

고추의 성숙에 따른 세포벽 다당류의 변화와 β -Galactosidase Isozymes의 분리

金順東·姜明秀*·金光秀**

효성여자대학교 식품가공학과, *효성여자대학교 식품영양학과

**영남대학교 식품영양학과

(1985년 2월 19일 접수)

Ripening Related Changes in Hot Pepper Fruit Cell Walls Structural Alterations of Cell Wall Polysaccharides and Separation of Galactosidase Isozymes

Soon-Dong Kim, Meung-Su Kang* and Kwang-Soo Kim**

Department of Food Science and Technology, Hyosung Women's University

*Department of Food and Nutrition, Hyosung Women's University

**Department of Food and Nutrition, Yeungnam University

(Received February 19, 1985)

Abstract

Various cell wall polysaccharides and related enzyme activities in hot pepper fruit were determined at different stages of maturity. The uronic acid content of cell walls decreased between immature green and turning stage fruit and then increased by red ripe stage. In contrast, cellulose contents of cell walls changed only a little during ripening. Total neutral sugar content of cell wall material decreased 50% and galactose content of the walls decreased about 80% by the turning stage. Polygalacturonase and β -galactosidase activities, as well as total hemicellulose from isolated cell walls of ripening hot pepper fruit were studied using gel filtration chromatography. Polygalacturonase activity was not detectable but 5 isozymes of β -galactosidase were resolved. The activities of the enzymes were relatively high and gel filtration showed that they differed in molecular weight. Hemicellulose content decreased during ripening and softening. The molecular weight profiles shifted from high molecular weight to low molecular weight polymers during ripening. The changes in cell walls that may be associated with fruit softening involve the alteration of hemicellulose prior to the degradation of wall-bound uronic acid. It is suggested that the decrease in cell wall galactose involved changes in turnover of new cell wall components.

I. 서 론

과실이 익거나 유통 및 저장중에 일어나는 연화와 같은 물성변화가 세포벽 대사와 밀접한 관계가 있다는 사실은 많은 연구보고에서 설명되고 있다. 즉 Hobson¹⁾은 토마토가 성숙, 연화되어 가는 동안 세포벽 구성분 중 galacturonic acid가 손실되는 반면 가용성 polyuronide가 증가한다고 하였으며, Pressey²⁾는 토마토가 연화되는 동안 polygalacturonase의 활성이 높아진다고 하였다. 또 Knee³⁾는 사과에서, Pressy 등⁴⁾은 복숭아에서 동일한 현상을 보고하였다. 이러한 연구결과들은 pectin질의 분해에 의하여 과실이 연화된다는 설을 뒷받침하고 있다.

한편 Gross와 Wallner⁵⁾ 및 Wallner와 Bloom⁶⁾은 토마토가 연화되는 동안 세포벽 성분 중 galactose 잔기가 크게 손실된다고 하였으며, 또 Knee⁷⁾ 역시 사과에서 같은 현상을 관찰하고 있으나 이러한 현상이 연화와 직접적인 관련이 있는지에 대하여는 잘 알져 있지 않다.

본 실험에서는 고추의 성숙증에 일어나는 연화현상이 세포벽구성성분 중 어느 성분과 더욱 관련이 있는지를 조사하기 위하여 고추를 성숙단계별로 나누어 polygalacturonase와 β -galactosidase의 활성 및 세포벽구성다당류의 변화를 조사하는 동시에 β -galactosidase isozyme의 분리를 시도하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 고추는 신미종고추(*Capsicum annuum* L., CV. Choorae-hong)로서 21~27°C의 온실에서 재배하면서 개화후 20일째의 미숙고추, 30일째의 녹숙고추, 48일째의 적변개시고추, 60일째의 완숙고추를 각각 수확하여 시료로 하였다.

2. 성장상태

각 성숙단계별의 고추를 30~50개 무작위 수확하여 총중량을 측정 그 평균치로 표시하였다.

