

## Bacillus subtilis EK11로부터 Protopectinase 생산

문철환 · 최종수 · 이승철 · 황용일\*  
경남대학교 자연과학대학 생명과학부

**Production of Protopectinase from *Bacillus subtilis* EK11.** Mun, Chul-Hwan, Jong-Soo Choi, Seung-Cheol Lee, and Yong-Il Hwang\*. Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea – In plant tissues, intercellular cementing portion, called as middle lamella, consists of high proportion of protopectin, that is water-insoluble form of pectin, on their backbone. Protopectinase (PPase), a heterogeneous group of enzymes that hydrolyze or dissolve the insoluble protopectin in plant tissues by restricted depolymerization, liberates water-soluble pectin with the resultant separation of plant tissues that have been protected against environmental shock by rigid cell wall. *Bacillus subtilis* EK11 was most effective for PPase production. For increasing of PPase productivity, effects of glucose concentrations, pHs, and aeration rates were studied in batch culture. The most proper concentration of glucose, pH, and air condition for PPase production were 1%, 8.0, and 1vvm, respectively. In these conditions, PPase productivity was 84,364 UL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> and increased about 15.6 times than flask fermentation.

**Key words:** *Bacillus subtilis* EK11, protopectinase, fed-batch culture

식물의 세포벽은 세포의 형태 유지 및 특성에 중요한 역할을 하며, 그 주성분은 cellulose, hemicellulose, pectin substance 등의 탄수화물로 구성되어 있다[2,3]. 이들 탄수화물들을 구성하는 당당류는 β-결합으로 연결되어 있어 자연상태에서 그대로 분해되기 힘들다, 이들의 대사에 관여하는 효소들이 발견되어 효소를 이용한 산업적 이용이 가능하여졌다. 식품산업에서의 경우, cellulase를 이용한 주류제조공정의 개선[2], pectinase를 이용한 과즙의 청정화[14], 세포벽 분해효소 혼합물을 이용한 수용성 고형분 함유 식품의 제조공정의 효율성 제고[14] 등에 응용되고 있다.

Pectin substance는 식물조직 중에 다양하게 분포하며, galacturonic acid와 methoxyl 기로 이루어지는 heteropolysaccharide로서, 세포벽에서 유효작용 또는 접착역할을 하는 것으로 알려져 있으며[13], 과실의 숙성[5], 식품가공에서의 역할[15,22], 기능성 식이섬유로서의 이용 등이 연구되어 있다. 또한 최근에는 정장 작용, 콜레스테롤 저하효과, 지방대체제로서의 기능성 등이 보고되어 의학분야 및 화장품분야에서도 그 사용량이 계속 증가하고 있는 추세이다[6]. Pectin substance는 화학적, 물리적 성상으로 protopectin, 유기산기의 상당수가 methylester화 되어있는 pectinic acid, 유기산기의 일부가 methylester화 되어있는 pectin, 유기산기에 methylester가 전혀 존재하지 않는 pectic acid(pectate) 등으로 나눌 수 있으며, 서로간에 밀접한 관계를 갖는다. 이

중에서 protopectin의 화학적 구조에 관한 모델은 여러 논문에서 알려져 있고[7], 중성당 측쇄의 유리를 통해 pectin이 유리되는 것으로 알려져 있다. Protopectin을 제한 가수분해하여 수용성 pectin을 생산하는 효소를 pectin releasing enzyme, protopectin solubilizing enzyme, 또는 protopectinase(이하 PPase)라고 명명하고 있다[16]. PPase는 최근 식품산업과 제약산업에 이용되는 pectin생산[15,16], 식물성 식품소재에 대한 단세포화[10], 식물세포의 protoplast 생산[9] 등에 응용성을 가진다고 보고되었으며, 그 중요성은 점차 증가하고 있다.

