

## Valencia 오렌지로부터 내열성 Pectinesterase의 추출

허원녕 · Walker, B.L.\*

국립 목포대학교 원예육종학과  
\*플로리다대학교 식품영양학과

### A Study on the Extraction of Thermostable Pectinesterase from Valencia Orange

Won Nyoungh Hou and Brigdet L. Walker\*

*Department of Horticultural Breeding, Mokpo National University*

*\*Food Science and Human Nutrition Department, Institute of Food  
and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL 32611-0163, USA*

#### Abstract

Low yield of a thermostable pectinesterase(TSPE) from citrus fruits has made its detailed study extremely tedious and difficult; therefore, maximizing TSPE extraction is desirable. It is assumed that TSPE is bound to the cell components via ionic linkage and covalent bonds. Therefore, in this study, variations in extraction time, pH, NaCl concentration and commercial enzyme preparations were used to increase the yield of TSPE from Valencia orange. The largest recovery of TSPE, obtained by heating extracted pectinesterase(PE) at 70°C for 5~10 minute, was achieved using acetate buffer(pH 4.14) with 1 M NaCl and 0.2% Cytolase™ 104(a mixture of cellulase, hemicellulase and pectinase; Genecor, Inc). The two aqueous phase partitioning with 5.0% Triton X-114 could be used as a tool for separation of thermolabile pectinesterase(TLPE) and TSPE from crude PE. Also, water extraction and 0~0.3 ammonium sulfate fractionation could be used for removing non-pectinesterase protein.

Key words: Valencia orange, pectinesterase, thermostable pectinesterase, thermolabile pectinesterase, phase partitioning

#### 서 론

펙틴은 가락투론산 다당류의 카르복실기 일부가 메틸기로 에스테르화된 펙틴질을 나타내고 고등식물의 세포벽 구조의 보전과 결합을 유지하는 중요한 성분이며<sup>(1)</sup> 당분과 유기산이 공존할 때 겔화되어 잼이나 젤리 같은 높은 점성 용액을 만들 수 있게 한다. 펙틴은 씨트러스 주스류에서 consistency, 미립자의 현탁 그리고 혼탁성 유지에 관여하기 때문에 산업적으로도 중요한 역할을 한다. 일단 펙틴이 파괴되면 주스류는 혼탁성을 상실하고, 과일 채소류의 젤리류 가공시 겔 형성능력을 상실한다. 불투명 주스에서 혼탁성의 상실은 외견상 소비자들의 호감을 잃게되어 제조회사에 경제적 손실을 초래할 수 있다.

펙틴의 파괴는 식물체에 천연적으로 존재하는 효소에 의해서 일어나며<sup>(2)</sup> 그들은 두가지 그룹 즉, depolymerase와 esterase로 나뉜다<sup>(3)</sup>. Depolymerase는 보통 펙틴이나 펙틴산의 glycoside 결합을 가수분해하는<sup>(4)</sup> endo-와

exo- 형의 두가지 polygalacturonase로서 펙틴 분자의 methyl ester가 가수분해된 부분에 작용하는 특이성이 있으며<sup>(5)</sup>, 이들은 여러 가지 고등식물, 과일 및 종자에서 발견되었다<sup>(6)</sup>. Esterase는 펙틴 분자의 methyl ester group을 가수분해하여 펙틴산과 메탄올을 생성하는<sup>(3)</sup> pectinesterase(pectin pectyl hydorrage, EC 3.1.1.11, PE)이다. PE는 식물체의 모든 조직으로부터 분리되었으며<sup>(7)</sup> PE의 가수분해산물인 펙틴산은 칼슘 이온과 쉽게 결합하여 칼슘-펙틴산염 복합체를 형성하여 불용성으로 되므로<sup>(8)</sup> 식물 세포막을 견고하게 하며 채소나 과일 등의 수확 후 경도 유지에 영향을 주는 등 식물의 생리 현상에 관여한다.

과일로부터 제조한 주스류에서도 PE가 혼입되어 주스에 펙틴 분자를 가수분해하여 펙틴산과 칼슘의 복합체로 침전되게 하며 특히, 혼탁성 불투명 과즙에서 이와 같은 침전이 일어 나면 혼탁성을 잃고(cloud loss) 주스는 맑아져 주스류 제품 외관에 손상을 주기도 한다.

이러한 현상을 해결하기 위해 60°C 이상의 온도에서 주스를 가열처리하여 PE를 불활성화시킬 경우 제품에 나쁜 영향을 주는 flavor가 생성되고, PE의 활성을 저해하기 위하여 -20°C 이하에서 농축주스로 저장하거나, 저해효과가 있는 폐놀성물질인 탄닌 또는 저중합 poly-

Corresponding author: Won Nyoungh Hou, Department of Horticultural Breeding, Mokpo National University, Mokpo, Chunnam, Zip code 534-729, Korea

galacturonic acid 등을 사용하는 것은 침전을 지연시키는 효과는 있으나 PE의 활성은 지속되어 주스 제품에 좋지 않은 영향을 미친다<sup>(2,9)</sup>.

