

Valencia 오렌지로부터 분리 정제한 비내열성 및 내열성 Pectinesterase의 성질

허원녕 · Marshall, M.R.*

국립 목포대학교 원예육종학과

*플로리다대학교 식품영양학과

Characterization of Thermolabile Pectinesterase and Thermostable Pectinesterase Separated from Valencia Orange

Won Nyoungh Hou and Marshall, M.R.

Department of Horticultural Breeding in Mokpo National University

**Department of Food Science and Human Nutrition, Institute of Food and Agricultural
Sciences, University of Florida, Gainesville. FL 32611-0163, U.S.A.*

Abstract

This study was carried out to characterize thermolabile pectinesterase (TLPE) and thermostable pectinesterase (TSPE) separated from crude PE of Valencia orange in order to investigate the preventive measures of cloudy juice clarification. The TLPE was observed to be mixture of several isoenzymes with the same molecular weight of 36 KD (37.5 KD) but different isoelectric point of pH 8.4, 8.7, 8.9, 9.8 and ≥ 10 which were unstable at 70°C, and the TSPE also was found to be mixture of two or three isoenzymes with the same molecular weight of 53 KD (50 KD) but different isoelectric point of pH 8.7, 9.2 and ≥ 10 which had slightly different stability from one another at 70°C. The TLPE and the TSPE had the optimum reaction pH of 7.0 and 7.0~8.5, $appK_M$ of 1.1 and 1.7 mg/ml, $appV_{max}$ of 0.53 and 1.01 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$, and the turnover number of 19,000 and 54,000 mol/mol/min toward Kodak pectin, respectively. The TSPE had higher storage stability and cloud loss effect on orange juice than the TLPE. Above all, the crude PE was most effective on orange juice cloud loss among the PEs used.

Key words: thermolabile pectinesterase, thermostable pectinesterase, isoenzyme, cloud loss

서 론

펙티네스테라제(pectinesterase EC 3.1.1.11, PE)는 미생물이나 식물에 존재한다. 특히 주스 제조 원료로 많이 이용되는 여러가지 citrus 과일에도 다량 존재하며^(1,2), 세포벽과 강하게 결합되어 있으며 겔점질, 속겔질 그리고 juice sac 조직에 주로 존재한다⁽³⁻⁶⁾. 미생물이나 식물로부터 추출한 PE는 펙틴 기질에 유사하게 작용함에도 불구하고 PE의 성질은 추출 재료에 따라 달라지며, 이들의 성질은 지금까지 충분히 설명되어지지 못한 편이다⁽⁷⁾. 그들은 또한 다른 효소에 비하여 상대적으로 적은 경우만이 부분적으로 또는 완전히 정제되었다⁽⁷⁾. 대개의

경우 PE의 성질을 직접적으로 비교하는 것은 서로가 기질을 포함해서 분석조건이 다르기 때문에 한계를 가지며, 또한 정제되지 않은 PE의 성질에 관한 자료들은 여러가지 다른 PE형의 혼합체의 성질을 나타낸 것이므로 이들을 분리정제할 필요가 있다. Versteeg⁽⁸⁾는 본인이 사용한 재료인 Valencia orange와 같은 오렌지류에 속하는 Navel orange에서 같은 분자량을 가지며 등전점과 아미노산 조성이 다른 PE의 두가지형과 또 다른 한가지형은 일반적인 PE와는 다르게 특별히 큰 분자량을 갖는 high molecular weight PE(HMW PE)를 분리하였다. 또한 Seymour⁽⁷⁾도 grapefruit에서 내열성이 다른 두가지 isoenzyme을 분리하였다. 위에서 분리한 PE의 isoenzyme들은 각각 pH 또는 온도에 따른 효소활성, 펙틴에 대한 K_M , 오렌지 주스에서의 저장안정성, 열안정성 그리고 혼탁 과일 주스를 맑게하는 성질 등이 서로

Corresponding author: Won Nyoungh Hou, Department of Horticultural Breeding, Mokpo National University, Mo-

호를 떨어뜨리는 것이 PE이며 그 중에서도 내열성을 갖는 PE(thermostable PE, TSPE)가 주된 원인 효소라는 점에 유의하여 오렌지 주스 제조에 많이 이용되고 있는 Valencia orange로부터 내열성이 낮은 PE(thermolabile PE, TLPE)와 TSPE를 분리 정제할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 앞으로 이들의 작용을 억제하여 주스류의 혼탁성을 유지시킬 수 있는 방법을 모색하기 위한 기초자료로 이들의 효소적성질, 안정성 및 저장시 주스의 cloud loss에 미치는 영향등을 검토 비교하였다.

