

Tomato 成熟中 Pectin 酵素의 活性變化와 Polygalacturonase 의 分離 및 그 性質

徐且煥 · 孫泰華 · 崔鍾旭 · 崔相源

慶北大學校 農科大學 食品加工學科

Changes in Pectic Enzyme Activity during Maturation of Tomato Fruit and Purification, Some Properties of Polygalacturonase Isozymes

Suh, Cha Hwan · Sohn, Tae Hwa · Choi, Joung Uck · Choi Sang Won

Dept. of Food Science and Technology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

The changes in pectinesterase (PE) and polygalacturonase (PG) activities were investigated during maturation and ripening of tomato fruits. PG was isolated from ripe tomatoes and purified by using DEAE-sephadex A-50 column chromatography. Its property was examined by general methods. PE activity was increased during maturation and then peaked at the onset of color change. PG activity was not detectable in mature green tomato fruits but increased during softening. Slab electrophoresis of the crude enzyme isolated from ripe tomatoes showed 6 bands. Two polygalacturonase (PGI, PGII) were separated from crude enzyme of ripe tomatoes by chromatography on DEAE-sephadex A-50. PGI and PGII were purified by 61 fold and 98 fold by the present procedure, respectively. The Rm values of partially purified PGI and PGII were estimated to be 0.25 and 0.31, respectively. The optimum temp. and pH of PGI activity were 37°C and pH 4.5, while those of PGII activity were 40°C and pH 4.7, respectively. Isozyme PGI activity was the most stable at pH 4.3 and retained 50% of its activity when exposed at 78°C for 5 min.

結 論

Tomato 果實은 收穫後에도 追熟이 進行되어 着色, 着香 및 軟化 등의 현상이 일어나며 이러한 一連의 追熟作用은 果實內 代謝의 轉換에 영향을 미치는 酵素作用과 밀접한 관계가 있다.^{13), 22)}

果實의 追熟에 따라 일어나는 pectin 物質의 可溶化 現象은 pectin 酵素, 즉 不溶性 pectin의 glycoside 結合을 加水分解하는 polygalacturonase(PG)와 de-esterifying 酵素인 pectinase (PE)의 作用에 기인된 것으로 알려져 있다.

여러 果實에서 pectin 酵素의 有·無와 그 性質에 대하여 많은 報告가^{9), 20), 21)} 있으며 특히 追熟 現象이 빨리 進展되는 tomato 果實을 試料로 한 研究는 일찌기 Kertesz⁸⁾가 pectin 酵素의 性質을 규명한 데 이어 Hobson,⁵⁾ Pressey 등,¹⁹⁾ Swamura 등,²³⁾ Wallner 등²⁹⁾은 pectin 酵素와 tomato 果實의 軟化現象과의 관계에 대하여 報告하였다.

한편 Buescher 등,³⁾ Hobson,^{5), 6)} Tucker 등^{25), 26)}은 正常 tomato와 變異 tomato를 利用하여 각각의 pectin 酵素의 性質을 比較, 調査한 結果, pectin

酵素中 PE보다 PG가 果實의 軟化現象과 直接的인 관련이 있는 것으로 報告하였다. 특히 Ali等,¹⁾ Nakagawa等,^{10,11)} Tucker等^{27,28)}은 여러 tomato 果實에서 PE와 PG의 isozyme을 분리하여 그 性質을 調査한 바 品種에 따라 相異한 結果를 얻었다.

이와 같은 外國의 相當한 研究와는 달리 國內에서는 pectin 物質의 分離에 대하여 일부의 研究³⁰⁾는 發表된 바 있으나 果實의 成熟, 食品의 加工 및 貯藏中 pectin 物質의 可溶性 作用에 미치는 pectin 酵素에 관한 研究¹²⁾는 거의 없는 실정이다.

