

유기용매의 처리에 따른 *Bacillus subtilis* IFO 12113 유래 Protopectinase의 회수

이승철* · 육현균 · 황용일

경남대학교 식품공학과

초록 : Protopectinase(PPase)는 식물 세포벽의 protopectin을 분해하는 효소로서 식품의 가공에 이용될 수 있는 효소이다. PPase의 산업적 응용을 위하여 PPase를 생산하는 미생물 *Bacillus subtilis* IFO 12113의 배양여액에 acetone, methanol, ethanol을 각각 처리하여 PPase를 회수하는 연구를 수행하였다. Acetone의 경우, 배양여액 대 acetone을 1:1 (v/v) 비율로 첨가했을 때 효소는 59.2%가 회수되었으며 정제도는 1.7배 이었다. Methanol의 경우, 1:2 (v/v) 비율로 처리하였을 때, 효소는 100% 회수되었으며 비활성도로 본 정제도는 4.0배 증가하였다. Ethanol의 경우에 1:0.5 (v/v) 비율로 처리한 것을 원심분리시켜 침전물을 제거하고, 그 상등액에 최종 ethanol 비율을 1:1(v/v)까지 처리했을 때, 효소의 회수율은 68%를 나타냈으며 비활성도는 13.5배 증가하였다. 세균의 배양여액으로부터 PPase의 회수에는 methanol 처리가 가장 효율적이었으나, 산업적 응용을 위하여 정제효과까지 고려하면 ethanol처리가 가장 적절하였다.(1997년 1월 29일 접수, 1997년 2월 24일 수리)

서 론

식물의 세포벽은 세포의 형태 및 특성에 중요한 역할을 하며, 그 주성분은 cellulose, hemicellulose, pectic substance 등으로 구성되어 있다.¹⁾ 이들 세포벽 구성 탄수화물들의 대사에 관여하는 효소를 이용하여 식물성 식품소재의 가공공정에 이용할 수 있으며, 특히 cellulase, pectinase 등은 주스 가공 및 푸레와 같은 다량의 수용성 고형분 함유 식품의 제조에 있어 수율 향상과 함께 가공공정의 효율성을 가져오고 있다.²⁾

Pectic substance는 식물조직 중에 폭넓게 분포하며, galacturonic acid를 주성분으로 하는 복합다당류이다. Pectic substance는 세포벽에서 유힘작용 또는 점착역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 과실의 숙성, 식품가공에서의 역할, 영양성 섬유로서의 기능 등이 연구되어져 왔다.³⁾ Pectic substance는 화학적, 물리적 성상으로 protopectin, pectin (pectinate), pectic acid (pectate) 등으로 나눌 수 있으며, 서로간에 밀접한 관계를 갖고 있다. Protopectin은 불용성으로 pectin의 모체가 되며, 식물세포에 있어 세포와 세포간의 중엽부의 주성분을 이루고 있으며 식물체가 숙성됨에 따라 일부가 가용성 pectin으로 전환된다. Protopectin은 pectin에 비해 매우 큰 분자량을 가지며, 카르복시기와 세포벽의 다른 성분들의 수산기와 에스테르 결합을 형성한다. Protopectin을 제한 가수분해하여 수용성 pectin을 생산하는 효소는 pectin releasing enzyme, protopectin solubilizing enzyme, 또는 protopectinase (PPase)라고 불리워지고 있으며, 그 작용기작에 따라 분류되고 있다.^{4,5)} PPase는 homogalacturonan을 분해하는 A형

