

무화과 펙틴에스테라제의 부분 정제 및 *in situ* 상태에서의 활성 특성

허원녕 · 김명화 · 고은경
국립 목포대학교 원예육종학과

Partial Purification of Fig Pectinesterase and Characterization of its *in situ* Activity

Won-Nyoung Hou, Myoung-Hwa Kim and Eun-Kyoung Go
Department of Horticultural Crops Breeding, Mokpo National University

Abstract

This study was performed to purify fig pectinesterase(F-PE) and characterize its *in situ* activity. Three kinds of F-PE were partially separated by using ammonium sulfate fractionation, Q-Sepharose column, CM-cation exchanger column chromatography, and HPLC. One of those was anionic protein and the others were cationic proteins. All of them had approximate molecular weight of 27,000 and lost rapidly their activity during storage. Therefore alternative crude enzyme was prepared by suspending the freeze dried and milled fig powder in 0.1 M NaCl at pH 7.5. F-PE had the optimum pH of 8.5, the optimum temperature of 50°C with activation energy of 7,671 cal mol⁻¹K⁻¹ and stability up to 55°C with 10 minutes heating. Optimum activity was obtained in 0.2~0.4 M NaCl with optimum solubility at above 0.8 M NaCl.

Key words: fig, pectinesterase, activation energy, *in situ* activity

서 론

펙틴분해효소는 작용기작에 따라 pectinesterase (PE)와 polygalacturonase (PG)로 나뉜다⁽¹⁾. PE는 펙틴의 methoxyl group을 deesterification하여 low methoxyl pectin으로 분해하고, PG는 펙틴의 주골격을 형성하고 있는 polygalacturonic acid 사슬을 분해하는 작용을 한다⁽¹⁾. PG는 작용부위에 따라 endo-PG와 exo-PG로 구분한다⁽²⁾. 이들은 과일의 숙성 연화와 관련을 가지며 과실류의 가공에도 중요한 효소이다. 무화과의 효소적 연구는 단백질 분해효소인 ficin을 많이 함유하고 있어서 소화촉진 및 연육제 효과가 있기 때문에 서양에서는 예로부터 잘 알려져 왔으며 rennet 대용 및 연육제로의 이용을 하기 위한 연구^(3,7)가 많이 이루어져 왔다. 한편 다른 과실의 PE에 관한 연구^(8,13)는 많은 반면에 무화과의 PE에 관한 연구⁽¹⁴⁾는 별로 찾아볼 수 없었다. 저자는 무화과의 잼가공에 있어서 무화과 자체 내의 PE와 외부에서 첨가한 PE를 무화과 펄프에 처

리하여 high methoxyl pectin을 low methoxyl pectin으로 변화시킴으로써 당함량이 35% 이하인 저당성 잼을 만들 수 있었다⁽¹⁵⁾. 따라서 무화과의 펙틴분해효소를 분리하고 그들의 효소적 성질을 규명하여 식품이나 다른 산업에 이용할 수 있도록 기초자료를 확보할 필요성을 갖게 되었으며, 냉동 저장기간 중 PG는 10일만 지나도 거의 실패되므로⁽¹⁵⁾ PE만을 조사대상으로 하였다. PE를 추출하여 염색 및 chromatography를 실시함으로써 이들의 효소적 성질을 알아보고자 하였으나, 이들은 효소활성이 극히 불안정하고 단기저장에도 실패되어 실험을 계속 수행할 수 없었다. 그러므로 주스 또는 잼 가공에 이용되는 PE는 추출된 것이 아닌 *in situ* 상태를 고려하여 추출효소보다는 무화과 펄프를 냉동 건조하여 분말화한 *in situ* PE의 활성 특성을 조사함으로써 그 결과를 식품가공에 이용할 수 있도록 하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 무화과 품종은 미쓰히도후인이었

Corresponding author: Won Nyoung Hou, Department of Horticultural Crops Breeding, Mokpo National University, Mokpo, Chunnam 534-729, Korea

고 1997년 10월에 전남 영암군 삼호면 과수원에서 수확한 것을 -25°C에서 저장하면서 사용하였다.

효소의 추출 및 *in situ* PE 조제

PE의 추출은 보관중인 무화과에 대한 4% NaCl을 5:1 (V/W)의 비율로 혼합, 마쇄하여 5°C에서 24 hr 동안 방치한 후 cheese cloth로 여과하였다. 그리고 그 여액을 30~75% 유안염석하여 원심분리(4°C, 27,000×g, 20 min, Kontron instruments, Italy)하고 그 침전물을 최소량의 10 mM tris buffer (pH 7.5)에 녹인 후 원심분리하여 상정액을 0.1 M NaCl을 포함하는 10 mM tris buffer (pH 7.0)로 투석하여 추출 조효소액으로 사용하였다.

분말시료 조제는 냉동보관(-25°C)중인 무화과를 과피, 과육, 전과로 분리하고, 이들을 각각 waring blender로 마쇄하여 냉동 건조기 freeze dryer (Labconco Co., Kansas, MO)로 약 24 hr 동안 냉동 건조한 후 1 mm 체에 걸러질 정도로 분말화시켜 -75°C에 보관하면서 *in situ* PE 조제용으로 사용하였다. *In situ* PE는 분말화한 저장시료를 0.1 M NaCl (pH 7.5)로 20배(분말 0.3 g/6 mL) 희석현탁액으로 만들어 하룻밤 동안 냉장상태에서 방치한 후 pH 7.5로 조정하여 사용하였다.

효소의 분리

추출효소를 정제하기 위해 먼저 Q-Sepharose chromatography를 실시하였다. Column (1.5×5 cm)상에 Q-Sepharose (Sigma, St. Louis, MO)를 충전시킨 후 1 mM Na₂S₂O₃와 0.1 M NaCl을 함유하는 10 mM tris HCl buffer (pH 7.5)로 평형화시켜, 투석 효소를 column 상부에 주입하고 동일 buffer로 흘려 보내면서 파장 280 nm에서의 흡광도가 0.01이하가 될 때까지 washing시킨다. Column에 흡착된 효소(PE)를 용출시키기 위해 동일 완충액으로 0.1~1.0 M NaCl linear gradient하였으며 flow rate는 10 mL/hr로 하고 fraction collector (Isco, Inc., Lincoln, NEB)를 사용하여 5 mL씩 분취하고 활성이 있는 부위의 단백질을 모았다. 그리고 음이온 교환수지에 흡착되지 않은 washing 부분의 용출단백질만을 모아 CM-cation Exchange Chromatography를 실시하였다. 먼저 column (1.5×5 cm)상에 CM-cation exchanger (Waters Co., Milford, MA)를 충전시킨 후 1 mM Na₂S₂O₃와 0.1 M NaCl을 함유하는 10 mM tris HCl buffer (pH 7.0)로 평형화시켜, 음이온교환수지의 미흡착 단백질을 주입하고 0.1~0.6 M NaCl linear gradient하였으며, 이외의 수행조건은 Q-Sepharose chromatography와 동일하다. 위와 같은 두 개의 chromatography로

