

## Kiwi pectinesterase inhibitor의 분리와 불투명 과즙의 혼탁성 유지

김명화 · 고은경 · 허원녕  
목포대학교 원예육종학과

### Separation of Kiwi Pectinesterase Inhibitor and its Effect on Cloud Maintenance in Cloudy Juices

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

#### Abstract

Pectinesterase inhibitor(PEI) of ripened kiwi fruit(*Actinidia chinensis*) was separated with affinity chromatography using CNBr-activated Sepharose 4B being covalently bound by orange pectinesterase(PE). The affinity resin strongly and selectively bound PEI, which could be eluted in high yield as a single peak by pH 9.5 without loss of inhibitory activity. The separated PEI had maintained almost inhibitory activity at -25°C and 5°C during 30 days but lost it at room temperature in 4 weeks. The PEI possessed a molecular weight of 16.6 KDa, as estimated by 12.5% SDS-PAGE. PEI had optimum pH of 7.5, optimum temperature of below 10°C and stability up to 70°C. Also, optimum inhibitory activity for PEI was obtained in 0.2 M NaCl of substrate solutions. The kind of inhibition on tomato pectinesterase was found to be noncompetitive, using citrus pectin as substrate. Fresh orange juice added with crude PEI extracts maintained almost the same cloud stability as pasteurized juice. In case of apple juice, the addition of crude PEI extracts to apple juice had decrease of L-ascorbic acid with nearly no effect on cloud loss.

Key words : pectinesterase, pectinesterase inhibitor, kiwi, CNBr-activated Sepharose 4B, cloud loss, turbidity

## 서 론

과실의 수확 및 유통, 저장 과정에 있어서 생리적, 화학적 변화 등을 일으키는 세포벽 분해효소 중의 하나인 pectinesterase(PE, EC3,1,1,11)는 펙틴을 함유한 과일주스 안에 포함되어 있는 pectin의 methylester group을 가수분해하는 효소로서 분해시 펙틴산과 메탄올을 생성시키며<sup>(1)</sup> 생성된 carboxyl group은 금속이온과 회합하여 침전물을 생성시킴으로써 불투명주스를 맑게 하는 cloud loss의 주요요인이 된다<sup>(2)</sup>. 또한 PE는 과실 및 채소를 포함하여 전반적인 식물대사에 있어 중요한 생리적 관련효소로서 펙틴물질대사에 있어서의 중요한 역할들로 인하여 PE의 특성들이 광범위하게 조

사되었고<sup>(3)</sup>, 식품산업에 있어 PE는 과즙의 청징제로 이용되고 있으며 저당성 잼 제조<sup>(4)</sup>에도 이용 될 수 있다. 그러나 과거와는 달리 과실 주스의 경우, 투명주스보다는 천연 불투명주스를 선호하는 추세이다. 그러므로 주스의 cloud loss 현상을 가속화시키는 PE는 오히려 방해요인이 되고 있다. 이에 따라 PE 작용의 억제를 위해 종래의 열처리, 고압처리, 고전압처리 및 액체 탄산가스처리 등 여러 방법이 강구되고 있는 실정이다. 한편 Balestrieri 등은 kiwi로부터 pectinesterase inhibitor(PEI)를 발견하였으며<sup>(5)</sup>, Giovane 등은 친화성 크로마토그래피를 이용하여 PEI를 보다 용이하게 분리 정제할 수 있는 방법을 개발하였으며, 아울러 PEI의 PE저해 기능이 PE와 복합체 형성에 기인되는 것임을 밝히고, 또한 과실의 숙성 과정 중 PEI가 불활성 상태에서 활성화 단백질로 변화됨을 보고하였다<sup>(6)</sup>.

본 연구는 전남 지역에서 생산되는 kiwi로부터 affinity chromatography로 PEI를 분리한 후, 그 특성을

Corresponding author : Won-Nyoung Hou, Department of Horticultural Crops Breeding, Mokpo National University, Mokpo, Chunnam 534-729, Korea  
Tel : 82-61-450-2373  
Fax : 82-61-450-2373  
E-mail : Houwon@chungkye.mokpo.ac.kr

구명하고 PEI를 불투명 주스에 첨가하여 과실주스의 혼탁성 유지에 미치는 영향을 조사함으로써 PEI를 이용한 불투명주스 제조를 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 kiwi(*Actinidia chinensis* Planch)는 전남 해남에서 생산된 'Heyward' 품종으로 충분히 후숙시킨 것을 사용하였으며, CNBr-sepharose 4B resin은 Pharmacia Biotec.(Lot No. 249898, Sweden)사에서, orange PE는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 토마토 PE는 목포대학교 원예가공 실험실에서 분리한 것을 사용하였다. 주스 제조에는 미국산 Valencia 오렌지와 국내 경북산 홍옥 사과를 사용하였다.

### Affinity chromatography 수지 조제

Affinity chromatography에 의한 PEI 분리를 위한 수지는 다음과 같이 조제하였다.