3. β -Galactosidase의 추출, 분획 및 활성도의 측정

β -Galactosidase의 추출은 Pressy²⁾의 방법에 준하여 행하였다. 고추파피조직 500g을 4°C의 중류수로 균질화하고 그 혼탁액에 고체 NaCl을 가하여 최종

농도를 1M(pH 6.0)로 조정, 1시간 동안 추출하였다 그 여액의 30~80%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전물을 18,000 rpm에서 15분간 냉동원심분리하여 모은 후 분자량 6000~8000을 제거시키는 membrane tube를 사용하여 0.15M(pH 6.0)의 NaCl 용액내에서 투석, 원심분리한 상층액을 조효소로 하였다.

조효소액은 Amicon Corp. Model 52와 202 unit 및 PM-10 membrane으로 농축하여 70ml로 한 후 세척액 pH 6.0의 5mM MES(2[N-morpholino]ethane sulfonic acid) 30ml와 함께 DEAE-cellulose column(1.5×15cm)으로 분획하였다. 혼탁액은 50mM MES-NaOH(pH 6.0), gradient용 용매는 50ml의 5mM MES와 50ml의 200mM NaCl 용액을 사용하였고, 유속은 0.4 ml/min, fraction당 4ml를 분획하였다.

Sephadryl S-200 column(2.5×55cm)에 의한 효소의 재분획은 상기 분획부를 5ml로 농축하여 행하였으며 0.15M NaCl(pH 6.0) 용액으로 유속 0.35 ml/min, fraction 당 2.4ml를 분획하였다.

활성도의 측정은 100mM의 Na-acetate buffer(pH 4.0) 용액 100μl에 2% bovine serum albumin 300μl를 가하고 100μl의 효소용액을 가한 후 500μl의 기질 ρ -nitrophenyl- β -D-galactoside(100mM Na-acetate buffer 1ml 당 2mg을 녹인 것)를 가하여 30°C에서 일정시간 반응시킨 후 200mM의 Na₂CO₃ 2ml로 반응을 정지시켰으며 400nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성도는 생체 g 당 시간당 유리된 ρ -nitrophenol의 mM 농도로 표시하였다.

분자량의 측정은 표준품으로 bovine serum albumin, ribonuclease, ovalbumin 및 chymotrypsinogen 등을 사용하여 동일조건하에서 chromatography를 행하였으며 void volume 측정은 blue dextran 2,000(Sigma 제)을 사용하였다. 이때 검량선은 $\log MW = K_{av}(-1.58) + 5.27$, $r = -0.967$ 이었다.

4. Polygalacturonase(PG)의 추출 및 활성도의 측정

Tucker 등⁸⁾의 방법에 준하여 파피조직 200g을 4°C의 중류수 400ml로 균질화한 후 miracloth(Calbio-chem.)로 여과하고 간사는 1M의 NaCl(pH 6.0) 용액으로 혼탁하여 3시간 동안 추출한 후 여과, 18,000 rpm에서 15분간 냉동원심 분리한 상층액을 조효소로 하였다.

활성도측정은 기질 1% polygalacturonic acid를 녹인 50mM Na-acetate buffer(pH 4.0) 100μl에 효소액 50μl와 dd-H₂O 50μl를 가하여 30°C에서 일정

시간 반응시킨 후 100 mM의 borate buffer(pH 9.0) 용액 1 ml을 가하여 반응을 정지시켰으며, 1% 2-cyanoacetamide 200 μ l를 vortex 상에서 가하여 10분간 끓인 후 276 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 조세포벽의 추출

Selvendran⁹ 및 Jarvis 등¹⁰의 방법에 준하였다. 고추파피 100 g을 200 ml의 20 mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid)-NaOH (pH 6.9) 용액으로 균질화한 후 miracloth로 여과하고 mg/ml의 α -amylase를 함유하는 200 mM HEP ES-NaOH 용액으로 혼탁하여 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 여과하였다. 또 잔사를 chloroform:methanol(1:1, V/V)로 1시간동안 혼탁시킨 뒤 30분간 끓치하여 지용성물질을 제거하고 다시 acetone으로 추출, 여과한 후 P_2O_5 가 들어있는 감압건조기(37°C) 내에서 7일간 두면서 향량을 구한 후 시료로 사용하였다.

