

펙티나아제

Pectinase

정 의 이 품목은 *Aspergillus niger*의 배양물, *Aspergillus aculeatus*의 펙티나아제 유전자를 삽입한 *Aspergillus oryzae*의 배양물, *Aspergillus aculeatus*의 배양물에서 얻어진 것으로 펙틴 및 펙틴산을 분해하는 효소이다. 폴리갈락투로나아제(polygalacturonase), 펙틴에스터라아제(pectinesterase), 펙틴리아제(pectin lyase)가 포함된다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 펙틴과 펙틴산을 가수분해하여 올리고당을 생성한다.

성 상 이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

확인시험 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험 (1) 납 : 이 품목 약 2g을 정밀히 달아 백금제 또는 석영제 도가니에 넣고 황산 소량을 가하여 적신 다음 서서히 가열하여 가능한 저온에서 예비회화한 후, 다시 황산 1mL를 가하고 천천히 가열하여 450~550°C에서 회화될 때까지 강열한다. 회화가 끝나면 잔류물에 소량의 질산(1→150)을 가하여 녹이고, 다시 질산(1→150)을 가하여 10mL로 한 액을 시험용액으로 하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(3) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 살모넬라균 시험법에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(4) 대장균 : 이 품목 25g을 취하여 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

활성시험법(역가)

폴리갈락투로나아제는 제 1법, 펙틴에스터라아제는 제 2법, 펙틴리아제는 제 3법을 각각 적용한다.

제 1 법

원리 : 본 시험방법은 pH 4.0, 온도 40℃에서 펙틴산(Pectic acid)의 가수분해로 생성된 Galacturonic acid의 환원당량을 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 1mL당 40~60 Unit를 함유하도록 구연산완충액(pH 4.0)으로 희석한 액을 시험용액으로 한다.

시험조작 : 기질용액 10mL를 100mL 삼각플라스크에 넣고 40℃의 수욕조에서 미리 5분간 항온 시킨다. 항온 시킨 기질용액에 시험용액 1mL를 가해 주고 즉시 흔들어 섞고 40℃에서 정확히 30분간 방치시킨 후 무수탄산나트륨용액(106→1,000) 3mL를 가하여 반응을 중지시킨다. 이어서 0.1N 요오드용액 6mL를 가하여 잘 흔들어 섞고 암소에서 30분간 방치한다. 이에 8N 황산 6mL를 가해주고 요오드의 색이 거의 없어질 때까지

0.02N 치오황산나트륨용액으로 재빨리 적정한 다음, 다시 전분시액 1mL를 가하여 0.02N 치오황산나트륨용액을 한 방울씩 가하여 청색이 없어질 때까지 적정한다(AmL). 따로, 공시험용으로 100mL 삼각플라스크에 무수탄산나트륨용액(106→1,000) 3mL를 넣고 이에 시험용액 1mL를 가하여 잘 흔들어 섞어준다. 이어서 기질용액 10mL를 가해 주고 0.1N 요오드용액 6mL를 가해서 잘 흔들어 섞고 암소에서 30분간 방치한 다음 이하 시험용액과 동일하게 적정한다(BmL).

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(units/g)} = (B-A) \times 513 \times \frac{2}{100} \times \frac{60}{30} \times \frac{1}{W}$$

513 : 1mmol의 요오드는 513 μ mol의 galacturonic acid에 상당

W : 시험용액 1mL에 함유된 검체의 양(g)

역가의 정의 : 1 Polygalacturonase unit는 상기 시험조건 하에서 1 시간 동안 1 μ mol의 Galacturonic acid를 생성하는 효소의 양이다.

시액

기질용액 : 미리 펙틴산(Sigma P3889 또는 이와 동등한 것) 1.0g을 정밀히 달아 105 $^{\circ}$ C에서 3시간 건조하고, 그 감량을 측정한다. 그 환산한 건조물 0.55g에 대응하는 펙틴산을 정밀히 달아 구연산완충액(pH 4.0) 80mL를 가하여 녹인다. 용해시킨 후 구연산삼나트륨용액(29.4→100) 또는 염산(9→100)을 사용하여 pH 4.0으로 조정하고, 구연산완충액(pH 4.0)을 가하여 100mL로 한다.

구연산완충액(pH 4.0)

제 1 액 : 0.1N 염산

제 2 액 : 구연산삼나트륨 14.7g을 물에 녹여 1,000mL로 한다.

제 2 액에 제 1 액을 사용하여 pH 4.0으로 조정한다.

제 2 법

원리 : 본 시험방법은 pH 4.8, 온도 30℃에서 펙틴 중 에스테르기가 유리되어 생성된 펙틴산을 알칼리로 적정하여 알칼리 소비속도로부터 초기반응속도를 구하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 최종 희석액 1mL당 0.0007~0.006 unit를 함유하도록 물로 희석한 액을 시험용액으로 한다.

