

배추 Polygalacturonase의 열안정성

정태규 · 문태화 · 박관화*

서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과, *농업생물신소재연구센터

Thermostability of Polygalacturonase from Chinese Cabbage

Tae Kyou Cheong, Tae Wha Moon and Kwan Hwa Park*

Department of Food Science & Technology and
Research Center for New Bio-Materials in Agriculture
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract

Polygalacturonase(PG) was extracted from Chinese cabbage and partially purified by ammonium sulfate fractionation and ion-exchange chromatography. Three fractions, D-PG, C-1 PG, and C-2 PG, were separated by CM-Sephadex C-25 column chromatography and FPLC Mono Q HR 5/5 or Mono S HR 5/5 column and their physicochemical characteristics were investigated. All three fractions had optimum pH and temperature of 4.5 and 65°C, and were stable in the range of pH 4.5~8.0. These fractions were inhibited by 0.8 mM CaCl₂ or 0.6 M NaCl. In the thermal inactivation of PG isozymes at 65~80°C, z-values were 8.4~9.3°C and D-values at 80°C were in the range of 120~126 s. Thermodynamic constants were calculated from thermal inactivation data of the isozymes and were applicable to estimation of thermal process time of retort pouched Kimchi.

Key words: Polygalacturonase, thermal inactivation, prevention of tissue softening.

서 론

식물 세포벽의 구성 성분인 pectin은 불용성인 protopectin으로 존재하여 서로 엉켜있거나 세포벽의 다른 다당류와 복합체를 이루어 존재하는데 polygalacturonase (PG)의 작용에 의해 polygalacturonide chain의 depolymerization이 일어나 protopectin이 용해될 수 있는 구조로 전환된다⁽¹⁻⁴⁾. Pectin 물질 분해효소에는 pectinesterase(PE)와 polygalacturonase가 있는데 PG는 pectin 사슬의 glycosidic linkage를 공격하여 pectin 물질을 분해하며 PE는 galacturonic acid의 C₆ 위치에 존재하는 methoxyl기를 떼어 내어 유리카르복실기를 만든다^(5, 7). 이들 유리카르복실기를 가진 pectin 사슬에 Ca²⁺ 이온 등 2가 양이온이 작용하여 cross-linkage가 형성되면 PG에 의한 pectin 물질의 분해가 방지된다. 김치제조 후 장기저장시 PG 작용에 의한 조직의 연화가 일어나며 따라서 배추를 저장할 때 일어나는 조직의 변화 연구에는 배추에 존재하는 PG의 효소적 특성에 관한 연구가 요청된다. PG에 관한 연구로서 Yuan 등⁽⁸⁾은 살구에 생육하는 *Rhizopus arrhizus*로부터 PG를 분리하여 효소특성

을 조사하였고, Simon 등⁽⁹⁾은 *Sclerotinia fructigena*로부터 내열성이 강한 polygalacturonase isozyme을 분리하고 오염된 균이 과일 통조림에 혼입되면 효소의 잔존역가가 문제가 될 수 있다 하였다. 박 등⁽¹⁰⁾은 *Aspergillus niger*가 분비하는 endo-polygalacturonase를 분리하고 열불활성화 실험을 하였다. Harvey 등⁽¹¹⁾은 papaya로부터 endo-, exo-PG를, Arakji 등⁽¹²⁾은 cranberry에 존재하는 내열성 PG를, Pressey 등⁽¹³⁾은 오이로부터 PG를 분리하여 각 효소의 특성을 조사, 보고하였다. 한편 윤⁽¹⁴⁾과 하⁽¹⁵⁾는 김치 산패현상의 원인이 배추 조직내에 존재하는 PG의 작용에 의해 pectin질이 분해되기 때문이며, 또한 PG의 활성은 산막미생물이 증식하는 김치 발효 후기에 증가한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 배추에 존재하는 PG를 황산암모늄 분획과 이온교환컬럼 크로마토그래피를 이용하여 부분 정제하여 효소의 작용 최적온도, 최적 pH, 염에 의한 영향 및 내열성 등의 효소특성을 알아보고 retort pouch 김치의 살균공정에서 PG역가의 잔존 가능성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

재료

배추 및 부재료는 슈퍼마켓에서 시판되는 품질이 우수한 것을 사용하였으며, polygalacturonic acid는 Sigma

Corresponding author: Kwan Hwa Park, Department of Food Science & Technology and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

제품을 구입하여 사용하였다.