씨트러스 과일 펄프에 존재하는 PE는 열 안정성에 의하여 분류될 수 있다. 즉 열에 불안정한 thermolabile pectinesterase(TLPE)와 안정한 thermostable pectinesterase(TSPE)로 나뉜다<sup>(2,9)</sup>. TLPE는 오렌지로부터 추출되는 전체 PE의 90% 이상이고 TSPE는 전체 PE의 10% 미만의 소량임에도 불구하고 TSPE는 90°C에서 불활성화되고 또한 오렌지 주스의 혼탁성 상실에 주원인이 된다<sup>(2)</sup>. 주스류의 가공에서 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 PE의 성질을 정확하게 이해할 필요가 있으며 그 전단계로 PE의 추출 특히 소량이면서도 주스가공에 중요한 영향을 미치는 TSPE의 추출방법을 개선하여 추출의 수율을 높이는 것이 중요하다.

현재까지 연구동향은 TLPE와 TSPE가 혼합된 전체 PE의 추출 수율을 높이려는 노력이었으며 염의 농도와 pH의 조정은 PE 추출과 그의 수율에 크게 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다<sup>(10)</sup>. PE가 multiple forms이라는 사실에서 모든 multiple form을 동시에 추출하려고 하였으나<sup>(11-13)</sup>, 그 중에서 TSPE는 전체 PE 중에서 10% 미만의 소량임으로 TLPE를 가열처리로 제거하고 TSPE만을 남기는 방법으로 연구하였다<sup>(2,9,14)</sup>. 최근 여러 연구자들은<sup>(15-17)</sup> PE가 씨트러스 과일 조직의 고체 입자와 결합하고<sup>(7,10)</sup> 특히 세포벽과 결합하고 있다는<sup>(18)</sup> 보고에 근거하여 TSPE의 추출 수율을 높이고자 하는 노력을 계속 해왔다.

본 연구의 목적은 Valencia 오렌지의 PE를 정제하고 그들의 multiform의 성질을 알아보고 비교하기 위한 전 단계로 TSPE 추출 수율을 높이기 위한 방법을 찾아보기 위한 것이었으며, 현재까지 사용된 추출 방법보다 Valencia 오렌지로부터 TSPE의 추출 수율을 높일 수 있었으므로 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 시료조제

신선한 플로리다 Valencia 오렌지를 현지 시장에서 구입하여 냉장하였다. 이후 냉장된 시료를 세척 건조시켜 실온에 하룻 밤 방치하였다. 오렌지를 반으로 분할하여 reamer(Sunkist Grower, Inc.; Los Angeles, CA)를 이용하여 압착한 후 주스를 4점의 cheesecloth로 걸러 펄프와 종자를 나누었고, 껍질부분에 있는 rag는 분리하여 펄프 부분과 합쳤다. 주스, rag를 분리한 껍질과 종자는 PE 함량이 적으므로<sup>(7)</sup> 효소 추출에서 제외하였다. Rag-pulp는 액체질소로 냉동시켜 blender로 분말화하였다. 분말화한 시료는 플라스틱주머니에 넣어 -30°C에 보관하였다.

### 내열성 시료 효소의 조제

열 안정성 조사: Versteeg 등<sup>(2)</sup>이 사용한 방법에 따라 TSPE만의 활성을 측정하기 위한 가열시간 결정에 사용하였다. 황산암모늄 염석과 투석을 한 시료 효소 1 ml를 1.0×7.5 cm 시험관에 주입하고, Omega 2176A digital thermometer(Omega Engineering, Inc., Stamford, CT)가 부착한 thermocouple도 함께 시험관에 넣어 놓았다. 시험관을 71°C 수조에 넣고 70°C까지 가열하여 항온으로 유지하였다. 효소 시료(200 μl)를 처음 3분 동안은 매 15초마다 채취하고 그 다음 3~10분 동안은 30초마다 채취하여 바로 0°C의 수조에서 냉각시켰다. 효소 활성은 titrimetric assay 방법으로 측정하였다.

가열 효소 시료: 시료 효소(2~3 ml)를 시험관에 넣고 항온수조에서 70°C가 되면 10분간 처리하여 즉시 0°C의 수조에서 냉각하여 titrimetric assay 방법으로 PE의 활성을 측정하였다. TSPE는 70°C에서 10분간 가열처리한 후에 잔존한 효소의 활성으로 하였다.

### TSPE 추출 방법의 결정

추출 방법의 결정을 위한 요인별 실험: 추출 완충액의 pH(4.14와 8), 추출 완충액의 NaCl의 농도(0.3과 1M), macerating enzyme인 Cytolase™ 104(Genencor Corp., Sunnyvale, CA) 또는 ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA) 첨가 및 분말 시료의 단기와 장기저장 등의 변화를 주면서 그들이 효소의 추출에 미치는 영향을 조사하였다. 조사대상으로 하는 변화요인만 달리하고 추출 완충액을 분말시료에 1:3(w/v) 비율로 혼합하고 1분간 Polytron 균질기(Brinkman Instruments, Westbury, NY)로 균질화하고 상온에서 1시간 교반하면서 효소를 추출하고 원심분리(9,000×g, 30분, 4°C)한 상정액을 0~0.75 황산암모늄 포화도로 염석하여 침전물을 회수하였다. 단 macerating enzyme를 첨가하여 가수분해하는 실험에서는 균질화한 다음 Cytolase를 첨가 교반하면서 상온에서 가수분해하고 하룻밤 4°C에 보관한 후에 원심분리하는 것만 달리하였다. 염석한 침전물을 모아 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 용해하여 동일 완충액으로 투석하였다. 투석 효소는 효소의 활성 및 단백질량을 측정하고 -30°C에 냉동보관하였다.