재료 및 방법

TLPE와 TSPE

전보⁹⁾에서 보고한 바와 같이 가열처리하지 않은 PE 조효소로부터 30~50% 황산암모늄 염석 분획, CM-Sephadex C-50, Phenyl Sepharose CL-4B와 CM-Biogel A의 chromatography를 차례로 수행하여 TLPE와 소량의 TSPE를 분리 정제하였으며, 가열처리한 PE 조효소로부터 위와 같은 방법으로 수행하여 가열처리한 것보다 다량의 TSPE만을 분리정제하였고 이들을 공시효소로 사용하였다.

효소 활성 및 단백질 양 측정

효소활성 및 단백질 양의 측정은 전보⁹⁾와 같은 방법으로 실시하였으며, 이 때 PE unit는 표준측정조건에서 분당 1 μ mole carboxyl group을 유리하는 효소량으로 하였다.

Gel Electrophoresis

단백질 band의 분자량의 결정은 Weber와 Osborn¹⁰⁾ 방법에 따라 수행하였다. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)¹¹⁾를 위한 표준 단백질은 bovine serum albumin(66 KD), chicken egg albumin(45 KD), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(36 KD), carbonic anhydrase(29 KD), trypsinogen treated with PMSF(24 KD), trypsin inhibitor(20 KD) 그리고 α -lactalbumin(14.2 KD)의 혼합물(Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO)을 사용하였다. 변성되지 않은 효소단백질을 전기영동하기 위한 hexadecylpyrimidium chloride polyacrylamide gel electrophoresis(HDPC-PAGE)^{12,13)}의 수행에는 변성되지 않은 표준 단백질로 bovine serum albumin(66 KD), ovoalbumin(45 KD), carbonic anhydrase(29 KD)와 chymotrypsinogen(25 KD)(Sigma)을 사용하였다. 등전점을 측정하기 위한 isoelectrofocusing은 Wrigley¹⁴⁾와 Versterberg¹⁵⁾의 방법에 따라 수행하였다. Gel 용액은 1.5%(w/v) methylenedisacrylamide를 함유하는 30%(w/v) acrylamide 6 ml, riboflavin 4 mg과 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED) 0.45 ml를 혼합하여 증류수를 가하여 100 ml로 만든 용액 3 ml, 40% ampholine(pH 3~10, Serva Biochemicals,

Westberg, NY) 1.2 ml, 25% glycerol 9.6 ml 그리고 H₂O 4.2 ml를 혼합하여 만들었다. Gel 용액을 glass tube(5×125 mm)에 90 mm 높이까지 주입한 후에 형광등 아래서 30분간 광중합시켰다. 상기 gel 혼합 용액에 H₂O의 일부를 분리 정제한 TLPE와 TSPE로 대체하여 running gel에 주입하였다. Gel 보호 용액은 40% ampholine 0.15 ml, 70% glycerol 0.643 ml와 H₂O 2.207 ml를 혼합하여 만들고, 이를 광중합시키려는 glass tube의 gel 위에 overlay 하였다. 음극의 전극용액은 1 M NaOH 양극의 전극용액은 0.02 M H₃PO₄로 사용하기 전에 탈기하여 사용하였다. 또한 isoelectrofocusing 중에 PE의 불활성화를 방지하기 위하여 2-mercaptoethanol(0.1 mM)를 양극의 전극용액에 첨가하였다. Isoelectrofocusing은 서서히 전압을 올려 전류는 2 mA/gel, 전압은 350 V 이상이 되지 않도록 주의하면서 5시간 동안 power supply(Eps 500/400, Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NY)를 사용하여 행하였다. Isoelectrofocusing을 마친 후 한 개의 gel은 단백질을 고정하고 ampholine을 제거하기 위하여 5% trichloroacetic acid를 수회 교환하면서 침지한 후 염색 및 탈색은 HDPC-PAGE의 방법과 같이 실시하여 단백질 band를 확인하고, 똑같은 단백질 시료를 loading한 다른 한개의 gel은 5 mm 길이로 절단하여 시험관에서 1.5 ml 물로 하룻밤 동안 추출하여 그들의 pH와 PE 활성을 측정하여 등전점을 결정하였다.

PE의 반응 초기속도에 pH와 반응 기질 농도의 영향

pH 영향을 조사하기 위하여 기질로서 에스테르화도(degree of esterification)는 62% anhydrogalacturonic acid 함량은 64%인 Kodak pectin(Eastman Kodak Company, Rochester, NY)을 사용하였다. pH 8.5 이상에서는 펙틴에 메칠에스테르의 알카리분해에 의하여 효소활성 측정이 지장이 있었으므로 Kodak pectin을 기질로한 PE의 최적 반응 pH를 알아내기 위한 실험에서는 pH 8.5 까지만 조사할 수 있었으며 반응 초기속도를 pH 5~8.5 범위에서 소정의 pH로 pH-stat를 맞추어 놓고 titrimetric method^{16,17)}에 의하여 효소 활성을 측정하여 결정하였다. Kinetic parameter로서 $appK_M$ 과 $appV_{max}$ 값은 1~10 mg/ml범위의 기질 농도에서 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plots로부터 계산하였다.

