

Valencia 오렌지에서 내열성 및 비내열성 Pectinesterase 분리 정제

허원녕 · Marshall, M.R.*

국립 목포대학교 원예육종학과
플로리다대학교 식품영양학과

A Study on Separation of Thermolabile and Thermostable Pectinesterase from Valencia Orange

Won Nyong Hou and Marshall, M.R.*

Department of Horticultural Breeding in Mokpo National University

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

Abstract

Pectinesterase(PE) has been definitively established as the causative agent for clarification of citrus juice and gelation of frozen concentrates. This enzyme is present in multiple forms in citrus fruit. Although representing a minor fraction of the total PE activity, thermostable pectinesterase(TSPE) accounts for the severe time/temperature processing treatment required to inactivate PE. This study was undertaken to separate and purify thermolabile pectinesterase(TLPE) and TSPE from the crude PE extracts of Valencia orange rag-pulp powder. The approach taken was to carry out the three kind of chromatographies of CM-Sephadex C-50, Phenyl Sepharose CL-4B and CM-Biogel A to the unheated crude PE or the heated crude PE. All of them used could increase the purity of PEs and, specially, Phenyl Sepharose CL-4B chromatography could separate crude PE as the mixture of PEs into two forms of TLPE and TSPE. The purified TLPE had specific activity of 1,005 units/mg, yield of 13.6% and purification of 35 fold, while the TSPE separated from the unheated crude PE showed specific activity of 3,115 units/mg, yield of 1.5% and purification of 100.5 fold, and another TSPE from the heated crude PE was found to be specific activity of 1,803 units/mg, yield of 15.4% and purification of 140 fold.

Key words: thermolabile pectinesterase, thermostable pectinesterase

서 론

펙틴에스테라제(pectinesterase EC 3.1.1.11, PE)는 citrus 과일로부터 만든 주스의 침전 형성(cloud loss)이나 농축주스의 겔화에 원인이라는 것이 밝혀진 이래로 오렌지 주스 등을 제조하는 산업에서 주요한 관심의 대상이 되었다^(1,2). Citrus 과일 주스나 이들을 함유한 천연음료에서 PE의 불완전한 불활성화는 주스 품질의 손상을 초래하게 된다. 이효소는 citrus 과일에 multiple form으로 존재하며 그 중의 일부는 특별히 내열성을 지니고 있다⁽³⁻⁶⁾. 내열성 PE(thermostable pectinesterase, TSPE)는 citrus fruit의 총 PE 중에 5~30%에 불과하지만^(5,7), 저온 저장한 주스에서도 강한 활성을 나타내고⁽⁸⁾

citrus 과일주스에서 이들을 불활성화시키기 위해서는 증발농축하거나 90°C에서 1분간 가열처리하여야 한다^(6,8,9). 그러나 높은 온도에서 가열처리한 주스는 off-flavor를 생산한다⁽¹⁰⁾. citrus 과일 과 여러가지 과일 및 채소에 PE가 존재하는 것이 많은 경우 확인되었다. 그러나 주스 가공 및 저장에 보다 크게 영향을 미치는 TSPE를 PE의 대부분을 차지하는 비내열성 펙틴에스테라제(thermolabile pectinesterase, TLPE)로부터 분리하는 것은 혼탁주스(cloudy juice)에 혼탁성의 유지로 이들의 품질을 향상시키고자 할 때에 필요한 선결과제이라 생각할 수 있다. Versteeg⁽⁶⁾이 navel 오렌지 및 기타 citrus 과일로부터 TLPE보다 분자량이 큰 TSPE를 분리하였고, Seymour 등⁽¹¹⁾은 자몽으로부터 추출한 PE 조효소를 일단 가열처리한 다음 TSPE만을 정제한 보고는 있지만, TSPE는 TLPE에 비하여 양이 적고 그들의 분리수단이 확립되지 못하여 TLPE로부터 분리하기 어려운 점이 있다^(6,11,12). 오렌지주스 원료로 많이 이용되고 있는 Valencia 오렌지로부터 추출한 조효소에서 TLPE와 TSPE를