결정된 추출방법과 다른 추출 방법의 비교: 결정된 추출 방법을 보완도 하고 또한 다른 방법을 찾아보기 위하여 다음과 같이 하였다. 분말시료를 증류수와 1:2(w/v)의 비율로 혼합하여 균질화하고 원심분리(9,000×g, 30분, 4°C)하여 상정액의 일부만 염석 투석하여 효소 활성과 단백질 측정에 사용하고 침전물만 회수하였다. 침전물에 1 mM sodium azide와 1 M NaCl 그리고 0.2% Cytolase를 포함하는 0.2 M acetate 완충액(pH 4.14)을 1:3(w/v)의 비율로 혼합하여 상온에서 교반하면서 1시간 동안 가수분해하고 4°C에서 하룻밤 보관한 것을 원심분리하여 상정액을 0~0.3과 0.3~0.75 황산암모늄 포화도로 각각 염석하여 침전물을 회수하였다. 침전물을

모아 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 녹여 동일 완충액으로 투석하였다. 투석 효소는  $-30^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하였다.

한편 Seymour<sup>(16)</sup>는 TSPE는 TLPE보다 소수성이라고 보고한 점을 고려하여 다음과 같이 Triton X-114를 사용한 두개의 액상을 이용한 분배의 방법<sup>(19,20)</sup>으로 TSPE의 수율을 높이고자 하였다. TritonX-114(Sigma Chemical Co. St Louis, MO)를 Bordier<sup>(21)</sup> 방법에 따라 3회 농축하였다. TritonX-114 30g을 1 M NaCl과 5 mM sodium azide를 포함하는 acetate 완충액(pH 4.14) 980 ml에 첨가하여  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 용해한 후  $30^{\circ}\text{C}$ 의 항온으로 유지하여 detergent를 소량 함유한 다량의 액상과 detergent를 다량 함유한 소량의 액상으로 분리시켰다. 다량의 액상은 버리고 동일한 양의 새로운 acetate 완충액을 첨가하여  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 용해하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 분리하기를 2회 반복하였다. 농축을 3회 실시한 후에 detergent를 다량 함유한 액상은 25% TritonX-114(w/v)이었고, 이것을 PE 추출을 위한 저장용액으로 사용하였다. TritonX-114의 농도는 희석된 detergent 용액의 278 nm의 흡광도로부터 측정하였다( $A_{278}=1.25$ , 0.05%(w/v) TritonX-114). 저온실에서 분말 시료 50g을 여러가지 소정 농도의 TritonX-114를 함유하는 동일한 완충액을 혼합하여 1분간 균질화하고 90분간 보관한 후 원심분리(10,000×g, 30 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ )하였다. 상정액은  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 위의 TritonX-114 저장용액을 첨가하여 TritonX-114 농도를 4% 증가시켜 15분간  $35^{\circ}\text{C}$ 로 가온함으로 두개의 액상이 분리되도록 하였다. Detergent를 소량 함유한 액상과 다량 함유한 액상 각각을 추출된 PE 조효소액으로 하였다. 각각의 조효소액을 원심분리하여 상정액을 0.3~0.75 황산암모늄 포화도로 염색 침전물을 회수하였다. 침전물을 모아 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 녹여 동일 완충액으로 투석하였다. 투석 효소는  $-30^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관하였다.

#### 효소 활성 측정

Titrimetric assay : Seymour<sup>(16)</sup>의 titrimetric assay 방법을 개변하여 추출한 효소의 활성을 측정하였다. 펙틴(Eastman Kodak Company, Rochester, NY)을  $40^{\circ}\text{C}$ 로 가열한 1 mM sodium azide를 포함하는 0.1 M NaCl 용액에 서서히 가하고 교반하면서 용해하여 1% 펙틴 용액을 만들었다. 효소 활성은 Metrohm pH Stat/End Point Titration system(Brinkman Instruments Company, Westbury, NY)을 사용하여 측정하였다. 펙틴 용액 30 ml를 50 ml의 비이커에 넣고 실온에서 교반하면서 pH 7.5로 조정하고 효소 시료를 넣고 다시 pH를 조정한다음에 측정을 시작하였다. pH는 0.01 N NaOH로 자동 중화정적에 의하여 7.5로 유지하였다. 중화에 소모되는 0.01 N NaOH 양을 5분간 30초마다 기록하였다. 효소 활성 단위는 측정 조건에서 매 분당 1 μmole의 카복실 그룹을 유리하는 효소량으로 하였다.