본 연구는 PPase 고생산 균주 *Bacillus subtilis* EK11를 이용하여 전보[7]에서 얻은 배지성분으로 fermentor에서 배양하였다. 생산을 위한 최적 조건을 찾아 그 결과로 유가배양을 실시하여 PPase의 생산효율을 증가시키고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 배지

*B. subtilis* EK11[8]이 PPase 생산을 위하여 사용되었다. 먼저 모균주를 LB배지(0.5% yeast extract, 1% trypton, 1% sodium chloride) 상에서 배양하고, 균체증식을 위한 전배양과 효소생산을 위한 본배양 배지는 기본배지(1% glucose, 0.3% yeast extract, 1.4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% Na<sub>3</sub>-citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)를 이용하였다. 본 실험에 사용한 시약류는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품과 기타 1등급 이상의 시약을 사용하였다.

\*Corresponding author  
Tel. 82-55-249-2685, Fax. 82-55-249-2995  
E-mail: yihwang@kyungnam.ac.kr

**배양조건**

*B. subtilis* EK11의 효소생산을 위한 전배양은 LB 평판배지 상의 단일 colony를 취하여 시험관의 10 ml LB배지에 접종하고, 전배양은 기본배지 100 ml가 들어있는 500 ml baffled flask에 전배양액 1%를 접종하였다. 각각 배양 온도는 37°C, 교반속도는 180 rpm으로 하여 12시간 동안 배양하였다. 본배양은 전배양액 1%를 취하여 기본배지 2 L를 함유한 5L-jar fermentor(Korea Fermenter Co., KF-5L)에 접종하고 배양온도는 37°C로 하고, 교반속도는 500 rpm으로 하여 배양하였고, 생균수와 포자수 그리고, PPase 활성을 측정하였다. pH 조절용액은 25% NH<sub>4</sub>OH와 5 N HCl을 사용하였다.

**포자 및 생균수의 측정**

포자수(spore number)의 측정은 배양액을 100°C에서 3분 30초 동안 열처리하여 영양세포를 사멸시키고, 멸균수로 적절하게 희석한 다음, 평판배지(LB)에 0.1 ml씩 분주한 후 37°C에서 24시간 배양 후, 콜로니 형성단위(Colony Forming Unit; CFU)를 측정하여 포자수를 계산하였다. 또한, 생균수는 배양액을 멸균수로 희석한 다음, 평판배지(LB)에 0.1 ml씩 분주한 후 37°C에서 24시간 배양 후, 콜로니형성단위(CFU)를 측정하여 총균수를 계산하였다.

**Glucose 농도 측정**

Glucose 농도는 배양액을 원심분리하여 Biochemistry analyzer(Yellow springs Co., USA)를 이용하여 측정하였다.

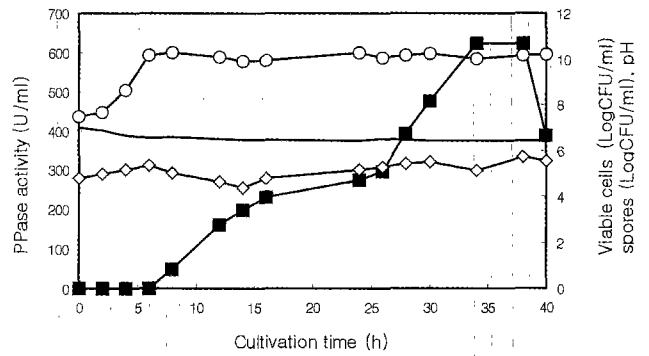
**Protopectinase의 활성측정**

효소활성 측정은 Sakai 방법[20]에 따라 50 µg/ml bovine serum albumin을 함유한 40 µM acetate buffer (pH 5.0) 2 ml에 protopectin 10 mg과 0.5 ml의 효소용액을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응종료 후 Toyo No.2 filter paper로 여과하여 여액을 얻었으며 galacturonic acid의 함량측정은 *m*-hydroxy-diphenyl법[1]에 따라 실시하였다. 1 unit의 PPase는 상기의 조건에서 분당 1 µmole의 galacturonic acid를 생성하는 효소량으로 하였다.

**결과 및 고찰**

**발효조 배양에서 PPase**

산업용 생산을 위하여 전보[9]에서 보고한 PPase 생산용 최적 배지조성(0.7% corn starch, 0.3% yeast extract, 1.4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% Na<sub>3</sub>-citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)을 기초로 발효조에서 PPase를 생산하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* EK11의 성장은 배양 초기인 6시간까지가 대수증식기로 빠른 성장을 보였으며 배양 8시간 이후부터 정지기에 들어서서 배양 종료



**Fig. 1. PPase production of *B. subtilis* EK11 in fermentor under flask-optimal conditions.**

Symbol: ○, Viable Cells (Log CFU/ml); ◇, Spores (Log CFU/ml); ■, PPase activity (U/ml); —, pH.