시험조작 : 기질용액 20mL를 정확히 취하여 비이커에 넣고 30℃의 수욕조에서 미리 항온 시킨다. 항온 시킨 기질용액에 0.05N 수산화나트륨용액을 가하여 pH 4.8로 조정하고 시험용액 1mL를 가해 준다. 2분 동안 pH 4.8로 조정하면서 반응시키고 이 때 소비된 0.05N 수산화나트륨용액의 소비 mL수를 A라 한다. 따로 공시험용으로 기질용액에 0.05N 수산화나트륨용액을 가하여 pH 4.8로 조정하고 물 1mL를 가해 준다. 2분 동안 pH 4.8로 조정하면서 소비된 0.05N 수산화나트륨용액의 소비 mL수를 B라 한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(units/g)} = \frac{A-B}{20 \times 2 \times W}$$

20 : 1 μ mol의 카복실기에 상당하는 0.05N 수산화나트륨용액의 적정량(μ L)

2 : 반응시간(분)

W : 시험용액 1mL에 함유된 검체의 양(g)

역가의 정의 : 1 Pectinesterase unit는 상기시험조건 하에서 1분간 펙틴으로부터 1 μ mol의 카복실기를 유리시키는 효소의 양이다.

시액

기질용액 : 에스테르화펙틴[Fluka 76282(pectin from apple, 70% 이상 methoxylation된 것) 또는 이와 동등한 것] 5g을 정밀히 달아 40 $^{\circ}$ C로 향온시킨 물 800mL에 서서히 혼합해서 현탁시킨다. 이를 60 $^{\circ}$ C 이하에서 충분히 녹인 후 실온으로 냉각시킨다. 이에 염화마그네슘 2.03g을 가해 주고, 수산화나트륨시액으로 pH 4.8로 조정 한 후 물을 가하여 1,000mL로 한다.

제 3 법

원리 : 본 시험방법은 pH 5.8, 온도 30 $^{\circ}$ C에서 펙틴(Pectin)이 분해되어 생성된 불포화 Galacturonic acid의 양을 흡광도로 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 이 품목 0.5g을 구연산완충액(pH 5.8)에 녹여 100mL로 하고, 이 액 3mL를 취하여 구연산완충액(pH 5.8)으로 희석하여 25mL로 한 액을 시험용액으로 한다.

시험조작 : 30 $^{\circ}$ C의 수욕조에서 미리 5분간 향온시킨 기질용액 3mL에 시험용액 0.1mL를 가해 주고 짧게 흔들어 준 다음 물을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 235nm에서 1분 간격으로 10분 동안 흡광도를

측정하여 분당 흡광도곡선을 작성한다. 동일한 시험조작을 3회 반복한다. 이 때, 직선구간은 최소 5분간(6개 point)을 유지하여야 한다. 또한 흡광도의 변화는 분당 0.03을 초과하여서는 아니되며, 0.02~0.03의 범위가 최적값이다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다

$$\text{역가(units/mg)} = \frac{\Delta A_{235}/\Delta t}{0.01 \times 3.1 \times C}$$

3.1 : 최종 반응 용액(mL)

C : 최종 시험용액의 농도(mg/mL)

역가의 정의 : 1 Pectin lyase unit는 상기시험조건 하에서 1분당 흡광도 0.01을 증가시키는 효소의 양이다.

시액

기질용액 : 펙틴(Copenhagen Pectin X 2955, Sigma P9135 또는 이와 동등한 것) 0.5g을 비이커에 넣고 에탄올 2mL로 잘 저어주고, 마그네슘바를 사용하여 구연산완충액(pH 5.8) 80mL를 가해주고 거품이 생성되지 않도록 하면서 계속 교반한다. 제 1 액 또는 제 2 액을 사용하여 액의 pH가 5.8이 되도록 조정한다. 다음 구연산완충액(pH 5.8)을 가하여 100mL로 한다. 이 액은 냉장고에서 하룻밤 방치한 후 다음날 12,000×g에서 10분간 원심분리한 후 여과하여 사용한다.

구연산완충액(pH 5.8)

제 1 액 : 제이인산나트륨(2수화물) 35.6g을 물에 녹여 1,000mL로 한다.

제 2 액 : 구연산(1수화물) 21g을 물에 녹여 1,000mL로 한다.

제 1 액 57mL 용량과 제 2 액 43mL 용량을 잘 혼합한 후 제 1 액 또는 제 2 액으로 pH 5.8로 조정한다.

보존기준

흡습성이 강하므로 냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.