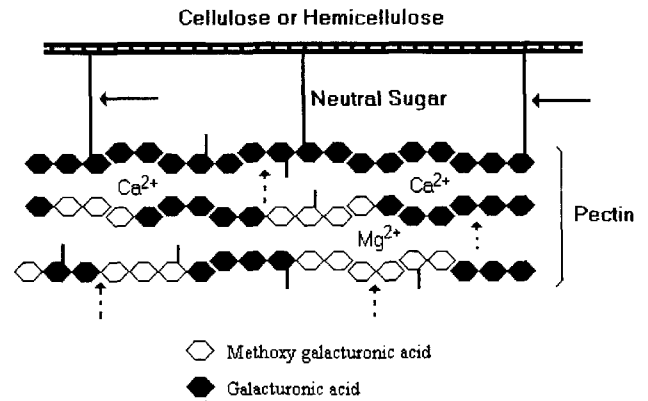


Fig. 1. Schematic illustration of the structure of protopectin and reaction site of A-type (†) and B-type (←) of protopectinase.

태와 cellulose와 결합된 펙틴의 중성당 결사슬을 분해하는 B 형태가 있다 (Fig. 1). PPase는 최근 식품 및 의약산업에서의 pectin생산,⁷⁾ 식물성 식품소재에 대한 단세포화,⁸⁾ 식물 세포의 protoplast 생산⁹⁾ 등에 응용성을 가진다고 보고되어 그 중요성은 점차 증가하고 있다.

PPase는 효모에서 효소 생산이 발견된 후,¹⁰⁾ 곰팡이를 비롯한 여러 종의 미생물에서도 효소 생산이 보고되었다.¹¹⁻¹⁴⁾ *Bacillus subtilis* IFO 12113 균주가 생산하는 PPase는 B 형태로 효소 정제와 특징은 Sakai 등에 의해 보고된 바 있다.¹⁴⁾ 기존의 정제 방법은 이온 교환 크로마토그래피 및 size permeation 크로마토그래피 등을 포함한 여러 공정을 거치므로 그 방법이 까다롭고, 산업적으로 이용하기에 비용이 비싼 단점을 가지고 있다. 본 연구에서는 다양한 산업응용성을 가진 PPase를 쉽게 대량회수하기 위해 *Bacillus*

찾는말 : protopectinase, organic solvent, precipitation, recovery
 *연락처

subtilis IFO 12113 균주의 세포배양액에 다양한 유기용매를 처리하여 PPase의 침전 및 회수형태를 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

본 실험에서 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* IFO 12113이였으며, acetone과 methanol은 1급 시약을, ethanol은 특급 시약을 사용하였다. 그리고 PPase 분자량을 확인하기 위해 전기영동에 사용된 Size marker는 Sigma 회사의 제품을 사용하였고, 미생물의 생육배지용 시약은 Difco사에서 구입하였으며, 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기질의 조제

PPase의 기질인 protopectin은 껌껍질의 albedo층을 분리하여 50 mM EDTA로 4시간씩 교환하면서 하루 세척하고 다시 증류수로 4시간씩 교환하면서 12시간 세척한 다음 4,000×g에서 15분간 원심분리시켜 얻은 침전물을 동결건조시킨 후, 사발에서 갈아 얻은 분말을 사용했다.³⁾

배양상등액의 조제

Bacillus subtilis IFO 12113 균주를 Luria Bertani(LB)배지 (0.5% yeast extract, 1% tryptone, 0.5% sodium chloride, pH 7.0)에서 11시간 전배양한 후, 본배양액에 1%를 접종하여 24시간 배양했다. 배양조건은 37°C, 200 rpm으로 shaking incubator에서 전배양과 본배양을 수행하였다. 본배양 후 배양액을 15분간 원심분리(4,000×g)시키고 그 상등액을 Toyo No. 2 filter paper에 여과시켜 배양 상등액으로 사용했다.

유기용매의 처리

Acetone, methanol, ethanol은 각각 -20°C에서 보관한 것을 사용하였으며, 4°C chamber에서 유기용매를 3.12 ml/min의 속도로 처리했다. 각 유기용매를 배양 상등액에 첨가 비율을 달리하여 -20°C에서 12시간동안 방치한 후, 20분간 원심분리(12,000×g)하여 그 침전물을 동결건조시켰다.