6. Hemicellulose의 추출과 분획 및 분자량 측정

Hemicellulose의 추출은 Jarvis 등¹⁰과 Jarvis¹¹의 방법에 준하여 50 mM CDTA (trans-1,2-diaminocyclohexane-N, N, N', N'-tetraacetic acid)를 함유하는 Na-acetate buffer(pH 6.5) 용액으로 25°C에서 6시간 동안 추출하여 제거한 뒤 다시 2 mM CDTA를 함유하는 50 mM Na_2CO_3 (pH 6.5) 용액으로 4°C에서 20시간, 25°C에서 1시간동안 순차적으로 추출, 제거하였다. 다음에 잔사를 0.1 M $NaBH_4$ 를 함유하는 4 N KOH 용액으로 25°C에서 1시간동안 추출한 액을 냉암소에서 72시간동안 증류수로 투석하여 동결건조시킨것을 hemicellulose로 하였다. 투석중 증류수는 3회 교환하였으며 투석막은 분자량 6000~8000을 제거시키는 membrane tube를 사용하였다.

Sephacyrl S-500 column(2.8×42 cm; bed volume 260 ml)에 의한 hemicellulose의 분획은 시료 10mg을 5 mM EDTA를 함유하는 50 mM MES buffer(pH 6.5) 1 ml에 녹여 loading 한 후 동일 buffer로서 0.7 ml/min의 유속으로 fraction 당 4 ml를 분획하였으며 함량은 Anthrone법¹²으로 측정, galactose의 검량선에 의하여 산출하였다.

분자량의 변화를 알기 위한 표준품으로 blue dextran 2,000과 평균 분자량 10^5 및 10^4 의 dextran 및 glucose를 사용하였다.

7. Cellulose 함량의 측정

Updegraff¹³의 방법에 따라 조세포벽 10 mg을 2N TFA(trifluoro acetic acid) 용액을 가하여 121°C에서 1시간동안 autoclave하여 가수분해시킨 후 여과하고 불용성의 잔사를 모아 78% H_2SO_4 으로 다시 분해하여 Anthrone법¹²으로 측정, glucose의 검량선에 의하여 그 함량을 산출하였다.

8. Uronic acid 함량의 측정

Ahmed와 Labavitch¹⁴의 방법에 준하여 조세포벽 10 mg에 C-H₂SO₄을 vortex 상에서 가하여 분해시킨 뒤 carbazole 시약¹⁵으로 반응시켜 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 함량측정은 표준품 galacturonic acid의 검량선(μ g/0.5 ml=OD×84. 1-1.84, $r=0.997$)에 의하여 산출하였다.

9. 세포벽구성 비설유성 종성당(noncellulosic neutral sugar)의 함량측정

Jones와 Albersheim¹⁶의 방법에 준하여 세포벽 10 mg에 내부표준물질로서 0.5 mg/ml의 myo-inositol을 함유하는 2 N TFA 용액을 가하여 121°C에서 1시간동안 autoclave하고 50°C에서 N_2 gas 기류하에서 전조시킨 후 30 mg의 hydroxylamine-HCl을 함유하는 0.5 ml의 pyridine 용액을 가하여 100°C에서 30분간 가열한 후 냉각하였다. 여기에 0.5 ml의 acetic anhydride를 가하여 100°C에서 20분간 반응, aldononitrile acetate 유도체¹⁷로 하여 gas chromatography(GC)를 행하였다. GC 용 column은 200 mesh의 gas chrom Q를 처리한 3% HIEFF 3 BP를 사용하였으며 210°C에서 234°C까지 상승시켰다.

III. 결과 및 고찰

1. 고추의 성숙증 세포벽성분의 함량변화

1) 과실의 중량과 조세포벽 함량의 변화

고추의 성숙단계별에 따른 과실의 중량과 조세포벽의 함량변화를 측정한 결과는 Table 1과 같다.

과실의 중량은 개화후 48일째의 적변개시기(turning stage)까지 계속 증가하였으나 그 이후부터는 과실이 점차 적색으로 변화되면서 중량이 감소되었다. 또 과실이 적색으로 변하기 시작하면서부터 연화가 이루어지기 시작하였다. 그러나 고추의 연화는 감이나 토마토에 볼 수 있는 것처럼 심한 상태는 아니였다.