Corresponding author: Won Nyong Hou, Department of Horticultural Breeding, Mokpo National University, Mokpo, Chunnam, Zip code 534-729, Tel. (0636) 450-2373, Fax. (0636) 52-0140, Korea

Versteeg⁽⁶⁾나 Seymour⁽¹¹⁾의 방법에 따라 분리 정제하고자 하였으나 좋은 결과를 얻지 못하였다. 그러므로 본 연구에서는 TSPE와 TLPE를 용이하게 분리할 수 있는 새로운 시도로 이들의 소수성 차이를 이용한 hydrophobic interaction chromatography(HIC)에 의하여 추출한 가열하지 않은 조효소에서 TLPE와 TSPE를 또는 가열 처리한 조효소에서 TSPE만을 분리하여 정제할 수 있었기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

효소의 추출

Valencia 오렌지의 Rag-pulp분말을 증류수(1:2 w/v)와 혼합하여 5,000 r.p.m.에서 20초씩 3회 균질화하고 원심분리하였다(9,000×g, 30 min., 4°C). 상정액은 버리고 침전물에 1 mM NaN₃와 1 M NaCl 함유한 0.2 M 초산 완충액(pH 4.14)과 1:3(w/v)으로 혼합하고 침전물의 양에 0.2%의 Cytolase™ 104(cellulase, hemicellulase 및 pectinase를 함유)를 첨가하여 실온에서 교반하면서 가수분해한 다음 저온실(4°C)에서 하룻밤 방치하였다. 가수분해액을 원심분리하여(10,000×g, 20 min., 4°C) 상정액을 조효소액으로 사용하였다⁽¹³⁾.

TLPE와 TSPE의 분리

조효소를 황산암모늄 30~75% 범위의 포화도로 염색 분취하여 그 침전물을 원심분리(9,000×g, 30 min., 4°C) 회수하고, 1 mM NaN₃를 함유하는 10 mM 인산완충액(pH 7.5)에 녹여 동일 완충액에 투석하였다. 투석효소를 1:10의 부피 비율로 양분하여 소량의 부분은 가열하지 않은 천연적인 상태로 하고 다량의 부분은 Seymour 등⁽¹¹⁾이 TSPE를 분리정제한 것과 같이 가열 처리하였다. 가열 처리는 투석효소 30 ml를 큰 시험관에 넣어 70°C에서 10분간 가열하고 원심분리하여(10,000×g, 30 min., 4°C) 상정액을 회수하였다. 천연상태의 투석효소에서는 TLPE와 TSPE를, 가열처리한 투석효소에서는 TSPE만을 CM-Sephadex C-50(Sigma, St. Louis, MO) chromatography, Phenyl Sepharose CL-4B(Sigma) chromatography(hydrophobic interaction chromatography; HIC)와 CM-Biogel A(Sigma) chromatography를 수행하여 분리 정제하였다. Chromatography를 위한 완충액은 가열 처리한 효소와 가열처리하지 않은 효소에서 TSPE를 주 성분으로 한 HIC peak I은 1 mM NaN₃를 포함하는 pH 7.0의 10 mM 인산완충액을 사용하고 다른 경우는 1 mM NaN₃를 포함하는 pH 7.5의 10 mM 인산완충액을 사용하였다. CM-Sephadex C-50 column(275 ml bed volume, 5×14 cm)와 CM-Biogel A column(88 ml bed volume, 2×28 cm)에 각각의 해당 수지를 팽윤하여 충전하고 완충액을 16 ml/hr의 유속으로 활성화 내지 평형화시켰다. 효소를 수지에 흡착시킨 다음 CM-Sephadex C-50 column에서는 A_{280 nm}의 값이 0.1 이하일 때까지 CM Bio-