CNBr-activated sepharose 4B를 glass filter상에서 수지량의 200배에 상당하는 1 mM HCl로 세척해낸 후 다시 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>로 수회 세척하였다. 세척한 수지는 0.5 M NaCl를 함유한 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> buffer(pH 8.3)에 팽윤시킨 후 동일 buffer로 녹인 orange PE와 혼합하여 실온에서 4시간 동안 서서히 shaker를 이용하여 흔들어주면서 CNBr-Sephacrose 수지에 PE가 결합되도록 하였다. 이때 orange PE 첨가량은 수지 1 mL당 1 mg이었다. 이를 다시 glass filter상에서 동일 buffer로 서서히 여과시키고 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 현탁하여 하루동안 방치시킨 후 100 mM NaCl을 함유하는 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 세척하여 column(1.8×20 cm)에 충전시킨 다음 100 mM NaCl를 함유하는 상기 buffer(pH 7.5)로 평형화시켰다.

### Kiwi로부터 PEI 분리

과피를 제거한 kiwi와 증류수를 1:1(w/v)의 비율로 혼합하고 homogenizer로 마쇄한 후 4°C에서 약 2시간 동안 교반 방치한 다음 4°C에서 15,000×g로 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조추출액으로 하였다. 회수된 상정액은 2 N NaOH를 사용하여 pH를 6.0으로 조정 한 후 PEI 친화성 수지인 CNBr-sepharose 4B column에 주입하여 flow rate 0.4 mL/min가 되도록 흘러주었다. 이후 0.5 M NaCl을 함유한 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 결합되지 않은 단백질을 세척한 다음 1 M NaCl이 포함되어 있는 2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

buffer(pH 9.5)로 PEI를 용출, 분획한 후 PEI 활성을 측정하였다.

### PEI 분리과정과 저장주스에서 PE 및 PEI 활성측정

PE의 활성은 Hagermann과 Austin<sup>(7)</sup>의 방법을 변형한 Seymour 방법<sup>(8)</sup>에 따라 titrimetric assay법을 사용하여 측정하였고, column chromatography로 분획한 PEI의 상대적 활성 측정을 위해서는 pectin-dye 용액을 이용한 spectrophotometric assay 법을 이용하였다. PE 효소 활성단위는 측정조건에서 매분당 1 μmole의 carboxyl group을 유리시키는 효소량으로 하였고, PEI unit는 PE 만 반응시킨 PE unit값과 PE와 PEI를 25°C에서 5분 동안 혼합 반응시킨 후 기질을 넣어 반응시킨 PE unit 값의 차를 첨가한 PEI의 양으로 나눈 값으로 나타내었다.

$$\text{PEI(units/mL)} =$$

$$\frac{\text{PE units without PEI} - \text{PE units with PEI}}{\text{amount of PEI(mL)}}$$

### 전기영동

전기영동은 Weber와 Osborn의 방법<sup>(9)</sup>에 따라 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 의해 수행하였다. 전기영동용 완충액은 0.1%(w/v) SDS를 포함하는 0.025 M Tris-0.192 M glycine (pH 8.3)용액을 사용하였으며 전기영동 후 염색은 Coomassie brilliant blue R-250 용액을 사용하여 상온에서 3시간 동안 흔들어주면서 수행하였다. PEI의 분자량 계산은 표준단백질들의 전기영동상 이동거리와 분자량과의 관계식으로부터 계산하였다.

### PEI의 특성조사

PEI 특성조사를 위한 PE는 tomato PE를 사용하였다. Kiwi로부터 분리해낸 PEI의 저장온도별 저장성을 알아보기 위해 column 용출시 PEI 활성이 있는 분획을 모아 농축하여 실온, 5°C, -25°C의 온도에서 각각 보관하면서 4, 5일 간격으로 30일 동안의 활성을 측정하여 비교하였다. 기질의 pH 변화에 따른 PEI의 활성 변화를 조사하기 위해 1% pectin 용액의 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0로 변화시키면서 PEI의 활성을 측정하였다. NaCl 농도에 따른 PEI의 활성변화를 알아보기 위해 pectin 기질의 NaCl 농도를 0.1~0.9 M까지 변화시키면서 PEI의 활성변화를 측정하여 조사하였다. PEI의 최적반응 온도를 조사하기 위해 pH stat(718 STAT Titrino, Metrohm Ltd. Switzerland)의 glass

jacket과 항온수조를 연결하여 기질의 온도를 10~60°C로 변화시켜가면서 PEI의 활성을 측정하였다. PEI의 열에 대한 안정성도 항온수조로 10~90°C 범위의 온도에서 각 온도마다 PEI를 10분씩 열처리하여 PEI의 활성변화를 측정하여 조사하였다. PE와 PEI의  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값은 pectin용액의 농도 1, 2.5, 5, 10 mg/mL에서 각각 PE활성을 측정하여 PE의 Lineweaver-Burk plots에 의하여 계산한 후 이들 값으로 PE에 대한 PEI의 저해작용을 알아보았다.