부터 얻어진 3개의 활성peak 부분을 더욱 정제하고자 HPLC (Waters Co.)를 실시하였다. 즉 음이온 교환수지와 양이온 교환수지에 흡착 용출된 활성 PE들을 boiling처리된 10 KDa 분자체막(Millipore Co., Bedford, MA)으로 농축하고 원심분리(10,000×g, 4°C, 20 min)하여 탈기시킨 시료 0.5 mL를 HPLC에 주입하였다. 이 때 column은 Protein-Pak™ 300. SW 10 μm (7.8×300 mm, Waters Co.)를 사용하였으며 0.1 M NaCl을 포함하는 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 충분히 column을 활성화시킨 후 시료를 주입하고 NaCl 0.1~1.0 M까지 automated gradient controller (Waters Co.)로 linear gradient하였다. Flow rate는 0.4 mL/min로 하고 280 nm에서 O.D.가 0.1 이상인 부분을 수집 농축하였다.

전기영동

12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의한 전기영동은 Weber와 Osborn의 방법⁽⁶⁾에 따라 수행하였다. 전기영동은 Mighty Small™ II dual slab cell unit (Hofer Pharmacia Biotech Inc., Sanfrancisco, CA)와 power supply (Minebea Co. LTD., Kondo, Japan)를 사용하여 수행하였다. 영동 후 gel 염색은 40% methanol과 10% acetic acid를 혼합한 용액에 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 (FisherBiotech, electrophoresis grade, Fisher Scientific)을 용해하여 사용하였으며, 40% methanol과 10% acetic acid의 혼합액으로 탈색시켰다. 효소의 분자량 측정용 표준 단백질은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 KDa), carbonic anhydrase (29 KDa), trypsin inhibitor (20.1 KDa), α-lactalbumin (14 KDa) 혼합물로 사용하였다.

효소의 활성 측정

PE의 활성측정은 Seymour⁽⁷⁾의 titrimetric assay 법을 수정한 방법으로 1 mM sodium azide와 0.1 M NaCl을 포함하는 1% pectin (Sigma, from citrus fruits)기질 (pH 7.5) 25 mL에 추출효소는 0.1~0.2 mL, 그리고 *in situ* PE의 현탁액은 0.2~0.4 mL를 첨가하여 실온에서 교반하면서 pH 7.5로 조정한 후 5분 동안 중화적정에 소모되는 0.001 N NaOH 양을 pH 7.18 stat titrino (Metrohm Ltd., Switzerland)로 측정 하였다. PE의 활성 단위는 분당 1 μmole의 카복실그룹을 유리하는 효소량으로서 추출효소는 효소량 mL에 대하여, 그리고 *in situ* PE의 현탁액은 g dry matter에 대하여 다음 식에 의해 구하였다.

PE units/mL or g dry matter =

$$\frac{\text{mL NaOH} \times \text{Normality of NaOH} \times 1000}{\text{min} \times \text{mL sample or g dry matter}}$$

각 시료는 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 자연 상태로의 효소활성 측정은 냉동건조된 시료 0.01 g을 NaCl 농도를 달리한 0.5% pectin 기질 25 mL에 녹여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 한 편 column chromatography에서 분취한 효소의 상대적 효소 활성을 측정하기 위해 Hagermann과 Austin⁽¹⁰⁾의 방법을 개편한 Seymour의 방법⁽¹¹⁾에 따라 다음과 같이 수행하였다. 활성 측정을 위한 pectin-dye 용액은 3 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.5)에 3:7의 비율로 증류수를 혼합하여 0.04%의 bromthymol blue를 첨가한 용액 7.5 mL를 0.5% pectin 100 mL와 혼합하고 pH 7.5로 조정된 후 전체 용량이 150 mL가 되도록 하여 사용하였다. 큐벳에 3 mL의 pectin-dye 혼합액을 넣고(초기 A_{620} 은 H₂O를 blank로 하였을 때 1.1~1.25) 100 μ L의 PE 시료를 첨가하여 반응을 시작하였고 A_{620} 의 감소속도는 enzyme kinetic accessory가 부착된 UV/VIS spectrophotometer (Hewlett Packard, West Germany)에서 기록하였다. 표준곡선용 물질로는 galacturonic acid를 사용하였으며, ΔA_{620} (galacturonic acid를 포함하는 pectin-dye 용액 혼합액과 galacturonic acid를 포함하지 않은 pectin-dye 혼합액의 A_{620} 의 차이)이 0.85 (3 mL의 pectin-dye 용액 당 0.16 μ mole galacturonic acid)까지는 첨가한 galacturonic acid의 양에 직선상의 비례관계를 나타냈다. 표준곡선의 직선상의 범위에서 PE시료의 $\Delta A_{620}/\text{min}$ 을 구하여 PE unit (생성된 산 μ mole/min)로 환산하는 데 이용하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry법⁽⁹⁾에 따라 측정하였다. 이 때 사용한 표준단백질은 Bovine serum albumin (BSA) 이고, BSA 농도를 달리하여 UV파장 656 nm에서의 O.D. 값을 측정하여 작성해 놓은 기존의 표준곡선을 이용하였다. 그리고 column에서 분취한 단백질은 A_{280} 을 측정하여 비교하였다.

최적 반응온도

항온수조(Dongyang science co., Korea)와 glass jacket을 연결하고 glass jacket 안의 pectin기질 25 mL를 10~65°C 범위의 소정 온도로 조절된 후 추출 효소액과 효소 현탁액을 각각 첨가하여 활성을 측정 비교하였다.

활성화에너지 및 Q_{10} 값

활성화에너지(E_a)는 절대온도의 역수에 대한 효소의 활성의 Log값을 plotting한 Arrhenius plot의 slope로부터 구하였고, Q_{10} 은 Segel의 방법에 의하여 구하였다⁽²⁰⁾.

최적 반응 pH

추출 효소액은 pH 6.0~10.0, 효소 현탁액은 pH 6.0~11.0까지 변화시킨 1% pectin 기질 25 mL에 각각 효소를 첨가하여 활성변화를 조사하였다.

열 안정성

항온수조로 20~90°C 범위의 소정온도로 변화시키면서 추출 효소 또는 효소현탁액을 각각 10분 동안 처리한 후 각 효소를 기질에 첨가 반응시켜 활성변화를 조사하였다.

NaCl이 효소의 반응에 미치는 영향

1% pectin 기질의 NaCl 농도 변화를 0~1.0 M로 하여 효소현탁액의 활성변화를 조사하고 또한 0.5% pectin의 NaCl 농도를 0~1.0 M 범위로 변화시키면서 분말상태의 *in situ* PE 0.01 g을 첨가하여 활성변화를 조사하였다.

