

Aspergillus japonicus에서 추출한 Pectinesterase를 이용한 Low Methoxyl Pectin Gel 및 LMP 사과 Jelly 제조에 관한 연구

최정선* · 오혜숙** · 윤 선*

*연세대학교 식품영양학과, **상지대학교 식품영양학과

The Preparation of Low Methoxyl Pectin Gel and LMP Apple Jelly with Pectinesterase Isolated from Aspergillus Japonicus

Jung Sun Choi*, Oh Hea Sook** and Sun Yoon*

*Dept. Food and Nutrition, Yonsei University

**Dept. Food and Nutrition, Sanggi University

Abstract

Pectinesterase was isolated from the culture medium of *Aspergillus japonicus* and partially purified by DEAE-Sephadex batchwise, Sephadex G-75 gel filtration and ion exchange chromatography. The purified enzyme solution was completely free from polygalacturonase which depolymerizes pectin molecule. The ability of the pectinesterase to demethylate high methoxyl pectin was investigated. On 20 minute of incubation, methoxyl content of low methoxyl pectin decreased from 88% to 6.93%. In general gel prepared with the pectin containing lower methoxyl content showed the lower value of percent sag, and showed the higher gel strength. Textural characteristics of pectin gel determined by Rheometer showed that as the methoxyl content was lowered, hardness and resilience of the gel were increased and cohesiveness was decreased. Apple juice containing HMP and organic acids can be converted into low methoxyl pectin apple jelly by the action of pectinesterase and addition of calcium ion. The strength of low methoxyl pectin apple jelly increased when it stored at room temperature.

I. 서 론

Pectin은 다양한 식품학적 기능을 지니고 있으며 gel을 형성하는 성질이 있어 jam과 jelly를 만드는데 이용되고 있다. 특히 low methoxyl pectin(LMP)은 2가 양이온 존재시 다량의 당 없이도 gel을 형성하므로 저열량 식품에 이용되고 있다. LMP는 high methoxyl pectin(HMP)의 methoxyl기를 가수분해하여 얻을 수 있다. 그 방법으로는 산, 알칼리, 암모니아 등과 같은 화학적 처리와 pectinesterase(PE)와 같은 효소처리가 있다. 효소에 의한 LMP 조제법은 비용이 적게 들고, 작용 시간이 짧고 depolymerization이 일어나지 않고 중화과정이 필요하지 않다는 장점이 있다. PE는 고등 식물과 곰팡이, 박테리아에 존재한다. 곰팡이에서 추출한 PE(MPE)는 pectin의 methoxyl ester group을 무작위로 제거하여 methoxyl기가 고루 분포된 LMP를 형성하며 gel 성상도 우수하다고 한다^{1,2)}.

본 연구에서는 MPE로 조제한 LMP gel 성상에 대

해 연구하였으며, 또한 MPE의 최적 pH가 4.5이므로 이 효소를 직접 과일 주스에 작용시켰을때 과일 자체의 pH를 거의 변화시키지 않고 과일 주스의 풍미, 색, 성분을 그대로 유지하면서 Ca²⁺ 이온과의 염교형성으로 LMP gel을 형성하리라는 것에 착안하여 MPE를 사과 주스에 작용시켜 LMP를 함유한 사과 jelly를 제조하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

효소의 분리, 정제 과정에 사용한 Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-50은 Pharmacia 제품을 사용하였다. LMP 제조와 PE 활성 측정시 기질로 사용한 HMP는 methoxyl 함량이 88%인 Citrus pectin(No.P-9135, Sigma Chemical Co.)이었고 Commercial Low Methoxyl Pectin은 The Copenhagen Genu Citrus Pectin Type LM 101AS이었다. Polygalacturonase의 활성을

측정하기 위해 polygalacturonic acid, sodium salt(No.P. 1879, Sigma Chemical Co.)를 기질로 사용하였다.