#### 과일 주스 제조 및 저장

시중에서 구입한 오렌지는 NaOCl<sub>3</sub>(무공화 락스™) 300배 희석액에 5분 동안 침지하여 살균시킨 후 세척하여 겉껍질, 속껍질을 제거하고, 사과는 껍질을 제거하지 않고 그대로 녹즙기로 분쇄, 착즙 후 250 μm의 체에 통과시킨 것을 재료로 사용하였다. 사과주스 제조시에는 갈변 방지를 위해서 75 mg%의 비타민 C를 첨가하였다. 각각의 일부 주스는 85~90°C에서 40초간 열처리하여 비내열성 PE를 불활성화 시키고 각각의 시료는 멸균된 저장용기(100 mL screw-capped glass bottle)에 분취한 후 밀봉하여 4°C에 저장하였다. 제조된 주스는 저장실험을 위해 각각 열처리한 것(P), 열처리한 주스에 PEI를 첨가한 것(P+PEI), 열처리하지 않은 것(NP), 열처리하지 않은 주스에 PEI를 첨가한 것(NP+PEI) 4 가지로 분류하였고, 이들 각각을 저장기간별로 저장하였다. 첨가용으로 사용한 PEI는 kiwi의 조추출액을 사용하였으며, 오렌지 주스에 대해서는 150 μL/mL, 사과주스에 대해서는 50 μL/mL 씩 각각 첨가하였다. 저장기간별로 주스의 혼탁도, PE활성, 비타민 C 함량, 색깔의 변화 등을 조사하여 비교하였다.

#### 주스의 혼탁도(turbidity)

시료를 5일 간격으로 각각 10 mL씩 채취하여 50 mL의 tube에 넣고 원심분리(360×g, 4°C, 10 min)한 후 상정액의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer(Hewlett Packard, USA)로 측정하였다. 오렌지 주스는 660 nm<sup>(10)</sup>에서, 사과주스는 380 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

#### 비타민 C 함량

사과 주스의 비타민 C 함량은 hydrazine 비색법<sup>(11)</sup>을 이용하여 측정하였다.

#### 사과주스의 색깔 변화

사과주스의 색깔은 Hunter 색차계(CR-300, Minolta, Japan)을 이용하여 L, a, b값을 측정하였다.

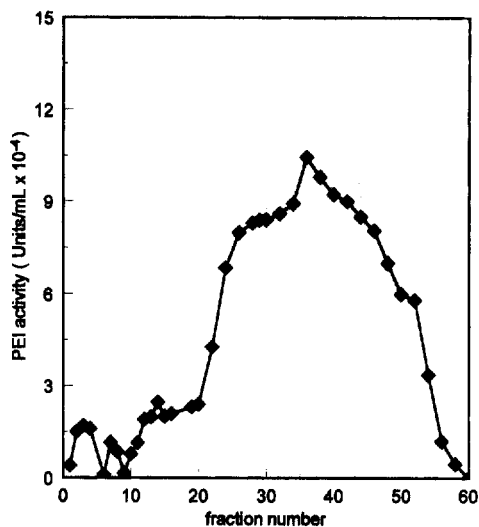


Fig. 1. Affinity chromatogram of kiwi PEI.

## 결과 및 고찰

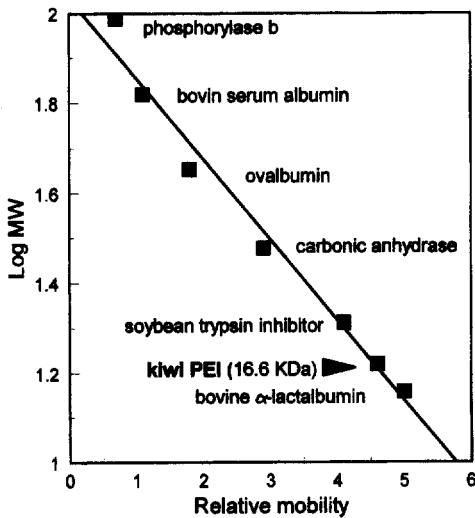
#### Kiwi로부터 PEI 분리

Affinity chromatography 수지 제조를 위해 CNBr-sepharose 4B에 오렌지 PE를 결합시켰다. 수지에 orange PE의 결합 여부를 확인하기 위해 PE용액에 CNBr-sepharose 4B를 넣고 결합전후의 PE용액의 PE 활성을 각각 측정하였다. 결합전의 PE활성이 236 units/mL에서 결합한 후에 20 units/mL로 감소되었으므로 오렌지 PE가 91%이상 결합되었음을 확인할 수 있었다.