효소활성 측정

효소활성 측정은 Sakai 방법¹⁵⁾에 따라 protopectin 10 mg과 50 µg/ml bovine serum albumin을 함유한 40 µmol acetate buffer (pH 5.0) 2 ml를 혼합하여 37°C, 10분간 방치한 후 0.5 ml의 효소용액을 반응혼합액에 첨가하여 37°C, 30분간 반응시켰다. Control blank는 열처리하여 실활된 효소용액을 사용하여 같이 실시하였다. 반응이 끝난 후에 열음상자에서 식혀서 반응을 중지시키고 Toyo No. 2 filter paper를 이용하여 여과를 하였다. 여과액 0.5 ml를 시험관에 취한 후, 32 N H₂SO₄ 6 ml, 0.2% carbazole을 함유한 ethanol용액 0.5 ml를 각각 첨가하여 80°C, 20분간 열처리하여 실온에서 방냉한 후 525 nm에서 흡광도를 측정을 했다. 효소 활성도 1 unit는 37°C, 30분간 반응혼합액의 ml당 1 µmol의 D-galacturonic acid에 해당하는 pectin질을 유리

시키는 활성도로 정의하였다.

단백질 농도 측정

단백질 농도는 Lowry법¹⁶⁾에 따라 측정하였다. Bovine serum albumin으로 표준곡선을 작성한 후, 이를 이용하여 시료에 존재하는 단백질 농도를 산출하였다.

SDS-PAGE 전기영동

SDS-PAGE 전기영동은 Laemmli법¹⁷⁾에 따라 실시하였다. 먼저 시료를 최종 10%가 되게 trichloroacetic acid (TCA)로 처리한 후, 11,924×g, 20분간 원심분리하여 그 침전물을 cold acetone(-20°C)으로 씻어주고 진공오븐에서 acetone을 휘발시켜 제거했다. Acetone이 제거된 침전물에 2× 전기영동 sample buffer를 첨가하여 전기영동 시료로 사용했다. 전기영동을 13% Laemmli gel에서 수행한 후에 0.05% Coomassie Brilliant blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid 혼합 염색액으로 염색한 후, 탈색액 (5% methanol, 7% acetic acid)으로 탈색을 하여 단백질 밴드를 확인했다.

결 과

단백질의 유기용매에 대한 용해도 차를 이용한 분획 침전법은 대량의 단백질을 회수할 수 있으며, 양호한 정제 효과를 얻을 수 있으므로 산업적으로 이용되는 효소의 회수에 많이 사용되고 있는 방법이다. 본 연구에서는 물과 완전히 혼합될 수 있어 널리 사용되고 있는 유기용매인 acetone, methanol, ethanol을 세포배양액에 처리하여 침전되는 단백질 중 PPase의 활성을 조사하여 PPase의 대량 회수에 적합한 유기용매를 찾고자 하였다.

Acetone처리에 따른 PPase 회수

Bacillus subtilis IFO 12113 균주를 LB배지에서 배양하여 얻은 세포배양액에 acetone을 각각 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (배양액:acetone, v:v)의 비율로 처리하여 이에 따른 PPase회수율, 단백질 농도 및 비활성도를 Table 1에 나타내었다. 가해진 acetone의 비에 따라 1:1에서는 PPase가 59.2% 회수되었으며, 1:5까지 처리되었을 때는 PPase가 86.4%까지 회수되었다. PPase의 회수율은 가해진 acetone에 비례하는 경향을 보였으나, 단백질의 전체 회수량도 가해진 acetone에 비례하여 증가하여 1:5를 처리했을 때 대부분 침전, 회수되었다. 불순물의 제거를 알 수 있는 비활성도(specific activity)를 보면 1:1과 1:2의 처리시 다소 증가하였으나, 그후의 처리에서는 감소하여 1:1의 처리에서 최대의 정제효과를 보이며 1.7배의 정제도를 나타내었다.