PE의 저장 안정성

PE를 single strength orange(SSO) juice(pH 4.0, 10° Brix)와 frozen concentrate orange juice(pH 4.0, 40° Brix)에 m/당 PE 1 unit를 첨가하여 전자는 4°C에 후자는 -20°C에 보관하면서 일정한 시간 간격으로 보관 시료를 취하여 잔존활성을 측정하였다.

열 안정성

여러개의 소정 온도에서 5분 동안 가열처리한 후 잔존활성을 측정하여 조사하였다. 같은 크기의 시험관에

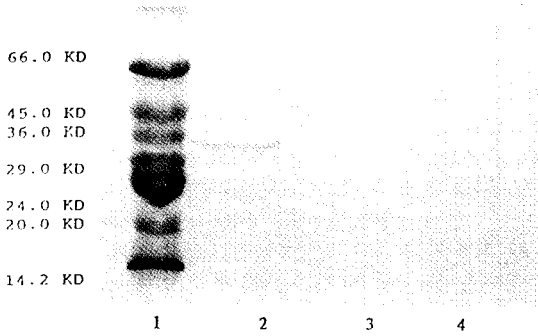


Fig. 1. Separated TLPE and TSPE on 12% SDS-PAGE mini-gel stained with Coomassie blue

Protein standards were bovine serum albumin(66 KD), chicken egg albumin(45 KD), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(36 KD), carbonic anhydrase(29 KD), trypsinogen treated with PMSF(24 KD), trypsin inhibitor(20 KD) and α -lactalbumin(14.2 KD). Lane 1: protein standards; lane 2: TLPE; lane 3: TSPE by unheated procedure; lane 4: TSPE by heated procedure.

SSO juice(pH 3.85, 13.7°Brix) 1 ml를 넣고 이에 PE 1 unit를 첨가하여 혼합한 후 thermocouple probe를 시험관에 넣고, 시험관을 소정의 온도로 맞춘 수조에서 5 분간 가열한 다음 즉시 얼음 물에서 냉각하여 잔존활성을 측정하였다. SSO juice(pH 3.85, 13.7°Brix)에서 TSPE의 열에 의한 불활성화 속도를 75°C, 80°C, 85°C에서 측정하였다. TSPE 3 units를 1 ml SSO juice가 들어있는 시험관에 넣고 혼합하여 소정 온도에서 소정의 시간 동안 위에서 말한 바와 같이 가열하였다. 그의 잔존활성 백분율(%)의 대수를 가열시간에 대하여 나타내어 D-value와 Z-value를 구하였다.

Orange juice의 cloud loss에 PE가 미치는 영향

Juice의 cloud loss에 분리한 TLPE TSPE 그리고 PE조효소가 미치는 영향을 보기 위하여 SSO juice에 존재하는 PE를 불활성화시키기 위하여 80°C에서 15분간 가열처리하고 50 ml juice에 각각의 PE 1 unit를 첨가하여 냉장 및 실온에서 저장하면서 일정한 시간 간격으로 cloud loss를 측정하였다. Cloud loss는 저장 중의 juice 일부분을 채취하여 10분 동안 325×g로 원심분리하여 상정액을 660 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다^(8,19).

결과 및 고찰

TLPE 및 TSPE의 효소적 특성

분자량 측정 : 분자량을 측정한 결과는 SDS-PAGE (Fig. 1)에서 TLPE는 36 KD이었고, TSPE는 53 KD이었다. 변성되지 않은 단백질의 HDPC-PAGE에서의 분자량 측정 결과도 비슷하여 TLPE는 37.5 KD TSPE는 50