Gel A column에서는 A_{280 nm}의 값이 0.01 이하가 될 때까지 세척하였다. 흡착된 효소는 NaCl(0~0.6 M)의 농도를 증가시키는 increasing gradient에 의하여 추출하였다. 분획은 4 ml씩 채취하여 PE의 활성과 단백질 양을 측정하였다. PE의 활성을 보이는 분획을 모아 더욱 정확하게 단백질 양과 효소의 활성을 측정하였다. Phenyl Sepharose CL-4B column(88 ml bed volume, 2×28 cm)에 미리 20% ethanol에 팽윤 활성화시킨 수지를 충전하고 1 mM NaN₃와 2 M KCl를 함유하는 10 mM 인산완충액(pH 7.8)으로 평형화하였다. CM-Sephadex C-50 column의 활성부분을 1 mM NaN₃와 2 M KCl를 함유하는 10 mM 인산완충액(pH 7.8)으로 투석하여 이 column에 loading한 후에 유속 15 ml/hr으로 2 M KCl(pH 7.8)에서 0 M KCl(pH 7.0)으로 decreasing gradient하여 효소를 용출하였다. 소수성 column(HIC)의 활성부분을 투석하여 CM-Biogel A column에 loading하여 CM-Sephadex C-50 column에서와 같은 조건에서 chromatography를 수행하였다. 각각의 column chromatography의 활성부분은 전기영동에 의하여 분리 정제의 정도를 평가하였다.

효소의 활성 측정

정확한 효소활성을 알아보기 위한 Titrimetric assay는 전보⁽¹³⁾와 같이 하였으며 PE unit는 표준측정조건에서 분당 1 μmole carboxyl group을 유리하는 효소량으로 하였다. column chromatography fraction의 상대적 효소 활성을 측정하기 위하여 사용한 분광 광도계에 의한 Hargerman과 Austin⁽¹⁴⁾의 방법은 Seymour 등⁽¹¹⁾이 개편한 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 0.5% 펙틴(Eastman Kodak Company, Rochester, NY) 용액은 1% 펙틴 용액을 희석하여 만들고, 측정하기 직전에 3 mM 인산완충액(pH 7.5)에 0.04%로 녹인 bromthymol blue(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) 용액 7.5 ml를 100 ml의 0.5% 펙틴용액과 혼합하여 pH 7.8로 조정하고, 증류수를 첨가하여 150 ml로 만들어 필요하면 pH를 다시 조정한 용액을 pectin-dye 혼합액으로 하였다. 큐벳에 3 ml의 pectin-dye 혼합액을 넣고(초기 A₆₂₀은 H₂O를 blank로 하였을 때 1.1~1.25) 40 μl의 PE 시료를 첨가하여 반응을 시작하였고, A₆₂₀의 감소속도는 enzyme kinetic accessory가 부착된 Lambda 4B UV/VIS Spectrophotometer(Perkin-Elmer)에서 기록하였다. 표준곡선용 물질로는 galacturonic acid를 사용하였으며, ΔA₆₂₀(galacturonic acid를 포함하는 pectin-dye 혼합액과 galacturonic acid를 포함하지 않은 pectin-dye 혼합액의 A₆₂₀의 차)이 0.85 (3 ml의 pectin-dye 용액 당 0.16 μmole galacturonic acid)까지는 첨가한 galacturonic acid의 양에 직선상의 비례 관계를 나타냈다. 표준곡선의 직선상의 범위에서 PE 시료의 ΔA₆₂₀/min을 구하여 PE unit(생성된 산 μmole/min)로 환산하는 데 이용하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradford⁽¹⁵⁾의 방법으로 수행하였다. 단백질 분석용 시약 kit는 Bio-Rad Laboratories(Meville, NY)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 정량 표준곡선은 bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였다, 그리고 column에서 분취한 단백질은 A₂₈₀을 측정하여 비교하였다.

전기영동

PE는 염기성 단백질인 점을 고려하여 양전하로 하전시켜 전기영동하는 hexadecylpyrimidium chloride polyacrylamide gel electrophoresis(HDPC-PAGE)^(16,17)를 사용하여 PE 분리 단계별로 단백질의 순도를 검정하였다. HDPC-PAGE는 Bio-Rad Mini ProteanR II dual slab cell unit(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)를 사용하여 수행하였으며 단백질 band의 염색은 40% methanol과 10% acetic acid의 0.1% Coomassie brilliant R-250 (FisherBiotech, electrophoresis grade, Fisher Scientific)을 사용하였다.