NaCl이 효소의 용해성과 안정성에 미치는 영향

NaCl 농도를 0~1.0 M로 조절된 증류수에 분말상태의 *in situ* PE를 용해하여 충분히 효소가 용출되도록 24 hr 동안 냉장으로 방치한 후 일부를 원심분리(4°C, 27,000×g, 20 min)하여 상정액과 침전물로 분리시켜 원심분리하지 않은 현탁액과 함께 그들의 활성변화를 측정하여 용해성과 안정성을 비교하였다.

저장 온도가 효소 활성에 미치는 영향

추출효소와 분말화시킨 효소를 플라스틱 용기에 담아 실온(20°C, desiccator에 보관), 5, -25, -75°C의 온도에 보관하면서 추출 효소는 5일 간격으로, 분말상태의 *in situ* PE는 현탁액으로 조제하여 10일 간격으로 60여 일 동안의 활성변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

추출 PE 정제

0.30~0.75 포화도의 황산암모늄으로 염석한 PE를 투석한 후, 1 mM Na₂S₂O₃와 10 mM NaCl를 포함하는 10 mM tris-HCl (pH 7.5) 완충액으로 평형화시킨 Q-Sepharose column에 loading하여 chromatography한 결

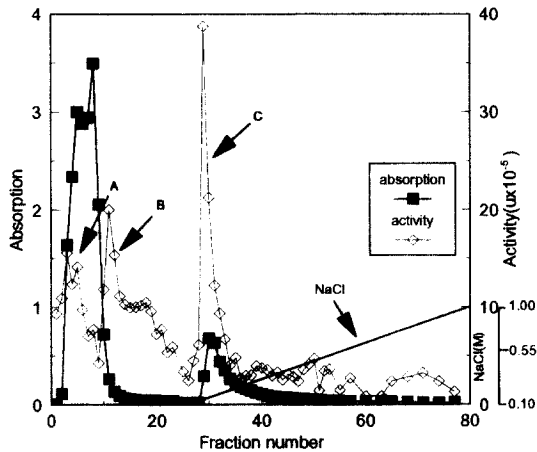


Fig. 1. Chromatogram of fig PE by Q-sepharose.

과는 Fig. 1과 같았다. 평형화시킨 완충액과 동일한 완충액으로 용출시켰을 때 흡착되지 않은 단백질인 A와 B, 두 개의 PE활성 peak가 용출되었고 column에 흡착되었던 단백질은 0.20 M NaCl 농도의 gradient 단계에서 비교적 활성이 큰 peak C로 용출되었다. Valencia orange PE들의 등전점이 >8.38⁽¹³⁾, papaya >9.0⁽²¹⁾, kiwi PE 7.3⁽²²⁾, lemon PE >11과 9⁽²³⁾, tomato PE 8.2, 8.3과 8.5⁽²⁴⁾의 양이온성 단백질임으로 DEAE 같은 음이온 교환수지에서는 거의 흡착되지 않고 CM 같은 양이온 교환수지에서 흡착 용출되는 것이 일반적인 경향이였으나 본 무화과 PE는 음이온 교환수지에 흡착 용출됨으로써 위의 예들과는 다른 경향을 보였다. 즉 Lin 등⁽¹⁴⁾의 무화과 PE(pI 3.5)의 정제에서 나타난 것과 유사하게 음이온 수지에 일부가 흡착 용출된 것이다. Q-Sepharose에 흡착되지 않고 용출된 A와 B peak의 단백질을 모아서 농축한 다음 CM-cation exchanger에 loading하여 용출한 결과는 Fig. 2와 같았다. 미흡착 부분에서 비활성이 약한 peak A와 0.25 M NaCl gradient 부근에서 비교적 높은 비활성을 보이는 peak B가 나타났다. 이상 chromatography 결과에서 무화과 PE는 양이온성과 음이온성을 갖는 두 종류가 주된 PE였으며 이온성이 미약하여 양이온과 음이온교환수지에 결합되지 않은 PE도 약간 포함되어 있다고 여겨

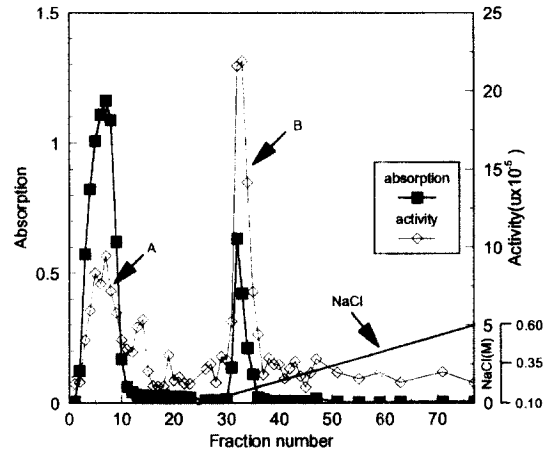


Fig. 2. Chromatogram of non adsorption fig PE on Q-Sephadex chromatography by CM-cation exchanger.

진다. 이들의 결과를 정제 단계별로 정리한 결과는 Table 1과 같았으며 정제된 정도를 알아보기 위하여 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같았다. Table 1에서 보여주는 바와 같이 ammonium sulfate 염석(3.0~7.5)한 후의 비활성이 0.505인 데 반하여 Q-Sepharose chromatography의 peak C 부분과 CM-cation exchange chromatography의 peak B 부분은 도리어 비활성이 낮아져 각각 0.052와 0.076이었고 정제도는 조효소의 1.54와 2.26배를 나타내었으며 염석 투석한 PE보다 9.4와 6.6배로 감소하는 결과를 보였다. 사과, Cox's orange, pippin 오렌지 그리고 tomato의 PE의 활성비율이 1:200:5,800:24,000이라는 Pollard 등⁽²⁵⁾의 결과에서 보듯이 비교적 많이 연구되었던 토마토나 오렌지에 비하여 본 효소는 활성이 낮을 뿐만 아니라 정제조작의 진행에 따라 단백질의 변성이 일어나는 즉, 안정성이 낮은 결과를 나타냄으로서 정제를 더 진행하는 것은 어려운 일이었다. 두 가지 수지에서 PE 활성을 갖는 부분과 염석 투석시킨 조효소를 SDS-polyacrylamide gel로 전기영동한 결과는 Fig. 3와 같았다. Lane 3의 Q-Sepharose의 peak C 부분은 lane 2의 염석 투석한 조효소보다 분리가 많이 된 편이었고 lane 4의 CM-cation exchanger의 peak B부분은 덜 된 편이었다. 이들 중 어느 band가

Table 1. Separation of pectinesterase from Korean fig fruit

Purification step	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$)	Yield (%)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
Crude enzyme	5,000.0	15,042.46	506.50	100.00	0.034	1.00
Ammonium sulfate fraction	34.0	138.14	69.72	13.76	0.505	14.99
Q-Sepharose chromatography	45.0	18.99	0.98	0.19	0.052	1.54
CM-cation exchange chromatography	10.0	20.18	1.53	0.30	0.076	2.26

Fig. 3. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of fig PE by separation setp. Lane 1: protein standards (α -lactalbumin; 14 KDa, trypsin inhibitor; 20.1 KDa, carbonic anhydrase; 29 KDa, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; 36 KDa), Lane 2: ammonium sulfate fraction, Lane 3: Q-Sepharose chromatography peak C eluate, Lane 4: CM-cation exchange chromatography peak B eluate.