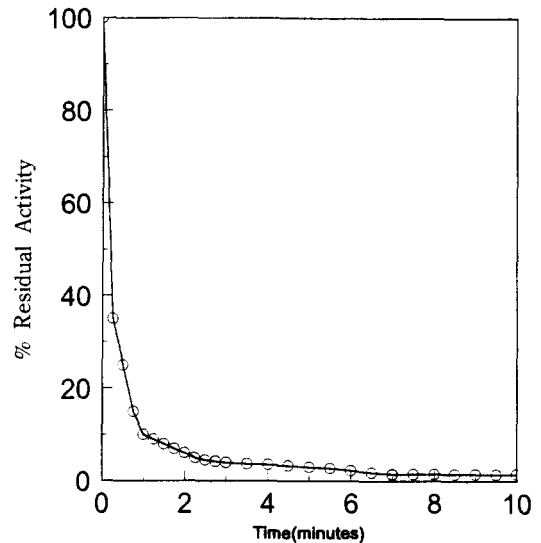


Fig. 1. Heat stability curve to determine heating time

$$\text{PEU/ml} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{Normality of NaOH} \times 1,000}{\text{ml sample} \times \text{minutes}}$$

#### 단백질 정량

단백질 정량은 개변한 Bradford<sup>(23)</sup> 방법에 의하여 수행하였다. 단백질 분석용 시약 키트는 Bio-Rad Laboratories(Melville, NY)에서 구입하여 사용하였다. 정량 표준 곡선용 단백질은 bovine serum albumin(Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO)을 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 열 안정성 실험

열 안정성 실험은 조효소를 가열 처리한 후 잔존한 활성을 측정하여 가열처리하지 않은 효소활성과 비교하여 % residual activity를 구하였으며, 반복시험한 값을 평균한 실험값을 Fig. 1에 나타내었다. 효소 활성은  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 가열처리할 때 처음 15초에서 65% 이상 활성을 잃었으며 7분 후에는 1.4~1.5%의 거의 일정한 값을 유지하였다. 그러므로 TSPE의 추출 수율을 알아보기 위한 처리는 10분간  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 가열처리하여 잔존한 활성을 TSPE로 보고 총PE에 함유된 %TSPE를 구하였다.

##### 추출 방법의 결정을 위한 실험

TSPE는 citrus 가공품에서 열악한 조건에서도 펙틴을 분해하는 주된 효소이면서도 TLPE에 비하여 상대적으로 추출되는 양이 적으므로 추출 방법을 TSPE의 추출을 증가시키기 위하여 Seymour<sup>(16)</sup>의 pH 8.0의 0.3 M NaCl 0.25 M Tris-HCl 완충액으로 처리한 방법에 따라 추출한 것은 거의 효과가 없었으나, Wicker 등<sup>(15)</sup>의 방법을 일부

**Table 1. Effect of Cytolase™ 104 addition to stored pulp powder on PE extraction**

Sample <sup>1)</sup>	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Unheated			Heated			%TSPE <sup>2)</sup> (PEU/mg)
			Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	
1 month Without Cytolase	35.0	2.2	76.0	2,660	34.5	0.4	14	0.2	0.5
1 month With Cytolase	35.0	2.8	205	7,175	73.2	3.3	114	1.2	1.6
5 month Without Cytolase	32.4	1.4	96.0	3,110	68.6	1.1	35.6	0.8	1.1
5 month With Cytolase	37.0	1.5	136	5,032	90.7	1.3	48.1	0.9	0.9

<sup>1)</sup>Values based on 100g samples after ammonium sulfate fractionation and dialysis. <sup>2)</sup>Based on table values.

**Table 2. Effect of pH and 0.3 M NaCl on PE extraction**

Sample <sup>1)</sup>	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Unheated			Heated			%TSPE <sup>2)</sup> (PEU/mg)
			Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	
pH 8.0 Without Cytolase	32.4	1.4	96.0	3,110	68.6	1.1	35.6	0.8	1.1
pH 8.0 With Cytolase	36.9	1.5	136	5,018	90.7	1.3	48.0	0.9	1.0
pH 4.14 Without Cytolase	25.5	1.4	19.1	487	14.7	0.9	23	0.6	4.7
pH 4.14 With Cytolase	32.4	1.3	23.5	761	18.1	2.2	70.6	1.6	9.3

<sup>1)</sup>Values based on 100g samples after 0.75 ammonium sulfate fractionation and dialysis.

<sup>2)</sup>Values based on table figures.

개변하여 1 M NaCl을 함유한 orange 착즙액의 pH 4.14로 조정된 완충액에서 여러가지 commercial macerating enzyme 중에서 cellulase, hemicellulase 그리고 pectinase를 함유한 Cytolase™ 104로 가수분해하여 추출한 것이 효과적인 결과를 예비실험에서 알 수 있었으므로, 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 TSPE의 추출 방법을 결정하고자 관계되는 인자의 변화를 주면서 미치는 영향을 개별적으로 조사하였다.

효소 첨가의 영향: 저장을 1개월간 하였던 분말시료에 효소의 무첨가로 추출한 것은 총 PE 중에는 0.5%의 TSPE가 함유되어 있는데 반하여 효소의 첨가는 1.6%의 TSPE가 추출되었다(Table 1). 좀더 장기간인 5개월간 저장하였던 분말시료에서 효소의 무첨가는 1.1%의 TSPE가 추출되었고 효소의 첨가는 0.9%의 TSPE가 추출되어 단기간 저장한 것에 비하여 효소 첨가의 영향이 감소하였다. 단기간인 1 개월 저장한 분말시료에서 추