Kiwi PEI 분리는 충분히 후속된 kiwi로부터 얻어낸 조추출액을 affinity chromatography용 수지에 주입하고 affinity chromatography한 결과 Fig. 1과 같이 단일과정에 의해 분리되었다. Giovane 등<sup>(6)</sup>에 의하면 친화성수지에 흡착된 PEI는 저해활성의 손실 없이 pH 9.5로 조절된 고농도의 염에 의해 단일한 peak로 용출된다고 하였으나 본 실험에서는 비교적 넓은 범위의 활성을 나타내는 단일한 peak로 분리되었다.

PEI 분리중 단백질의 chromatography pattern을 알아보기 위해 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과 PEI활성이 있는 부분과 없는 부분이 모두 차이 없이 미량의 단백질량으로 측정되어 단백질량과의 관계를 나타내기는 어려웠다. 분리되어진 kiwi PEI의 분자량을 알아보 고자 Weber와 Osborn의 방법<sup>(9)</sup>에 따라 12.5% SDS-PAGE의 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2의 Lane 2는 PEI 조추출액이며 Lane 3는 Fig. 1의 분획 No. 24~52를 모아 최대한 농축한 것을 전기영동한 것이고 이들 중 PEI 활성이 높은 분획 No. 34~43

**Fig. 2. 12.5% SDS-Polycrylamide gel electrophoresis pattern of separated kiwi PEI on separation step.**  
Lane 1: protein standards, Lane 2: crude extract, Lane 3, 4: affinity chromatography peak eluate.

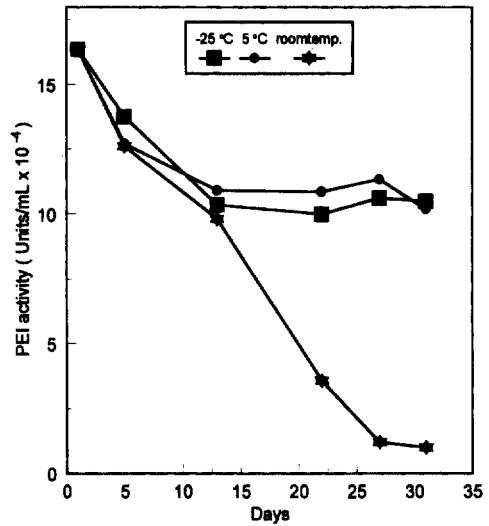


**Fig. 3. Estimation of molecular weight of kiwi PEI.**

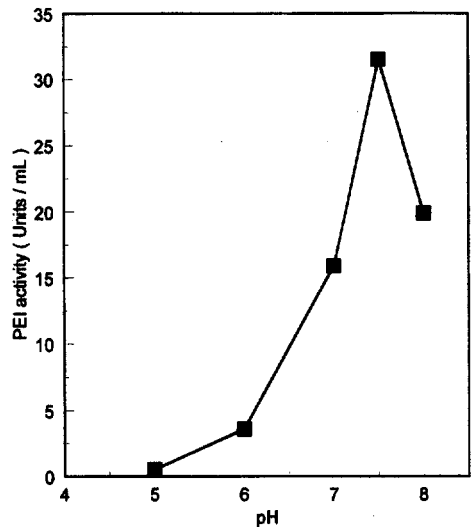
까지를 따로 모아 농축한 것을 Lane 4에 전기영동 하였다. 이들의 전기영동 결과, Lane 3과 4는 같은 모양의 밀접한 두 개의 band로 나타났으므로 chromatography상에 넓게 나타난 peak는 분자량이 거의 같은 두 종류 단백질의 peak임을 알 수 있었다. 이 두 종류의 단백질의 분리를 시도하였으나 해결되지 않았으며, 향후 이에 관한 연구가 필요하리라고 생각되었다. 이들의 분자량을 추정한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 약 16.6 KDa로 나타났다. 이는 Giovane<sup>(6)</sup>등이 연구한 kiwi PEI의 분자량인 18 KDa과는 약간의 차이를 보였다.

**PEI의 특성**

PEI의 온도에 따른 저장성을 알아보기 위하여 PEI



**Fig. 4. PEI activity changes according to storage temperature.**



**Fig. 5. Effect of pH on the activities of kiwi PEI.**

를 30일 동안 실온, 5°C 및 -25°C에 각각 저장하면서 PEI의 저해활성변화를 살펴본 결과는 Fig. 4와 같이 -25°C와 5°C에서는 초기 저장 2주까지 저해활성의 감소가 급격하다가 그 이후로는 75%의 잔류활성이 유지되는 반면에, 실온 저장에서는 계속적으로 저해활성이 감소하여 4주 후에는 거의 모든 PEI 활성이 상실되었다.