PE band인가를 확인하여 보고자 전기영동한 gel에 pectin paper를 처리하여 확인⁽²³⁾하고자 하였으나, PE 활성이 미약하여 확인할 수 없었으므로 각각의 수지에서 얻은 활성부분을 다시 Protein-Pak TM 300. SW 10 μ m column 을 이용하여 HPLC를 수행(자료 미제시)한 결과, Q-Sepharose의 peak C에서는 1개의 활성 peak를, CM-cation exchanger의 peak B에서는 2개의 활성 peak를 얻었으며 이들을 전기영동한 결과는 Fig. 4와 같았다. HPLC로 얻은 3개의 PE가 모두 분자량 27,000 정도에서 밀접한 두 개의 band가 동일한 위치에 있었다. 그러므로 이들을 분리하려면 ion exchange chromatography나 gel filtration 이외의 다른 방법을 강구하여야 할 것으로 여겨지며, 이들은 분자량이 같으면서 서로 반대로 하전되어 있거나 또는 동일하게 하

Fig. 4. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of fig PE by HPLC. Lane 1: protein standards, Lane 2: HPLC active fig PE fraction eluate of CM-cation exchange chromatography peak B eluate, Lane 3 and 4: HPLC two kind of active fig PE fraction eluates of Q-Sepharose chromatography peak C.

전되어 있더라도 하전량이 서로 다른 isoenzyme으로 여겨진다. 본 무화과 PE의 분자량은 Lin 등⁽¹⁴⁾의 jelly fig PE의 분자량 38,000과는 큰 차이를 보이며 이는 품종간의 차이에 기인하는 것으로 여겨진다.

무화과 PE의 성질

정제한 효소의 성질을 알아보는 것은 효소학적 연구에 중요하지만 정제과정이 진행됨에 따라 PE활성이 급속히 감소되므로 더 이상 실험을 진전시키는 데에는 어려움이 있었고, 또한 이들의 효소적 성질을 구명하고자 하는 목적은 무화과의 저장성 잼 가공 시에는 무화과 자신이 본래 가지고 있는 PE를 추출하지 않은 *in situ* 상태로 이용하는 것이므로, King⁽²⁶⁾ 등이 시도한 *in situ* 상태의 PE와 함께 추출 PE도 일부 포함하여 몇 가지의 성질을 조사하여 보았다.

효소의 저장성: 효소의 온도에 따른 저장성을 알아보기 위하여 분말 시료와 추출 염석한 효소를 2 개월간 저장하면서 활성의 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같았다. 껍질, 과육, 전과를 분말화한 시료들은 조사기간 중 활성 감소가 거의 없었다. 특히 껍질부위가 가장 큰 PE 활성을 가지고 있었으며 일정 기간 감소하다가 증가하고, 과육은 저장기간 동안 완만하게 증가하며, 전과는 약간 감소하다가 완만한 증가를 보였다. 또한 5°C와 상온에서 저장한 것과 -25°C와 -75°C에서 저장한 것을 비교해 보면 조사기간 말기에 전자의 활성이 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 껍질 부위와 과육 부분에 존재하는 PE가 서로 성질이 다른 isozyme 일 것이라 여겨지며 무화과의 껍질 부위에 특히 PE가 많이 존재하는 것은 수확후 단시간에 연화되어지는 원인으로 될 것으로 여겨진다. 또한 PE가 고체입자^(27,28) 및 세포벽⁽²⁹⁾과 강하게 결합하고 있어 PE가 이들과의 결합 정도와 구조변화에 따라 저장기간 중에 활성의 증감을 나타내는 것으로 보여진다. 추출 PE도 조사 온도 및 저장 기간에 걸쳐 거의 활성의 변화가 없는 저장성을 가졌다. 그러나 정제 단계에 들어가면 단시간 내에 불활성화 되어지는 것은 공존하고 있는 보호 물질과의 유리에 기인하는 것이라고 여겨진다.

최적 반응 pH: 최적 pH를 조사한 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같이, 분말시료는 모두 pH 8.5이고 추출 효소는 pH 9.5로서 추출효소가 분말 시료를 현탁시켜 조제한 효소보다 pH 1 정도 높은 알칼리 쪽에서 최적 반응을 나타내었다. PE는 기질의 염류 농도에 의하여 최적 pH가 변화되므로⁽³⁰⁾ 같은 염류농도 조건에서 측정된 것과 비교해 볼 필요가 있었다. 예를 들어 비교해 보면 정제된 Valencia orange PE⁽¹¹⁾는 pH 7.0과 7.0~