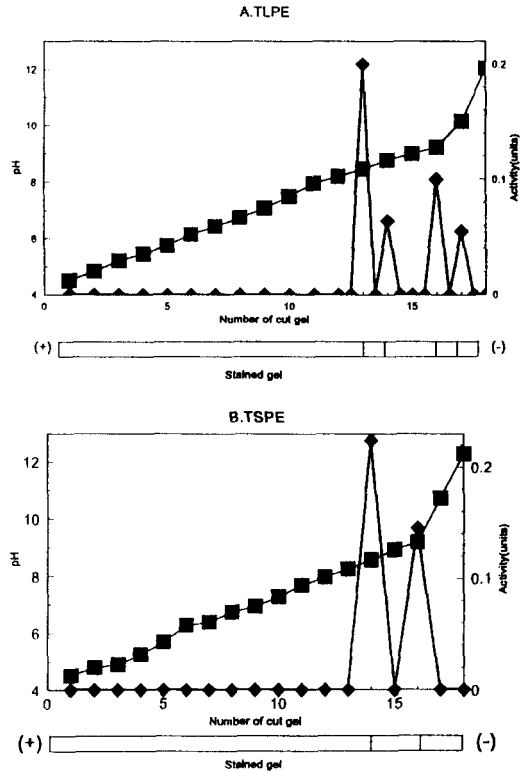


Fig. 2. pI determination of separated TLPE and TSPE

The 5% acrylamide gels containing pI 3-10 amphorine were electrofocused with electrode solutions of 0.02 M phosphoric acid and 1 M sodium hydroxide for 4 hours at cold room and 350 volts. Each 0.5 cm cut of 0.5×9 cm electrofocused tube gels was extracted with 2 ml distilled water and measured for pH and PE activity at room temperature. Another same gels were detected protein band with Coomassie blue.

■—■, pH; ■—■, Activity

KD이었다. 본 효소의 TLPE는 일반적인 식물성 PE와 같고 TSPE는 navel orange의 HMW PE⁽⁶⁾와 grapefruit의 TSPE⁽⁷⁾와 유사한 분자량을 나타내었다.

등전점 : TLPE는 Fig. 2의 A에서와 같이 효소 활성을 갖는 pH 8.4, 8.7, 8.9 그리고 9.8의 4개의 등전점 band를 보였다. TSPE는 Fig. 2의 B에서 보는 바와 같이 PE 활성을 갖는 pH 8.7과 9.2의 등전점 band를 보였다. Isoelectrofocusing tube gel상에서 분리되어 나타난 TLPE 및 TSPE의 각 band의 내열성을 조사하여 전보⁽⁹⁾에서 분리 정제한 결과와 같은 내열성을 갖는가를 재확인하여 보기 위하여 gel로부터 추출한 효소를 70°C에서 10분간 가열 처리한 후의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과는 TLPE의 등전점을 나타낸 4개의 band는 모두 PE의 잔존 활성이 전혀 없었으나, TSPE의 등전점 8.7의 PE band는 90% 이상의 잔존활성을 보였으며 등전점 9.2의 PE band는

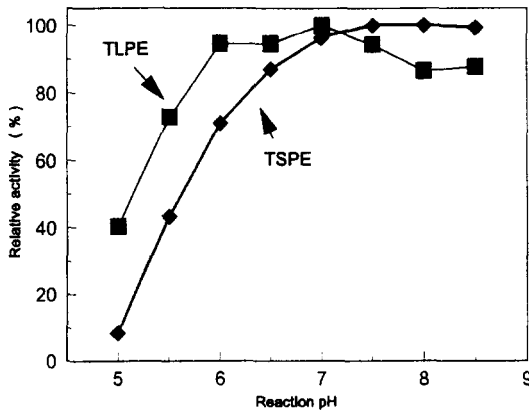


Fig. 3. The effect of pH on reaction rate of TLPE and TSPE

Enzyme activity was measured titrimetrically at all reaction pH. 13 units of TLPE and 10 units of TSPE(measured at optimal pH) were used per assay.

70% 정도의 잔존활성을 보였다. 이로써 isoelectrofocusing에 의해 분리된 TLPE는 내열성이 예상대로 없었으며 TSPE는 분리되어진 band가 내열성이 있으나 그들 간에 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다(데이터 제시되지 않았음). Seymour⁽⁷⁾의 grapefruit PE 들과 Versteeg⁽⁸⁾의 orange PE들의 등전점이 pH 10 이상임을 고려하여 pH 9~11 ampholine(Serva의 Servalyte)을 사용하여 등전점 측정용 gel을 만들고자 하였으나 중합이 되지않아 pH 10 이상의 등전점은 확인할 수 없었다. Citrus PE들의 등전점은 특별히 pH 10 이상의 등전점을 갖는 염기성 단백질이라고 한다^(8,19). TLPE와 TSPE는 SDS-PAGE와 HDPC-PAGE에서는 동일한 분자량을 나

타냈으나, 이들은 각각 다른 charge를 갖는 몇개의 isoenzyme이 혼합되어 있으며, Versteeg⁽⁸⁾나 Seymour⁽⁷⁾의 citrus 과일과 다르게 pH 10 이하의 등전점도 나타내었다. 이는 분리 정제된 TLPE는 같은 분자량과 내열성이 없는 점은 같지만 charge가 다른점이 차이점인 isoenzyme의 집합체이며 TSPE는 분자량은 같으며 내열성 및 charge가 다른 isoenzyme의 집합체이었으며 앞으로 이들을 각각으로 분리하여여만 더욱 필요한 정보가 얻어질 것이라고 본다.

