣은 후 시간에 따른 직경변화를 측정하고 단세포화 정도는 현미경을 이용하여 1시간 간격으로 관찰하였다. 조효소 건조분말을 이용한 경우는 조효소 건조분말을 1%가 되도록 용해한 후 효소용액 50 ml에 대해 전과 같은 방법으로 실시하였다.

PPase 활성 측정

PPase 활성은 protopectin으로부터 유리되는 pectin의 양을 carbazole-sulfuric acid 방법에 의해 측정하였다(10). 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 2 ml에 protopectin 10 mg을 넣은 후 효소액 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 얼음속에서 반응을 중지시켰다. 반응액을 Toyo filter paper No. 2로 여과하고 이 중 0.5 ml를 취하여 32 N 황산과 0.5 ml의 0.2% carbazole 용액을 첨가한 후 80°C 항온 수조에서 20분간 반응시키고 525 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 unit는 반응 혼합물 ml당 유리되는 D-galacturonic acid의 μmol 로 나타내었다. 이때 사용된 protopectin은 Sakai와 Okushima의 방법에 따라 제조되었다(7).

Cellulase 활성 측정

Cellulase 활성은 carboxymethyl cellulose(CMC)를 기질로 이용하여 유리되는 환원당의 양을 측정하여 확인하였다(2). 0.05 M citrate buffer(pH 5.5)에 CMC가 1%가 되게 녹인 기질용액 0.5 ml와 조효소액 0.5 ml를 잘 혼합하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 30분 후 100 μl 를 취해 dinitrosalicylic acid 시약 1 ml를 가하고 끓는 물에서 5분간 열처리한 후 원심분리(900 g, 10분, 4°C)하여 상등액을 얻었다. 흡광광도계를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hemicellulase 활성 측정

Hemicellulase 활성은 Locust bean(Galactomannan polysaccharide)으로부터 유리되는 환원당(D-galactose)을 측정하여 확인하였다(2). 조효소액 0.5 ml에 0.05 M citrate buffer(pH 5.5)에 Locust bean을 1%가 되게 녹인 기질용액을 0.5 ml 가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 30분 후 100 μl 를 취해 dinitrosalicylic acid 시약 1 ml를 가하고 끓는 물에서 5분간 열처리하고 원심분리(900 g, 10분, 4°C) 후 상등액을

언어 흡광광도계 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Pectinase 활성 측정

Pectinase 활성은 pectin을 가수분해하여 생기는 점도의 감소를 측정하여 확인하였다(10). 2% 기질용액 10 ml에 효소액 1 ml를 넣은 후 30분간 반응시키고 반응 후 점도의 감소를 Bruckfield 점도계를 이용하여 감소정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

생산균주의 선별

PPase는 식물 세포벽의 불용성 protopectin을 선택적으로 분해하여 가용성 pectin화하여 세포간 접착을 저해하므로 세포가 조직으로부터 유리되어 단세포화된다(4). Takahashi 등의 연구(13)에 따라 *Rhizopus* 속의 곰팡이로부터 비교적 PPase 생산능이 우수한 균주가 분리됨에 착안하여 분리용배지에서 생육시의 형태적인 특징을 중심으로 1차적으로 선별하였다. 먼저, 토양을 분리원으로 하여 왕겨추출물을 주성분으로 하는 분리용 배지상에서 생육이 가능한 약 50주의 *Rhizopus* sp.의 형태적인 특징을 보이는 곰팡이를 분리하였다. 이들 1차적으로 분리된 곰팡이를 대상으로 PPase의 생산능을 조사하였다. PPase의 생산능은 왕겨배지에서 각 균주를 이용하여 30℃에서 4일간 정지배양하여 얻어진 배양여액을 이용하여 식물조직으로부터 단세포 생산능력으로 확인하였다. Fig. 2는 감자조직에 PPase 생산능을 지닌 분리균주의 조효소액을 처리한 결과의 일부로서, PPase의 감자조직에 대한 반응결과로 유리된 감자세포를 현미경으로 확인할 수 있었다. PPase 생산균주 중에서 상대적으로 높은 단세포화 활성을 보이는 6주의 균주를 선별하여 향후 실험에 이용하였다.