본 研究는 tomato 果實의 追熟 및 老化現象과 깊은 관련이 있는 pectin 酵素의 生理的 機能을 說明하는 基礎的인 資料로서 成熟 段階別로 pectin 酵素의 活性의 變化를 調査하고 아울러 pectin 物質의 可用化 作用에 주된 役割을 하는 PG의 分離, 精製 및 精製된 PG의 酵素學的 性質을 調査하였기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試材料

本 實驗에 使用한 tomato 果實은 大邱市 不老洞 所在 農園에서 露地栽培한 「強力美穗」를 1985年 5月부터 成熟 段階別로 收穫하여 外觀이 健全하고 重量이 150g 程度인 中果를 選別하여 供試材料로 使用하였다.

實驗方法

酵素의 抽出

Pressey와 Avants의 方法¹⁹⁾에 따라 實施하였다. 즉 tomato 果肉部 50g을 同量의 2.0M NaCl을 加해 磨碎한 後 磨碎液을 NaOH로 pH6으로 調整하고 난 다음 2時間동안 攪拌한 後 9,000×g에서 20分間 低溫遠心分離하여 얻은 上澄液 50ml를 0.15M NaCl로 一夜 재 반복 透析하여 粗酵素液을 얻었다.

酵素活性度 測定

PE와 PG의 活性度는 Pressy와 Avants의 方法^{18,19)}에 따라 다음과 같이 實施하였다.

PE 活性度는 1% pectin (pH 7) 10 ml, 0.125 M NaCl 40 ml 및 酵素液 0.5 ml를 混合한 反應液을 25℃에서 10分間 pH 7을 유지하는데 소비되는 0.005 N NaOH를 測定하였다.

酵素活性度の 單位는 25℃에서 10分間 1 μmole의 D-galacturonic acid를 分解할 수 있는 酵素의 量으로 表示하였다.

다음 PG의 活性度는 1% polygalacturonic acid (PGA) 0.5 ml, 0.15 M NaCl 0.4 ml 및 酵素液 0.1 ml를 混合한 反應液을 37℃에서 1時間 反應시킨 後 酵素作用에 의해 生成된 환원당을 Nelson-Somogyi 法³¹⁾에 준하여 520 mμ에서 比色 測定하였다.

이때 酵素活性 單位는 1時間에 1 μmole의 galacturonic acid를 生成하는 酵素量으로 定하였으며, 비활성도는 단백질 mg당 酵素의 單位로 表示하였다.

황산암모니아에 의한 蛋白質 分劃

上記 操作에서 얻어진 粗酵素液에 황산암모니아를 서서히 添加하여 攪拌하면서 40%로 飽和시켜서 12,000×g에서 20分間 遠心分離하여 얻은 上澄液에 다시 황산암모니아를 加하여 80%로 飽和시켰다.

이것을 遠心分離하여 酵素活性이 낮은 上澄液은 除去하고 沈澱을 모아서 10 ml의 0.15M NaCl (pH 6)으로 溶解시킨 후 同一한 溶液에서 하루밤 透析시켰다.

透析이 끝난 溶液의 不溶性 物質을 遠心分離하여 除去하고 上澄液을 다음의 精製用 酵素液으로 하였다.

DEAE-Sephadex A-50 Column Chromatography

DEAE-Sephadex A-50을 再蒸溜水에서 팽윤시킨 後 헤파틱시켜, 0.1 N HCl, 再蒸溜水, 0.1 N NaOH, 再蒸溜水의 順序로 洗滌하고 殘渣를 除去시켜 2×80 cm의 column에 충전시킨 後 0.15M NaCl (pH 6)으로 平衡을 이루게 한 다음 여기에 上記 酵素液 5 ml을 넣고 0.15 M NaCl (pH 6)으로 湧출시켰다. 이때 流出速度는 時間당 12 ml 이었고 分劃당 20 ml씩 모았다.

蛋白質의 定量

粗酵素液, 精製過程中的의 各 分劃 및 部分精製된 酵素의 蛋白質含量은 Bradford의 方法²⁾에 따라 Coomassie Brilliant Blue G-250을 使用하여 測定하였으며, 標準物質으로는 bovine serum albumin

을 使用하였다.

電氣泳動

電氣泳動은 Davis의 方法⁴⁾에 따라 10% poly-acrylamide slab gel (pH 8.9)와 tris-glycine 緩衝液 (pH 8.3)을 使用하여 40 mA에서 4時間 電氣泳動하였다.