결과 및 고찰

가열처리하지 않은 조효소로부터 TLPE와 TSPE의 분리 정제

0.3~0.75 포화도로 황산암모늄 염석한 PE를 투석하여 가열하지 않고 CM-Sephadex C-50 column에 loading하여 chromatography한 결과는 Fig. 1의 A와 같았다. 단백질과 색소물질의 대부분은 세척 단계에서 흡착되지 않고 배출되었으며 이 부분은 PE 활성이 거의 혹은 전혀 없었다. 0~0.5 M NaCl 범위에서 increasing gradient로 추출할 때 0.2~0.32 M NaCl의 용출범위에서 하나의 활성이 있는 peak를 나타냈다. 이 범위의 분획을 모아 Amicon filter로 농축하였다. 여기에서 얻은 활성 peak는 단백질의 양은 많지만 전체가 PE가 아니었으므로 이 부분을 TLPE와 TSPE로 분리하기 위하여 다음 단계의 chromatography를 시도하였다. TSPE가 TLPE보다 hydrophobic⁽¹¹⁾이라는 근거에서 CM-Sephadex C-50 column에서 취한 PE를 hydrophobic인 phenyl-sepharose

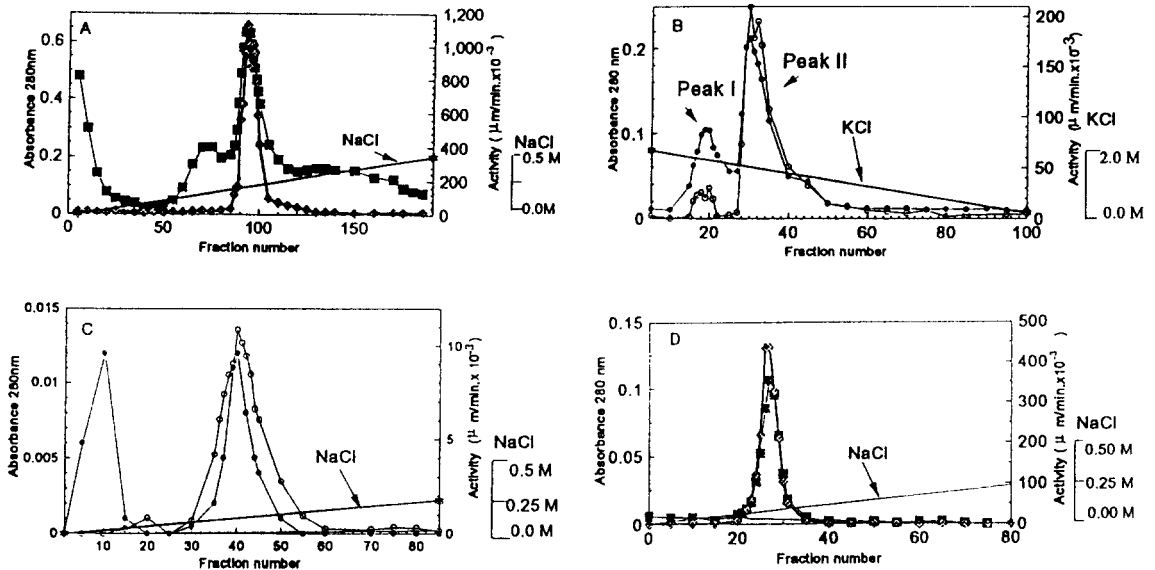


Fig. 1. Chromatography of unheated crude pectinesterase

- A. Increasing gradient elution (0-0.5 M NaCl, pH 7.5) pattern from CM-Sephadex C-50 column chromatography of unheated crude PE. A preparation containing protein 68.5 mg with activity of 20,600 PEU was applied.
 - , Absorbance, ◇—◇, PE activity
- B. Decreasing gradient elution (2-0 M KCl, pH 7.8-pH 7.0) pattern from Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography (HIC) of CM Sephadex C-50 peak fractions. A preparation containing protein 22 mg with activity of 12,250 PEU was applied.
 - , Absorbance, ○—○, PE activity
- C. Increasing gradient elution (0-0.5 M NaCl, pH 7.0) pattern from CM-Biogel A column chromatography of HIC peak 1 fractions. A preparation containing protein 0.25 mg with activity 155.9 PEU was applied.
 - , Absorbance, ○—○, PE activity
- D. Increasing gradient elution (0-0.5 M NaCl, pH 7.5) pattern from CM-Biogel A column chromatography of HIC peak II fractions. A preparation containing protein 6.34 mg with activity 2,036.64 PEU was applied.
 - , Absorbance, ◇—◇, PE activity