시까지 큰 변화가 없었다. *B. subtilis* EK11의 아포 형성은 세포성장과 함께 배양 6시간까지 미세한 증가가 있었으나 전체적으로 큰 변화없이 세포 성장곡선과 유사한 양상을 보였다. PPase 생산은 대수 증식기 말기인 배양 8시간에서부터 시작되었으며 PPase 최고 활성은 배양 34시간째에 약 624 U/ml였다. 배양 중의 pH의 변화는 배지의 초기 pH로 조정된 7.0에서 세포 성장과 함께 감소하다가 정지기에 들어서서 배양 pH는 6.4에서 6.5범위로 일정하게 유지되었다(Fig. 1).

전보[9]에서 Flask 배양의 최대 PPase 활성은 배양 48시간에서 260 U/ml, 생산성은 5,417 UL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>였으나 발효조 배양에서 PPase 생산성은 24,000 UL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>로 Flask 배양에 비해 약 4.4배의 생산성 증가를 보였다. 즉, 발효조 배양이 flask 배양과 비슷한 양상을 보였으나, PPase 효소생산량은 상당히 증가하였다.

**포도당 농도의 영향**

전보[9]에서 보고한 최적 배지조성의 탄소원 및 에너지원으로 사용한 corn starch는 회분배양에서는 적합하나 유가 배양을 이용하여 PPase를 생산하는 경우에는 어려움이 따른다. 유가배양시 추가적인 탄소원 공급시기를 결정하기 위하여 corn starch의 소비농도를 측정해야 하는데 단시간에 정확한 농도를 측정하기가 곤란하다. 따라서 본 연구에서는 유가배양을 이용하여 PPase를 생산하고자 탄소원의 소비 속도를 쉽게 측정할 수 있는 포도당을 corn starch대신 이용하였다. 포도당은 배양시간에 따른 정확한 농도를 측정할 수 있으나, 고농도로 첨가할 경우 catabolite repression이 일어날 수 있다[3,4]. 따라서, PPase의 고생산을 위한 유가 배양을 하기 위해서는 PPase 생산을 증가시키고, catabolite repression을 피할 수 있는 제한된 농도의 포도당을 유지 및 공급해야 한다.

Table 1은 PPase 생산에 적합한 포도당 농도의 영향을

**Table 1. Effect of carbon concentrations on PPase production<sup>a</sup>**

| Carbon source (w/v) | Viable cell (Log CFU/ml) | Spore (Log CFU/ml) | Extracellular PPase activity <sup>b</sup> (U/ml) | Overall productivity (UL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|--------------------------|--------------------|--|---|
| 0.7% Starch         | 9.2                      | 6.1                | 668  | 20,875  |
| 1% Glucose          | 11.5                     | 5.7                | 1,132  | 70,750  |
| 2% Glucose          | 11.1                     | 3.2                | 1,105  | 50,227  |
| 3% Glucose          | 10.5                     | 5.2                | 1,006  | 45,727  |
| 4% Glucose          | 10.5                     | 2.8                | 912  | 38,000  |

<sup>a</sup>The pH of medium was adjusted to 7.0 with 25% NH<sub>4</sub>OH and 5 N HCl.

<sup>b</sup>Each enzymatic activities were measured when which PPase activity reached maximal value.