pH와 기질 농도가 효소의 반응 초기속도에 미치는 영향: 그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 TLPE는 pH 7.0이었고 TSPE는 pH 7.0에서 8.5까지 같은 높은 활성을 나타내었다. 식물성 PE의 반응 최적 pH는 8.0이고 pH 3.5에서 최소반응을 나타낸다고 하였고⁽²⁰⁾, Versteeg⁽⁸⁾는 pH를 7.0으로부터 4.0으로 감소시킬 때 효소의 기질에 대한 친화도가 급격히 감소하였다고 하였다. 이는 펙틴이 음으로 하전되고 염기성 단백질인 PE는 양으로 하전되어 이들이 효소 기질 복합체를 형성하는데 기질의 free carboxyl group은 필수적이라고 볼 때⁽²¹⁾, 낮은 pH에서 기질에 대한 친화도의 감소는 펙틴의 pKa가 약 4.0인 점을 고려할 때 free carboxyl group의 해리도가 감소되는 것이 원인이라고 하였다⁽⁷⁾. 또한 과일 주스의 펙틴과 같이 기질인 펙틴의 에스테르화도가 낮을수록 free carboxyl group이 많아짐으로 과일 주스의 낮은 pH에서도 PE 작용에 영향이 적은 것으로 생각할 수 있다고 하였다⁽⁷⁾. 본 효소도 비교적 기질의 에스테르화도가 높은 편임으로 free carboxyl group이 많이 생성될 수 있는 pH 7.0 또는 그 이상의 pH에서 높은 활성을 나타내었다. 반응 초기속도를 pectin 기질의 농도를 여러가지로 달리하여 측정된 결과를 Lineweaver-Burk plot하여 구한 TLPE와 TSPE의 $appK_M$ 값은 각각 1.1과 1.7 mg/ml이

Table 1. Characteristics of Pectinesterases of Citrus Fruits

Source	M.W.	pI	Sp.Act. (units/mg)	K_M (mg/ml)	Opt.pH	Turnover No. (mol/mol/min)
Valencia Orange						
TLPE	36,000 ⁽⁵⁾ (37,500 ⁽⁶⁾)	8.4, 8.7, 8.9, 9.8, ≥10	1,005	1.1	7.0	19,058
TSPE	53,000 ⁽⁵⁾ (50,000 ⁽⁶⁾)	8.7, 9.2, ≥10	3,115	1.7	7.0-8.5	53,588
Grapefruit ⁽¹⁾						
TLPE ^c	37,300 ^c	≥10	776	0.274	7.0	26,354
TSPE ^c	53,500 ^c	≥10	540	1.02	7.8	30,621
Orange ⁽²⁾						
PE I	36,200 ^c	10	694	0.083	7.6	20,400
PE II	36,200 ^c	≥11	762	0.0046	8.0	20,280
HMWPE	54,000 ⁽⁷⁾	10.2	762	0.041	8-8.5	
Orange ⁽³⁾						
PE I			222	0.25		
PE II			444	0.21		
Orange ⁽⁴⁾			110.39	2.3	8.0	

¹⁾Seymour(7), ²⁾Versteeg(8), ³⁾Evans and McHale(22), ⁴⁾Manabe(6), ⁵⁾Estimated by SDS-PAGE, ⁶⁾Estimated by HDPC-PAGE, ⁷⁾Estimated by gel filtration chromatography.

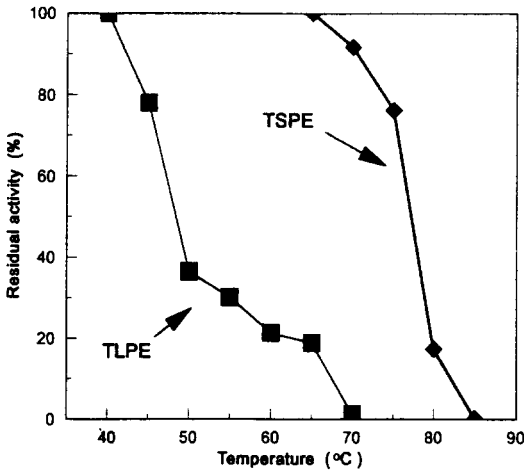


Fig. 4. Heat stability of pectinestrase in single strength orange juice

After TLPE and TSPE were heated at various temperature in single strength orange juice of pH 3.85 and 13.7 °Brix for 5 min, residual activity was measured by titrimetric assay.