선별균주의 특징

상기 실험의 결과로 선별된 6주의 PPase 생산균주의 형태적인 특징을 조사하였다. 각각의 균주를 PD평판배지상에서 30℃로 배양하며 광학현미경을 통해 생육주기를 통한 형태적인 변화를 관찰하였다. 그 결과, 이들 균주는 균사에 격막

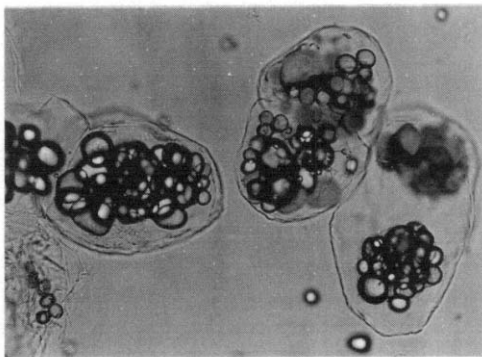


Fig. 2. Microphotograph of separated potato cells (×100) by treating potato tissue with crude enzyme from isolated *Rhizopus* sp. strains.

이 없고 포복지와 가운을 왕성하게 형성하였으며 colony는 회갈색을 띠었다. 그리고 포자 및 포자낭의 형상은 구형의 포자낭과 포복지의 결합부에 둘 이상의 포자낭병을 가지고 있어 *Rhizopus* 속의 형태학적 특성을 보였다. 분리된 50주의 곰팡이 중 15주 정도가 식물조직을 단세포화할 수 있는 PPase를 생산하는 것으로 조사되었다. 이러한 분리비용은 토양 곰팡이 중에서 *Rhizopus* 속이 다른 속의 곰팡이에 비하여 우수한 PPase의 생산능을 지니는 것으로 추측되며, 이는 Takahashi의 연구 결과(13)와도 일치하였다.

Cellulase, hemicellulase, pectinase 활성 조사

생산된 PPase를 이용하여 조제된 식물조직의 단세포화물을 식품에 응용하기 위해서는 선별균주로부터 생산된 조효소 중에는 세포벽 분해에 관여하는 cellulase, hemicellulase, pectinase 등의 활성이 미약하거나 함유되어 있지 않아야 유리하다. 이들 세포벽 분해효소들은 식물체의 세포벽을 분해하여 세포막만을 지닌 protoplast 상태의 단세포를 생성하며, 이들은 건조나 살균 등의 외부 조건의 급격한 변화에 따라 쉽게 파괴될 수 있다.

PPase, 그리고 표품 cellulase, hemicellulase, pectinase를 이용하여 효소활성을 비교하였다. 조효소를 이용한 pectinase, cellulase, hemicellulase 및 PPase의 활성을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 이들 중에서 시판의 PPase R10과 효소 비활성에서 큰 차이를 보이지 않으며 다른 균주들에 비하여 pectinase, cellulase, hemicellulase 활성이 비교적 미약한 균주인 R2를 선정하여 배양한 후 얻어진 조효소를 이용하여 식물조직의 단세포화를 위한 효소반응조건을 검토하였다.

PPase에 의한 감자조직의 단세포화에 미치는 pH의 영향

본 실험에서 분리된 *Rhizopus* sp. R2의 배양액으로부터 조제된 PPase 조효소의 효소반응에 대한 pH의 영향을 검토하였다. 조효소 분말을 1%로 하여 pH를 달리한 반응액을 조성하여 감자 절편의 감소, 즉 PPase에 의한 단세포의 생성정도를 조사하였다. 감자를 10×10×10 mm로 절단한 후, 40℃에서 R2 균주의 조효소 분말액으로 처리하여 시간별로

Table 1. Activities of each crude enzyme prepared from culture filtrate of six screened *Rhizopus* sp. strains

Activity ¹⁾ (units/mg)	Pectinase	Cellulase	Hemicellulase	Protopectinase
Strain				
CSE ²⁾	4	2	3	10
R1	3	2	2	5
R2	2	1	3	8
R4	3	2	1	6
R13	3	1	2	6
R22	2	1	2	6
R25	2	1	3	7

¹⁾Specific activity (units/mg protein) which is an average of duplicate measurements.

²⁾Protopectinase purchased as macerozyme-R10 from Yakult Co., Japan.