배추 polygalacturonase의 역가측정

Polygalacturonic acid를 기질로 사용하여 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson 방법⁽¹⁶⁾으로 측정하였다.

0.1 M NaCl을 함유한 0.2 M Tris-acetic acid buffer (pH 6.5)에 녹인 0.45% polygalacturonic acid 용액 5 ml를 시험관에 넣고 50°C 에서 5분간 예열시킨 후 효소용액 1 ml를 가하여 4시간 동안 반응시켰다. 2 N HCl 용액 0.9 ml를 가하여 반응을 중지시키고 2,500×g에서 8분 동안 원심분리하였다. 상층액 0.5 ml에 증류수 0.5 ml 및 0.1 N NaOH 1 ml를 시험관에 넣고 copper reagent 1 ml를 가하여 20분간 끓인 후 상온으로 식힌 다음 arsenomolybdate color reagent 1 ml를 가하고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 2 N HCl 용액 0.9 ml를 가하여 반응을 중지시킨 후 효소용액을 넣은 다음 같은 방법으로 진행하였다. α-D-galacturonic acid를 사용하여 표준곡선을 작성하였고, 효소 역가는 시간당 1.0×10⁻⁵ mol의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry⁽¹⁷⁾ 및 spectrophotometry⁽¹⁸⁾ 방법을 이용하였다.

배추 polygalacturonase의 분리 및 정제

황산암모늄 분획 : 정선된 배추 3.0 kg을 1×1 cm 크기로 절단하고 1 M NaCl 용액을 1 : 1(w/v) 비율로 가한 후 Waring blender로 1분간 마쇄하였다. 0.5 N NaOH로 pH를 6.0으로 조정하고 4°C 에서 24시간 방치한 다음 cheese cloth로 걸러 효소를 추출하였다. 추출용액에 고체 황산암모늄을 포화농도 35%까지 녹여 4°C 에서 16시간 방치한 후 4,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액에 황산암모늄을 포화농도 75%까지 녹여 4°C 에서 16시간 방치한 다음 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 회수하고 20 mM sodium acetate-acetic acid buffer(pH 5.5) 에 녹인 후 동일한 buffer로 투석하였다.

Ion exchange column chromatography : 조효소용액을 ultrafiltration으로 농축하여 20 mM sodium acetate-acetic acid buffer(pH 5.5)로 평형된 CM-Sephadex C-25 column(3.0×70 cm)에 loading하였다. 0.8 M NaCl이 포함된 동일 buffer를 이용하여 gradient를 형성시켰으며 유속은 30 ml/hr로 하였으며 전과정은 4°C 에서 행하였다.

FPLC : CM-Sephadex C-25 column에 흡착되지 않고 용출된 효소용액을 농축하여 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 평형된 Mono Q HR 5/5(FPLC, Pharmacia LKB) column에 200 μl loading한 다음 0.5 M NaCl이 포함된 동일 buffer로 gradient를 걸어 주었으며 유속은 1.0 ml/min로 하였다. CM-Sephadex C-25 column에 흡착된 후 용출된 효소용액은 20 mM sodium acetate-acetic acid buffer(pH 5.5)로 투석한 뒤 농축하여 동일 buffer로 평형된 Mono S HR 5/5(FPLC, Pharmacia LKB) column에 loading하여 전과 동일한 조건에서 정제하였다.

tic acid buffer(pH 5.5)로 투석한 뒤 농축하여 동일 buffer로 평형된 Mono S HR 5/5(FPLC, Pharmacia LKB) column에 loading하여 전과 동일한 조건에서 정제하였다.