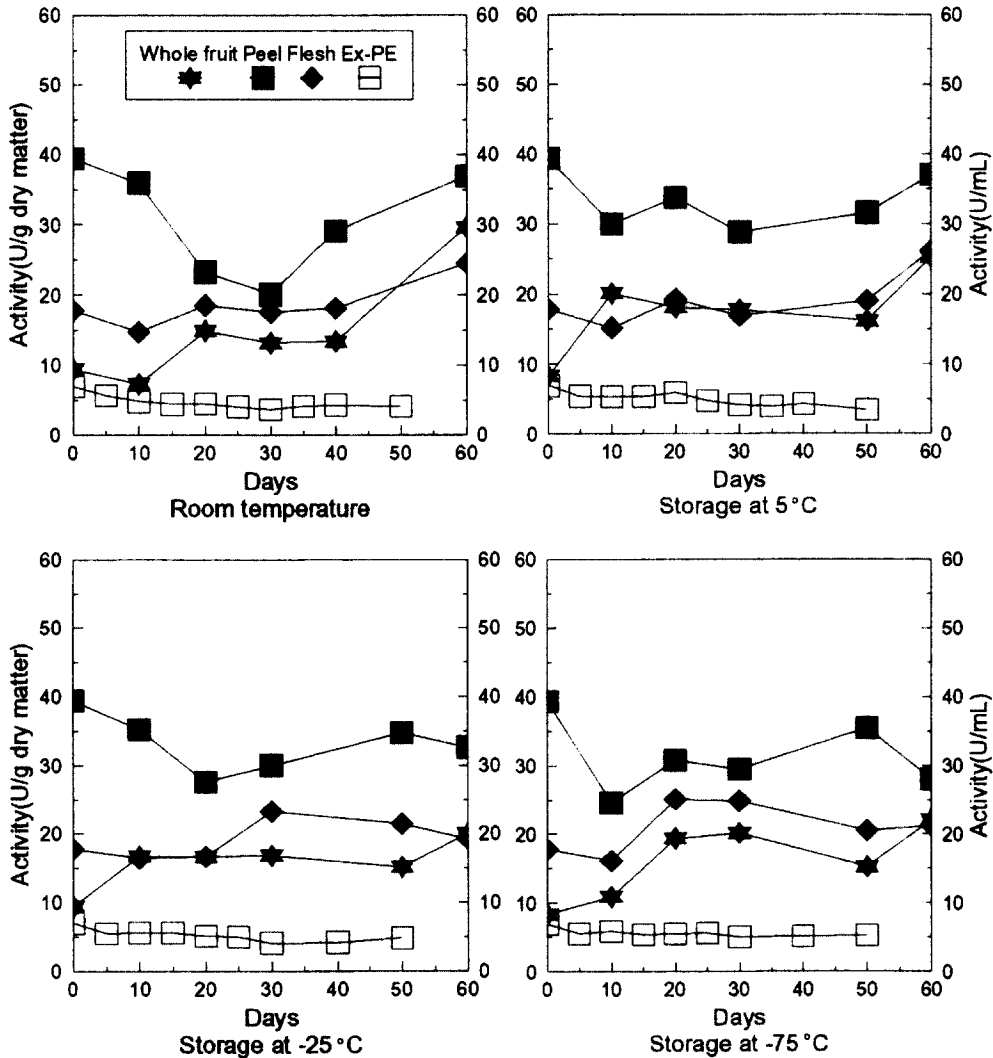


Fig. 5. PE activity change according to storage temperature. Whole fruit, peel and flesh sample were *in situ* PE preparations which were freeze-dried, powdered and stored during indicated period in dessicator. Ex-PE sample was ammonium sulfate salting out fraction. Unit of *in situ* preparations sample was U/g dry matter and unit of Ex-PE was U/mL.

8.0, Marsh grape fruit PE⁽¹²⁾는 pH 7.0과 7.8로 본 무화과 추출 효소보다 낮았다. 또한 분말시료를 사용한 Bramley apple PE⁽²⁶⁾ 경우 최적 pH 10.0으로 분말화시킨 무화과의 *in situ* PE가 더 낮은 최적 pH를 나타내었다. 분말 시료에서 얻어진 실험 값은 추출된 PE활성과 세포벽 물질과 결합하고 있는 PE의 활성도 포함하고 있으므로 추출 정제한 효소와 비교해 볼 때 최적 pH가 1 정도 높게 나타남으로써 서로 다른 최적 pH를 나타내었다. 분말 효소의 실제적인 pH 활성 곡선은 효소의 용출시간과 측정시간 동안의 안정성을 반영한다고 볼 수 있다. PE의 용출은 일반적으로 높은 pH 즉

7.0⁽¹³⁾ 또는 7.5⁽¹⁷⁾에서 수행하지만 용출액의 염 농도와 pH에서 장시간에 걸쳐 추출하게 되므로 그 조건에서의 안정성도 고려되어야 한다고 사료된다. 본 무화과 PE의 pH 활성곡선에서 보면 분말 시료 현탁액의 pH 범위는 4.5~5.0 (자료 미제시)으로 이 범위에서는 전혀 활성을 나타내지 않았다. 따라서 *in situ* 조직의 pH는 알 수 없지만 PE는 낮은 pH에서 안정성을 유지하는 반면 활성은 낮은 것으로 여겨진다.

최적 반응온도 및 열 안정성: 온도 변화에 따른 PE의 활성은 Fig. 7에 나타난 바와 같으며, 분석에 사용한 시료 모두 50°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 정

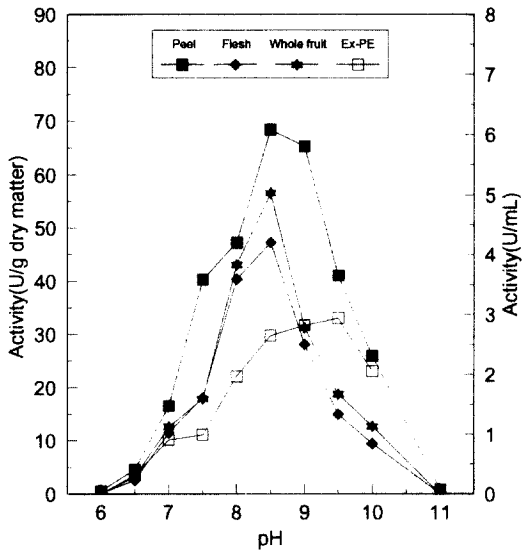


Fig. 6. Change in PE activity with pH. The PE activity was measured at various pH adjusted buffers.

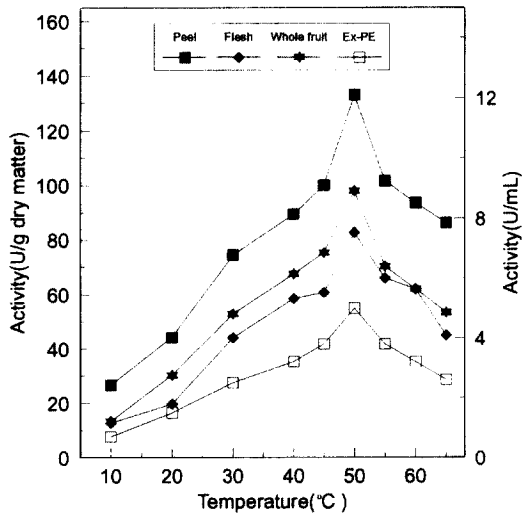


Fig. 7. Dependence of PE activity on temperature. The PE activity was measured at various temperature.