Table 1. Fresh weight and crude cell wall content of hot pepper fruit cell wall at various stages of maturity

	Maturity stage ¹⁾			
	IM	MG	Tu	RR
Fruit weight(g)	6.61	8.60	11.90	9.74
Crude cell wall (g/100g-fw)	3.37	4.62	4.92	5.68

1) Maturity stage abbreviations: IM, immature green; MG, mature green; Tu, turning; RR, red ripe

Lee¹⁸⁾은 고추과실의 중량이 적변개시기에서 가장 높고 완적기에는 오히려 감소하였다고 하였으며, 또한 Lee¹⁹⁾는 고추과실이 적변개시 무렵에 climacteric rise현상을 나타내며 과피가 60% 적변한 무렵에 ethylene의 생성량이 가장 높았다고 하였다. Lacey²⁰⁾은 토마토과실에서는 climacteric rise가 있는 적변개시기에서 ethylene의 생성이 현저하다고 하였다. 이러한 점으로 미루어 고추는 개화후 48일경인 적변개시기에 이르러 ethylene과 같은 노화촉진 hormone이 생성되고 이로인하여 과실이 연화되는 것으로 추정된다. 한편 조세포벽 함량은 개화후 30일까지는 계속 증가하였으나 적변개시기에서는 완만하였고 그후 완적기(red ripening stage)에서는 다소 증가하는 현상을 나타내었다. Labavitch²¹⁾는 과실이 연화되는 동안 세포벽으로부터 유리된 중성당이 새로운 세포벽 형성에 관여한다고 보고한 점으로 미루어 본 실험에서 과중이 감소하고 연화가 이루어지는 시기에서 조세포벽의 감소현상이 나타나지 않는 것은 이와 관련이 있는 것이라 짐작된다.

2) Uronic acid, cellulose 및 비섬유성중성당의 함량변화

고추가 익는 동안 세포벽구성분의 변화를 조사

하기 위하여 세포벽분해물중 uronic acid, cellulose 및 비섬유성중성당의 함량변화를 측정한 결과는 Table 2, 3과 같다.

Uronic acid는 과실이 익어감에 따라 감소하는 경향을 보이고, 특히 연화가 이루어지는 적변개시기에서 그 함량이 가장 낮았다. 반면에 이시기에서의 cellulose함량은 뚜렷한 변화현상이 관찰되지 않았고 완적기에서 다소 증가함이 관찰되었다. 이같은 현상들을 종합해 볼 때 연화현상은 세포벽을 구성하는 pectin질의 분해에 의하여 이루어 진다는 많은 연구 결과가^{1, 3, 22, 23)}와 일치한다고 하겠으며, 또 Pressey²³⁾는 cellulose가 세포벽 turn over에 관여하지 않는다는 보고와 본 결과로 미루어 고추의 경우도 cellulose의 분해로 인한 물성변화는 없는 것으로 추정되며 오히려 세포벽으로부터 유리된 중성당(Table 3)이 cellulose화(Table 1, 2) 하는것이 아닌가 생각된다.

세포벽을 구성하는 비섬유성중성당(Table 3)은 rhamnose, arabinose, xylose mannose, glucose, galactose의 6종류로 구성되었고 개화후 20일째의 미숙고추에서의 함량분포는 전중성당중 galactose가 45%, arabinose가 19% 이었다. 그리고 전중성당(total NS)은 연화현상이 나타나는 적변개시기에서 49%가 감소하였으며, 구성성분별로 보면 rhamnose xylose, mannose는 큰 변화가 없었으나 arabinose와 glucose는 50%, galactose는 약 80% 감소되었다. 이

Table 2. Uronic acid and cellulose content of hot pepper fruit cell wall at various stages of maturity

	Maturity stage ¹⁾			
	IM	MG	Tu	RR
mg/100mg cell wall				
Uronic Acid	24.7	17.8	13.0	15.1
Cellulose	16.9	14.2	17.3	20.1