배추 polygalacturonase의 열불활성화

배추 polygalacturonase의 열처리에는 flask method⁽¹⁹⁾로 하였다. 시험관에 4 ml의 20 mM sodium acetate-acetic acid buffer(pH 5.5)를 넣고 항온수조에 방치한 다음 열처리하고자 하는 온도까지 도달하게 한 후 자석교반기로 격렬히 교반하면서 효소용액 1 ml를 가하고 일정시간 후 피펫으로 1 ml씩 취하여 미리 얼음으로 냉각시켜 놓은 시험관으로 옮긴 다음 효소역가를 측정하여 열처리 후의 잔존 역가를 계산하였다.

열처리 후 잔존 polygalacturonase 역가 및 미생물수의 계산

살균시간별 효소 잔존역가는 다음 식 (1)을 이용하였다. 이때 미생물의 살균 정도는 *Lactobacillus plantarum* K-10균의 열화학적인 자료⁽²⁰⁾를 참고로 하여 식 (2)를 이용하였으며 시간에 따른 retort pouch 김치 내부온도와 D-value를 이용한 프로그램을 사용하여 personal computer로 적분하였다.

$$\text{Log} \frac{A}{A_0} = \int_0^t \frac{dt}{D(t)} \tag{1}$$

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = \int_0^t \frac{dt}{D(t)} \tag{2}$$

여기서 A₀=PG activity at time 0, A=PG activity at time t, N₀=number of microorganisms at time 0, N =number of microorganisms at time t.

Retort pouch 김치의 제조

정선된 배추를 4등분하여 세척한 후 40°C 의 20 mM CaCl₂ 용액에서 2시간 동안 예비열처리를 하였다. 물로 세척한 후 3×3 cm로 절단하여 8% 염용액에 15시간 동안 염지한 뒤 세척하고 양념을 가하여 김치를 제조하였다. 4°C 에서 숙성시켜 산도가 0.45% 되었을 때 retort pouch 용기에 500 g씩 넣고 진공 밀봉하여 살균하였다. Retort pouch 용기(17.5×25 cm)의 중심부위에 온도센서를 부착시키고 김치 500 g을 넣은 후 92°C 항온수조에 넣어 시간별로 중심온도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Polygalacturonase의 정제

CM-Sephadex C-25 column chromatography : 단백질이 검출된 분획 중 효소역가가 있는 단백질 peak 2개를 검출하였으며 흡착되지 않고 용출된 것을 분획