2. 효소의 추출 및 정제

MPE의 추출을 위해 Aspergillus japonicus KFCC 11639 균주를 potato dextrose agar(PDA) 한천 배지에 배양한 후 균주를 채취하여 밀기울 배지 위에 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 20 ml의 증류수를 가하여 2-3시간 방치시킨 후 균주 배양액을 모아 교반시키면서 효소를 추출한 후 9000×G에서 10분간 원심 분리시켜 얻은 상층액을 조효소액으로 하였다.

조효소액의 pH를 6.8로 조절한 후 50 mM NaCl을 함유한 50 mM sodium phosphate(pH 6.8)완충액에 수화시킨 DEAE Sephadex A-50을 가한 후 NaCl 농도를 50 mM에서 500 mM까지 stepwise로 증가시키면서 수세하여 활성이 있는 여액만 모았다. Ultrafiltration에 의해 농축한 후 50 mM sodium acetate(pH 5.0) 완충용액에 대해 투석시킨 후 Sephadex G-75 column(3.1×75 cm)에 가하여 1.2 ml/min의 일정한 속도로 4 ml씩 분획하였다. 효소 활성이 있는 분획을 모아 DEAE Sephadex A-50 column(2.5×40 cm)을 이용해 NaCl 농도를 50 mM에서 500 mM까지 stepwise로 증가시키면서 ion exchange chromatography를 실시하였다. 유속은 0.8 ml/min이며 4 ml씩 분획하였다.

3. 단백질 농도 측정

정제 과정에서 단백질 농도는 280 nm에서 흡광도를 측정하였고 효소 정제과정 중 각 단계에서 얻어진 효소 용액의 단백질 농도는 Lowry법으로 정량하였다.

4. 효소의 활성도 측정

(1) Pectinesterase

효소의 활성은 Kertesz의 적정방법⁴⁾을 변형시켜 측정하였다. PE의 역가는 효소용액 1 ml에 대해 1분 동안 1×10^6 mol의 free carboxyl group를 유리시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 나타내었다.

(2) Polygalacturonase

효소의 작용으로 유리되는 환원당의 함량은 DNS법으로 측정하였다.

5. Pectinesterase에 의한 Low Methoxyl Pectin의 조제

LMP 조제는 Ishii²⁾, 오³⁾ 등의 방법을 보완하였다. 2% HMP 용액 2 l을 pH 4.5로 조절한 후 PE용액 4000 units를 첨가하고 1N NaOH를 사용하여 pH를 4.5로 유지시켰다. 효소를 작용시키면서 일정시간 간격으로 20

ml씩 채취하고 100°C에서 가열하여 효소를 불활성시켰다. 여기에 3배되는 양의 95%(V/V) ethanol을 가하면서 침전을 생성시켰다. 침전을 polyester cotton filter cloth에 거르고 acetone으로 탈수 시킨 후 덩어리가 없도록 고루 비벼 잘게 부수고 건조시킨 후 분쇄하여 80 mesh 체에 통과시켰다.

6. Low Methoxyl Pectin의 Methoxyl 함량 측정

Owens⁵⁾의 적정법에 의해 측정하였다.

7. Low Methoxyl Pectin Gel의 특성 측정

(1) LMP gel의 조제

National Research Council⁶⁾에 의한 방법으로 1% pectin, 30% 설탕, 60 mg Ca²⁺/g pectin으로 제조하였다.

(2) LMP Gel의 Percent Sag 측정

Sunkist회사에서 제작한 Exchange Ridgelimeter를 사용하여 gel의 percent sag을 측정하였다.

(3) Rheometer에 의한 Low Methoxyl Pectin Gel의 질감 측정

질감측정은 Rheometer(R-UDJ-DM tyre, I&T Co., LTd, Tokyo)를 사용하여 견고성, 응집성, 탄력성을 측정하였다.

8. 사과 Jelly 제조

(1) 과즙의 제조

이⁷⁾의 방법에 의해 사과 150 g에 물을 120 g의 비율로 가하여 적정 시간 가열한 후 두겹의 cheese cloth로 걸러내어 과즙을 얻었다. 위와 같이 준비한 과즙은 pectin 함량 측정, jelly 제조시 사용하였다.