1) Stages are described in Table 1

Table 3. Non-cellulosic neutral sugar content of hot peper fruit cell wall at various stages of maturity

Maturity stage ¹⁾	Neutral sugar ²⁾						Total N S
	Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	
mg/100mg cell wall							
IM	0.7	2.0	1.4	0.5	1.1	4.7	10.4
MG	0.6	1.7	1.7	0.5	0.9	4.3	9.7
Tu	0.5	1.0	1.4	0.4	0.8	1.2	5.3
RR	0.5	1.1	1.6	0.4	0.6	1.0	5.2

1) Maturity stages are described in Table 1

2) Sugar abbreviations: NS, non-cellulosic neutral suger; Rha, rhamnose; Ara, arabinose; Xyl, xylose; Man, mannose; Glc, non-cellulosic glucose; Gal, galactose

러한 결과로 미루어 볼 때 고추가 익으면서 세포벽으로부터 pectin질의 분해(Table 2)와 함께 hemicellulose의 분해가 일어남을 짐작 할 수 있다.

3. PG와 β -Galactosidase의 활성 및 β -Galactosidase isozyme의 분리

고추과실이 익으면서 연화되는 동안 pectin질의 분해(Table 2)와 hemicellulose의 분해(Table 3)가 예상됨으로 Table 4에서는 pectin을 분해하는 효소 PG와 galactose의 β -1,4 결합을 분해하는 β -galactosidase의 활성도를 측정해 보았다.

그 결과 PG의 활성이 검출되지 않았는데 이같은 현상은 세포벽구성 uronic acid함량이 익음에 따라 감소한 사실(Table 2)과 상반된다고 하겠다. 한편 PG를 염용액으로 추출하여 20,000 rpm에서 원심분리한 상층액이나 투석처리한 것의 활성은 검출되지 않으나 DEAE-cellulose와 같은 ion교환 chromatography를 행하면 미미한 활성이 보이는 현상(미 발표된 결과임)으로 미루어 PG가 단백질등과 결합한 비활성 형태로 존재할 가능성도 있다고 하겠다.

β -Galactosidase의 활성은 특히 연화현상을 나타내는 적연개시기에서부터 현저히 높은 활성을 나타내었다. 이러한 현상은 이 시기에서 세포벽구성 galactose의 손실이 현저한 Table 3의 결과와 일치한다.

β -Galactosidase isozyme을 조사하기 위하여 DEAE-cellulose와 Sephadryl S-200을 연결한 column chromatography를 행한 결과는 Fig. 1, 2에서와 같다.

Table 4. Polygalacturonase and β -galactosidase activities in hot pepper fruit at various stages of maturity

	Maturity stage ¹⁾			
	IM	MG	TU	RR
	<i>m</i> Mol/hr/g-fw			
Polygalacturonase	ND ²⁾	ND	ND	ND
β -Galactosidase	1.2	4.3	14.8	62.4

1) Maturity stages are described in Table 1

2) ND, none detected

Table 5. Apparent molecular weight of β -galactosidase isozymes from mature green hot pepper fruit

	Isozyme				
	I	II	III	IVa	IVb
Molecular weight	62,000	ND ¹⁾	87,000	40,000	

1) ND, none detected

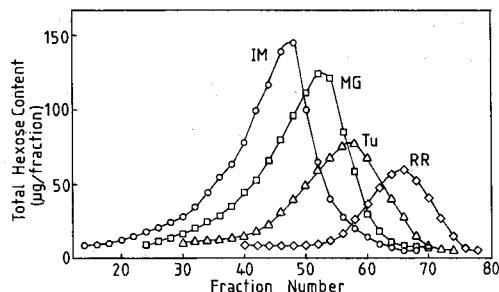


Fig. 1. Separation of β -galactosidase isozymes in mature green hot pepper fruit using DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

Chromatography conditions are described in "Materials and Methods". One isozyme(I) eluted during loading of crude extract.