Kiwi PEI의 최적반응 pH를 알아보기로자 기질의 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0으로 변화시켜 가면서 활성변화를 살펴 본 결과는 Fig. 5와 같았다. pH 7.5에서 제

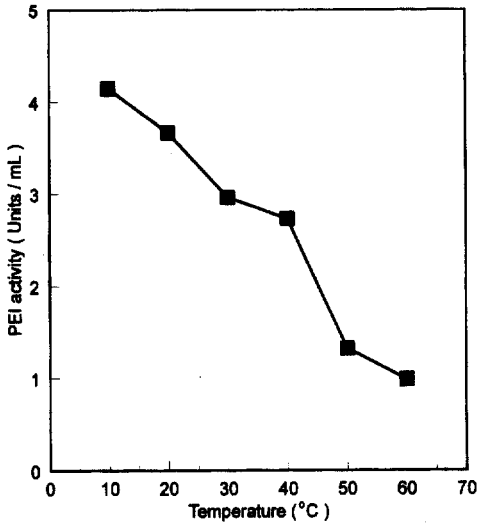


Fig. 6. Effect of temperature on the activities of kiwi PEI.

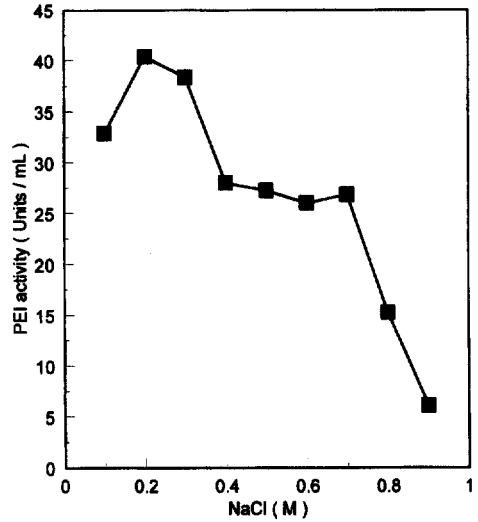


Fig. 8. Effect of NaCl concentration in substrate solution on the activities of kiwi PEI.

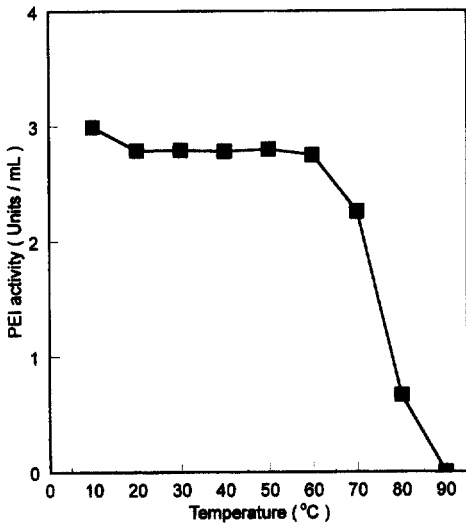


Fig. 7. Effect of temperature on the thermal stability of kiwi PEI.

일 높은 저해활성을 나타내었고, 저해활성 측정에 사용한 tomato PE의 최적반응 pH 9.0<sup>(12)</sup>과는 다른 pH에서 최적 반응 pH를 나타내었다.

Kiwi PEI의 최적 반응온도를 알아보고자 기질의 온도를 10, 20, 30, 40, 50, 60°C까지 각 온도별로 저해활성 변화를 살펴본 결과는 Fig. 6에서와 같이 측정범위 온도에서는 낮은 온도에서 저해활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 본 실험에 이용된 tomato PE의 최적 반응온도가 60°C<sup>(12)</sup>인 것과는 상당한 차이를 보였다. 이것은 PEI보다는 저온 반응온도의 영향이라고

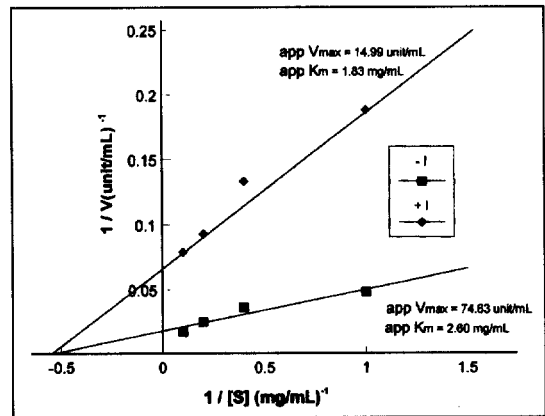


Fig. 9. Lineweaver-Burk plots of PE with PE inhibitor.

여겨진다.

Kiwi PEI의 내열성을 알아보기 위하여 설정온도별로 10 min씩 열처리하여 활성변화를 살펴본 결과는 Fig. 7과 같았고 70°C 이하에서는 열안정성을 나타내었다. 본 실험에 이용된 tomato PE가 55°C까지 내열성을 지니고 있으며<sup>(12)</sup> Bramley apple PE가 40°C까지<sup>(13)</sup>, 무화과 PE가 55°C까지 내열성을 지닌 반면<sup>(14)</sup> 저해제의 내열성은 70°C까지인 것으로 나타남으로써, 과실 주스 제조시 PEI를 첨가하여 순간 가열살균처리 하면 병원성 미생물 살균과 비내열성 및 내열성이 낮은 PE의 불활성화가 동시에 이루어질 수 있을 것이라 여겨진다.