었고, appVmax의 값은 각각 0.53과 1.01 μmol/min/μg 이었다. 또한 turnover number(Kcat)는 각각 19,000과 54,000 mol/mol/min이었다. 이상의 본 효소의 효소적 성질과 보고된 PE의 특성을 Table 1에 요약하여 보았다. 본 TLPE와 TSPE의 분자량과 Versteeg⁽⁶⁾와 Seymour⁽⁷⁾의 PE들과 유사하였으나 다른 성질에서는 많은 차이를 보였다. 이러한 차이는 본 효소의 높은 비활성, 추출 및 분리방법의 차이 그리고 대상으로한 과일의 차이에 연유한 것으로 볼 수 있다.

TLPE 및 TSPE의 안정성과 juice의 cloud loss에 미치는 영향

열 안정성 : TLPE와 TSPE의 열 안정성을 조사하기 위한 예비실험으로 여러 온도에서 시간을 달리하고 가열처리하여 잔존활성을 측정한 결과 5분동안 가열한 이후에는 거의 비슷한 잔존활성을 보였으며, TLPE는 40 °C까지 TSPE는 65°C까지는 100%의 잔존활성을 유지하였으므로, TLPE는 40°C에서부터 TSPE는 65°C에서부터 5분간 인산완충액(pH 7.0)에서 가열한 다음 잔존활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig.4에서 나타난 바와 같이 큰 차이를 보였으며, TLPE는 70°C에서 TSPE는 85°C에서 각각 완전히 불활성화되었다. 열 안정성이 큰 TSPE를 SSO juice에 m/당 PE 3.08 units씩 첨가하여 75, 80, 85 °C에서 여러 시간 간격으로 가열하여 잔존 활성을 측정하여 D값(decimal reduction time)을 구한 결과는 75, 80, 85°C에서 각각 22.7, 3.5, 0.46 min이었으며, 이로부터 구한 Z값은 5.9°C이었다. 이 값은 Versteeg⁽⁸⁾가 분리한 내열성을 갖는 HMW PE의 Z값 6.5°C보다 작으며 본

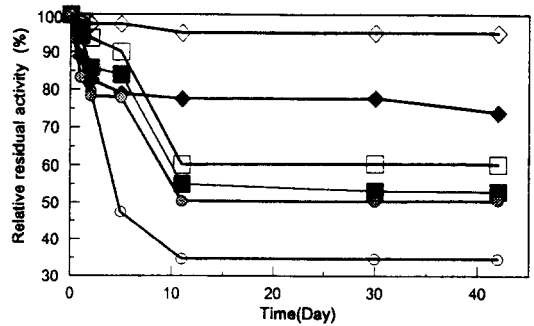


Fig. 5. Storage stability of PE in orange juice

Activity was measured titrimetrically after PEs storage in single strength orange juice(pH 4.0, 10°Brix) at 4°C and frozen concentrated orange juice (pH 4.0, 40°Brix) at -20°C.

■—■, TLPE 4°C; ◆—◆, TSPE 4°C; ○—○, Crude PE 4°C; □—□, TLPE -20°C; ◇—◇, TSPE -20°C; ●—●, Crude PE -20°C

공시효소의 TSPE가 열 안정성이 낮은 편으로 나타났다. 모든 citrus 과일의 PE들은 60~100°C의 범위에서 불활성화된다^(2,8). Navel orange로부터 정제한 내열성이 없는 두개의 PE가 그들의 조효소보다 열 안정성이 작은 것은 조효소가 정제된 PE이외에 불활성시키려면 20~30°C 더 높은 온도를 필요로 하는 HMW PE가 5% 정도 함유되어 있기 때문이라고 하였다⁽⁶⁾. 이에는 같은 조건(pH, °Brix, 이온농도, 펄프의 함량)의 citrus 주스에서 다른 열 안정성을 갖는다면 PE는 서로 다른 PE라는 생각까지 하게 되었다^(23,24). 이와 같은 열 안정성의 결과는 아미노산 분석이나 그들의 배열을 조사하지는 않았지만 이들 사이의 구조상의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

저장성 : 재료 및 방법에서 설명한 바와 같은 조건에서 TLPE, TSPE 그리고 PE 조효소의 잔존활성을 42일간 조사하였다. 그 결과는 Fig.5에서 나타난 바와 같이 조사한 조건이 냉장이나 냉동에 관련없이 TSPE, TLPE, 그리고 PE 조효소의 순으로 저장성이 크게 나타났다. 그리고 예상되는 바와 같이 냉동저장이 냉장 보다 또한 저장성이 크게 나타났으며 조사한 모든 효소가 저장 10일 이후에는 거의 일정한 활성을 유지하였다. Versteeg⁽⁸⁾는 Navel orange로부터 분리한 PE들을 오렌지주스(pH 4)에서 4°C와 30°C에 저장하면서 저장안정성을 조사한 결과는 HMW PE는 상기 저장조건에서 매우 안정하였으나 두개의 저분자량의 PE는 각각 30°C에서 0.22일 혹은 21 일 저장에 10% 이하로 활성이 저하되었다. 본실험 결과에서 TSPE가 TLPE보다 저장성이 크게 나타난 것은 Versteeg⁽⁸⁾의 결과와 비슷한 경향을 보였으나, TLPE와 TSPE가 혼합되어 있는 PE조효소가 예상과는 달리 TLPE보다 안정성이 낮은 이유는 앞으로 규명할 필요가 있다고 본다.