Acetone 처리에 대한 상대적인 단백질 전기영동은 13% SDS-PAGE를 이용하여 실행하였다(Fig. 2). Acetone 비율에 따른 배양액 중의 침전 단백질 패턴을 보면 acetone의 비율이 증가함에 따라 단백질 양이 많아지는 것을 볼 수 있었다. 분자량이 97,400 이상과 21,500 이하의 단백질이 ace-

Table 1. Recovery yield of PPase depending on the amount of acetone

Acetone ratio ^a	Activity (unit/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification fold
1:0	10.3	2.0	5.2	100.0	1.0
1:1	6.1	0.7	8.7	59.2	1.7
1:2	6.6	0.9	7.3	64.1	1.4
1:3	8.5	1.5	5.7	82.5	1.1
1:4	7.4	1.8	4.1	71.8	0.8
1:5	8.9	1.9	4.7	86.4	0.9

^aEach ratio means culture filtrate : acetone, v/v.

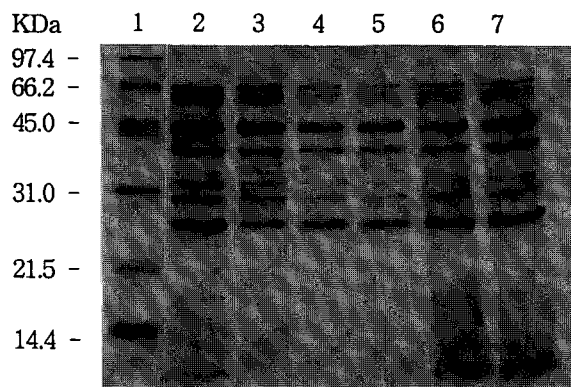


Fig. 2. SDS-PAGE of acetone treated culture filtrates. Samples were analyzed by 13% Laemmli gel. Detailed method for sample preparation was described in Materials and Methods. Lane 1, molecular weight makers; lane 2, culture filtrate; lane 3, 1:1 ratio; lane 4, 1:2 ratio; lane 5, 1:3 ratio; lane 6, 1:4 ratio; lane 7, 1:5 ratio. Molecular weight markers were composed of phosphorylase b (97,400), serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), trypsin inhibitor (21,500), and lysozyme (14,400). Each ratio in lanes 3~7 means culture filtrate : acetone, (v/v).

Table 2. Recovery yield of PPase depending on the amount of methanol

Methanol ratio ^a	Activity (unit/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification fold
1:0	10.3	2.0	5.2	100.0	1.0
1:2	10.4	0.5	20.8	101.0	4.0
1:3	9.9	0.6	16.5	96.1	3.2
1:4	6.1	0.5	12.2	59.2	2.3
1:5	8.3	0.8	10.4	80.6	2.0
1:9	7.4	0.8	9.3	71.8	1.8

^aEach ratio means culture filtrate : methanol, v/v.

tone처리로 제거될 수 있었고 1:1과 1:3의 단백질 양이 차이가 나지 않는 원인은 sample 조제시의 소실로 추정된다.

Methanol 처리에 따른 PPase 회수

Acetone처리와 같은 방식으로 세포배양액에 methanol을 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:9 (배양액:methanol, v:v)의 비율로 처리하였다 (Table 2, Fig. 3). Acetone 처리 때와는 달리 첨가된 methanol의 비가 증가할수록 회수된 PPase의 양은 줄어드는 경향을 보였으나, 단백질의 침전량은 증가하는 경향을 보였다. 따라서 처리한 methanol의 비가 증가할