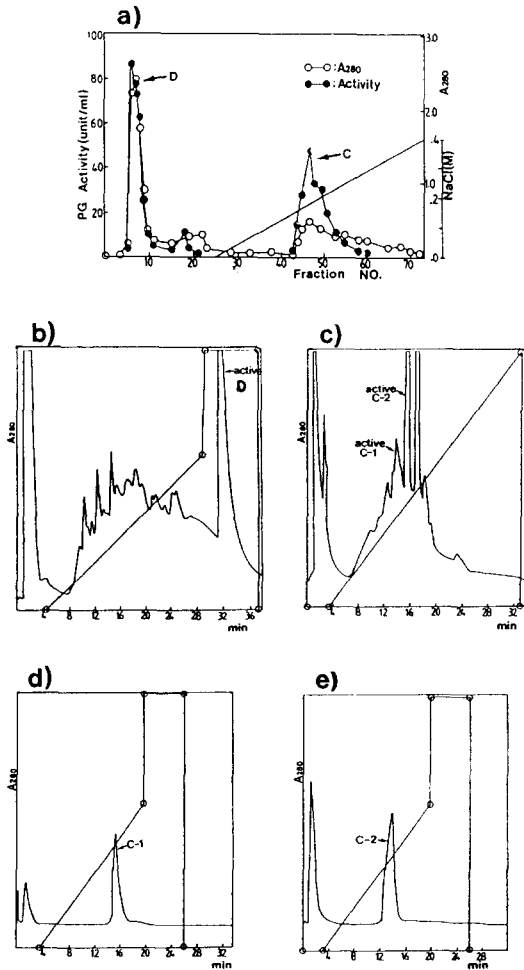


Fig. 1. (a) CM-Sephadex C-25 chromatogram of polygalacturonase from Chinese cabbage, (b) Mono Q FPLC of fraction D from CM-Sephadex C-25 chromatogram, (c) Mono S FPLC of fraction C from CM-Sephadex C-25 chromatogram, (d) Rechromatogram of fraction C-1 on Mono S FPLC, (e) Rechromatogram of fraction C-2 on Mono S FPLC

D, 흡착된 후 염에 의해 용출된 것을 분획 C라 하여 Fig. 1(a)에 나타내었다.

Mono Q HR 5/5 column chromatography : 분획 D 효소용액을 농축하여 Mono Q HR 5/5 column을 이용하여 크로마토그래피를 실시한 결과 Fig. 1(b)에서와 같이 단백질 peak 중 효소역가가 검출된 하나의 peak를 얻었으며 이를 D-PG라 하였다.

Mono S HR 5/5 column chromatography : 분획 C 효소용액을 농축하여 Mono S HR 5/5 column을 이용하여 크로마토그래피를 실시한 결과 Fig. 1(c)에서와 같이 단백질 peak 중 효소역가가 검출된 2개의 peak를 얻을 수 있었으며 각각 분획 C-1, 분획 C-2라 하였다. 분획 C-1과 분획 C-2를 동일 조건에서 크로마토그래피를 실시하여 각각 C-1 PG, C-2 PG라 하였다(Fig. 1(d) 및 (e)).

이상의 각 정제단계에서의 단백질 회수율과 정제배수는 Table 1에 표시하였다.

배추 polygalacturonase의 효소학적 특성

배추 polygalacturonase의 작용에 미치는 pH 및 온도의 영향 : 0.1 M Na acetate-acetic acid buffer(pH 4.5~5.2)와 0.1 M Tris-acetic acid buffer (pH 5.5~8.0)에서 효소작용 속도를 측정된 결과 pH 5.2에서 가장 높은 역가를 나타내었다. 온도에 따른 효소역가는 65°C에서 가장 높은 역가를 나타내었다(Fig. 2(a) 및 (b)). Papaya⁽¹¹⁾ 및 무우⁽²¹⁾의 polygalacturonase는 45°C, 오이의 polygalacturonase⁽²²⁾는 40°C에서 최적온도를 보이는 것으로 보고되고 있다. 이로 미루어 보아 배추 PG는 높은 온도에서 작용하는 것으로 보인다. 그러나 박테리아 및 곰팡이가 분비하는 PG는 높은 작용 최적온도를 보이고 있다. *S. fructigena*⁽⁸⁾ PG는 90°C, *Aspergillus niger*⁽²³⁾ PG는 55°C, *Bacillus subtilis*⁽²⁴⁾ PG는 45~60°C에서 각각 최적온도를 보이는 것으로 보고되고 있다.

pH 안정성 : 0.1 M sodium acetate-acetic acid buffer (pH 3.0~6.0), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0~9.0), 0.1 M NaHCO₃-NaOH buffer(pH 10), 0.1 M Na₂HPO₄-NaOH buffer(pH 11.0~12.0)를 이용하여 buffer 용액 3 ml에 효소용액 1 ml을 넣고 4°C에서 24시간 방치한 뒤 효소