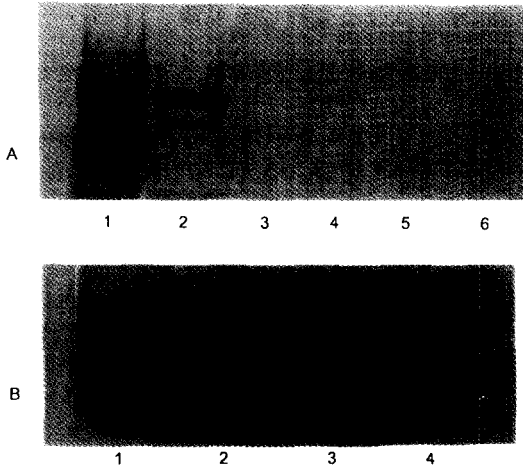


Fig. 2. Electrophoresis pattern of 8% HDPC-PAGE mini gel stained with Coomassie Brilliant blue R-250

A. Unheated separation procedure

Lane 1: ammonium sulfate 30-75% fraction, Lane 2: CM-Sephadex C-50 chromatography eluate, Lane 3: Peak I elute of HIC, Lane 4: Peak II elute of HIC, Lane 5: CM-Biogel A chromatography eluate of HIC peak I, Lane 6: CM-Biogel A chromatography eluate of HIC peak II

B. Heated separation procedure

Lane 1: heated ammonium sulfate fraction. Lane 2: CM-Sephadex C-50 chromatography eluate. Lane 3: second HIC eluate. Lane 4: CM-Biogel A chromatography

CL-4B를 충전한 column에 loading하여 용출한 결과는 Fig. 1의 B와 같았다. 작은 peak(peak I)가 1.95~1.85 M KCl의 범위에서 용출되고 보다 큰 peak가 1.80~1.45 M KCl(peak II)에서 용출되었다. 각각의 peak 부분을 모아 10분간 70°C에서 가열 처리한 후에 활성을 측정된 결과는

peak I에서 90% 이상의 잔존활성이 있어 내열성을 나타내었고, peak II에서는 겨우 0.7%의 잔존활성을 나타내었으므로 내열성이 없는 특성을 보였다. 그러므로 peak I은 내열성을 갖는 TSPE, peak II는 내열성이 없는 TLPE라고 지칭하였다. 이와같은 결과는 TSPE가 TLPE 보다 소수성이 작음을 보여주며, TSPE가 TLPE 보다 소수성이 크다는 일반적인 경향에 상반되는 것이었다.

HIC column으로부터 용출된 두개의 peak는 Fig. 2의 A에 lane 3과 4에서 보는 바와 같이 약간의 이질 단백질이 포함되어 있어 정제를 더 필요로 하므로 Versteeg⁶⁾가 사용한 CM-Biogel A column에 loading하고 increasing gradient시켜 흡착된 단백질을 용출시켰다. HIC peak I의 CM-Biogel A chromatography의 결과는 Fig. 1의 C이고 HIC peak II는 Fig. 1의 D와 같았다. Fig. 1의 C의 peak 부분과 Fig. 1의 D의 peak 부분 각각을 모아 농축하고 소정의 pH 완충액으로 투석하여 전기영동한 결과는 Fig. 2의 A에 lane 5와 6에서 보는 바와 같이 거의 단일한 band를 나타내었다. Fig. 2에 A를 보면 염색 투석효소에서 PE 이외의 많은 단백질을 CM-Sephadex C-50 column에서 제거되고, HIC column은 TSPE와 TLPE로 분리시켰으며 이들은 미량의 이질 단백질을 포함하며 CM-Biogel A column은 전기영동에 의하여 각각 거의 단일한 band를 나타내는 순수한 단백질로 분리하였다. 일련의 분리 및 정제과정을 Table 1에 요약하였다. TLPE는 1,005 units/mg의 비활성, 13.6%의 수율과 35배로 정제되었고, 한편 TSPE는 3,115 units/mg의 비활성, 1.5%의 수율과 100.5배의 정제도를 보였다.