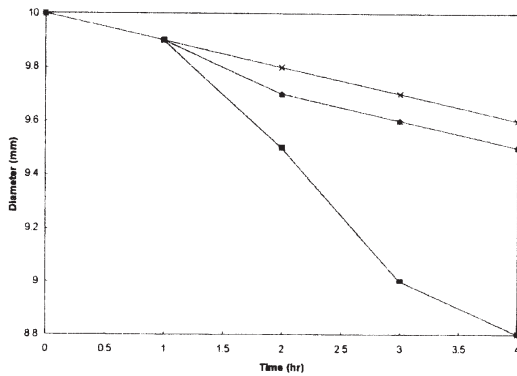


Fig. 3. Effect of pH on cell separating activity of protopectinase prepared from culture filtrate of *Rhizopus* sp. R2. ◆ pH 3, ■ pH 4, ▲ pH 5, × pH 6

감자절편의 크기의 측정과 반응액 중의 단세포 생성을 현미경을 통하여 관찰하였다. Fig. 3에서와 같이 조효소 처리후 1시간까지는 pH에 대한 의존성을 보이지 않으나, 1시간 이후부터 pH에 따라 PPase의 활성에 의한 감자조직의 붕괴도의 차이가 관찰되었다. pH 3과 pH 5에서는 유사한 붕괴도를 보이며, pH 6에서는 낮은 효소활성이 시간에 따라 1차반응적인 직선의 감소형태를 보였다. 한편 pH 4에서는 반응개시 1시간 이후부터 급속한 감소경향을 보였다. 이와 함께 대조 실험으로 각각의 효소반응액을 100°C, 30분간 열처리하여 PPase를 불활성화시킨 경우에는 반응액 중의 감자조직변화는 공히 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 식물세포의 단세포화를 위한 최적 활성조건이 pH 4임을 확인하였다. 한편, Takahashi(13)에 의하여 분리된 균주, *Rhizopus* sp. No. 10으로부터 회수된 조효소액에서의 PPase에 의한 감자조직의 붕괴도는 pH 4 부근에서 최고였으나 pH 3보다 pH 5에서의 붕괴도는 오히려 높았다. 이에 대하여 본 실험에서 분리된 균주로부터의 활성은 pH 3과 pH 5에서 유사한 활성을 보이는 것과 비교할 때 분리된 균주의 차이에서 기인하는 것이라고 추정된다.

PPase의 단세포화에 미치는 온도의 영향

Rhizopus sp. R2에서 생산된 PPase가 식물조직의 단세포화에 미치는 온도의 영향을 알기 위하여 효소반응액에 대한 pH를 최적조건인 pH 4로 조정하여 각 온도별 영향을 검토하였다. PPase의 온도에 따른 활성은 1% 조효소 분말액을 이용하여 감자절편을 처리함으로써 조사하였다. Fig. 4에서 보이듯이 반응온도 20°C와 30°C에서는 PPase가 미미한 활성을 보인 반면, 반응온도 40°C와 50°C에서는 PPase 작용에 의하여 뚜렷한 감자절편의 감소, 감자의 붕괴도를 보였으며 현미경 관찰에서도 전체 효소반응액 중에 단세포화된 감자의 세포를 볼 수 있었다. 특히 40°C에서 최고의 PPase 활성을 나타내어 분리균주의 PPase의 최적 반응온도는 40°C임을 확인하였다. 각 온도별 대조실험을 위한 불활성화된 PPase의 반응액에서는 반응액 중의 감자조직 변화는 없었다. 한

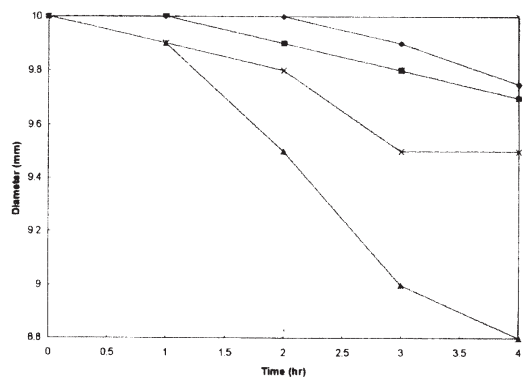


Fig. 4. Effect of temperature on cell separating activity of protopectinase prepared from culture filtrate of *Rhizopus* sp. R2. ◆ 20°C, ■ 30°C, ▲ 40°C, × 50°C