Table 1. Purification of Chinese cabbage polygalacturonase

Procedure	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	3,800	16,910	4,217	4.0	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 35~75%	140	8,925	254	35.1	52.8	8.8
CM-Sephadex D	80	2,093	56	77.3	12.4	19.3
C-25 C	120	1,475	32	64.2	8.7	16.0
Mono Q of D-PG	26	967	24	87.1	5.7	21.7
Mono S C-1	18	737	9	80.5	4.4	20.1
C-2	20	710	8	93.9	4.2	23.4
Re-Mono S C-1	24	548	6	89.0	4.1	22.2
C-2	20	646	6	103.8	3.8	25.9

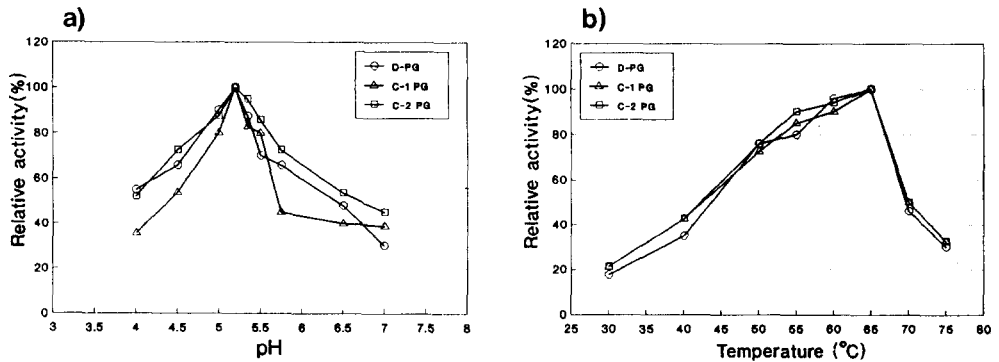


Fig. 2. Effect of pH and temperature on polygalacturonase activity

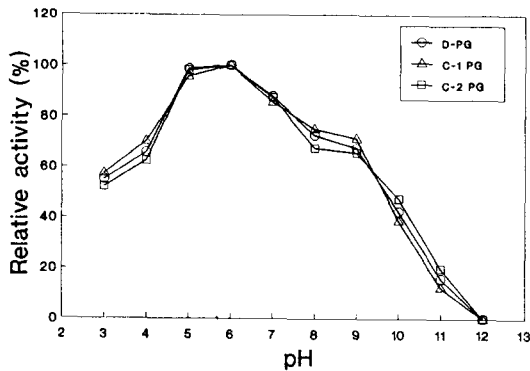


Fig. 3. pH stability of polygalacturonase

역가를 측정하였다. pH 4.5~8.0 범위에서 최대 역가의 70% 이상이 보존되어 이 범위의 pH에서 PG가 안정함을 알 수 있었다(Fig. 3).

염의 영향: NaCl 농도를 달리하여 NaCl이 효소의 작용에 미치는 영향을 조사한 결과 세 분획 모두 NaCl이 존재하지 않을 때는 아주 낮은 역가를 보이다가 0.05 M에서 현저히 높은 역가를 보였으며 0.3 M NaCl 농도에서 가장 높은 역가를 나타내었다(Fig. 4(a)). 따라서 NaCl은 polygalacturonase에 activator로 작용함을 알 수 있었다. 그러나 0.6 M NaCl 이상에서는 역가가 현저히 감소되어 저해작용을 보였다. 배추의 pectinesterase⁽²⁵⁾는 0.25 M NaCl 농도에서 높은 작용을 보이고 있다. 한편 오이의 polygalacturonase⁽²²⁾는 0.1 M NaCl에서 최적작용을 보이다가 0.2 M NaCl에서 완전히 저해되었다.