출한 PE의 활성은 무첨가구가 76(PEU/ml)이며 첨가구는 205(PEU/ml)이었으며, 가열처리한 후에는 전자는 0.4(PEU/ml)이고 후자는 3.3(PEU/ml)이었다. 장기간인 5개월 저장한 분말시료는 1개월 저장한 것에 비하여 효소 무첨가구는 효소의 활성이 증가(비가열 처리 96(PEU/ml); 가열 처리 1.1(PEU/ml))하였으나, 첨가구는 오히려 감소(비가열 처리 136(PEU/ml); 가열 처리 1.3(PEU/ml))하였다. 이는 장기 저장한 경우에 세포간질에 결합하고 있는 PE가 그 기간중에 자체내의 요인들에 의하여 유리되었기 때문에 탄수화물 분해효소의 영향이 감소되는 것으로 생각된다. 그러나 단기간 저장시료에서 탄수화물 분해효소의 사용은 효소의 무첨가에 비하여 3배 이상의 %TSPE 값을 나타내며 총 TSPE의 양으로는 8배 정도 추출을 할 수 있었으며, 이는 탄수화물 분해효소에 의한 세포 간질의 탄수화물이 가수분해되었기 때문인 것으로 보이며, 장기간 저장한 시료의 경우도 효소 첨가의 효

Table 3. Effect of pH and 1.0 M NaCl on PE extraction

Sample <sup>1)</sup>	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Unheated			Heated			%TSPE <sup>2)</sup> (PEU/mg)
			Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	
pH 8.0									
Without Cytolase	35.5	2.1	95.9	3,440	45.7	0.5	17.8	0.2	0.5
With Cytolase	34.0	2.3	137.0	4,658	59.6	2.5	85	1.1	1.8
pH 4.14									
Without Cytolase	30.0	1.3	23.3	699	17.9	0.2	5.7	0.2	0.8
With Cytolase	40.0	2.1	85.0	3,400	47.6	3.4	136	1.6	4.0

<sup>1)</sup>Values based on 100g samples after 0.75 ammonium sulfate fractionation and dialysis.

<sup>2)</sup>Values based on table figure.

과가 나타나지 않았으나, TSPE의 추출에는 1개월 저장한 시료에 효소의 무첨가 보다는 효과를 보였다. 그러므로 TSPE의 추출 수율을 높이기 위하여서는 Cytolase™ 104를 첨가하는 것이 효과적이었다.

추출 완충액의 pH의 영향: 완충액의 pH를 Valencia 오렌지 착즙액의 pH와 같도록 4.14로 조정 한 것과 일반적으로 PE의 추출에 사용하고 있는 8.0<sup>(23)</sup>으로 조정 한 것을 사용하였다. 여기에 또한 Cytolase를 첨가와 무첨가의 실험도 병행하여 수행한 결과는 Table 2와 같다. 효소를 무첨가하고 pH 4.14 완충액으로 추출한 PE의 활성은 pH 8.0에서 추출한 것의 96(PEU/ml)보다 적은 19.1(PEU/ml)로 겨우 5분의 1정도의 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 낮은 염의 농도와 낮은 pH는 PE의 낮은 추출을 보였다는 MacDonell 등<sup>(10)</sup>의 보고와 유사하였다. 효소를 첨가한 것의 PE의 활성도는 pH 4.14에서 추출한 것이 pH 8.0에서 추출한 것 136(PEU/ml)보다 6분의 1 정도로 감소한 23.5(PEU/ml)의 낮은 효소 활성을 보였다. 이상의 결과는 현재 PE추출에 주로 사용하는 pH 8.0의 완충액은 주로 TLPE가 추출되는 것임을 알 수있다. TSPE의 활성도 추출 pH에 따라 변화하였다. 효소를 무첨가한 것은 pH 4.14에서는 0.9(PEU/ml), pH 8.0에서는 1.1(PEU/ml)의 효소 활성을 나타냈지만, 이와 반대로 효소를 첨가한 경우는 pH 4.14에서 추출한 것이 pH 8.0에서 추출한 것보다 효소 활성(PEU/ml)이 70% 총 효소활성은 47% 증가하였다. %TSPE는 효소를 첨가 또는 무첨가 경우에 모두 pH 4.14에서 추출한 것이 높았다. pH 4.14에서는 효소를 첨가한 것이 무첨가한 것보다 2배 정도 높은 수율을 나타냈다. 그러므로 TSPE의 수율을 높이기 위하여는 Cytolase와 같은 효소 첨가와 병행하여 착즙액의 pH와 같은 완충액으로 추출하여야 할 것으로 본다.