(2) Pectin 함량 및 Methoxyl 함량 측정

Pectin 함량은 McComb & McCready⁸⁾ 등의 비색법으로 측정하였다. Methoxyl 함량은 Owens⁵⁾의 적정법에 의해 측정하였다.

(3) HMP 사과 Jelly 제조

당도가 65%이고 jelly grade를 150으로 정하였다. 당도 65%가 될때까지(104-105°C) 가열한 후 citric acid를 가해 pH 2.8로 산도를 조절하였다.

(4) LMP 사과 Jelly 제조

사과 주스에 PE 100 units를 30분간 작용시켜 LMP를 함유하고 있는 사과 주스를 만들었다. 사과 주스 100 ml에 citric acid 0.9 ml과 sodium citrate 1.8 ml을 가한 후 설탕 20 g을 잘 섞어 저으면서 끓인다. 끓이다가 CaCl₂ 용액을 서서히 떨어뜨리면서 계속 저어주었다. 총무게가 100 g이 될 때까지 끓인다.

(5) 사과 Jelly의 특성 측정

1) 색조 측정

색조 측정은 측색색차계(Hunter model 1001 np)를 사용하여 명도 L값, 적색도 a값, 황색도 b값을 측정하였다. 표준 백판과 jelly의 L, a, b사이의 차이인 ΔL , Δa , Δb 로부터 얻어진 ΔE 를 감변도로 하였다.

2) Penetrometer를 이용한 Jelly의 견고도 측정

Gel의 견고도를 측정하기 위하여 Penetrometer(일본 유시킴기공업)를 사용하였다.

9. 통계분석

실험결과 SAS(statistical analysis system)를 사용하여 분산분석과 턴컨 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Aspergillus japonicus*에서 Pectinesterase의 추출 및 정제

A. japonicus의 배양액으로부터 PE 추출, 정제하기 위하여 DEAE Sephadex A-50 batchwise, 2회의 Sephadex G-75 gel filtration과 DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography 방법을 사용하였다.

DEAE Sephadex batchwise에서 50 mM sodium phosphate(pH 6.8) 완충 용액의 NaCl 농도 10, 15, 18, 20, 30 mM에서 PE가 용출되었다. 이 PE 용출액에는 pectin 분자의 α -1,4-glycoside 결합을 끊어주는 polygalacturonase (PG)가 상당량 내포되어 있었다. Batchwise 단계에서 얻

은 효소를 Sephadex G-75 column chromatography 2회 실시한 결과 효소의 specific activity는 각각 9.82, 19.89 units/mg이고 정제도는 각각 8.05, 16.3배이었다. 2회의 gel filtration에서는 PE와 PG가 분리되지 않았다. 50 mM sodium phosphate(pH 6.8) 완충용액의 NaCl 농도를 50 mM에서 500 mM까지 stepwise로 증가시키면서 DEAE Sephadex ion exchange chromatography 실시한 결과 PE를 분리할 수 있었다. PE는 Fig. 1에서와 같이 NaCl 농도가 18, 20, 30 mM에서 용출되었다. PG는 NaCl 농도가 10, 40 mM에서 2개의 효소활성 상승 곡선을 나타냈다. 이것으로 보아 PG는 적어도 2개의 isoenzyme을 갖고 있음을 알 수 있었다. DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography한 결과 PG가 제거된 PE 효소용액을 얻을 수 있었다. 이때의 효소의 활성은 200 units/ml, 단백질 농도 1.75 mg/ml, specific activity 114.29 units/mg, 정제도는 93.68배 이었다. 이를 모아 LMP 조제에 이용하였다.

2. Low Methoxyl Pectin의 Methoxyl 함량

HMP 용액에 MPE를 일정 시간 작용시켜 조제된 LMP의 효소작용 시간에 따른 pectin의 methoxyl 함량 변화를 측정하였다. HMP 용액에 효소를 4000 units 작용시킨 결과, Table 1에서와 같이 시간경과에 따라 methoxyl 함량이 감소하여 20분 후에는 methoxyl 함량이 6.93%, DE값이 42.50인 LMP를 생성하였다. 시간에 따른 DE의 감소는 유의적인 차이를 나타냈다($P < 0.01$).