CaCl₂의 농도를 달리하였을 때 효소의 반응속도는 세 분획 모두 0.3 mM CaCl₂ 농도에서 가장 높은 역가를 나타내었으나, Ca²⁺ 농도 0~0.5 mM 범위내에서는 효소작용에 크게 영향을 미치지 않는다고(Fig. 4(b)). 배추의 pectinesterase⁽²⁵⁾는 20 mM CaCl₂ 농도에서 높은 작용을 보이나 100 mM CaCl₂ 농도에서 저해를 받으며, 오이의 polygalacturonase⁽²²⁾는 0.4 mM CaCl₂ 농도에서 최적작용을 보이나 0.5 mM에서 저해작용이 시작되었다.

배추 PG에 대해 NaCl은 0.6 M 이상에서 효소작용을 크게 저해함에 비하여 CaCl₂는 훨씬 낮은 농도인 0.8 mM 이상에서 효소작용을 저해함을 알 수 있었다.

배추 polygalacturonase의 열불활성화

3개의 배추 polygalacturonase isozyme은 65~80°C 범위내에서 대체로 유사한 열불활성화 곡선을 보이며 (Fig. 5) 모두 1차반응을 따르고 있다. 곡선으로부터 계산된 D값 및 z값은 Table 2에 표시하였다. 80°C에서 D-PG가 C-1, C-2 PG보다 내열성이 약간 높았으며, z값은 D-PG가 9.3°C 이고 C-1 PG는 8.8°C, C-2 PG는 8.4°C였다. *S. fructigena* PG의 열불활성화 곡선⁽⁹⁾은 역시 1차반응을 따랐고 90°C에서 1시간 열처리 했을 때 50%의 잔존역가를 보였다. *Aspergillus niger* PG⁽¹⁰⁾는 40°C에서 D값(D₄₀)이 240초, z값은 7.5°C였다. 이로 미루어 보아 배추 PG는 식물체 중에는 매우 높은 내열성을 보이고 있다고 생각되며 따라서 배추를 원료로한 김치 통조림, retort pouch 김치 살균공정에서 이 효소의 잔류역가를 고려해야 할 것으로 생각된다.

Retort pouch 김치의 열처리 후 살균치와 잔존 polygalacturonase 역가

3개의 배추 PG isozyme의 평균 D₉₂값 4.14초, z값 8.8°C와 retort pouch 김치의 92°C에서의 열처리 시간에 대한 중심온도 자료를 이용하여 계산된 잔존 PG 역가를 적분하여 Fig. 6에 나타내었으며 26분 열처리하였을 때 PG 역가는 초기 역가의 1.0%로 감소하였다. 이때 김치 숙성에 관여하는 주요 젖산균인 *Lactobacillus plantarum* K-10 균주의 수는 초기균수의 10⁻¹³⁶배로 감소하였다. 그러나 실제로 김치 통조림을 살균할 때에는 *Lactobacillus plantarum*의 균수가 초기균수의 10⁻⁵~10⁻¹⁰배 감소하도록 살균하므로 PG의 역가는 잔존하게 된다. 그러나 김치의 NaCl 농도가 3~5% 정도되므로 NaCl에 의한 효소의 저해작용이 있어 저장시에는 효소의 작용이 거의 없는 것으로 보인다. 다만 김치의 염농도를 더욱 낮추게 되는 경우에는 PG의 작용이 계속될 수 있으므로

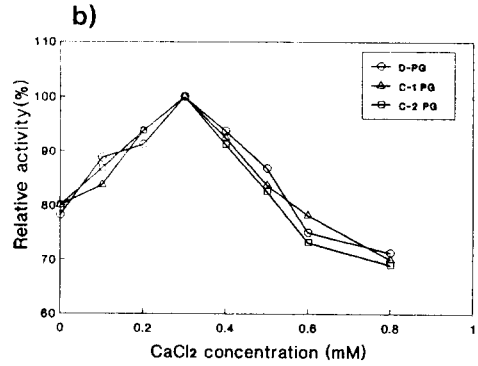
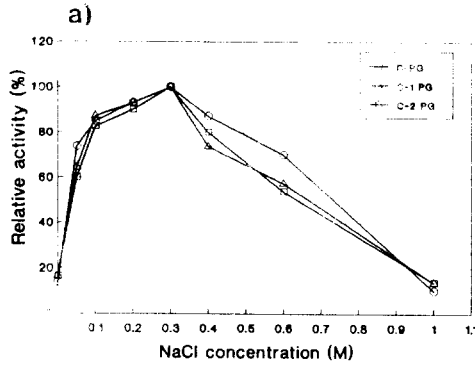