검토하고, 탄소원으로 corn starch를 이용하는 경우의 PPase 생산과 비교하였다. pH는 25% NH<sub>4</sub>OH와 5 N HCl로 7.0으로 일정하게 유지하였으며 산소는 1.0 vvm으로 일정하게 공급하면서 효소생산을 위한 glucose의 농도를 회분식 배양에서 그 영향을 조사하였다. 탄소원으로 corn starch를 사용할 경우 균의 비증식속도는 0.44 h<sup>-1</sup>이었고, PPase 활성은 32시간 후에 최고활성을 보인 반면에 포도당을 사용했을 경우, 1% 포도당은 0.40 h<sup>-1</sup>였고, 2~4%는 0.29 h<sup>-1</sup>에서 0.26 h<sup>-1</sup>의 증식속도를 보였다. 2~4% 포도당을 사용한 경우에는 포도당의 농도가 증가함에 따라 세포성장 및 PPase의 활성이 낮아지는 것으로 보아 catabolite repression의 영향을 받는 것으로 보였다. 반면에 1%의 포도당을 사용했을 때 PPase는 가장 높은 활성을 나타내었으며 세포성장도 가장 높았다. 탄소원으로 포도당을 사용하는 경우가 전체적으로 0.7% corn starch를 사용한 경우보다 PPase 활성이 높았다. 본 연구 범위에서는 1% 포도당 농도가 catabolite repression을 피할 수 있고 PPase 생산에 가장 적합하다는 것을 의미한다.

#### pH의 영향

일반적으로 낮은 pH에서 효소생산은 저해[3,4]를 받기 때문에 pH를 일정하게 유지하는 것이 효소생산증대에 효과가 있을 것으로 예상되었다. PPase 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해서 pH 6.0에서 9.0 범위 내에서 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. pH 8.0에서 최대 PPase 활성과 생산성을 보였으나, 균의 비성장속도는 0.30h<sup>-1</sup>로 pH 7.0으로 조절하여 배양하는 것보다 낮은 값을 보였다.

pH 6.0으로 조절한 것은 pH 8.0보다 균의 성장은 좋으나 효소생산이 감소하였다. pH 9.0은 균의 농도가 시간이 경과할수록 감소하고 따라서 효소생산도 저조하였다. pH 6.0에서 균의 성장은 좋았으나 효소생산이 감소하는 것은 낮은 pH로 PPase의 생산이 저해되는 것으로 사료된다. 따라서 PPase의 생산성 향상을 위하여 다음 연구는 pH 8.0에서 조사하는 것이 효과적이라고 생각되었다.

#### 산소공급속도의 영향

용존산소는 호기성 발효에 있어 중요한 기질인데, 산소는 물에 잘 녹지 않는 기체이기 때문에 용존산소가 제한기질이 될 수도 있다. 즉, 높은 세포 농도에서는 산소 소모 속도가 공급속도를 초과할 수도 있으며 이로 인해 산소 부족이 야기된다. 따라서 균의 생육이 저해되지 않고, PPase의 생산성을 향상시키는 적절한 산소공급속도를 조사할 필요가 있다. 산소 공급속도와 PPase생산에 대한 결과를 Table 3에 나타내었다. 0.5, 1.0, 1.5 vvm으로 공급할 때 비증식속도는 0.19 h<sup>-1</sup>, 0.30 h<sup>-1</sup>, 그리고 0.28 h<sup>-1</sup>로 나타내었다. 따라서, 이 실험에서 산소가 이 균의 중요한 성장제한 기질임을 추측 가능하고 효소생산에 중요한 인자임을 알 수 있다. 따라서, 본 실험에 의해 산소 공급속도는 1.0 vvm이 적절하다고 생각된다.

#### 유기배양에서 PPase의 생산

유기배양에서 PPase 생산은 초기 배양액의 포도당 농도는 1%로 하고, pH는 25% NH<sub>4</sub>OH와 5 N HCl로 pH 8.0

**Table 2. Effect of pHs on PPase production**

| pH  | Viable cell (Log CFU/ml) | Spore (Log CFU/ml) | Extracellular PPase activity <sup>b</sup> (U/ml) | Overall productivity (UL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ) |
|-----|--------------------------|--------------------|--|---|
| 6.0 | 9.9                      | 3.4                | 860  | 33,077  |
| 7.0 | 11.5                     | 5.6                | 1,132  | 70,750  |
| 8.0 | 9.7                      | 3.3                | 1,440  | 72,000  |
| 9.0 | 1.9                      | 0.0                | 306  | 13,909  |

<sup>a</sup>The pH of medium was adjusted with 25% NH<sub>4</sub>OH and 5 N HCl.