NaCl의 영향: NaCl의 첨가는 세포로부터 삼투압을

이용한 효소의 추출에 필요하거나<sup>(24)</sup>, 혹은 NaCl의 첨가 농도의 증가는 "Salting in"이라고 하는 현상에 의하여 단백질의 용출이 증가하지만 일정농도 이상의 증가는 효소 불용성의 원인이 되는 "Salting out" 현상이 일어난다<sup>(25)</sup>. 본 실험에서는 NaCl의 영향을 알아보기 위하여 1 M NaCl을 함유하는 pH 4.14와 8.0의 완충액에 효소를 첨가 또는 무첨가하면서 PE의 추출에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과는 Table 3과 같았으며, Table 2(0.3 M NaCl의 완충액)와 비교하면 pH 8.0 완충액에서 추출한 PE의 활성은 거의 비슷한 값을 나타냈으며, 비활성은 어느 NaCl의 농도에서도 pH 8.0의 완충액에서 추출한 PE의 활성이 pH 4.14에서 추출한 것보다 큰 값을 나타내었으며 또한 어느 것이고 Cytolase를 첨가한 것이 활성과 비활성이 큰 값을 나타내었다. 한편 0.3 M NaCl의 pH 8.0에서 추출한 것이 1 M NaCl에서 추출한 것보다 비활성이 큰 값을 나타내었다. TSPE의 수율은 0.3 M NaCl 농도의 pH 8.0 완충액에서 추출한 것은 효소를 첨가하거나 첨가하지 않은 것이나 거의 1% 정도이었다 (Table 2). 그러나 염의 농도를 1 M NaCl로 하였을 때 효소의 무첨가 쪽이 4분의 1 정도의 훨씬 적은 값을 나타내었다(Table 3). 효소를 첨가하여 추출하였을 경우는 0.3 M NaCl에서 1.0%이었으나 1 M NaCl에서는 거의 2배 정도인 1.8%로 증가하였다. 효소를 첨가하지 않은 것은 1 M NaCl에서는 겨우 0.5%로 크게 감소하였다. pH 8.0에서 염의 농도를 증가하고 아울러 Cytolase 같은 효소를 첨가하면 TSPE의 추출 수율이 증가하는 것으로 나타났다. pH 4.14에서 효소 무첨가 경우에 0.3 M NaCl보다 1 M NaCl에서 추출한 것의 PE 활성이 19.1 (PEU/ml)에서 23.3(PEU/ml)으로 증가하였다. 그러므로 총 PE의 수율은 pH 4.14의 1.0 M NaCl에서 높게 나타났으며, 이와 같은 결과는 MacDonell 등<sup>(10)</sup>이 낮은 pH (4.5)에서 염의 농도를 1.0 M NaCl까지 증가시켰을 때

**Table 4. Effect of 5 mM EGTA in pH 4.14 and 1 M NaCl on PE extraction**

Sample <sup>1)</sup>	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Unheated			Heated			%TSPE <sup>2)</sup> (PEU/mg)
			Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	Activity (PEU/ml)	Total Activity (PEU)	Specific Activity (PEU/mg)	
pH 4.14 Without Cytolase	35.0	0.8	69.6	2,436	87	3.0	105	3.7	4.3
With Cytolase	44.0	0.9	42.6	1,874	47.3	3.0	132	3.3	7.0

<sup>1)</sup>Values based in 100g samples after 0.75 ammonium sulfate fractionation and dialysis.

<sup>2)</sup>Values based on table figures.

**Table 5. The comparison of the established TSPE extraction with other extraction methods**

Extraction Method	Volume <sup>1)</sup> (ml)	Protein (mg/ml)	Total PE Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Total TSPE Activity (units)	TSPE <sup>2)</sup> of Total PE (%)	Relative <sup>3)</sup> TSPE Yield (%)
A <sup>4)</sup>	1.8	0.60	15.12	14.00	6.48	42.8	5.90
A <sup>5)</sup>	2.5	0.10	1.25	5.00	0.63	50.0	0.60
A <sup>4)</sup>	0.8	0.47	2.56	6.78	1.06	75.0	0.97
B <sup>5)</sup>	2.8	0.08	1.54	7.86	0.84	54.5	0.77
C <sup>4)</sup>	2.2	0.20	7.04	16.00	6.60	93.7	6.09
C <sup>5)</sup>	2.6	0.15	3.51	8.90	0.65	18.5	0.60
D <sup>4)</sup>	1.5	1.32	20.10	10.09	5.10	25.3	4.70
D <sup>5)</sup>	3.6	0.22	2.34	2.90	1.80	76.9	1.60
E <sup>6)</sup>	9.0	0.13	3.15	2.73	0.45	14.3	0.42
E <sup>7)</sup>	3.5	7.04	1,430.00	58.23	108.15	7.5	100.00

<sup>1)</sup>Based on 50g of orange sample after ammonium sulfate fractionation and dialysis

<sup>2)</sup>Based on table values.

<sup>3)</sup>Based on E<sup>5)</sup> value as standard

<sup>4)</sup>Aqueous phase part

<sup>5)</sup>Detergent rich phase part

A: Phase partitioning extraction with 0.1% Triton TX-114, 1 M NaCl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 200 mM acetate buffer (pH 4.14)

B: Phase partitioning extraction with 1.0% Triton TX-114, 1 M NaCl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 200 mM acetate buffer (pH 4.14)

C: Phase partitioning extraction with 5.0% Triton TX-114, 1 M NaCl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 200 mM acetate buffer (pH 4.14)

D: Phase partitioning extraction with 6.0% Triton TX-114, 1 M NaCl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 200 mM acetate buffer (pH 4.14)

<sup>6)</sup>E: Water extraction

<sup>7)</sup>E: Extraction with 1 M NaCl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, acetate buffer (pH 4.14) and 0.2% Cytolase<sup>TM</sup> 104

PE의 수율을 증가시켰고 1.0 M 이상으로 염을 첨가하는 것은 추출 수율의 증가에 영향을 미치지 못하였다는 보고와 유사하였다. 그러나 효소 첨가 없이 PE를 추출한 것의 TSPE 양은 0.3 M NaCl에서 4.7%에서 1 M NaCl에서 0.8%로 감소하였으므로, 낮은 pH 4.14에서 높은 염의 농도인 1 M NaCl에서 TSPE의 추출효과를 기대할 수 없었다. pH 4.14이며 1.0 M NaCl인 완충액에서 효소의 첨가는 무첨가의 비활성 17.9(PEU/mg)에서 40.5(PEU/mg)로, 효소활성은 23.3(PEU/ml)에서 85.0(PEU/ml)로 증가하였다. TSPE의 효소활성도 0.2(PEU/ml)에서 3.4(PEU/ml)로 증가하였다. pH 8.0 경우와 같이 pH 4.14에서도 효소의 첨가와 염의 농도의 증가는 총 PE 추출을 증가시켰다. pH 4.14 완충액에서 1 M NaCl로 추출할 때 TSPE는 0.3 M NaCl의 효소 첨가와 함께 추출한 총