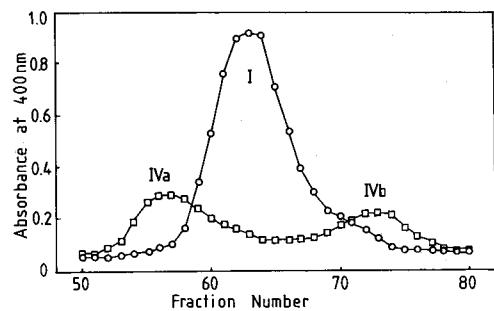


Fig. 2. Chromatography of peak I and peak IV from ion exchange chromatography (Fig. 1) using Sephadryl S-200. The flow rate was 0.35 ml/min and fraction volume was 2.4 ml. The void volume was 101 ml and was determined using blue dextran 2,000.

β -Galactosidase isozyme은 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 분리된 II, III 및 IV와 조효소액의 loading시에 용출된 I의 4개가 분리되었다. 또 이를 농축하여 Sephadryl S-200으로 재분획한 결과 I은 하나의 효소로 구성되어 있었으나 IV는 IVa와 IVb로 분리되었다. II와 III은 효소의 양이 적음으로 인해 나타나지 않았다. 따라서 β -galactosidase는 3~5개의 isozyme으로 구성되어 있음을 알 수 있다 각 isozyme의 개략적인 분자량은 I이 약 62,000, IVa가 약 87,000, IVb가 약 40,000이었다(Table 5).

Pressey²⁾는 토마토 β -galactosidase isozyme은 I, II 및 III의 3개로 구성된다고 하였으며, 그 분자량은 각각 144,000, 62,000 및 71,000으로 isozyme I

은 Ⅱ의 배당체로서 과실이 성숙되는 동안 분리되어 작용할 것으로 추정한 바 본결과에서도 IVa는 IVb의 배당체 일 것으로 추정되나 토마토 β -galactosidase 와는 분자량에서 차이가 있었다. 그리고 성숙도에 따른 isozyme별 활성변화는 정확한 결과를 얻지 못하였으나 토마토에서의 연구결과²⁾를 보아 앞으로 흥미있는 결과가 예상된다.

4. 성숙 및 연화에 따른 hemicellulose의 변화

고추과실이 익는 동안에 세포벽을 구성하는 당류 중에서 galactose의 손실이 현저하였으므로 이와 관련이 있다고 생각되는 hemicellulose의 변화양상을 알아보기 위하여 조세포벽으로부터 얻은 hemicellulose 와 blue dextran 2,000 과 평균분자량 10^5 , 10^4 및 glucose를 각각 Sephadryl S-500으로 gel filtration한 결과는 Fig. 3과 같다.

그 결과 Huber²⁴⁾가 토마토 연화중에 관찰한 바와 같은 hemicellulose의 저분자화 현상이 나타났으며, 그 함량도 현저하게 감소되었다.

이상의 연구결과에서, 고추과실이 익는 동안에 pectin 질의 분해와 hemicellulose의 저분자화, 또 이로 부터 일어나는 벽성분중 galactose의 손실등의 현상과 hemicellulose가 pectin질과 cellulose를 가교하고 있다는 사실²¹⁾등으로 미루어 볼 때 과실의 연화는 pectin질의 분해와 동시에 내지는 이에앞서 hemicellulose의 분해가 일어남에 기인된 것으로 판단된다.

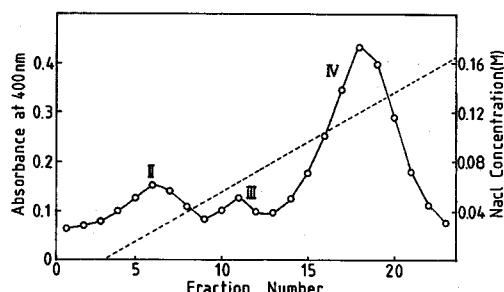


Fig. 3. Sephadryl S-500 column chromatography of the hemicellulosic fraction extracted from hot pepper cell wall material. Total hexose was determined using anthrone.

Arrows at the top of the figure represent the elution positions of: Blue dextran 2,000; dextrans of average molecular weight of 10^5 and 10^4 ; and glucose.