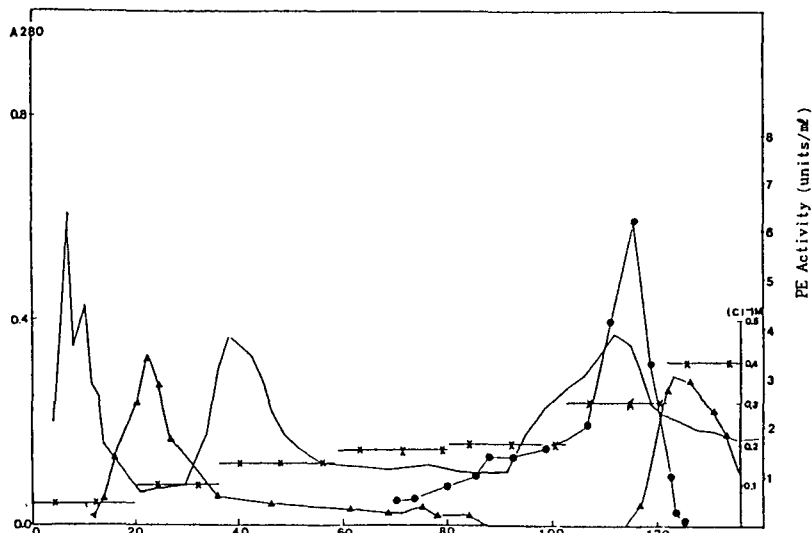


Fig. 1. Isolation of Microbial on DEAE Sephadex a-50 Chromatography. —: A280 nm, ●: PE activity, ✖: NaCl, ▲: Polygalacturonase activity.

Rajni 등¹³⁾의 연구 보고에 의하면 lime peel로부터 LMP 조제시 산에 의한 demethylation은 pH 0.5, 60°C에서 9시간 소요되었고, alkali에 의한 demethylation은 pH 10.5, 5°C에서 1-2시간 소요되었으며, 암모니아 사용시, pH 10.5, 25°C에서 2-3시간 소요되었다고 하였다. 이와 비교해 볼 때 효소에 의한 demethylation 과정은 신속하게 진행됨을 알 수 있었다.

3. Low Methoxyl Pectin Gel의 물리적 특성

(1) Percent Sag

Commercial LMP gel의 percent sag은 2.25%이었다. MPE의 작용에 의해 형성된 gel은 methoxyl함량이 감소함에 따라 percent sag도 감소되었다(P < 0.01). MPE를

Table 1. Methoxyl Content and Degree of Esterification of Low Methoxyl Pectin Prepared by Microbial Pectinesterase

Pectin	Incubation Time (min)	Methoxyl Content (%)	Degree of Esterification (%)
Commercial LMP		5.41±0.20	33.15±1.90
Commercial LMP prepared by MPE	5	8.99±0.22	55.09±1.35 ^a
	10	8.18±0.30	50.15±1.87 ^b
	15	8.09±0.30	49.51±2.63 ^b
	20	6.93±0.26	42.50±1.62 ^c
	25	6.75±0.05	41.34±0.31 ^c
	30	5.95±0.15	36.46±0.93 ^d
	40	5.01±0.23	33.72±1.39 ^d
	50	5.00±0.11	30.64±0.65 ^e
	60	4.89±0.14	30.17±1.02 ^e
90	4.77±0.20	29.17±1.24 ^e	

^aNumbers sharing the same letters in columns with variables are not significantly different at the p < 0.01 level.

90분 작용시켜 만든 gel은 용기에서 제거된 후에도 gel 형태의 변화가 없었고 투명하고 탄력있는 gel을 형성하였으며 percent sag이 1.89%로 commercial LMP gel보다 단단한 것으로 나타났다(Table 2).