Fig. 4. Effect of salt on polygalacturonase activity

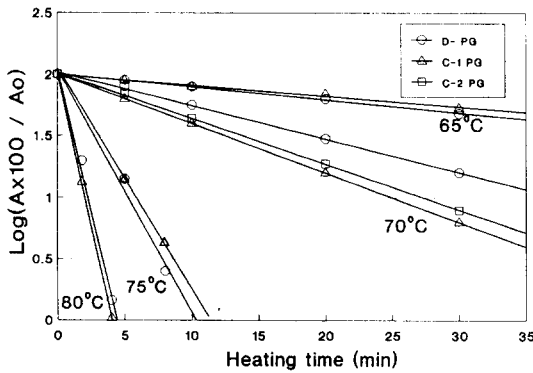


Fig. 5. Thermal inactivation of polygalacturonase

Table 2. D-values and z-values for heat inactivation of Chinese cabbage polygalacturonase

	Temp.(°C)	D-PG	C-1 PG	C-2 PG
D-value (s)	65	5,012	5,622	5,622
	70	2,190	1,512	1,620
	75	348	366	348
	80	126	108	102
z-value (°C)		9.3	8.8	8.4

김치 살균공정에 효소의 열불활성화를 고려해야 할 것으로 생각된다.

요 약

김치 조직의 연화에 관여하는 효소인 polygalacturonase(PG)를 배추에서 추출하여 황산암모늄 분획, 이온교환크로마토그래피 및 FPLC를 이용하여 D-PG, C-1, C-2 PG 세 분획으로 분리 정제하여 특성을 조사하였다. 분리된 세 분획의 활성 최적 온도는 65°C, 최적 pH가 5.2였으며 pH 4.5~8.0 범위에서 안정하였다. NaCl에 의한 영향은 0.3 M NaCl에서 최대의 활성을 보였으나 0.6

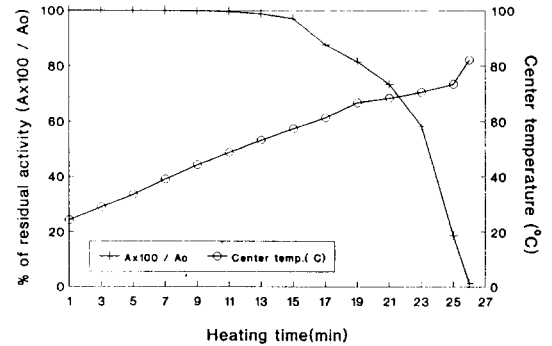


Fig. 6. Estimated residual polygalacturonase activity after heat treatment of retort pouched Kimchi. A₀=PG activity at heating time 0, A=PG activity at heating time t

M 이상에서는 저해를 받았으며 CaCl₂의 경우 0~0.5 mM 농도에서는 활성이 크게 영향을 받지 않았으나 0.8 mM에서는 저해를 받았다. 열불활성화 특성은 isozyme간에 큰 차이가 없었으며 1차 반응을 따랐다. 이 효소 isozyme의 z값은 8.4~9.3°C, 80°C에서 D값은 102~126 초였다. 이 효소의 불활성화 값을 이용하여 retort pouch 김치 살균공정에 적용하고 역가의 잔존 가능성에 대하여 고찰하였다.