제한 오렌지 PE⁽³¹⁾는 60°C, papaya PE⁽²⁰⁾는 60°C, 그리고 *in situ* 상태의 분말시료 현탁액을 사용한 Bramley apple PE⁽²⁶⁾ 역시 60°C인 것에 비하여 본 무화과 PE는 낮은 최적 온도를 나타내었다. 분말시료 현탁액의 반응 온도 20~50°C 범위에서의 1/T(K)에 대한 log initial velocity를 Arrhenius plots하여 Fig. 8를 얻었으며 이로부터 과피 PE 6861, 전과 PE 7289, 과육 PE 8862 cal mol⁻¹ K⁻¹ (평균 7671 cal mol⁻¹ K⁻¹)의 활성화에너지를 각각 구하였다. Lee 등⁽⁴⁰⁾에 의하면 활성화 에너지

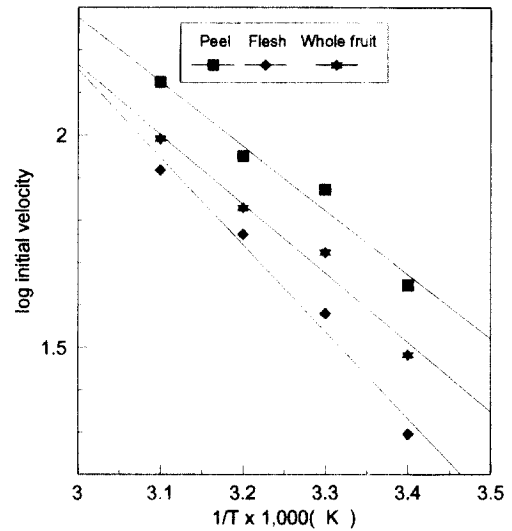


Fig. 8. Arrhenius plot for the reaction of fig PE.

는 반응상태에서 기질 분자에 필요한 에너지의 양이라고 보았다. 기질 분자는 먼저 활성화 에너지를 흡수한 다음 반응하여 생성물로 변할 수 있다. 이와 같은 견지에서 본 무화과 PE의 활성화에너지는 평균 7,671 cal mol⁻¹ K⁻¹로 papaya⁽²⁰⁾ 5,690, 오렌지 PE⁽³¹⁾ 5,600, 5,740, 5,800, 6,200 cal mol⁻¹ K⁻¹에 비해 높은 값을 나타냈으나 King⁽²⁶⁾의 Bramley apple PE의 7644 cal mol⁻¹ K⁻¹와 거의 유사한 값을 보였으며 *in situ* 상태에서 기질의 활성화 에너지를 더 많이 요구하는 것으로 나타났다. 또한 같은 온도 범위에서 Q₁₀ 값을 구한 결과, 과피 PE는 1.443, 전과 PE는 1.478 그리고 과육 PE는 1.614로 나타났다. 이러한 결과는 papaya PE⁽²⁰⁾, 감자 PE⁽³²⁾, 오이 PE⁽³³⁾ 그리고 완두콩 PE⁽³⁴⁾의 각각에 대한 Q₁₀ 값이 1.29, 1.33, 1.34 그리고 1.35와 비교하였을 때 비교적 큰 값을 나타내었다. Fig. 6과 Fig. 7에서 나타난 바와 같이 pH 7.5와 실온의 조건에서 각각의 PE 활성은 과피 40.25, 과육 18.13, 전과 25 µg dry matter, 추출효소 0.99 U/mL인데 반하여 이들이 최적 온도에서는 PE 활성이 과피 133.04 (3.3배), 과육 82.84 (4.6배), 전과 98.1 µg dry matter (3.9배), 추출효소 4.2 U/mL (4.2배)로 활성이 증가하였고, 최적 pH의 실온에서 측정된 활성(과피 68.39, 과육 47.28, 전과 56.57 µg dry matter, 추출효소 2.9 U/mL)보다도 추출 PE를 제외한 분말 PE는 거의 2배 정도의 높은 활성을 보였다. 이와 같은 결과는 과일을 *in situ* 상태의 PE를 이용하여 deesterification할 때에 최적온도를 유지하면 과일과 같은 낮은 pH (무화과 펄프의 pH: 5.0~5.2)에서도 low methoxyl화가 가능하다는 것을 제시하여 준다. 무

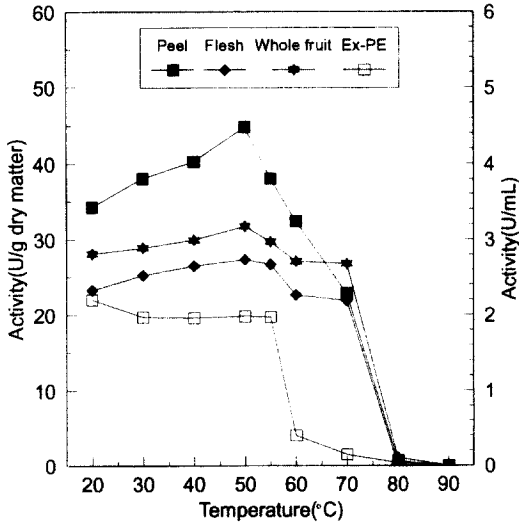


Fig. 9. Effect of temperature on the stability of fig PE. The PEs were incubated at various temperature for 10 minutes and the remaining activity was measured at room temperature.

화과 PE의 내열성을 조사하기 위하여 소정의 온도에서 10분간 열처리한 후 표준측정 방법으로 활성을 조사한 결과는 Fig. 9와 같았다. 분말 시료 현탁액은 최적 반응온도인 55°C까지는 안정성을 보이다가 70°C까지 안정성이 점감하고 그 이후는 급감하였다. 한편 추출 효소는 50°C까지만 안정성을 보이다가 그 이후에는 급속하게 안정성이 급감하였다. 특히 과피의 PE는 50°C까지는 열처리를 하면 도리어 활성이 증가되는 현상을 보였으며 이는 세포막 성분과 결합하고 있는 효소의 용출 및 활성화에 기인되는 것이라고 여겨진다. 이러한 결과는 King⁽²⁰⁾의 Bramley apple PE가 40°C까지 안정성이 있었다는 것보다 열 안정성이 높게 나타난 것이며, Pollard 등⁽²⁵⁾이 사과주스에 존재하는 PE가 정제한 사과 PE보다 내열성이 훨씬 크다고 한 것처럼 무화과에 있어서도 *in situ* PE가 추출 PE보다 내열성이 크다는 것을 보여주고 있다.

NaCl이 PE에 미치는 영향: Pectin 기질의 NaCl 농도가 PE 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pectin 기질의 NaCl 농도를 달리하여 활성을 측정한 결과는 Fig. 10과 같았다. 과피 PE는 0.1~0.5 M, 과육과 전과 PE는 0.2~0.4 M 범위에서 높은 활성을 유지하였고, NaCl이 없으면 과피, 과육, 전과 모두 거의 활성을 나타내지 못하였으며 0.7 M 이상에서는 활성이 최고 활성의 1/2~1/3 이하로 감소하였다. 이러한 결과는 papaya PE⁽²⁰⁾ 0.15~0.30 M, 사과 PE⁽²⁶⁾ 0.15 M 인 것에 비하여 보다 넓은 범위의 NaCl 농도에서 활성이 촉진

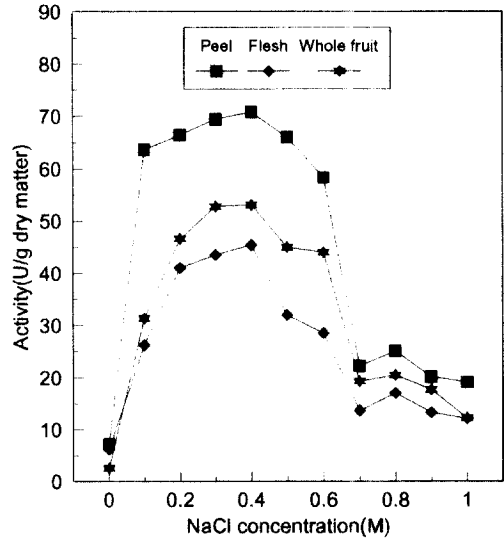


Fig. 10. Dependence of PE activity on NaCl concentration. The fig PE powder suspension and 1% pectin substrate with various NaCl concentration (0~1.0 M, pH 7.5) were incubated following measured PE activity at room temperature.