Kiwi PEI의 염농도에 따른 활성변화를 살펴보고자

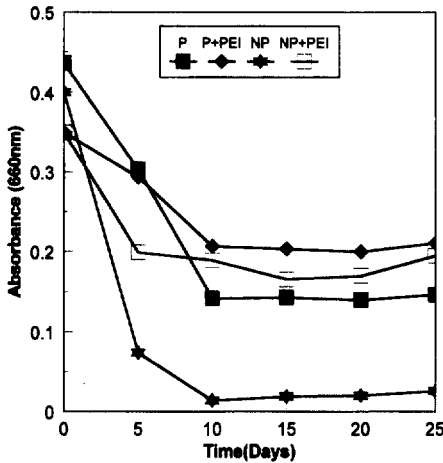


Fig. 10. Turbidity of orange juice during the cold strage. P: Pasteurized, P+PEI: PEI addition to be pasteurized juice, NP: Not to be pasteurized, NP+PEI: PEI addition to not to be pasteurized.

1% pectin기질의 NaCl 농도를 0.1~0.9 M까지 변화시킨 후 저해활성을 조사해 본 결과 Fig. 8과 같았다. 저해활성은 0.2 M의 NaCl 농도에서 가장 높게 나타났고 0.7 M 이후에는 급격히 활성이 감소되었다. Tomato PE는 0.1 M에서 가장 높은 활성을 보였고<sup>(12)</sup>, 사과 PE는 0.15 M의 농도에서<sup>(13)</sup>, *in situ* 무화과 PE는 0.1~0.4 M의 농도에서 높은 활성<sup>(14)</sup>을 나타내는 양상과 비슷하게 PE활성이 높을 때 PEI의 저해 활성도 높은 경향을 보였다.

Kiwi PEI의 PE에 대한 저해작용 방법을 알아보기 위하여 pectin 기질의 농도를 10, 5, 2.5, 1 mg/mL로 달리하여 PE와 PEI를 첨가한 PE의 활성변화를 조사하여 Lineweaver-Burk plot한 결과는 Fig. 9와 같다. PE의  $app.K_m$ 과  $app.V_{max}$ 는 2.60 mg/mL, 74.63 units/mL이었고, PEI를 첨가한 PE의  $app.K_m$ 과  $app.V_{max}$ 은 1.83 mg/mL, 14.99 units/mL로  $app.K_m$ 값의 변화는 적은 반면에  $app.V_{max}$ 값은 상당한 감소를 보여 PE에 대한 PEI의 저해 작용은 noncompetitive inhibition<sup>(15)</sup>의 양상을 나타내었으며, 이는 Balestrieri 등<sup>(5)</sup>이 competitive inhibition이었다는 결과와는 다른 결과를 보였다.

PEI 첨가에 의한 오렌지 주스의 특성 변화

오렌지 주스와 저장기간별 혼탁도의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 10과 같다. 열처리한 주스에 PEI를 넣은 것(P+PEI)이 가장 혼탁도가 높게 유지되었으며, 다음으로 열처리하지 않은 주스에 PEI를 넣은 것(NP+PEI), 열처리한 것(P), 열처리하지 않은 것(NP)의 순서로 나

Table 1. Pectinesterase activity of orange juice during the storage (units/mL)

Juice Sample	Storage Days				
	5	10	15	20	25
P <sup>1)</sup>	ND <sup>5)</sup>	ND	ND	ND	ND
P+PEI <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
NP <sup>3)</sup>	0.2964	0.3342	0.2604	0.3572	0.5631
NP+PEI <sup>4)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>1)</sup>Pasteurized, <sup>2)</sup>PEI addition to be pasteurized juice, <sup>3)</sup>Not to be pasteurized, <sup>4)</sup>PEI addition to not to be pasteurized juice, <sup>5)</sup>Not detected

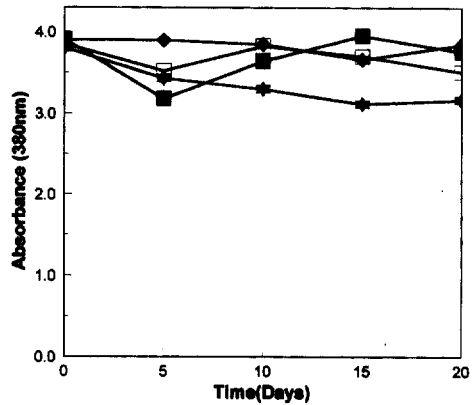


Fig. 11. Turbidity of apple juice during the cold strage. P: Pasteurized, P+PEI: PEI addition to be pasteurized juice, NP: Not to be pasteurized, NP+PEI: PEI addition to not to be pasteurized.