IV. 결 론

고추과실이 성숙 연화되는 동안 세포벽다당류와 이에 관여하는 효소의 활성을 조사해 본 결과를 요약하면 다음과 같다.

세포벽다당류중 uronic acid는 미숙기와 적변개시기 사이에서 크게 감소하다가 완적기에서 다소 증가하였다. 반면에 cellulose 함량은 과실이 익는 동안에 큰 변화가 없었다. 비설휴성 중성당의 함량은 적변 개시기에서 50% 감소되었으며 그중 galactose 함량은 약 80%가 감소되었다.

PG 및 β -galactosidase 활성과 hemicellulose의 변화를 gel filtration chromatography 하여 조사해 본 결과 PG는 활성이 나타나지 않았으나 β -galactosidase는 비교적 활성이 높으며 분자량이 서로 다른 5개의 isozyme으로 구성되었다.

Hemicellulose는 고추과실이 익는 동안에 함량이 감소되었으며 분자량은 고분자에서 저분자로 이동하였다. 따라서 고추과실의 연화와 관련된 세포벽 변화는 벽결합 uronic acid의 분해에 앞서 hemicellulose 가 먼저 분해되는 것 같으며 유리된 세포벽 galactose 가 새로운 세포벽의 합성에 관여하는 것으로 추정되었다.

참 고 문 헌

1. Hobson, G. E.: *Biochem. J.*, 92, 324(1964)
2. Pressey, R.: *Plant Physiol.*, 71, 132(1983)
3. Knee, M.: *Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci.*, 238, 341(1974)
4. Pressey, R., Hiton, D. M. and Avants, J. K.: *J. Food Sci.*, 36, 1070(1971)
5. Gross, K. C. and Wallner, S. J.: *Plant Physiol.*, 63, 117(1979)
6. Wallner, S. J. and Bloom, H. L.: *Plant Physiol.*, 60, 207(1977)
7. Knee, M.: *Phytochemistry*, 12, 1543(1973)
8. Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D.: *Eur. J. Biochem.*, 112, 119(1980)
9. Selbendran, R. R.: *Phytochemistry*, 14, 1011 (1975)
10. Jarvis, M. C., Hall, M. A., Threlfall, D. R. and Friend, J.: *Planta*, 152, 93(1981)
11. Jarvis, M. C.: *Planta*, 154, 344(1982)
12. Spiro, R. G.: *Analysis of sugars found in glyco-*

- proteins. In "Methods in Enzymology" (Neufeld, E. F. and Ginsburg, V. eds), Academic Press, New York, 8, 4(1966)
13. Updegraff, D. M.: *Anal. Biochem.*, 32, 420 (1969)
 14. Ahmed, A. and Labavitch, J. M.: *J. Fd. Biochem.*, 1, 361(1977)
 15. Bitter, T. and Muir, H. M.: *Anal. Biochem.*, 4, 330(1962)
 16. Jones, T. M. and Albersheim, P.: *Plant Physiol.*, 49, 926(1972)
 17. Lehrfeld, J.: *Anal. Biochem.*, 115, 410(1981)
 18. Lee, S. W., Lee, K. R., Cho, S. Y., Kim, K. S., Lee, K. J. and Kim, K. H.: *Res. Bull. Yeung Nam Univ.*, 5(3), 333(1971)
 19. Lee, S. W.: *J. Kor. Sci. Hort.*, 9, 13(1971)
 20. Lackey, G. D., Gross, K. C. and Wallner, S. J.: *Plant Physiol.*, 66, 522(1980)
 21. Labavitch J. M.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 385(1981)
 22. Pilnik, W. and Voragen, A. J. G.: *Pectic substances and other uronides*. In "The Biochem. of Fruits and Their Products" (Hulme, A. C. ed), Academic Press, London, 1, 53(1970)
 23. Pressey, R.: *Enzymes involved in fruit softening* In "Enzymes in Food and Beverage Processing" (Ory, R. L. and St. Angelo, A. J. eds), Washington DC: Am. Chem. Soc., 172(1977)
 24. Huber, D. J.: *J. Amer. Soc., Hort. Sci.*, 108 (3), 405(1983)