Kohn 등¹⁾은 곰팡이와 식물체에서 추출한 PE는 각각 그 작용 양상이 달라 곰팡이에서 추출한 PE로 조제한 LMP는 methyl ester group 분포가 균일하여 이 LMP로 만든 gel은 식물체 존재하는 PE로 조제한 LMP gel보다 더 우수한 성상을 갖는다고 보고하였다.

(2) Rheometer에 의한 Gel의 질감

Rheometer로 질감을 측정된 결과, Table 3에서와 같이 methoxyl 함량이 감소할수록 gel의 견고도와 탄력성은 증가하였으나 응집성은 감소하였다(P < 0.01).

윤 등¹⁴⁾의 보고에 의하면, 견고도와 탄력성은 HMP gel이 LMP gel보다 높았으며 PE 작용 시간에 따라 감소하였다. 부착성은 pH 8.5에서 10분간 효소처리를 하여 얻은 pectin의 gel이 가장 높았으며 이때 pectin의

Table 2. Percent Sag of Low Methoxyl Pectin Gel

Pectin	Incubation Time (min)	% Sag
Commercial LMP		2.25±0.64
LMP Prepared by MPE	5	
	10	16.24±1.95 ^a
	15	11.25±1.25 ^b
	20	9.17±0.84 ^c
	25	9.40±0.71 ^{cd}
	30	8.56±0.67 ^d
	40	7.79±0.10 ^e
	50	4.74±0.45 ^f
	60	4.98±0.08 ^f
90	1.89±0.74 ^g	

^aNumbers sharing the same letters in columns with variables are not significantly different at the p < 0.01 level.

Table 3. Textural Parameter of Low Methoxyl Pectin Gel by Rheometer

Pectin	Incubation Time (min)	Hardness (cm)	Cohesiveness (cm ²)	Resilience
Commercial LMP		6.65±0.35	0.35±0.03	2.39±0.51
LMP prepared by LMP	5			
	10	3.10±0.10 ^g	0.53±0.06 ^a	1.03±0.07 ^e
	15	7.40±1.20 ^f	0.41±0.04 ^b	0.96±0.17 ^e
	20	8.25±0.75 ^e	0.41±0.01 ^b	1.53±0.22 ^d
	25	8.70±1.20 ^e	0.40±0.06 ^b	1.63±0.12 ^d
	30	12.15±0.85 ^d	0.41±0.04 ^b	1.57±0.37 ^d
	40	13.90±0.40 ^c	0.30±0.01 ^c	1.86±0.24 ^c
	50	14.60±0.10 ^b	0.28±0.08 ^c	2.24±0.07 ^b
	60	15.30±0.10 ^b	0.30±0.01 ^c	2.82±0.32 ^a
90	16.50±1.20 ^a	0.18±0.02 ^d	2.35±0.30 ^b	

^aNumbers sharing the same letters in columns with variables are not significantly different at the p < 0.01 level.

methoxyl 함량은 4.27%이었다고 한다.

4. Microbial Pectinesterase에 의한 Low Methoxyl Pectin Apple Jelly의 특성

(1) Pectin 함량 및 Methoxyl 함량 측정

사과 주스의 pectin 함량은 0.47%이었다. 사과 주스 자체에 존재하는 pectin 함량만으로는 jelly 형성이 불가능하므로 여러번의 관능검사를 통해 jelly의 질감을 조사한 결과 0.7% pectin을 함유하고 있는 jelly의 수용도가 높은 것으로 나타났다. 따라서 사과 주스에 pectin을 첨가하여 0.7% pectin을 함유하는 사과 주스를 만들었다. 사과 주스에 존재하는 pectin의 methoxyl 함량은 9.55%이고 DE는 58.54%인 HMP이었다. 앞의 LMP gel의 연구결과에 의하면 PE를 30분간 작용시켜 얻은 LMP gel의 성상이 우수한 것으로 나타났으므로 0.7% pectin을 함유하고 있는 사과 주스에 PE 100 units를 30분간 작용시켜 LMP를 함유하고 있는 사과 주스로 만들었다.