Seymour 등¹¹⁾의 TLPE의 비활성이 776 units/mg TSPE의 비활성이 540 units/mg이고, Versteeg⁶⁾의 TLPE의 PE I이 694 units/mg PE II가 762 units/mg인 점과 비교하면, 위와 같이 분리 정제한 본효소는 그들의 효소보다 TLPE는 1.3배 TSPE는 5.8배 비활성의 증가를

Table 1. Separation of PE¹⁾ by unheated procedure

Step	Activity ²⁾ (Units)	Protein ²⁾ (mg)	Specific activity (Units/mg)	TSPE ³⁾ (%)	Yield (%)	Purification (X)
Crude PE	5,196	169,000	31	7.03	100.0	1.0
Ammonium Sulfate 30-75% Fractionation	3,149	21,330	148	5.03	60.6	4.8
CM-Sephadex C-50 Eluate	2,759	5,620	491	1.40	53.1	15.8
Hydrophobic Interaction Chromatography Eluate						
Peak I	90	0.099	909	94.00	1.7	29.3
Peak II	1,291	1,782	713	0.69	24.8	23.0
CM-Biogel A Eluate						
HIC Peak I	81	0.026	3,115	95.00	1.5	100.5
HIC Peak II	708	0.652	1,005	0.34	13.6	35.0

¹⁾The results of two purification procedure were averaged.

²⁾Activity and protein values were calculated per 100g of Valencia orange pulp-rag frozen powder.

³⁾Based on remaining units after heat treatment (70°C, 10 min) of various step.

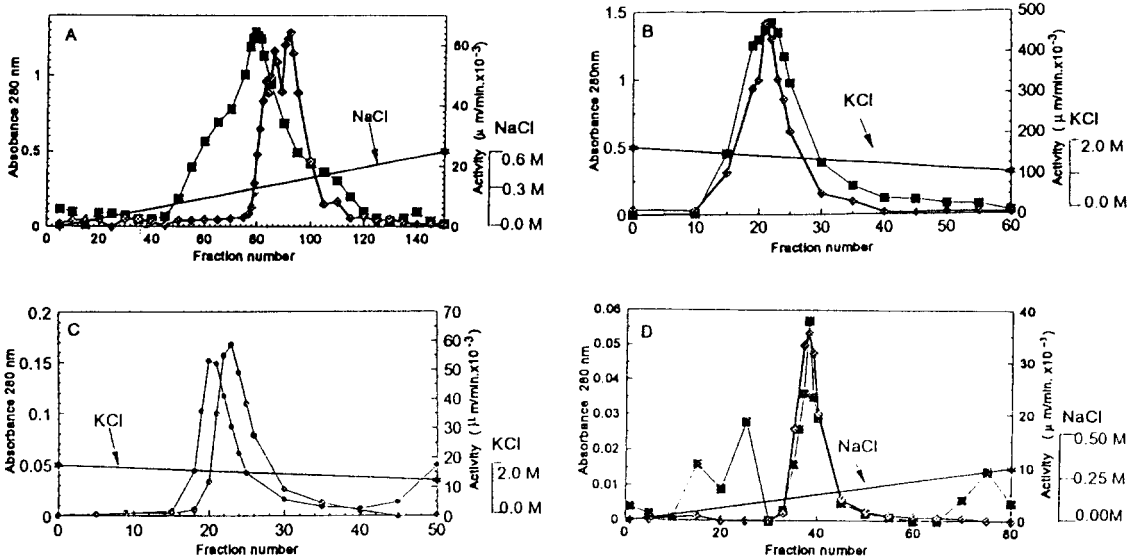


Fig. 3. Chromatography of heated crude pectinesterase

A. Increasing gradient elution (0-0.5 M NaCl, pH 7.0) pattern from CM-Sephadex C-50 column chromatography of heated crude PE. A preparation containing protein 302.4 mg with activity of 2,670 PEU was applied.