電氣泳動 後 gel을 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 染色液으로 1時間 染色한 다음 7% acetic acid 溶液으로 脫色시켰다.

結 果

PE와 PG의 活性의 變化

Tomato 果實의 成熟中 PE와 PG의 活性은 Table 1에서 보는 바와 같이 果實의 追熟이 進行됨에 따라 增加하였으며 PE는 색깔 變化가 일어나는 시기에서 最大의 活性을 나타냈으며 완숙기 tomato가 綠熟期것보다 3배의 活性 增加를 보였다.

한편 PG의 活性은 綠熟期에서는 거의 無視할 정도의 낮은 活性을 나타냈지만 果實의 軟化가 進行되면서 活性이 增加하여 完熟期에는 綠熟期보다 약 145배의 活性 增加를 보였다.

Table 1. Pectinesterase and polygalacturonase activities in tomatoes during maturation

| stage | PE(units/ml) | PG(units/ml) |
|---------------|--------------|--------------|
| Green | 28 | 0.05 |
| Turning color | 118 | 0.38 |
| Medium ripe | 93 | 4.30 |
| Ripe | 89 | 7.21 |

粗酵素液의 電氣泳動

Ripe tomato에서 抽出한 粗酵素液을 電氣泳動시킨 結果, Fig. 1에서 보는 바와 같이 6개의 蛋白質 band를 나타냈으며, 그 중 Rm치가 0.18~0.31 사이에서 主分離帶를 나타내었다.

Isozyme의 分離와 精製

Ripe tomato의 PG isozyme을 分離, 精製하기 위하여 황산암모니아에 의한 蛋白質의 分劃, DEAE-

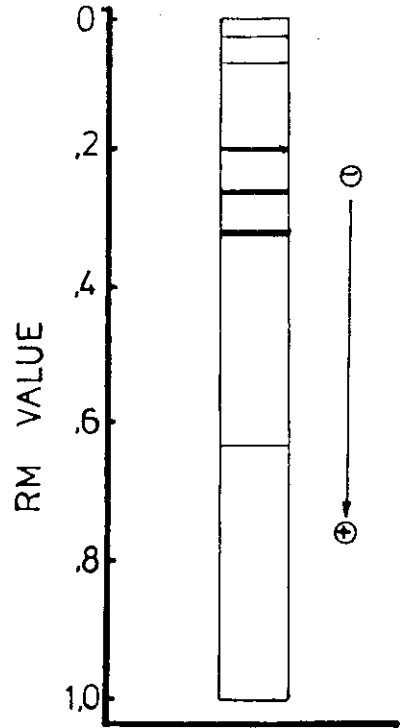


Fig. 1. Slab gel electrophoresis profile of protein bands of crude homogenate from ripe tomato.

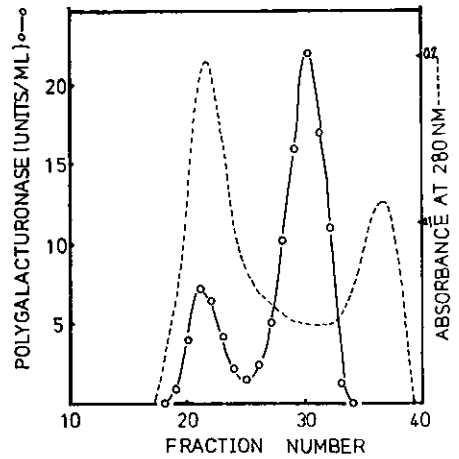


Fig. 2. DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography of ripe tomato extracts.

Table 2. Summary of purification of polygalacturonase from ripe tomato

| Fraction | Total activity (units) | Total protein (mg) | Specificactivity (U/mg) | Yield (%) | Purification (fold) |
|--|---------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------|------------------------|
| Crude extract | 2187.32 | 732.09 | 2.98 | 100 | 1 |
| 40-80% (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1597.40 | 198.39 | 8.05 | 73 | 2.7 |
| DEAE-Sephadex A-50 | | | | | |
| Fraction I | 148 | 0.82 | 180.49 | 6.78 | 60.57 |
| Fraction II | 440 | 1.51 | 291.39 | 20.14 | 97.78 |

sephadex A-50 column chromatography 한 결과는 Fig. 2 와 Table 2 와 같다.