타났다. 주스저장기간 동안 주스의 PE활성을 조사한 결과는 Table 1과 같이, 열처리하지 않은 주스(NP)만이 PE활성을 띄고 있어 혼탁도 변화와 밀접한 정의 상관관계를 나타내었다. 또한 저장 10일 까지 PE활성이 나타나지 않았음에도 불구하고 혼탁도가 감소한 것은, PE활성에 의한 것이라기보다는 오렌지주스에 존재하는 단백질, 펙틴, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 등의 물질이 서로 응집되어 침전되는 현상에 의해 나타난 것<sup>(16)</sup>으로 보이며, 열처리한 주스(P)가 열처리하지 않고 PEI를 넣은 주스(NP+PEI)에 비해 혼탁도가 낮게 나타난 것은 열처리한 주스 내에 존재하는 미량의 내열성 PE<sup>(17)</sup>의 영향일 것이라 생각된다.

PEI의 첨가에 의한 사과주스의 특성변화

PEI첨가에 따른 사과주스의 저장기간동안 PE활성변화는 Fig. 11에서 보는 바와 같이 주스 자체의 PE활성이 매우 약하여 서로간에 큰 차이를 나타내진 않았지만 열처리한 주스에 비하여 열처리하지 않은 주스

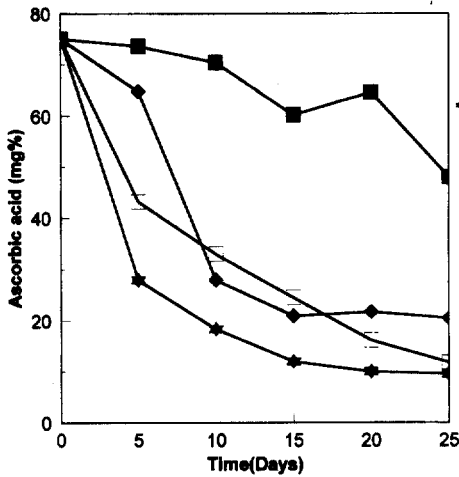


Fig. 12. Contents of L-ascorbic acid of apple juice during the cold storage.  
 P: Pasteurized, P+PEI: PEI addition to be pasteurized juice, NP: Not to be pasteurized, NP+PEI: PEI addition to not to be pasteurized.

가 미약한 혼탁성 감소를 보여주었고 PEI 첨가에 의한 혼탁성 변화의 차이는 거의 없었다. 저장기간동안 사과주스의 비타민 C 함량은 Fig. 12에서 보는 바와 같이 열처리한 주스(P)가 가장 감소량이 적었으며 열처리하여 PEI를 넣은 것(P+PEI), 열처리하지 않은 주스(NP), 열처리하지 않고 PEI를 넣은 것(NP+PEI)은 50% 이상 비타민 C 함량의 감소를 보여주었다. 이는 열처리하지 않은 사과주스<sup>(18)</sup>와 kiwi PEI 추출액에 들어있는 비타민 C가 자가 ascorbinase의 작용으로 비타민 C 함량이 감소된 것으로 보여진다.

저장기간동안 사과주스의 색깔변화

저장기간동안 갈변현상을 살펴보기 위해 사과주스의 색깔변화를 살펴본 결과는 Table 2와 같았다. 처리간

큰 차이는 나타나지 않았지만 밝기는 저장기간동안 약간 감소되었으며, 적색도는 열처리하지 않은 주스가 열처리한 주스에 비하여 아주 약하게 증가하였다. 열처리하지 않고 PEI를 첨가한 것이 가장 높은 적색도의 증가를 보였다. 황색도는 초기에 열처리한 것이 높은 값을 나타내었고, 저장말기에는 서로간의 차이가 나타나지 않았다. PEI의 첨가가 적색도의 변화에 약간의 영향을 미친 것은 PEI 조추출액 내의 갈변효소의 영향일 것이라고 여겨진다.

요 약

CNBr-sepharose 4B에 orange pectinesterase(PE)에 결합시킨 affinity chromatography용 수지에 PEI를 선택적으로 결합시킨 후, 높은 이온강도를 갖는 pH 9.5의 용액으로 PEI의 활성 peak를 용출 분리하였다. 분리된 kiwi PEI의 분자량은 12.5% SDS-PAGE 전기영동상에서 약 16.6 KDa 정도인 것으로 나타났다. 분리된 PEI 활성은 -25°C와 5°C에서 30일 동안 저장하였을 때 2주간 저장 시 25% 저해활성이 감소하였고 그 이후에는 큰 변화 없이 유지되었으나 실온에서는 급격한 저해활성 감소를 나타내고 30일 저장시 거의 저해활성을 상실하였다. PEI 최적활성 pH는 7.5이고 최적반응 온도는 10-60°C 측정범위에서 낮은 온도이었다. 또한 기질용액 중 NaCl의 0.2 M일 때 최적활성을 나타내었으며, kiwi PEI의 PE에 대한 저해작용 방법은 noncompetitive inhibition인 것으로 나타났다. 오렌지 주스 저장시 주스를 열처리하지 않고 PEI 조추출액을 첨가하면 저장기간동안 열처리한 주스와 같이 혼탁도 유지에 효과적이었다. 사과 주스 저장 시 PEI 조추출액 첨가는 비타민 C 함량을 감소시켰으며 오히려 열처리한 주스가 비타민 C 함량이 높게 유지되었으며 갈변현상도 적게 일어났다.