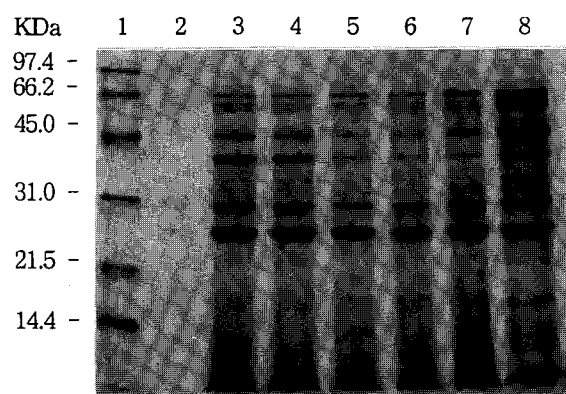


Fig. 3. SDS-PAGE of methanol treated culture filtrates. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, 1:1 ratio; lane 3, 1:2 ratio; lane 4, 1:3 ratio; lane 5, 1:4 ratio; lane 6, 1:5 ratio; lane 7, 1:9 ratio; lane 8, culture filtrate. Each ratio in lanes 3~7 means culture filtrate : methanol, (v/v).

Table 3. Recovery yield of PPase depending on the amount of ethanol

Ethanol ratio ^a	Activity (unit/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification fold
1:0.0	10.3	2.0	5.2	100.0	1.0
1:0.5	1.3	0.2	6.5	12.6	1.3
1:1.0	8.4	0.3	28.0	81.6	5.4
1:1.5	9.2	0.4	23.0	89.3	4.4
1:2.0	9.5	0.4	23.8	92.2	4.6

^aEach ratio means culture filtrate : ethanol, v/v.

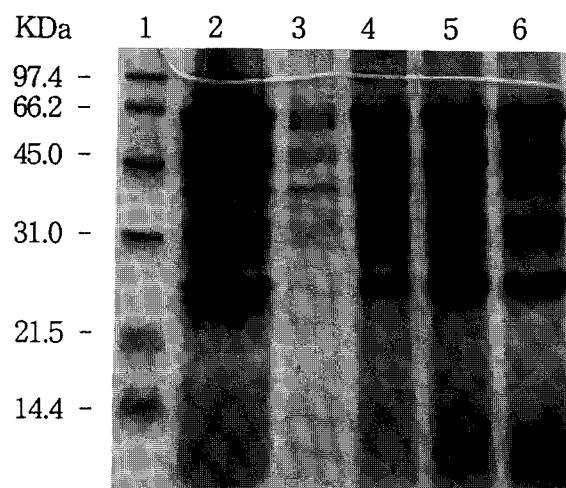


Fig. 4. SDS-PAGE of ethanol treated culture filtrates. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, culture filtrate; lane 3, 1:0.5 ratio; lane 4, 1:1 ratio; lane 5, 1:1.5 ratio; lane 6, 1:2 ratio. Each ratio in lanes 3~6 means culture filtrate : ethanol, (v/v).

수록 PPase의 회수 및 정제효과가 감소하였으며, 가장 효율이 높은 1:2의 처리 비율에서 4배의 정제도를 나타내며 모든 효소가 회수되었다. 한편, 1:1과 1:2 사이의 methanol 처리는 1:2의 처리와 유사한 경향을 보였다 (미발표 결과). SDS-PAGE를 이용한 단백질 전기영동의 결과도 상기의 결과를 뒷받침하고 있다.

Table 4. Recovery yield of PPase depending on the fractionated treatment of ethanol

Ethanol ratio ^a	Activity (unit/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification fold
1 : 0.0	10.3	2.0	5.2	100	1.0
1 : 0.5	1.3	0.2	6.5	12.6	1.3
1 : 1.0~1 : 0.5 ^b	7.0	0.1	70.0	68.0	13.5
1 : 1.5~1 : 1.0	0.7	0.1	7.0	6.8	1.3
1 : 2.0~1 : 1.5	0.3	0.1	3.0	2.9	0.6

^aEach ratio means culture filtrate : ethanol, v/v. ^bAfter treatment of ethanol to the culture filtrate at a ratio of 1 : 0.5 (culture filtrate : ethanol, v/v), the resulted supernatant was retreated with ethanol to the final ratio 1 : 1.0 (culture filtrate : ethanol, v/v).