■—■, Absorbance, ◇—◇, PE activity

B. Decreasing gradient elution (2.0 M KCl, pH 7.8-pH 7.0) pattern from first Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography (HIC) of CM-Sephadex C-50 peak fractions. A preparation containing protein 22,896 mg with activity of 1,782 PEU was applied.

■—■, Absorbance, ◇—◇, PE activity

C. Decreasing gradient elution (2.0 M KCl, pH 7.8-pH 7.0) pattern from second HIC of first HIC peak fractions. A preparation containing protein 0.344 mg with activity of 145 PEU was applied.

●—●, Absorbance, ○—○, PE activity

D. Increasing gradient elution (0-0.5 M NaCl, pH 7.5) pattern from CM-Biogel A column chromatography of second HIC peak fractions. A preparation containing protein 6.34 mg with activity 2,036.64 PEU was applied.

■—■, Absorbance, ◇—◇, PE activity

보일 정도로 정제도가 높은 편이었다.

가열처리한 조효소로부터 TSPE의 분리 정제

황산암모늄 분획한 투석효소를 가열처리하여 TLPE는 제거하고 TSPE만을 분리 정제하여 앞에서 수행한 방법과 비교하여 보았다. 가열 처리한 후의 잔존 활성은 5.4%임으로 투석한 효소가 가열 처리하지 않고 분리하는 것에 비하여 15 배 이상의 양이 필요하였다. 가열처리한 단백질 시료의 chromatography는 완충액의 pH만을 7.0으로 달리하여 앞의 방법과 같게 수행하였다. CM-Sephadex C-50 column에서는 0.29~0.43 M NaCl의 범위에서 효소 활성 부위가 용출되었고(Fig. 3의 A), 6배 정도 정제되었다(Table 2). 이 효소를 HIC column에 loading하여 용출한 결과는 1.8 M KCl gradient 부근에서 용출되었고(Fig. 3의 step B 및 C), 첫번의 HIC에서는 6.5배, 효소 양을 줄여서 loading한 두번째 HIC에서는 35배로 정제되었다(Table 2). 정제의 마지막 단계의 CM-Biogel A chromatography의 결과는 0.09 M NaCl gradient 범위에서 효소가 용출되었으며(Fig. 3의 D), 가열처리한 단

백질 시료로부터 140배로 정제되었다(Table 2). 각각의 단계별 분획을 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 2의 B와 같았다. A의 lane 1에서 가열하지 않는 황산암모늄 염석 분획과 B의 lane 1에서 가열한 황산암모늄 염석의 영동한 모양을 보면 가열 처리에 의해서 TLPE에 해당하는 단백질 부분이 거의 소실되었음을 보여준다. B의 lane 2에서는 CM-Sephadex C-50 column chromatography에 의하여 lane 1에 다량 함유하고 있는 단백질이 제거되었음을 나타내고, HIC에서도 lane 3에서 보는 바와 같이 TLPE와 다른 이질 단백질을 제거하였으며 CM-Biogel A column에서도 lane 4에서 보여주는 바와 같이 잔존한 이질 단백질을 제거하여 거의 단일한 band가 되었다. 가열처리하여 정제한 TSPE는 1,803 units/mg의 비활성과 15.4%의 수율을 보였다. 가열처리하지 않고 분리 정제한 TSPE에 비하여 58%의 비활성을 나타냈지만 Seymour 등⁽¹⁵⁾의 TSPE보다는 3.2배의 비활성을 나타내었다. 그러므로 가열하지 않고 분리 정제하는 방법은 TLPE와 TSPE를 동시에 분리할 수 있고 열처리를 받지 않은 상태임으로 그들의 성질을 비교 조사하기 위하여 바람직

Table 2. Separation of PE¹⁾ by heated procedure

Step	Activity ²⁾ (Units)	Protein ²⁾ (mg)	Specific Activity (Units/mg)	Yield (%)	Purification (X)
Crude PE	50,780	1,652.000	30.1	100.00	1.00
Ammonium Sulfate					
30-75% Fractionation	25,520	232.000	110.0	50.30	3.58
Heat Treatment Eluate	1,377	104.980	13.1	2.70(100.00)	0.42(1.00)
CM Sephadex C-50					
Eluate	1,050	13.490	77.8	2.10(77.78)	2.53(6.02)
First Hydrophobic Interaction					
Chromatography Eluate	673	7.892	84.3	1.30(48.14)	2.74(6.52)
Second Hydrophobic Interaction					
Chromatography Eluate	431	0.943	457.0	0.85(31.48)	14.80(35.24)
CM Biogel A Eluate	211	0.117	1803.0	0.42(15.56)	58.70(139.76)

¹⁾The results of two purification procedures were averaged.