0.7% pectin을 함유하고 있는 사과 주스의 pH는 4.2이었다. MPE의 최적 pH는 4.5^{2,3)}이므로 0.1N NaOH를 이용하여 pH를 4.5로 조정 한 후 30분간 0.1N NaOH로 pH 4.5를 유지시키면서 PE를 작용시켰다. 그러나 NaOH를 사용하지 않고 효소를 30분간 작용시켰을 때 30분후의 pH는 3.89로서 일정한 pH부근(pH 3.9)에 도달하면 효소에 의한 demethylation 반응이 계속 일어나도 pH 변화는 거의 없었다. 이는 과즙 내에 존재하는

buffer system때문이라고 생각된다. 오³⁾의 연구보고에 의하면 MPE는 pH 3.89 부근에서도 활성을 지니므로 효소 작용시 NaOH를 사용하여 pH를 4.5로 유지시키지 않고도 LMP 사과 jelly를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. LMP를 내포한 사과 주스의 methoxyl 함량은 5.6%, DE값은 34.32%이었다.

(2) 색조의 변화

Jelly를 만든 후 초기 색조와 4주 저장 후의 색조를 비교한 결과는 Table 4와 같다. LMP 사과 jelly는 HMP 사과 jelly보다 명도 및 갈변도의 증가가 큰 것으로 나타났다($P < 0.01$). 또 냉장 저장시보다 실온 저장시 명도와 갈변도 변화가 더 크게 증가하였다. 황색도는 감소하였으며, HMP 사과 jelly에서 더 크게 감소하였다($P < 0.01$).

Lopez 등⁹⁾은 LMP gel의 저장 기간이 길어질수록 외관이 탁해지며 이는 원래 사과 주스안에 존재하는 polyphenol 화합물의 산화 결과라고 하였다.

(3) Penetrometer에 의한 사과 jelly의 견고도

Penetrometer를 사용하여 HMP 사과 jelly와 LMP 사과 jelly의 견고도를 비교하였으며, 또 시간에 따른 jelly의 견고도 변화를 알아본 결과 Table 5와 같다. Table 5에서는 gel의 견고도를 침입도로 나타냈다. HMP 사과 jelly가 LMP 사과 jelly보다 견고도가 컸으며 초기보다 4주 저장하였을 때 견고도가 증가하였고 실온에 저장하였을 때 더 크게 증가하였다($P < 0.01$).

Table 4. Changes in Color Values of Jellies

Color Value	HMP 사과 jelly			LMP 사과 jelly		
	0 week	4 weeks		0 week	4 weeks	
		room temp.	refrigerator		room temp.	refrigerator
L	61.7	71.5	65.6	59.4	72.1	63.3
a	2.8	5.2	3.0	3.0	0.5	2.7
b	8.6	5.5	8.3	8.7	0.5	6.1
E	62.3	71.9	65.2	60.1	72.1	63.7

$$E = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2}$$

Table 5. Length of Penetration Determined by Penetrometer

Jellies	Storage time (weeks)	Storage temperature	Length of Penetration ($\times 10$ mm)
HMP 사과 jelly	0		20.32
	4	room temperature	15.46
	4	refrigerator	19.76
LMP 사과 jelly	0		27.55
	4	room temperature	24.00
	4	refrigerator	24.56

IV. 결 론

본 연구에서는 A. japonicus 배양액에서 microbial pectinesterase(MPE)를 분리, 정제하였다. 이 효소를 이용하여 low methoxyl pectin(LMP)을 조제하여 작용시간에 따른 methoxyl 함량의 변화와 gel 성상을 조사하였다. 또한 MPE를 사과 주스에 작용시켜 LMP를 함유한 사과 jelly를 제조하여 질감과 저장기간에 따른 품질 변화를 연구하였다.

1. A. japonicus의 배양액으로부터 PE를 추출, 정제하기 위해 DEAE Sephadex A-50 batchwise, 2회의 Sephadex G-75 gel filtration과 DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography를 실시하였다. 그 결과 DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography를 실시하였을 때 18, 20, 30 mM의 NaCl 농도에서 PE가 용출되었다. 위의 방법에 의해 추출 정제된 PE의 specific activity는 114.29 units/mg이고 조효소에 비해 93.68배의 정제도를 나타냈다.