Table 2에서 40~80% 飽和 황산암모니아로沈澱된 蛋白質 分割의 酵素活性도는 總活性도의 약 73%가 포함되어 있었고 crude homogenate에 比하여 약 3배 精製된 酵素溶液을 얻을 수 있었다.

이것을 DEAE-sephadex A-50 column chromatography로 分離한 結果 Fig. 2에서 보는 바와 같이 2개의 활성도 peak가 나타났으며, 이 중 첫번째 peak인 分割 21번을 Fraction I 또는 isozyme A로 하였으며 두번째 peak인 分割 30번을 Fraction II 또는 isozyme B로 하였다.

이 두가지 分割을 電氣泳動한 結果, protein band는 各各 1개로서 Rm값은 0.25와 0.31이며 精製하기 前의 粗酵素液을 電氣泳動하였을때와 같은 Rm값을 나타내었다. (Fig. 3)

이상과 같이 DEAE-sephadex A-50 column chromatography를 하여 얻은 isozyme I과 II는 각각 61배, 98배의 精製效果를 얻었다.

酵素學的 特性

最適 pH와 溫度

部分精製된 isozyme I와 II의 最適 pH를 調査하기 위하여 反應溶液의 條件과 酵素의 濃度를 일정하게 하고 37℃에서 pH를 變化시키며 酵素의 活性도를 調査한 結果, Fig. 4와 같이 isozyme I와 II는 각각 pH 4.5, pH 4.7에서 最大의 活性를 나타내었다.

이때 citrate緩衝液을 使用하여 pH 3.0에서 6.0까지 觀察하였다.

다음 最適 溫度를 調査하기 위하여 反應溶液의 條件과 酵素의 濃度를 일정하게 하고 pH 4.7에서 反應溫度를 20℃~80℃까지 溫度別로 5分씩 保持하였다.

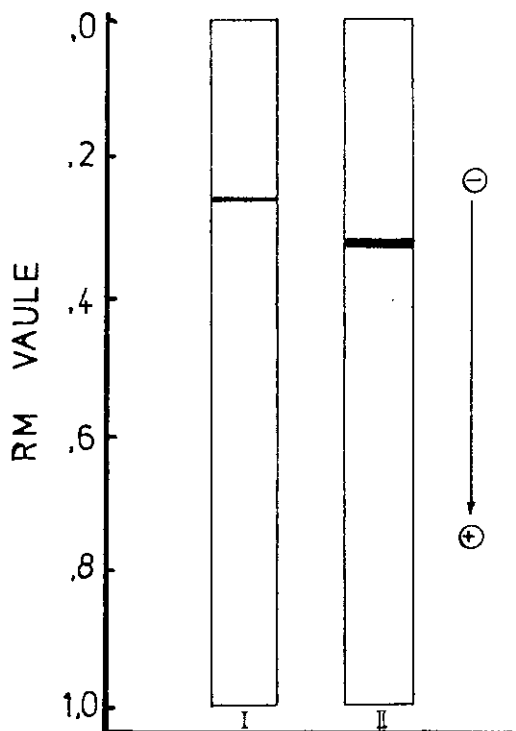


Fig. 3. Slab gel electrophoresis of the purified two isoenzymes, fraction and fraction II.

그 結果, Fig. 5에서 보는 바와 같이 isozyme I와 II는 각각 37℃, 40℃에서 最大의 活性를 나타내었다.

pH와 熱安定性

Isozyme I와 II의 pH와 熱安定性을 調査한 結果는 Fig. 6 및 Fig. 7과 같았다.