²⁾Activity and protein values were calculated per 1,000 g of Valencia orange pulp-rag frozen powder.

하다고 볼 수 있겠으며, 또한 가열처리에 의한 정제 방법은 TSPE가 다량 필요할 때 이용할 수 있으리라고 본다.

요 약

Valencia 오렌지로부터 추출한 펙틴에스테라제(pectinesterase, PE) 중에서 가열처리하지 않은 PE 조효소를 CM-Sephadex C-50, Phenyl Sepharose CL-4B와 CM-Biogel A의 chromatography를 차례로 수행하여 내열성이 약한 TLPE(thermolabile pectinesterase)와 내열성이 강한 TSPE(thermostable pectinesterase)를 분리 정제하였다. PE 중에서 가열처리한 PE 조효소에서는 위와 같은 정제과정으로 TSPE 만을 분리하였다. TLPE는 비활성 1,005 units/mg이고 35배로 정제된 것을 13.6% 회수할 수 있었으며, 반면에 가열하지 않고 분리한 TSPE는 비활성 3,115 units/mg이고 100.5배로 정제된 것을 1.5% 얻을 수 있었으나 가열하여 분리한 TSPE는 비활성 1,803 units/mg이고 가열처리한 조효소가 140배로 정제된 것을 15.4% 얻을 수 있었다.

문 헌

- Joslyn, M.A. and Pilnik, W.: Enzymes and enzyme activity. In *The Orange: Its biochemistry and physiology*, Sinclair, W.B., Ed., University of California, Los Angeles, p.373 (1961)
- Krop, J.J.P.: The mechanism of cloud loss phenomena in orange juice. *Agric. Res. Rep.* 830, Pudoc, Wageningen (1974)
- Evans, R. and McHale, D.: Multiple forms of pectinesterase in limes and oranges. *Phytochemistry*, 17, 1073 (1978)
- Körner, B., Zimmermann, G. and Berk, Z.: Orange pectinesterase: purification, properties and effect on cloud stability. *J. Food Sci.*, 45, 1203 (1980)
- Versteeg, C., Rombouts, F.M. and Pilnik, W.: Purification and some characteristics of two pectinesterase isozymes from orange. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 11, 267 (1978)
- 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)
- 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)
- Versteeg, C., Rombouts, F.M., Spaansen, C.H. and Pilnik, W.: Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterase from orange. *J. Food Sci.*, 45, 969 (1980)
- Atkins, C.D and Rouse, A.H.: Time-temperature relationship for heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. *Food Technol.*, 7, 489 (1953)
- Kew, T.J. and Velduis, M.K.: Cloud stabilization in citrus juice. *U.S. Patent* 2, 995 448 (1961)
- Seymour, T.A., Preston, J.F., Wicker, L., Lindsay, J.A. and Marshall, M.R.: Purification and properties of pectinesterase of Marsh White Grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1080 (1991)
- Walker, B.L.: Optimization of extraction and purification of pectinesterase from Florida oranges. *M. Sc. Thesis*, Dept. of Food Science and Human Nutrition, University of Florida, FL, U.S.A. (1992)
- Hou, W.N. and Walker, B.L.: A study on the extraction of thermostable pectinesterase from Valencia orange. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 658 (1995)
- Hargerman, A.E. and Austin, P.J.: Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 440 (1986)
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bio-*

- chem.*, 72, 248 (1976)
16. Amory, A., Foury, F. and Goffeau, A.: The purified plasma membrane ATPase of yeast *Schizosacharomyces pombe* forms a phosphorylated intermediate. *J. Biol. Chem.*, 255, 9353 (1980)
17. 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)
-
- (1995년 2월 6일 접수)