PE의 9.3% 보다 작은 값인 4%임에도 불구하고 TSPE의 총 활성은 136 PEU로 가장 높은 값을 나타냈으며 총 PE의 활성 761 PEU 보다 8배 이상되는 3,400 PEU의 값을 보였다. 그러므로 TSPE의 추출을 증가시키기 위하여 착즙액의 pH와 같은 완충액을 1 M NaCl 농도로 하고 Cytolase같은 가수분해효소를 첨가하여 추출하면 TSPE의 추출증대와 함께 TLPE도 다량 함유된 PE를 추출할 수 있는 결과를 보였다.

EGTA의 영향: PE 추출에 2가의 양이온 다리(divalent cation bridge)로 세포간질에 포집되어 있거나 세포벽의 펙틴과 결합할 수도 있는 PE<sup>(23)</sup>를 용해시키기 위하여 EGTA의 첨가는 약간 효과적이었다는 점<sup>(15)</sup>을 고려하여 EGTA의 영향을 조사하였다. 저장한 분말시료에서 PE의 추출은 pH 4.14이며 1 M NaCl인 완충액에서

TSPE의 가장 높은 수율을 나타냈기 때문에, EGTA의 영향을 보는 실험에서도 이 완충액을 사용하였고 그 결과는 Table 4와 같았다. 효소 첨가없이 추출한 것이 첨가한 것 보다 29% 이상 높은 효소 활성을 보였고, 비활성도 거의 배이상의 큰 값을 보였다. TSPE의 효소 활성은 효소 첨가 및 무첨가가 모두 3.0(PEU/ml)이었고 총 PE에서의 수율은 4.3%와 7.0%이었다. EGTA를 첨가하지 않은 경우의 4.0%(Table 3)보다는 큰 값을 나타냈지만 총 TSPE의 함량은 132 PEU와 136 PEU(Table 3)로 거의 유사하였다. 그리고 총 PE의 추출량이 EGTA를 첨가하지 않은 경우(Table 3의 3,400PEU)에는 첨가한 경우(Table 4의 1,874PEU)보다 81% 이상 더 많은 추출량을 보였으며, 이것은 EGTA가 효소반응에 필요한 금속 이온을 반응계에서 제거함으로써 Cytolase의 활성을 저해하는 것으로 보이며 특히 TLPE 추출의 감소를 초래하였다. 이상의 결과로부터 TSPE의 추출량을 증가하면서 TLPE도 다량 포함하여 이들의 정제를 보다 용이하게 할 수 있는 방법은 1 M NaCl의 pH 4.14의 완충액에서 0.2% Cytolase를 이용하여 가수분해한 후 추출하는 것이었으며 이 방법을 추출 방법으로 결정하였다.

#### 결정된 추출 방법과 다른 추출 방법과의 비교

재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 이상의 추출 실험에서 확립한 pH 4.14와 1.0 M NaCl 농도에서 효소를 이용하는 추출 방법 이외에 다른 방법도 찾아보기 위하여 detergent를 사용한 두개의 액상에서 분배를 이용한 추출을 시도하였고 또한 물로만 추출을 하여 보았다. 그리고 염석처리도 0~0.3과 0.3~0.75로 달리하여 보았다. 그 결과는 Table 5와 같았으며 지금까지 확립한 E\*가 다른 어느 방법보다 총 PE의 양이나 총 TSPE의 양이 제일 많았으며, 비활성도 제일 큰 값을 보였다. 방법 C<sup>4</sup> (5.0% Triton X-114의 수용액상에 추출된 효소)는 추출된 총 PE의 90% 이상이 TSPE이었으며, 이와 같은 결과는 Seymour 등<sup>(16)</sup>이 TSPE는 TLPE보다 소수성이라는 보고와는 다른 결과를 나타내었다. 물로만 추출한 E\*에서는 PE는 다른 방법에 비하여 거의 추출되지 않았지만 약간의 단백질은 추출되었다. 또한 0~0.3 포화도의 유산 염석에서도 효소의 활성은 거의 없으나 단백질 정량이나 전기영동의 결과에서 단백질을 상당히 함유하고 있음을 알 수 있었다(데이터 제시되지 않았음). 그러므로 Table 5에서 C의 방법은 PE를 추출한 후에 TLPE와 TSPE를 분리하는 데 응용 할 수 있는 가능성을 시사하고, 또한 물로 일단 추출하거나, 황산암모늄의 포화도를 0~0.3으로 염석하면 PE 이외의 흥미없는 단백질을 제거할 수 있다고 본다.