Orange juice의 cloud loss에 미치는 PE의 영향 :

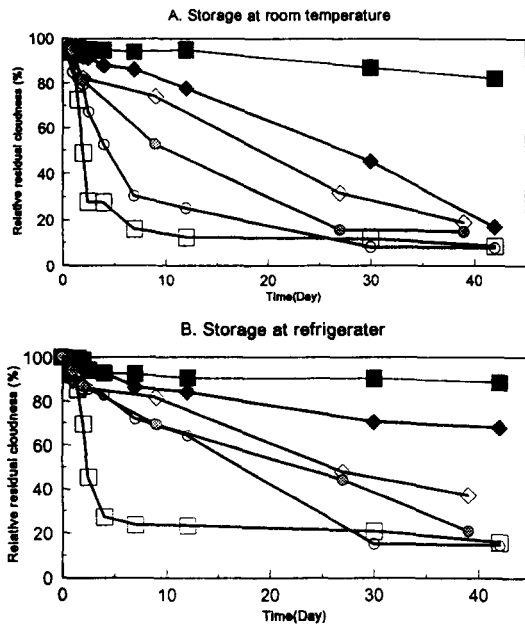


Fig. 6. Effect of PEs on orange juice cloud loss
Single strength orange juice (pH 3.9, 10°Brix containing 1 mM NaN_3) heated at 80°C for 10 min was used for measuring the effect of PEs on the cloud stability of orange juice. The cloud loss was determined by optical density of the supernatant at 660 nm after centrifuging for 10 min at 360×g.
■—■, no pectinesterase; ◆—◆, TLPE(1 unit), ○—○, TSPE(1 unit); □—□, crude PE(1 unit); ◇—◇, TLPE(0.9 units)+TSPE(0.1 units); ●—●, TLPE(0.5 units)+TSPE(0.5 units)

SSO juice에 PE들을 첨가하여 cloud loss에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 6과 같았다. 실온저장에서도 냉장 어디에서나 PE를 첨가하지 않은 것과 비교하면 모든 PE가 cloud loss에 영향을 주었으며 또한 실온저장이 저온저장보다 cloud loss의 속도가 크게 나타났으며, 그 순서는 PE 조효소, TSPE, TLPE이었다. 특히 PE 조효소는 다른 어느 것보다 영향이 크며 또한 TSPE와 TLPE의 혼합구(TLPE 0.9 units + TSPE 0.1 units, TLPE 0.5 units + TSPE 0.5 units)보다도 영향이 큰 것은 PE 조효소에 포함되어 있는 PE 이외의 어떠한 인자가 cloud loss에 크게 영향을 미치는 것이 아닌가하는 문제를 제기하는 반면, Fig. 6에서 오렌지주스의 냉장온도 5일 정도에서 PE의 잔존활성이 약 50%이었으며, PE 조효소가 cloud loss에 영향을 미치는 기간이 거의 이시기인 점을 보면 cloud loss는 PE 조효소의 PE활성에 의한 것이라고도 생각되어지며 좀더 철저한 규명이 필요하다고 본다. TSPE와 TLPE의 혼합구와 각각 단일하게 첨가한 경우의 결과는 모두 TLPE보다 TSPE가 cloud loss에 크게 영향을 미치는 결과를 보여준다. Versteeg의 조사결과⁽⁸⁾는 그의 HMW PE가 저온에서나 저온 살균처리한 주스에서

PE 조효소와 함께 cloud loss에 가장 영향이 큰 것은 본 실험의 결과와 유사하지만 본실험의 TLPE는 상온에서 뿐만아니라 냉장에서도 cloud loss에 영향을 미친 점은 다른 결과로 나타났다.

요 약

Valencia orange로부터 분리된 TLPE는 분자량이 36 KD(37.5 KD)이며 등전점이 pH 8.4, 8.7, 8.9, 9.8, ≥10인 isoenzyme의 혼합물이었고, 또한 TSPE는 분자량이 53 KD(50 KD)이며 등전점이 pH 8.7, 9.2, ≥10인 isoenzyme의 혼합물이었다. TLPE의 최적 작용 pH는 7.0, $\text{app}K_M$ 은 1.1 mg/ml, $\text{app}V_{\text{max}}$ 는 0.53 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$, turnover number는 19,000 mol/mol/min이었으며, TSPE의 최적 작용 pH는 7.0~8.5, $\text{app}K_M$ 은 1.7 mg/ml, $\text{app}V_{\text{max}}$ 는 1.01 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$, turnover number는 54,000 mol/mol/min이었다. TSPE는 가열처리와 오렌지주스에서 저장에 대하여 TLPE보다 훨씬 안정하였다. 또한 PE조효소, TSPE 그리고 TLPE 중에서는 orange juice의 cloud loss에 PE조효소가 가장 크게 영향을 미쳤으며 그 다음으로 TSPE TLPE 순서로 나타났다.