이때 pH安定性을 測定하기 위하여 基質을 citrate緩衝液을 使用하여 pH 2.0~7.0으로 조절하고 37℃에서 30分間 방치 후 酵素의 pH安定性을 調査

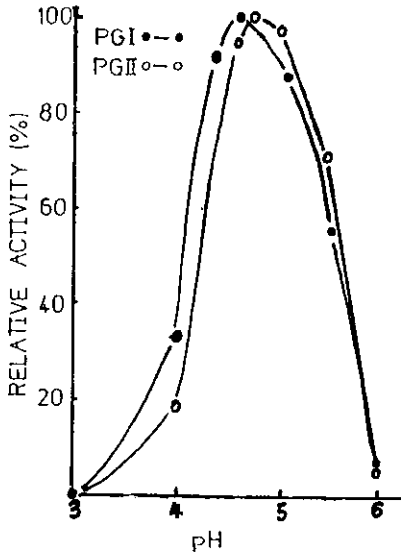


Fig. 4. The effect of pH on the activities of PG isoenzyme.

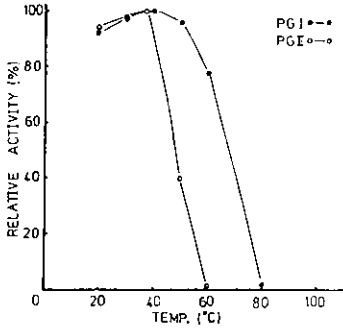


Fig. 5. The effect of temperature on the activities of PG isoenzyme.

한 結果 isozyme I와 II는 각각 pH 4.3, pH 5.6에서 安定하였으며 熱安定性を 測定하기 위하여 酵素의 最適 pH에서 40℃에서 90℃까지 溫度別로 5分씩 처리한 後 급냉하여 上法으로 殘存酵素活性을 測定하였다.

그 結果 isoenzyme I는 78℃에서, isoenzyme II는 57℃에서 각각 약 50%의 酵素活性이 감소하였으며, isoenzyme II는 65℃에서 酵素活性이 완전히 소실된 반면, isoenzyme I는 약 10%만 억제되었으므로 isoenzyme I가 II에 比하여 熱에 대하여 安定함을 나타내고 있다.

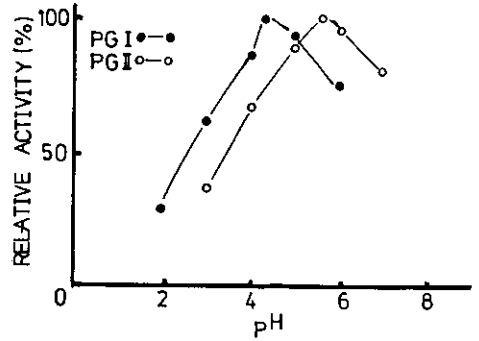


Fig. 6. The effect of pH on the stability of PG isoenzyme.

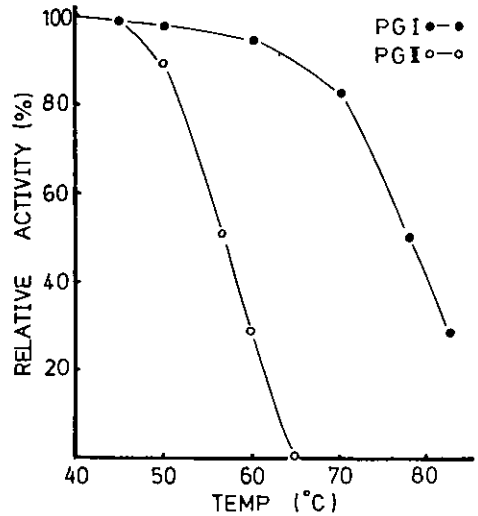


Fig. 7. The effect of temperature on the stability of PG isoenzyme.