#### 요 약

Pectinesterase(PE) 중에 열에 안정한 thermostable pe-

ctinesterase(TSPE)를 열에 불안정한 thermostable pectinesterase(TLPE)로부터 구분하기 위하여 70°C에서 5~10분간 가열 처리하였다. TSPE의 추출 수율을 증가시키기 위하여 추출시간, pH, 온도, NaCl의 농도 그리고 세포벽을 분해하는 가수분해 효소의 사용 등 여러가지 변화를 주어 개발한 최적 조건은 오렌지 착즙액의 pH 4.14와 같은 1 M NaCl의 acetate buffer에 분말시료의 0.2% Cytolase™ 104(cellulase hemicellulase와 pectinase의 혼합물) 첨가하여 가수분해하여 추출하는 것이었다. 증류수로 추출하거나 황산암모늄 0~0.3 포화도의 분획은 목적으로 하는 PE 이외의 단백질을 제거하는 수단으로 이용할 수 있었다. 또한 5.0% Triton TX-114의 두가지 액상을 이용한 분배의 방법은 추출한 조효소로부터 TLPE와 TSPE를 분리하는 수단으로 이용할 수 있었다.

#### 문 헌

- Whistler, R.L.: Polysaccharides. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Vol.11, N. BiKales(Ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, p.396 (1969)
- Versteeg, C., Rombouts, F.M., Spaansen, C.H. and Pilnik, W.: Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *J. Food Sci.*, **45**, 969 (1980)
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T.: Pectic enzyme. ch. 3. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Fogarty, W.M. (ed.), Applied Science Publisher, New York, Vol.4, p. 131 (1983)
- Rexová-Benková, L. and Markovič, O.: Pectic enzyme. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Tipson, R.S. and Horton, D.(ed.), Vol.33, p.323 (1976)
- Macmillan, J.D. and Sheimann, M.: Pectic enzymes. ch.4. In *Food Related Enzymes: Advances in chemistry series 136*, Whitaker, J.R.(ed.), American Chemical Society, Washington DC, p.101 (1974)
- Rombouts, F.M. and Pilnik, W.: Pectic enzymes. ch.5. In *Economic Microbiology*, Rose, A.H.(ed.), Academic Press, New York, Vol.5, p.227 (1980)
- Rouse, A.H.: Distribution of pectinesterase and total pectin in component parts of citrus fruits. *Food Technol.*, **7**, 360 (1953)
- Joslyn, M.A. and Pilnik, W.: Enzymes and enzyme activity. In *The Orange: Its Biochemistry and Physiology*, Sinclair, W.B.(ed.), Univ. of California Press, Berkeley, CA., p.373 (1961)
- Marshall, M.R., Marcy, J.E. and Braddock, R.J.: Effect of total solids level on heat inactivation of pectinesterase in orange juice. *J. Food Sci.*, **50**, 220 (1985)
- MacDonell, L.R., Jansen, E.F. and Lineweaver, H.: The properties of orange pectinesterase. *Arch. Biochem.*, **6**, 389 (1945)
- Versteeg, C., Rombouts, F.M. and Pilnik, W.: Purification and some characteristics of two pectinesterase isozymes from orange. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, **11**, 267 (1978)

12. Rombouts, F.M., Wissenburg, A.K. and Pilnik, W.: Chromatographic separation of orange pectinesterase isozymes on pectates with different degrees of cross-linking. *J. Chromatography*, **168**, 151 (1979)
13. Körner, B., Zimmermann, G. and Berk, Z.: Orange pectinesterase: purification, properties, and effect on cloud stability. *J. Food Sci.*, **45**, 1203 (1980)
14. Rouse, A.H. and Atkins, C.D.: Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. *Food Technol.*, **6**, 291 (1952)
15. Wicker, L., Vassallo, M.R. and Echeverria, E.J.: Solubilization of cell wall bound, thermostable pectinesterase from Valencia orange. *J. Food Sci.*, **53**, 1171 (1988)
16. Seymour, T.A.: Purification and properties of pectinesterases from marsh white grapefruit. *PhD. Thesis*, University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A. (1990)
17. Wicker, L.A.: Reaserch note: Selective extraction of thermostable pectinesterase. *J. Food Sci.*, **57**, 534 (1992)
18. Jansen, E.F., Jang, R. and Bonner, J.: Orange pectinesterase binding and activity. *Food Res.*, **25**, 64 (1960)
19. Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F. and Garcia-Carmona, F.: Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning aquous two phase system. *J. Agric. Food Chem.*, **4**, 1219 (1993)
20. Werck-Reihart, D., Benvenite, I., Teutsch, H., Durst, F. and Garbiac, B.: Glycerol allows low-temperature phase separation of membrane proteins solubilized in Triton X-114: Application to purification of plant cytochrome P-450 and b<sub>5</sub>. *Anal. Biochem.*, **197**, 125 (1991)
21. Bordier, C.: Phase separation of integral membrane protein in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.*, **256**, 1604 (1981)
22. Bradford, M.: Principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
23. Kertesz, Z.I.: Pectic enzymes, In *Method in Enzymology*, Vol 1, Colwick, S.P. and Kolan, N.O.(ed.), Academic Press, New York p.158 (1955)
24. Polcsek-Racz, M. and Pozsar-Hajnal, K.: Determination of pectinmethylesterase, polygalacturonase and pectic substaces in some fruits and vegetables. part 2: Study in the pectolytic enzyme contents of tomatoes. *Acta Alimentaria*, **5**, 189 (1976)
25. Price, N.C. and Stevens, L.: *Fundamentals of Enzymology*, Oxford University Press, London, p.23 (1982)

---

(1995년 1월 6일 접수)