되는 것을 나타내주고 있다. Linweaver 등⁽²⁵⁾에 따르면 Na⁺ 또는 Ca⁺⁺과 같은 양이온과 carboxyl기와 복합체 형성에 의하여 pectin의 carboxyl기에 의한 PE의 저해 작용을 억제하며 그러한 효과는 산성 쪽에서 민감하

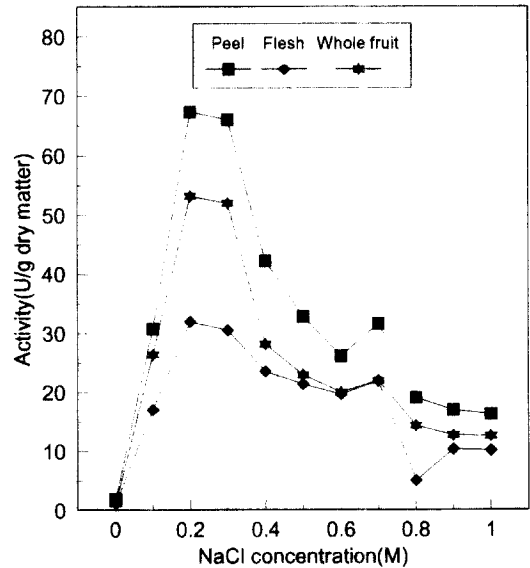


Fig. 11. Dependence of *in situ* PE activity on NaCl concentration. *In situ* activity was examined by adding samples of the dry ground PE powder to 1% pectin solution with various NaCl concentration (0~1.0 M) at room temperature.

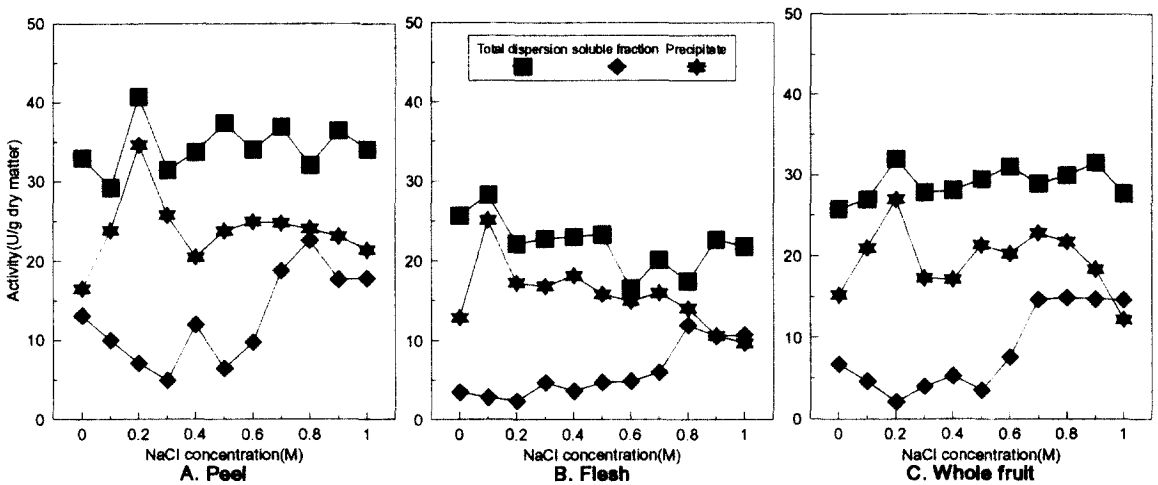


Fig. 12. Soublility and stability of fig PE in different NaCl concentration. The fig PE suspension (0.3 g/6 mL distilled water) with various NaCl concentration was left at refrigerator overnight and then samples of the solution assayed for PE activity using the same method as for crude enzyme preparation. Samples (4 mL) of the suspension preparation were centrifuged and soluble and precipitate fractions assayed separately for PE activity.

게 나타나고 알칼리성에서는 약화된다고 하였으나 본 실험에서는 측정 조건이 pH 7.5의 약알칼리성임에도 불구하고 활성 촉진효과가 크게 나타났으며, 산성 쪽에서는 더욱 양이온의 효과가 클 것으로 여겨진다. 시료 분말을 NaCl의 농도를 달리한 1% 펙틴기질에 첨가하여 활성을 측정한 결과는 Fig. 11와 같다. Fig. 11을 보면 모든 시료가 0.2~0.3 M의 범위에서 활성촉진 효과가 컸으며 Fig. 10의 실험 결과와 다르게 좁은 범위로 나타났다. 무화과 PE의 NaCl 농도에 따른 용해성과 안정성을 조사하기 위하여 소정의 NaCl 농도의 증류수 용액에 각각의 분말시료를 현탁하여 하루 동안 방치한 후 그의 일부를 채취, 원심분리하여 상정액과 침전물로 나누고 현탁액과 함께 활성을 조사한 결과는 Fig. 12와 같았다. 모든 시료의 PE가 0~1.0 M NaCl까지의 처리농도 조건에서 비교적 안정되었으며 0.2 M 부근의 NaCl용액에서 가장 용출이 되지 않았으며, 0.7~0.8 M이상의 NaCl범위에서는 용출이 잘 되었다. 이와 같은 결과는 Bramley apple⁽²⁶⁾ PE가 0.5 M NaCl 이상에서 안정성을 유지하므로 0.5 M NaCl의 조건에서 PE를 추출하는 것이 좋다고 한 것과는 차이를 보였다. 또한 상정액 PE와 침전물 PE의 활성을 합한 것은 현탁액의 활성과 거의 일치하는 결과를 보였다.