Table 3. Effects of cations on the activities of PG isoenzyme

| Salts | concentration (mM) | Absorbance at 520 mμ | |
|-------------------|--------------------|----------------------|-------|
| | | PG I | PG II |
| None | | 0.03 | 0.10 |
| NaCl | 50 | 0.11 | 0.55 |
| | 100 | 0.33 | 0.72 |
| | 150 | 0.49 | 0.52 |
| | 200 | 0.43 | 0.44 |
| MgCl ₂ | 20 | 0.23 | 0.60 |
| | 30 | 0.31 | 0.73 |
| | 40 | 0.45 | 0.71 |
| | 60 | 0.41 | 0.62 |

陽 ion 影響

Isoenzyme I와 II의 活性에 미치는 最適 NaCl

및 $MgCl_2$ 의 濃度を 살펴보기 위하여 각각의 濃度로 調節하여 酵素液量과 동일하게 添加하여 37℃에서 1時間 저리한 後 吸光度의 變化를 調査한 結果 Table 3에서와 같이 isoenzyme I는 0.15M NaCl, 0.04 M $MgCl_2$ 에서, isoenzyme II는 0.1M NaCl, 0.03 M $MgCl_2$ 에서 각각 最大의 活性을 나타내었다.

考 察

Tomato 果實의 軟化現象은 pectin 酵素(PE, PG)에 의한 細胞壁에서의 pectin 物質의 可溶化作用과 깊은 連관이 있다.

Pectin 酵素는 細胞壁에 存在하는 그들의 基質과 靜電氣의 結合을 하고 있으므로 세포벽 分획에 많이 存在하고 있다.

그러나 세포벽 分획에서의 pectin 酵素의 純粹分離는 어려우므로 追熟됨에 따라 細胞壁에서 유리되는 pectin 酵素를 可溶性 分획으로 分離하기 위하여 여러가지 方法^{24,29)}이 검토되고 있으나, pH와 염(NaCl)의 濃度を 적절히 調節한 Ali等^{13,18)} Pressey等의 方法이 널리 利用되고 있다.

本 實驗에서는 pH 6에서 2M NaCl로 抽出하여 crude pectin 酵素의 活性을 測定한 결과 PE와 PG는 追熟이 進行됨에 따라 그 活性이 增加하였다. (Table 1)

특히 PG는 綠熟果에서 거의 活性을 나타내지 않았는데, 이는 여러 tomato 品種에서 거의 類似한 傾向^{17,19,27)}을 보였지만 그 原因에 대해서는 確實히 밝혀지고 있지 않다. 아울러 다른 品種에 比하여 PE의 活性은 거의 비슷하나 PG의 活性은 큰 차이가 있다는 것을 미루어 볼때 이는 tomato pectin 物質의 可溶化作用에 미치는 주된 酵素가 PG인 사실을 암시하고 있다. 그러므로 PG의 活性增加는 追熟過程中 연속적으로 生合成되는 PG isoenzyme의 증가와 깊은 關連이 있는 것으로 생각하고 DEAE-sephadex A-50을 사용하여 ripe tomato의 PG를 分離한 結果 한개의 낮은 peak (PG I)와, 높은 peak (PG II)을 각각 分離하게 되었다(Fig.2) 이는 비록 既存의 研究結果^{18,19,26,27)}와는 品種은 차이가 있으나 서로 類似하며 追熟이 部分的으로 억제된 變異 tomato에서는 PG II의 peak가 나타나지 않는 반면, 本 實驗에서 使用한 “強力美穗”의

PG II는 높은 活性을 나타낸 주된 peak이므로 이 品種이 追熟이 進行되면서 軟化가 빨리 일어나는 것은 追熟中에 많이 合成되는 PG II에 기인된 것으로 思料된다.

다음 PG I, II로 分離된 peak를 다시 모아 電氣泳動上에서 그 均일성을 확인한 결과 粗酵素液에서 나타난 여러 蛋白質 band中 Rm치가 같은 2개의 protein band를 나타내었다.(Fig. 3) 그러므로 PG I과 II는 PG isoenzyme으로 確認할 수 있었다.

한편 純粹 分離된 PG isoenzyme I와 II는 最適 pH와 溫度가 서로 相異하였으며 (Fig. 4, 5) 또 酵素 安定성에 미치는 pH와 溫度도 다르게 나타났다.(Fig. 6, 7) Pressey等¹⁶⁾은 PG I 및 PG II의 最適 pH는 그 基質의 분자량에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 報告하였으며 Patel와 Phaff等^{14,15)}도 이런 事實을 뒷받침하고 있다. 따라서 위의 報告를 미루어 볼때 本人이 使用한 polygalacturonic acid는 상당히 높은 高分子임을 알 수 있었다.