2. PE 4000 units를 사용하여 LMP를 제조한 결과 작용 시간의 경과에 따라 methoxyl 함량이 감소되었다. 효소작용 20분 후에는 methoxyl 함량이 6.93%인 LMP를 생성하였다.

3. LMP gel의 percent sag은 methoxyl 함량이 감소함에 따라 감소되어 효소를 90분 작용시켰을 때에는 methoxyl 함량 4.77%이고 percent sag이 1.89인 commercial low methoxyl pectin gel보다 성상이 좋은 gel을 형성하였다.

4. Rheometer에 의한 gel의 질감측정 결과, methoxyl 함량이 감소할수록 gel의 견고도와 탄력성은 증가하였으나 응집성은 감소하였다.

5. HMP를 함유하고 있는 사과 주스에 효소를 작용시켜 LMP를 함유하고 있는 사과 주스를 만들었다. 효소 100 units를 30분간 작용시킨 결과 LMP를 함유하고 있는 사과 주스의 methoxyl 함량은 5.6%, DE값은 34.32%이었다.

6. LMP사과 jelly와 HMP사과 jelly의 저장에 따른 색조와 질감변화를 비교해 본 결과, 초기보다 4주 저장하였을 때 견고도가 증가하였으며 실은 저장시 더 크게 증가하였다. 색조의 변화에서는 저장시 명도와 갈변도가 증가하였으며 실은 저장시 더 크게 증가하

였다.

참고문헌

1. Kohn, R., Markovic, O., and Machova, E.: Deesterification mode of pectin by pectinesterase of A. foetidus, tomato and alfalfa, *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, **48**: 790 (1983).
2. Ishii, S., Kiho, K., Sugiyama, S., and Sugimoto, H.: Low methoxyl pectin prepared by pectinesterase from A. japonicus, *J. Food Sci.*, **44**(2): 611 (1979).
3. 오혜숙: Pectinesterase Isoenzyme의 분리 및 그의 특성에 관한 연구, 연세대학교 대학원 박사학위 논문, (1988).
4. Kertesz, Z.I.: The pectic substances, Interscience Pub. Inc., N.Y., (1951).
5. Owens, H.S.: Methods used at western regional research laboratory for extraction and analysis of pectic materials, U.S. Dept. Agriculture, Bureau of Agricultural and Industrial Chemistry, (1952).
6. National Research Council: Pectin in "Food Chemicals Codex", 2nd ed., p.577, National Academy of Science, Washington, D.C., (1972).
7. 이명희: 과일내의 Pectin 함량 및 성숙도에 따른 pectin 특성 변화에 관한 연구, 연세대학교대학원 석사학위 논문, (1981).
8. McComb, E.A., and McCready, R.M.: Colorimetric determination of pectin substances, *Anal. Chem.*, **24**: 1630 (1952).
9. Lopez, A. and Li-Hsieng, L.: Low methoxyl pectin apple gel, *Food Technol*, **22**: 1023 (1968).
10. Cooper, T.G.: The tools of biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., pp.53-55, (1977).
11. Wills, R.B.H. and Rigney, C.J.: Effect of calcium activity of mitochondria and pectic enzymes isolated from pomato fruits, *J. Food Biochem.*, **3**: 103 (1980).
12. Padival, R.A., Ranganna, S., and Manjrekar, S.P.: Mechanism of gel formation by low methoxyl pectin, *J. Food Tech.*, **14**: 277 (1979).
13. Rajni A., Pedival, S. Ranganna and S.P. Manjrekar: Low methoxyl pectins from lime peel, *J. Food Tech.*, **14**: 333 (1979).
14. 윤선, 윤경희, 이명희: 감귤류 과피내의 pectinesterase의 작용에 의한 low methoxyl pectin 조제 및 특성에 관한 연구, *한국식량영양학회지*, **12**(1): 7 (1983).