문 헌

1. Postlmayr, H.L., Luh, B.S. and Leonard, S.J.: Characterization of pectic changes in freestone and clingstone peaches during ripening and processing. *Food Technol.*, 10, 618(1966)
2. Shewfelt, A.L.: Changes and variations in the pectic constitution of ripening peaches as related to product firmness. *J. Food Sci.*, 30, 573(1965)
3. Shewfelt, A.L., Paynter, V.A. and Jen, J.J.: Textural changes and molecular characteristics of pectic constituents in ripening peaches. *J. Food Sci.*, 36, 573(1971)

4. Sterling, C. and Kalb, A.J.: Pectic changes in peach during ripening. *Bot. Gaz.*, 121, 111(1959)
5. Buescher, R.W., Hudson, J.M. and Adams, J.R.: Inhibition of polygalacturonase softening of cucumber pickles by calcium chloride. *J. Food Sci.*, 44, 1786(1979)
6. 백형희 : 예비열처리에 의한 오이지의 연화방지. 서울대학교 석사학위논문(1986)
7. Drake, S.R. and Spayd, S.E.: Influence of calcium treatment on golden delicious apple quality. *J. Food Sci.*, 48, 403(1983)
8. Yuan, K. Liu and Luh, B.S.: Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Rhizopus arrhizus*. *J. Food Sci.*, 43, 721(1978)
9. Simon, A.A. and Anthony, H.F.: Thermostable polygalacturonase secreted by *Sclerotinia fructigena*. *J. Food Sci.*, 40, 423-424(1975)
10. 박경빈, 박관화 : *Aspergillus niger*가 생산하는 endo-polygalacturonase의 분리와 특성. 한국식품과학회지, 16, 41-46(1984)
11. Harvey, T.C. Jr. and Steven, Y.T.T.: Partial separation and characterization of papaya endo- and exo-polygalacturonase. *J. Food Sci.*, 47, 1478(1982)
12. Arakji, O.A. and Yang, H.Y.: Identification and characterization of the pectic enzymes of the Mcfarlin cranberry. *J. Food Sci.*, 34, 340(1969)
13. Pressey, R. and Avants, J.K.: Cucumber polygalacturonase. *J. Food Sci.*, 40, 937(1975)
14. 윤혜정 : 김치에 대한 미생물학적 연구. 이화여자대학교 70주년 기념논문집, 349(1956)
15. 하순섭 : Pectin 분해효소 및 산막미생물의 침체류의 연부에 미치는 영향에 대하여. 과연 휘보, 5(2), 139(1960)
16. Somogyi, M.: Notes in sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23(1952)
17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
18. Whitaker, J.R.: Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker Inc., New York. p.112-113 (1972)
19. 박관화 : 식품공학에 중요한 몇 가지 효소들의 열불활성화. 한국식품과학회지, 9, 175-179(1977)
20. 박관화, 백운화, 이규순, 김영배 : 김치통조림에 관한 연구. 연구보고서, 68(1991)
21. 육철, 장금, 박관화, 안승요 : 예비열처리에 의한 무우김치의 연화방지. 한국식품과학회지, 17, 447-453(1985)
22. 전혜경, 장학길, 박관화, 백형희 : 열처리에 의한 오이지의 연화방지에 관한 연구. 농사시험연구논문집, 28(1), 158-164(1986)
23. Toshio, H., Jai, Y.L., Yusaku, F. and Seinosuke, U.: Purification and properties of endo-polygalacturonase of *Aspergillus niger* cultured in the medium containing Satsuma Mandarin Peel. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 30(11), 610-617(1983)
24. Takuo, S., Kiyoto, I. and Yoshihiko, O.: Purification, crystallization and characterization of a novel protopectinase from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 53(5), 1213-1223(1989)
25. Ko, Young-Hwan: Purification and characterization of Chinese cabbage pectinesterase. 서울대학교 석사학위논문 (1982)

(1993년 8월 27일 접수)