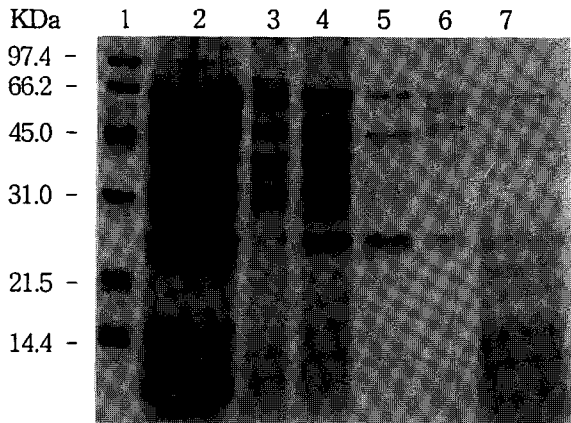


Fig. 5. SDS-PAGE of fractionated ethanol treated culture filtrates. Lane 1, molecular weight makers; lane 2, culture filtrate; lane 3, 1 : 0.5 ratio; lane 4, 1 : 1 → 1 : 0.5; lane 5, 1 : 1.5 → 1 : 1; lane 6, 1 : 2 → 1 : 1.5. Each ratio in lanes 3~6 means culture filtrate : ethanol, (v/v).

Ethanol 처리에 따른 PPase 회수

Ethanol을 같은 방법으로 처리한 결과를 Table 3과 Fig. 4에 나타내었다. 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 1.5, 1 : 2 (배양액 : ethanol, v : v)의 비율로 첨가한 결과, 회수된 PPase의 양은 첨가한 ethanol에 비례하였다. 또한 비활성도도 계속 증가하여 1 : 1의 처리에서는 초기의 경우에서보다 5.4배 증가하여 PPase의 회수에 적합한 유기용매임을 알 수 있었다. 상기 결과를 바탕으로 PPase의 정제도를 보다 높이기 위하여 분획 침전을 실시하였다.

세포배양여액에 먼저 1 : 0.5의 비율로 ethanol을 처리하여 침전시킨 후, 그 상등액에 최종비율이 1 : 1의 비율로 다시 ethanol을 처리하여 침전시키고, 다시 그 상등액에 ethanol을 처리하는 방식으로 1 : 1.5, 1 : 2의 비율에서의 PPase의 회수를 확인한 결과가 Table 4와 Fig. 5에 나타나 있다. 이 결과에서 1 : 0.5로 ethanol을 처리한 후, 그 상등액에 1 : 1을 처리하여 얻은 침전물에서 68%의 PPase를 회수하였으며, 비활성도는 13.5배가 증가하여 정제효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다.

고 찰

PPase의 산업화를 위한 효율적 추출용매를 찾기 위해 acetone, methanol, ethanol 등으로 처리하여 PPase를 회수하였다. Acetone의 경우 세포배양여액에 처리한 비율이 증

가할수록 PPase의 회수가 높아졌으며 1 : 5 (세포배양여액 : acetone)일 경우 86.4%가 회수되므로 acetone의 비를 높이면 더욱 많은 회수가 가능하리라 사료된다. 그러나 처리하는 acetone의 양이 많아지므로 경제적으로는 효율적이라 볼 수 없다. Methanol의 경우 1 : 2 (세포배양여액 : methanol) 이상에서 첨가한 비율이 높아질수록 PPase의 회수율이 감소하여 methanol에 의한 효소 실활이 발생하는 것을 발견할 수 있었다. 그러나 1 : 1부터 1 : 2의 처리비율에서 PPase가 완전 회수되므로 단순한 효소의 회수에는 acetone보다 경제적이다.