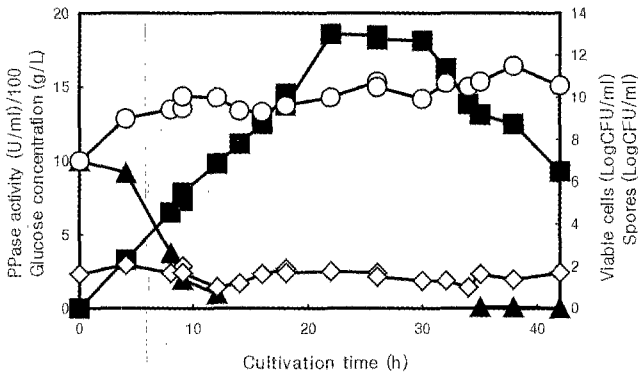
<sup>b</sup>Each enzymatic activities were measured when PPase activity reached maximal value.

**Table 3. Effect of air conditions on PPase production<sup>a</sup>**

| Air flow rate (vvm) | Viable cell (Log CFU/ml) | Spore (Log CFU/ml) | Extracellular PPase activity <sup>b</sup> (U/ml) | Overall productivity (UL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|--------------------------|--------------------|--|---|
| 0.5                 | 7.9                      | 1.7                | 1,175  | 53,409  |
| 1.0                 | 9.6                      | 3.3                | 1,440  | 72,000  |
| 1.5                 | 8.7                      | 1.0                | 1,049  | 47,682  |

<sup>a</sup>*B. subtilis* EK11 was cultured in basal medium at pH 8.0.

<sup>b</sup>Each enzymatic activities were measured when PPase activity reached maximal value.



**Fig. 2. PPase production of *B. subtilis* EK11 in fed-batch fermentation.**

Symbol: ○, Viable Cells (Log CFU/ml); ◇, Spores (Log CFU/ml); ■, PPase activity (U/ml); ▲, Glucose concentration (g/L); ↓, Feeding point.

**Table 4. Effect of culture type on PPase production**

|   | Batch culture <sup>a</sup> | Batch culture <sup>b</sup> | Batch culture optimum condition <sup>b</sup> | Fed-batch culture <sup>b</sup> |
|---|----------------------------|----------------------------|--|--------------------------------|
| Viable cell (Log cfu/ml)                                  | 8.5                        | 9.2                        | 9.6  | 10.1                           |
| Spore (Log cfu/ml)  | 5.5                        | 6.1                        | 3.3  | 1.8                            |
| Extracellular PPase activity (U/ml)                       | 260                        | 668                        | 1,440  | 1,856                          |
| Overall productivity (UL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ) | 5,417                      | 24,000                     | 72,000                                       | 84,364                         |

<sup>a</sup>Cultivation in flask scale.

<sup>b</sup>Cultivation in jar-fermentor scale.

으로 조절하였고, 공기 공급속도는 1.0 vvm으로 공급하면서 유가배양을 실시하였다. Fig. 2에서와 같이 배양액 내에 포도당 농도가 1~2 g/l 일 때, feeding solution으로 1% 포도당을 공급하였고, 질소원은 pH를 조절하면서 25% NH<sub>4</sub>OH로 공급하였다. 균의 농도는 두 번째 feeding solution을 공급한 후에 최고농도에 도달하였고, 이와 비슷한 시기에 최고 PPase 활성을 보였다. 배양이 시작되고 22 시간

후에 PPase 활성은 1,856 U/ml을 보였고, 생산성은 84,364 UL<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>였다. 이는 0.7% starch를 이용한 flask 배양보다 15.6 배의 생산성 증대를 보였다(Table 4).

발효조 내의 세포 성장과 PPase의 생산조건을 조사함으로써 균의 증식을 유도하여 PPase 생산의 증가를 보였다. 적합한 환경은 효소생산에 영향을 미치고 유가식 배양에 의한 세포 농도의 증가로 효소가 대량으로 생산된 것으로 생각된다. 따라서, 유가배양을 실시하는 것은 PPase의 생산성을 증대시키는데 효과적이라 할 수 있다.