편, Takahashi(13)에 의하여 분리된 균주, *Rhizopus* sp. No. 10의 PPase의 단세포화 활성은 45°C에서 최고였으며 30°C에서와 50°C에서의 활성은 유사한 값을 보였다. 한편, *Rhizopus* sp. R2에서 얻어진 PPase 조효소를 이용하여 상기 실험에서 얻어진 반응조건으로 시금치, 당근, 차잎에 대한 단세포화를 시도하였다. 시금치와 당근은 감자와 유사한 정도로 각조직으로부터 단세포화물을 얻을 수가 있었다. 어린 차잎의 경우에는 비교적 단세포화가 간단히 이루어졌으나 잎의 노화가 진행됨에 따라 표면에 형성된 wax층으로 인하여 NaOH용액을 이용한 wax 제거 등의 전처리를 필요로 하였다.

이상의 실험결과 토양으로부터 선별된 *Rhizopus* sp. R2의 PPase는 pH 4와 40°C에서 식물조직의 단세포화를 위한 최적 pH, 최적온도를 보임을 확인하였다. 이는 조효소 분말을 그대로 적용할 경우 최적의 조건으로 여겨지며 토마토 등의 일반주스류의 pH와도 유사하여 과일의 주스와 공정에 용이할 것으로 생각된다. 그리고 식물조직으로부터 단세포화를 통하여 얻어진 단세포화물물을 autoclave를 이용하여 5분간 처리하였을 경우에도 세포벽 성분에 의하여 안정하게 유지되어 채소류 특유의 색상을 지니고있어 다양한 이용가능성을 보였다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 1995년도 농업특정연구 개발사업비로 이루어진 연구결과의 일부로 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Campbell, L.A., and G.H. Palmer. 1978. In Topics in Dietary Fiber Research, (G.A. Spiller and R.J. Amen, eds.), p. 105-115. Plenum, New York and London.
2. Harwood, C.R., and S.M. Cutting. 1990. Molecular biological methods for *Bacillus*. pp. 380-382. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.

3. Leal, D.P., Isla, M.I., Vattuone, M.A., and A.R. Sampietro. 1994. Production of plant protoplasts by enzymes from selected wood-destroying fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 58-61.
4. Nakamura, T., R. Hours, and T. Sakai. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J. Food Sci.* **60**(3), 468.
5. Renard, C.M., A.G. Voragen, J.F. Thibault, and W. Pilnik. 1990. Studies on apple protopectin. I. Extraction of insoluble pectin by chemical means. *Carbohydr. Polym.* **12**, 9-25.
6. Sakai, T., and M. Okushima. 1980. Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**(4), 908-912.
7. Sakai, T., and M. Okushima. 1982. Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 667-676.
8. Sakai, T., M. Okushima, and M. Sawada. 1982. Some properties of endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum* SNO-3. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2223-2231.
9. Sakai, T., and S. Yoshitake. 1984. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reessii* strain L. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1941-1950.
10. Sakai, T., M. Okushima, and S. Yoshitake. 1984. Purification crystallization, and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1951-1961.
11. Sakai, T., and T. Sakamoto. 1990. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity on sugar beet protopectin. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 879-889.
12. Sakai, T., T. Sakamoto, J. Hallaert, and E.J. Vandamme. 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase ; production, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **39**, 213-294.
13. Takahashi, S., M. Kanke, H. Aihara, and T. Shimakawa. 1970. Studies on the utilization of microbial enzymes for food industry (Part 1); development of the macerating plant tissues. 愛媛總指報告 **8**, 45-53.
14. Tuttobello, R., and P.J. Mill. 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. II. Endopolygalacturonase. *Biochem. J.* **79**, 57-64.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: Isolation of *Rhizopus* sp. R2 Producing Protopectinase and Optimum Condition for Preparing Single Cells from Potato Tissues

Seung-Cheol Lee, Bo-Sung Ko, Hyang-Mee Kim, Ki-Woon Kim and Yong-II Hwang*
(Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea)

Several microorganisms capable of producing protopectinase, which catalyzes dissociation of plant tissue to single cells, were isolated from soils. Crude enzymes prepared from culture supernatants of the strains released potato cells as a single cell from potato tissues. One of the isolated strains showing higher activity of protopectinase was selected and identified as *Rhizopus* sp. from the morphological characteristics. For preparing single cells from potato tissues, optimum enzyme activity of protopectinase, which was prepared from culture filtrate of *Rhizopus* sp. R2, was observed at 40°C and pH 4.