한편, ethanol은 본 연구에서 처리하여 본 다른 유기용매와 비교할 때 PPase의 회수율이 다소 떨어졌으나 정제율은 가장 높았다. 일반적으로 미생물의 배양여액에는 여러가지 단백질이 함유되어 있으므로 산업적으로 이용할 때 가능한 불순 단백질을 제거하는 것이 유리하므로 본 연구결과에서는 산업적인 PPase의 회수 및 정제에는 ethanol이 가장 적합한 것으로 사료된다. 또한 ethanol은 인체에 가장 유해성이 적으므로 ethanol로 처리된 효소를 식품에 응용하였을 때 잔존 유기용매에 의한 유해성 측면에서 제일 문제가 없으리라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 농업진흥청 농업특정연구과제 연구비의 지원에 의하여 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Fry, S. C. (1988) In 'The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis,' Longman Scientific & Technical, New York.
2. Rombouts, F. M. and W. Pilnik (1979) Utilization of pectic enzymes in food production. *Dev. Food Sci.* **2**, 264-268.
3. 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.
4. Sakai, T. and M. Okushima (1982) Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 667-676.
5. Sakai, T. and S. Yoshitaka (1984) Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from

- Galactomyces reessii* strain L. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1941-1950.
6. Sakai, T., M. Okushima and S. Yoshitaka (1984) Purification, crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1951-1961.
 7. Sakai, T. and M. Okushima (1980) Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 908-912.
 8. Sakai, T., R. Hours and T. Nakamura (1995) Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J. Food Sci.* **60**, 468-472.
 9. Mitsui, T., N. Hashimoto, K. Deguchi, M. Hirano and L. Igaue (1990) Isolation of plant mesophyll protoplasts with an endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum*. *Plant Tissue Cult. Lett.* **7**, 14-18.
 10. Sakai, T. and M. Okushima (1978) Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 2427-2429.
 11. Sakai, T. and S. Yoshitaka (1984) Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reessii* strain L. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1941-1950.
 12. Yoshitaka, S., T. Numata, T. Katsuragi, R. A. Hours and T. Sakai (1994) Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 370-375.
 13. Sakai, T. and A. Takaoka (1985) Purification, crystallization, and some properties of endopolygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agri. Biol. Chem.* **49**, 449-458.
 14. Sakai, T., K. Ikemoto and M. Okushima (1989) Purification and crystallization, and characterization of a novel protopectinase from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1213-1223.
 15. Sakai, T. (1988) Protopectinase from yeasts and yeast-like fungus, *Methods in Enzymology* **161**, 336-337.
 16. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **196**, 265-275.
 17. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Recovery Yields of Protopectinase Depending on Treatments of Organic Solvents

Seung-Cheol Lee*, Hyun-Gyun Yuk and Yong-Il Hwang (Department of Food Engineering, Kyungnam University, 449 Wolyoung-dong, Hapbo-ku, Masan 631-701, Korea)

Abstract : To recover protopectinase (PPase) secreted from *Bacillus subtilis* IFO 12113, culture filtrate of the microorganism was treated with acetone, methanol, and ethanol, respectively. In the case of treatment with acetone at a ratio of 1 : 1 (culture filtrate : acetone, v/v), PPase was purified 1.7-fold with 59.2% recovery. The recovery of PPase was increased by increasing the acetone concentration. PPase was purified 4-fold with 100% recovery when the culture filtrate was precipitated with methanol at a ratio of 1 : 2 (culture filtrate : methanol, v/v). However, recovery of PPase was decreased by increasing the methanol concentration. PPase was purified 13.5-fold resulting in 68% recovery by the addition of ethanol with the final ratio 1 : 1 (culture filtrate : ethanol, v/v) to the supernatant, which was obtained after precipitation of the culture filtrate with ethanol at a ratio of 1 : 0.5. These results show that methanol treatment is better than other organic solvent treatments for the simple recovery of PPase, whereas fractionated treatment of ethanol can recover PPase with higher purification fold.

Key words : protopectinase, organic solvent, precipitation, recovery

*Corresponding author