陽 ion이 PG의 活性을 增加시키며 아울러 그 濃度에 따라 PG isoenzyme의 最適 pH가 달라지는 것은 이미 報告된^{13,17)} 바 있으므로 本 實驗에서는 PG 活性에 가장 影響을 많이 미치는 NaCl과 $MgCl_2$ 의 最適 濃度を 조사하였다. (Table 3)

앞으로 本 實驗에서 分리한 PG가 endopolygalacturonase 혹은 exopolygalacturonase 인지, PG isoenzyme의 作用機作을 분명히 밝히고, 아울러 pectin 物質의 可溶化作用에 상당한 影響을 미치는 PE의 分離, 精製 및 精製된 PE isoenzyme의 特性을 調査하여, PG와 PE의 상호 連關성을 밝힘으로서 토마토 果實의 追熟 및 軟化現象을 보다 쉽게 理解할 수 있으리라 생각된다.

摘 要

Tomato 果實의 成熟段階別, pectin 酵素(PE, PG)의 活性의 變化와 polygalacturonase (PG)의 分離, 精製 및 精製된 PG isoenzyme의 酵素學的 性質에 대하여 調査하였다.

Tomato 果實의 pectin esterase (PE) 酵素는 追熟이 進行됨에 따라 그 活性이 增加하였으며, 특히 색깔의 變化가 일어나는 時期에 最大의 活性을 나타

내었다.

PG는 綠熟果에서 活性이 거의 나타나지 않았으나 追熟이 進行되면서 크게 增加하였다.

Ripe tomato에서 抽出한 粗酵素液을 電氣泳動시킨 結果 6개의 蛋白質 band를 나타내었다.

粗酵素液을 황산암모니아에 의한 蛋白質의 分劃 DEAE-sephadex A-50 column chromatography한 結果 2개의 isoenzyme I와 II (PG I, PG II)를 分離하였으며, isoenzyme I와 II는 각각 61배, 98배 精製되었다. Isoenzyme I와 II는 電氣泳動시 Rm값은 각각 0.25와 0.31이었다.

Isoenzyme I의 最適溫度 및 pH는 각각 37℃,

pH 4.5에서, isoenzyme II는 각각 40℃, pH 4.7에서 最大活性을 나타내었다.

Isozyme I에 대한 pH와 熱安定性을 調査한 結果, pH 4.3 부근에서 安定하였으며, 78℃, 5分間에서 약 50%의 酵素活性이 억제되었다. 그리고 isozyme II에 대한 pH와 熱安定性을 調査한 結果, pH 5.6 부근에서 安定하였으며 57℃, 5分間에서 약 50%의 酵素活性이 抑制되었다.

Isozyme I와 II에 대한 最適 NaCl 濃度は 각각 0.15 M, 0.1 M이었으며, 最適 MgCl₂ 濃度は 각각 0.04 M, 0.03 M이었다.

引用文獻

1. Ali, Z. M. and Brady, C. J.: Purification and characterization of the polygalacturonase of tomato fruit, *Aust. J. Plant physiol.*, 9:155-169, 1982.
2. Bradford, M. M.: 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, 1976.
3. Bueshen, R. W. and Tigchelaar, E. C.: Pectinesterase, polygalacturonase, CX-cellulose activities and softening of the rin tomato mutant, *Hortscience*, 10 (6):624-625, 1975.
4. Davis, B. J.: Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins, *Ann. New York Acad. Sci.*, 121:404-427, 1964.
5. Hobson, G. E.: Pectinesterase in normal and abnormal tomato fruit, *Biochem. J.*, 86:358-365, 1963.
6. Hobson, G. H.: Polygalacturonase in normal and abnormal tomato fruit, *Biochem. J.*, 92: 324-332, 1964.
7. Hobson, G. E.: The firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity, *J. Hort. Sci.*, 40:66-72, 1965.
8. Kertesz, Z.: The pectin substances, XIV, Pectin enzyme, Interscience publishers Inc., New York pp.333-344, 1951.
9. Macready, R. M. and McComb, E. A.: Pectin constituents in ripe and unripe fruit. *Food Res.*, 19:530-535, 1954.
10. Nakagawa, H., Yanagawa, Y. and Takehana, H.: Studies on the pectolytic enzyme, part IV. Purification of tomato fruit pectinesterase, *Agr. Biol. Chem.*, 34 (7):991-997, 1970.
11. Nakagawa, H., Yanagawa, Y. and Takehana, H.: Studies on the pectolytic enzyme. part V. Some properties of the purified tomato pectinesterase, *Agr. Biol. Chem.*, 34 (7): 998-1003, 1970.
12. 안종웅, 손태화, 최종욱: 감압처리가 토마토 果實의 polygalacturonase 및 cellulase의 활성 변화에 미치는 영향, *경북대 논문집*, 30:433-439, 1980.
13. Ogura, N., Nakagaw, H. and Takehana, H.: Effect of high temp-shorten storage of mature green tomato fruits on change of their chemical composition after ripening at room temp., *J. Agr. Chem.*, 49:189-196, 1975.
14. Patal, D. S. and Phaff, H. J.: Studies on