Table 2. Change of color of apple juice during the storage(units/mL)

Storage days	Juice Sample											
	P <sup>1)</sup>			P+PEI <sup>2)</sup>			NP <sup>3)</sup>			NP+PEI <sup>4)</sup>		
	L <sup>5)</sup>	a <sup>6)</sup>	b <sup>7)</sup>	L	a	b	L	a	b	L	a	b
5	41.10	-1.62	+3.75	41.03	-1.45	+3.30	37.67	-0.81	+2.75	37.30	-0.75	+2.35
10	37.92	-0.62	+0.05	37.16	-0.88	+0.85	36.10	-0.10	+0.54	36.20	-0.28	+0.99
15	38.02	-0.43	0.00	35.37	-0.14	0.00	34.60	-0.07	+0.24	33.01	+0.08	+0.42
20	37.29	-0.39	-0.32	36.23	-0.23	-0.49	33.36	-0.07	+0.16	33.56	+0.20	-0.07
25	36.56	-0.35	-0.63	37.14	-0.31	-0.98	32.11	-0.06	+0.01	34.10	+0.32	-0.56

<sup>1)</sup>Pasteurized, <sup>2)</sup>PEI addition to be pasteurized juice, <sup>3)</sup>Not to be pasteurized, <sup>4)</sup>PEI addition to not to be pasteurized juice, <sup>5)</sup>Lightness, <sup>6)</sup>Redness, <sup>7)</sup>Yellowness

## 감사의 글

본 연구는 1999년도 한국과학재단지정 식품산업기술연구센터 지역협력과제의 연구결과로서 이에 감사드립니다.

## 문헌

1. Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. Pectic Enzyme. In: Microbial enzymes and Biotechnology, Vol. 4, p. 131. Fogarty, W.M. (ed). Applied Science Publisher, New York (1983)
2. Hou, W.N. and Marshall, M.R. A study on the separation of thermolabile pectinesterase from Valencia orange. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 673-679 (1995)
3. Giovane, A., Quagliuolo L., Castaldo, D., Servillo, L. and Balestrieri, C. Pectin methylesterase from *Actinidia chinensis* fruits. Phytochemistry 29: 2821-2823 (1990)
4. Hou, W.N., Kim, M.H. and Go, E.K. Processing of low sugar fig jam for marketable production. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 651-657 (1998)
5. Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L. and Servillo, L. A glycoprotein inhibitor of pectin metylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). Eur. J. Biochem. 193: 183-187 (1990)
6. Giovane, A., Balestrieri, C., Quagliuolo, L., Castaldo, D. and Servillo, L. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit-Purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor. J. Biochem. 233: 926-929 (1995)
7. Hargermann, A.E. and Austin, P.J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. J. Agric. Food Chem. 34: 440-444 (1986)
8. Seymour, T.A. Purification and properties of pectinesterases from marsh white grapefruit. PhD. Thesis, University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A. (1990)
9. Weber, K. and Osborn, M. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 224: 4406-4412 (1969)
10. Krop. J. The mechanism of cloud loss phenomena in orange juice. Ph.D. thesis, Agricultural Univ., Wageningen, The Netherlands (1975)
11. Chu, H.K. Food Analysis. pp. 355-359, Hak Moon Pub. Co. Seoul (1995)
12. Hou, W.N. and Go, E.K. Pectinesterase separation and properties of normal tomato(*L. esculentum*)and cherry tomato(*L. esculentum var. cerasiforme*) produced in Korea. Research of Natural Resources 1: 7-17 (1998)
13. King, K. Partial characterization of the *in situ* activity of pectinesterase in Bramley apple. Int. J. Food Sci. Technol. 25: 188-197 (1990)
14. Hou, W.N., Kim, M.H. and Go, E.K. Partial purification of fig pectinesterase and characterization of its *in situ* activity. Korean J. Food sci. Technol. 30: 1169-1178 (1998)
15. Mathews · van Holde The regulation of enzyme activity. In: Biochemistry, The Benjamin/ Cummings Publishing Co. pp. 381-403 (1990)
16. Jerome A.K, Raymond D.B and Sadie H.V. Physical/ Chemical nature of pectin associated with commercial orange juice cloud. J. Food Sci. 59: 339-401 (1994)
17. Hou, W.N. and Marshall, M.R. A study on separation of thermolabile and thermostable pectinesterase from Valencia orange. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 673-679 (1995)
18. Hostasova-B. and Kyzlink-V. Influence of temperature raise during pectolysis on the oxidative changes in fruit juices. Sbornik-Vysoke-Skoly-Chemico-Technologicke-V-Praze, -E-potravin 25: 11-21 (1969)

(2000년 3월 8일 접수)