문 헌

- MacMillan, J.D. and Sheiman, M.T.: Pectic enzymes. In *Food Related Enzymes*, Whitaker, J.R.(ed.), Advances in Chemistry Series, Am. Chem. Soc., Washington, D. C., Vol.136, p.101 (1974)
- Rexov-Benkov, L. and Markovi, O.: Pectic enzymes. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Tripton, R.S. and Horton, D(ed.), Acad. Press, New York, Vol.33, p.323 (1976)
- MacDonnell, L.R., Jansen, E.F. and Linweaver, H.: The properties of orange pectinesterase. *Arch. Biochem.*, **6**, 389 (1945)
- Rouse, A.H.: Distribution of pectinesterase and total pectin in component parts of citrus fruits. *Food Technol.*, **7**, 360 (1953)
- Jansen, E.F. Jang, R. and Bonner, J.: Orange pectinesterase binding and activity. *Food Res.*, **25**, 64 (1960)
- Manabe, M.: Purification and properties of *Citrus natsudaidai* pectinesterase. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1487 (1973)
- Seymour, T.A.: Purification and properties of pectinesterases from Marsh Grapefruit. PhD Dissertation, University of Florida, Gainesville, FL., U.S.A. (1990)
- Versteeg, C.: Pectinesterase from the orange fruit—their purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. *Ph.D. Thesis*, Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands (1979)
- Hou, W.N. and Marshall, M.R.: A study on separation of thermolabile and thermostable pectinesterase from Valencia orange. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 673 (1995)
- Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecu-

- lar weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
11. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
 12. Amory, A., Foury, F. and Goffeau, A.: The purified plasma membrane ATPase of yeast *Schizosacharomyces I2pombe* forms a phosphorylated intermediate. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9353 (1980)
 13. Resh, M.D.: Development of insulin responsiveness of glucose transporter and the (Na⁺, K⁺)-adenosine triphosphatase during *in vitro* adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6978 (1982)
 14. Wrigley, C.W.: Analytical fractionation of plant and animal protein by electrofocusing. *J. Chromatog.*, **36**, 362 (1968)
 15. Versterberg, O.: Isoelectric focusing of proteins. In *Method in Enzymology*. Acad. Press, New York, Vol.22, p.389 (1971)
 16. Kertesz, Z.I.: Pectic enzymes I. The determination of pectin-methoxylase activity. *J. Biol. Chem.*, **121**, 589 (1937)
 17. Rouse, A.H. and Atkins, C.D.: Pectinesterase and pectin in commercial citrus juice as determined by methods used at the citrus experiment station. University of Florida, Agricultural Experiment Stations, Gainesville, Florida, *Technical Bulletin*, **570**, (1955)
 18. Körner, B., Zimmermann, G. and Berk, Z.: Orange pectinesterase: purification, properties and effect on cloud stability. *J. Food Sci.*, **45**, 1203 (1980)
 19. Rombouts, F.M., Versteeg, C., Karman, H. and Pilnik, W.: Pectinesterases in component part of citrus fruits related to problems of cloud loss and gelation in citrus products. In *Use of Enzymes in Food Technology*, Dupuy, P.(ed.), Technique et. documentation Lavosier, Paris, p.483 (1982)
 20. Moustacas, A., Nari, J., Diamantidis, G. Noat, G., Crasnier, M., Borel, M. and Ricard, J.: Electrostatic effects and dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. Part 2. The role of pectin methylesterase in modulation of electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur. J. Biochem.*, **155**, 191 (1986)
 21. Solms, J. and Deuel, H.: On the mechanism of enzymatic saponification of pectic substances. *Helv. Chim. Acta*, **38**, 321 (1955)
 22. Evans, R. and McHale, D.: Multiple forms of pectinesterase in limes and oranges. *Phytochemistry*, **17**, 1073 (1978)
 23. Eagerman, B.A. and Rouse, A.H.: Heat inactivation temperature-time relationships for pectinesterase inactivation in citrus juices. *J. Food Sci.*, **41**, 1396 (1976)
 24. Rouse, A.H. and Atkins, C.D.: Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. *Food Technol.*, **7**, 221 (1952)

(1995년 2월 6일 접수)