요 약

무화과 PE를 추출하여 ammonium sulfate로 분획 투

석한 후 Q-Sepharose column 및 CM-cation exchanger column을 이용한 chromatography와 HPLC에 의해 1개의 음이온성 PE와 2개의 양이온성 PE로 분리되었으며, 이들은 모두 전기영동상에 분자량 27,000정도의 밀접한 두 개의 band로 나타난 부분 정제된 단백질이었다. 이 효소 단백질들은 보관 중에 활성을 급격히 상실되므로 현실적인 이용성을 고려하여 분말화한 시료 현탁액을 이용한 *in situ* PE의 특성을 조사하였다. 그 결과 분말 시료는 냉동 저장뿐만 아니라 5°C에서도 장기간 저장할 수 있었으며, 최적 pH는 8.5, 최적온도는 50°C이었고, 활성화 에너지는 7,671 cal mol⁻¹ K⁻¹이었으며 55°C까지는 열 안정성을 유지하였다. 또한 0.2~0.4 M NaCl에서 활성이 촉진되었으며 PE의 용출은 0.8 M 이상의 NaCl에서 효과적이었고 0~1.0 M NaCl까지의 범위에서는 특별히 안정성에 영향을 미치지 않았다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 한국과학재단 지정 식품산업기술연구센터의 지원 지역협력과제의 일부 연구결과로써 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Forgaty, W.M. and Kelly, C.T.: Pectic enzymes. ch. 3. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Forgaty, W. M.(ed.), Applied Science Publisher, New York, Vol.4, p.

- 131 (1983)
2. Rexova-Benkova, L. and Markovic, O.: Pectic enzyme. In *Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Tipson, R.S. and Horton, D.(ed.), Vol.33, p.323 (1976)
 3. Englund, P.T., King T.P., Graig, L.C. and Walti, A.: Studies on ficin. 1. Its isolation and characterization. *Biochem.* **9**(1), 163-175 (1968)
 4. Jones, L.K. and Glazier, A.N.: Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidase ("ficin") of ficus glagrata latex. *J. Biol. Chem.* **245**(11), 2765-2772 (1970)
 5. Kim, J.P., Suh, J.S. and Kim J.S.: Isolation and purification of ficin from fig latex (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **18**(4), 270-277 (1986)
 6. Kramer, D.E. and Whitaker, J.R.: Ficus enzymes II. properties of the proteolytic enzymes from the latex of Ficus carica variety kadota. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2178-2183 (1964)
 7. Kang, C.K. and Rice, E.E.: Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J. Food Sci.*, **35**, 563-565 (1970)
 8. Evans, R. and McHale, D: Multiple forms of pectinesterase in lime and orange. *Phytochemistry*, **17**, 1073-1075 (1978)
 9. Garces, M.B. and Luh, B.S.: Characteristics of pectinesterase and polygalacturonase in VF-145 tomatoes. *Confructa*, **17**, 360-370 (1972)
 10. Lee, Y.S. and Willey, R.C.: Measurement and partial characterization of pectinesterase in apple fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **95**, 465-468 (1970)
 11. 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**, 220-222 (1985)
 12. Versteeg, C., Rombouts, F.M., Spaansen. C.H. and Pilik, W.: Thermostability and orange juice destabilizing properties of multiple pectinesterase from orange. *J. Food Sci.*, **45**, 969-971, 998 (1980)
 13. Hou, W.N. Jeong, Y., Walker, B.L., Wei, C.I. and Marshall, M.R.: Isolation and characterization of pectinesterase from Valencia orange. *J. Food Biochem.*, **21**, 309-333 (1997)
 14. Lin, T.P., Liu, C.C., Chen, S.W., and Wang W.Y.: Purification and characterization of pectinmethylesterase from ficus awkeotsang Machino Achenes. *Plant. Physiol.*, **91**, 1445-1453 (1989)
 15. Hou, W.N. and Kim, M.H.: Processing of low sugar jams from fig pulp treated with pectinesterase (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(1), 125-131 (1998)
 16. Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **224**(6), 4406-4412 (1969)
 17. Seymour, T.A.: Purification and properties of pectinesterases from marsh white grapefruit. *PhD. Thesis*, University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A. (1990)
 18. Hargermand, A.E. and Austin, P.J.: Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 440-444 (1986)
 19. Lowry, D.H. and Rosebrough, N.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
 20. Fayyaz, A., Asbi, B.A., Ghazali, H.M., Che Man, Y.B. and Jinab, S.: Kinetics of papaya pectinesterase. *Food Chem.*, **53**, 129-135 (1995)
 21. Lim, Y.M. and Chung, M.C.M.: Isolation and characterization of pectin methylesterase from papaya. *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**(1), 15-20 (1993)
 22. Giovane, A., Quagliuolo, D., Castaldo, D., Servillo, L. and Balestrieri, C.: Pectin methyl esterase from *Actinidia Chinensis* fruits. *Phytochemistry*, **29**(9), 2821-2823 (1990)
 23. Macdonald, H.M., Evans, R and Spenser, W.J.: Purification and properties of the major pectinesterases in lemon fruits (*citrus limon*). *J. Sci. Food Agric.* 163-168 (1993)
 24. Gaffe, J., Tieman, D.M. and Handa, A.K.: Pectinmethylesterase isoform in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues. *Plant Physiol.*, **105**, 199-203 (1994)
 25. Pollard, J.E. and Kieser, M.E.: The pectase activity of apples. *J. Sci. Food Agric.*, **2**, 30-36 (1951)
 26. King, K.: Partial characterization of the *in situ* activity of pectinesterase in Bramley apple. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **25**(2), 188-197 (1990)
 27. Rouse, A.H.: Distribution of pectinesterase and total pectin in component parts of citrus fruits. *Food Technol.*, **7**, 360-364 (1953)
 28. MacDoell, L.R., Jansen, E.F. and Linweaver, H.: The properties of orange pectinesterase. *Arch. Biochem.*, **6**, 389-401 (1945)
 29. Jansen, E.F., Jang, R. and Bonner, J.: Orange pectinesterase binding and activity. *Food Res.*, **25**, 64-72 (1960)
 30. Pressey, R. and Avants, J.K.: Multiple forms of pectinesterase in tomatoes. *Phytochemistry*, **11**, 3139-3142 (1972)
 31. Korner, B., Zimmermann, G. and Berk, B.: Orange pectinesterase: purification, properties, and effect on cloud stability. *J. Food Sci.*, **45**, 1203-1206 (1980)
 32. Puri, A., Solomos, T. and Kramrmer, A.: Partial purification and characterization of potato pectinesterase. *Food Chem.*, **8**, 203-213 (1982)
 33. Bell, T.A., Etchells, J.L. and Jones, I.D.: Pectinesterase in the cucumber. *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**, 431-441 (1951)
 34. Collins, J.L.: Pectin methylesterase activity in southern peas (*Vigna sinensis*). *J. Food Sci.*, **35**, 1-4 (1970)
 35. Linweaver, H. and Ballou, G.A.: The effect of cations on the activity of alfalfa pectinesterase (pectase). *Arch. Biochem.*, **6**, 373-387 (1945)