**요 약**

PPase는 식물세포 중엽부의 주성분인 protopectine를 분해하여 maceration(죽화; 단세포화)하는 기능이 있다. PPase는 대부분의 야채류 및 과일류의 단세포화에 응용하여 새로운 식품재료로 이용이 가능하다. 본 연구에서 먼저 PPase의 생산을 향상시키기 위해서 배양조건을 조사하였는데, 탄소원으로서 glucose는 catabolite repression이 일어나지 않는 1%가 적절하였고, pH는 8.0으로 조절할 때 PPase 생산이 향상되었다. 그리고, 산소공급속도는 1.0 vvm, 500 rpm으로 조절 하는 것이 회분식 배양에서 PPase의 생산에 효과적이었다. 이 결과로 유가배양을 실시하여 PPase의 생산효율이 flask 배양(5,417 UL<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>), 회분식 배양(72,000 UL<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)에 비해 각각 15.6배, 1.17배의 증가를 보였다. 이와 같은 결과로 유가배양을 실시하는 것이 PPase의 생산성을 증대시키는데 효과적이라 할 수 있다.

**REFERENCES**

1. Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid, *Anal. Biochem.* **54**: 484-489.
2. Fry, S. C. 1998. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*, Longman Scientific & Technical, New York.
3. Haavik, H. I. 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: Effect of glucose. *J. Gen. Microbiol.* **81**: 383-390.
4. Haavik, H. I. 1974. Studies on the formation of bacitracin by

- Bacillus licheniformis*: Role of catabolite repression and organic acids. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 321–326.
5. Jackman, R. L. and D. W. Stanley. 1995. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Tren. Food Sic. Technol.* **6**:187–194.
  6. Kertesz, Z. I. 1930. A new method for enzymic clarification of unfermented apple juice. New York State Agricultural Experiment Station (Geneva) Bull. No. 689. U.S. Patent No. 1, 932, 833.
  7. Knee, M. 1978. Metabolism of polymethylgalacturonate in apple fruit cortical tissue during ripening. *Phytochemistry* **17**: 1261–1264.
  8. Lee, S. C., H. G. Yuk, and Y. I. Hwang. 1997. Recovery yields of protopectinase depending on treatments of organic solvents. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**: 107–111.
  9. Lee, D. H., E. K. Park, C. H. Mun, J. U. Ha, S. C. Lee, and Y. I. Hwang. 1999. Effect of medium composition on protopectinase production from *Bacillus subtilis* EK11. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 378–884.
  10. Miyazaki, H. and K. Terata. 1974. Treatment of waste rind of citrus fruits and extraction of the components. *Shokuhin Kogyo* **17**: 81–87.
  11. Mitsui, T., N. Hashimoto, K. Deguchi, M. Hirano, and I. Igaue. 1990. Isolation of plant mesophyll protoplasts with an endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum*. *Plant Tissue Cult. Lett.* **7**: 14–18.
  12. Nakamura, T., R. Hours, and T. Sakai. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J. Food Sci.* **60**: 468–472.
  13. Nielsen, E. B. 1971. Brewing with barley and enzymes-A review. *Proc. Eur. Brew. Conv.(Estoril)* **15**: 149–170.
  14. Pszczola, D. E. 1991. Pectin's functionality finds use in fat-replacer market. *Food Technol.* **45**: 116.
  15. Rees, D. A. and N. J. Wight. 1969. Molecular cohesion in plant cell walls. *Biochem. J.* 115–431.
  16. Rombouts, F. M. and W. Pilnik. 1978. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem.* **13**: 9–13.
  17. Rombouts, F. M. and W. Pilnik, 1979. Utilization of pectic enzymes in food production. *Dev. Food Sci.* **2**: 264–268.
  18. Sakai, T. and M. Okushima. 1978. Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 2427–2429.
  19. Sakai, T. and Okushima, M. 1982. Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 667–676.
  20. Sakai, T. and S. Yoshitake. 1984. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reesei* strain L. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1941–1950.
  21. Sakai, T., M. Okushima, and S. Yoshitake. 1984. Purification, crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1951–1961.
  22. Sakai, T. 1988. Protopectinase from yeasts and yeast-like fungus. *Methods in Enzymol.* **161**: 335–350.
  23. Sakai, T. and T. Sakamoto. 1990. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity on sugar beet protopectin. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 879–889.
  24. Van Buren, J. P. 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Text. Stud.* **10**: 1–23.

(Received Apr. 20, 2001/Accepted Jun. 25, 2001)