- purification of tomato polygalacturonase, *Food Res.*, 25:37-47, 1960 a.
15. Patel, D. S. and Phaff, H. J.: Properties of purified tomato polygalacturonase, *Food Res.*, 25:47-50, 1960 b.
 16. Pressey, R. and Avant, J. K.: Effect of substrate size on the activity of tomato polygalacturonase, *J. Food Sci.*, 36:486-489, 1971.
 17. Pressey, R. and Avants, J. K.: Two forms of polygalacturonase in tomatoes, *Biochem. Biophys. Acta*, 309:363-369, 1973.
 18. Pressey, R. and Avants, J. K.: Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonase: Effects of pectinesterase, *J. Food Biochem.*, 6:57-74, 1982.
 19. Pressey, R. and Avants, J. K.: Pectin enzymes in long keeper tomatoes, *Hortscience*, 17 (3):398-400, 1982.
 20. Reymond, D. and Phaff, H. J.: Purification and certain properties of avocado polygalacturonase, *J. Food Sci.*, 30:266-273, 1965.
 21. Roe, B. and Bruemmer, J. H.: Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of keitt mangos, *J. Food Sci.*, 46:186-189, 1981.
 22. Sacher, J. A.: Senescence and postharvest physiology, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24:109-224, 1973.
 23. Sawamura, M., Knecht, E. and Bruinsma, J.: Levels of gaseous ethylene, carbon dioxide, and soluble pectin and activities of pectin methylesterase and polygalacturonase in ripening tomato fruits, *Plant and Cell Physiol.*, 19 (6):1061-1069, 1978.
 24. Talmadge, K. W., Keegstra, K., Bauer, W. D. and Albersheim, P.: The structure of plant cell walls, I. The macromolecular components of the walls of suspension cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides, *Plant Physiol.*, 51:158-173.
 25. Themmen, P. N., Tucher, G. A. and Grierson, D.: Degradation of isolated tomato cell walls by purified polygalacturonase in vitro, *Plant Physiol.*, 69:122-124, 1982.
 26. Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D.: Changes in polygalacturonase isoenzyme during the ripening of normal and mutant tomato fruit, *Eur. J. Biochem.*, 112:119-120, 1980.
 27. Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D.: The conversion of tomato fruit polygalacturonase isoenzyme -2 into isoenzyme -1 in vitro, *Eur. J. Biochem.*, 115:87-90, 1981.
 28. Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D.: Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzyme, *J. Sci. Food Agri.*, 33:396-400, 1982.
 29. Wallner, S. J. and Bloom, H. L.: Characteristics of tomato cell degradation in vitro: Implications for the study of fruit softening enzymes, *Plant Physiol.*, 60:207-210, 1977.
 30. 崔成鎭, 金鏞喆, 朴權 : 토마토 果實의 貯藏中 pectic substance의 變化에 關한 硏究, *한국식품과학회지*, 24 (2):118-123, 1980.
 31. 久保田正光 : 糖變試驗法, 共立出版, 東京, pp. 13-14, 1967.