

감의 연화와 관련된 세포벽다당류의 변화

金順東 · 朴南淑 · 姜明秀

효성여자대학교 식품가공학과

Softening Related Changes in Cell Wall Polysaccharides of Persimmon

Soon Dong Kim, Nam Sook Park and Meung Su Kang

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

Abstract

Various cell wall polysaccharides such as ionically associated pectin (IAP), covalently bounded pectin (CBP), 4N potassium hydroxide soluble hemicellulosic fraction (HF₁) and 0-3N soluble hemicellulosic fraction (HF₂) were fractionated from crude cell wall of the fresh and soft persimmon by chemical method. The changes in cell wall polysaccharides were studied by gel filtration chromatography. The content of crude cell wall remarkably decreased in the soft persimmon. The decreasing rates of IAP, CBP and HF₂ were 59, 60 and 74%, respectively, while HF₁ and cellulose changed only a little during softening. Sugar compositions of IAP and CBP were 72-84% uronic acid, 5-11% hexose and 11-16% pentose, and also the hemicellulose was composed of uronic acid besides hexose and pentose that was hemicellulosic components. The loss rate of pentose in IAP, of hexose in CBP, of hexose and uronic acid in HF₁, of pentose in HF₂ increased during softening. Though apparent average molecular weight of all polysaccharides shifted from high molecular weight to low molecular weight polymer, the shifting degree of CBP and HF₂ was especially remarkable during softening. It is suggested that the severe softening phenomenon of persimmon involved the degradation and dissolution of wall bound-CBP and HF₂ which were associated with each other.

서 론

과실의 연화(softening)는 성숙, 저장, 유통 및 가공중에 일어나는 품질에 매우 큰영향을 미치는 물성변화의 하나로써 세포벽다당류의 변화와 밀접한 관계가 있다.

Hobson¹⁾은 과실이 성숙·연화되어 가는 동안 세포벽 구성다당류중의 galacturonic acid는 감소되는 반면 가용성 polyuronide는 증가한다고 하였으며, Bartley 등²⁾은 middle lamella와 1차세포벽의 분리현상을 관찰하였고 이때의 특징적인 현상으로 가용성 pectic polysaccharide의 농도가 증가한다고 하였다. 또 Shewfelt 등³⁾ 및 Shewfelt와 Smit⁴⁾은 과실이 익음에 따라 난용성의 protopectin은 감소하고 수용성의 pectinic acid가 증가하는 동시에 분자량 역시 감소함으로 연화와 같은 물성변화를 초래한다고 하였으며 이들 변화와 함께 Pressey⁵⁾, Knee⁶⁾, Pressey 등⁷⁾은 polygalacturonase의 활성이 높아진다고 하였다. 그러나 Huber⁸⁾은 토마토과실의 연화중에 세포벽 구성 hemicellulose의 현저한 저분자화현상을 관찰하였다.

감은 jelly형성이 어려울 정도로 pectin질의 함량은 적나 연화현상은 두드러지게 나타나는 과실로서 저장 및 유통상에 많은 어려움을 가지고 있다.

본 연구에서는 감의 연화에 관한 연구가 없음을 감안하여 이에 대한 기초적 연구로서 신선한 감과 연화된 감으로부터 얻은 조세포벽을 시료로 하여 구성다당류의 함량과 그 조성 및 gel여과법에 의한 분자량의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

실험용 재료로는 진영단감, 富有 (*Diospyros kaki* Thunb)를 25°C에서 10일간 두어 연화시킨 것과 구입시의 신선한 것을 각각 사용하였다.

조세포벽(crude cell wall)의 추출

Selvendran⁹⁾과 Jarvis 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 과피를 제거한 감 10g을 200ml의 20mM HEPES(N-2-hydroethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid)-NaOH 용

액(pH 6.9)으로 균질화한 후 miracloth 로 여과하고 mg/ml 의 α -amylase 를 함유하는 동일한 HEPES 용액에 현탁하여 37°C 에서 24시간 동안 반응시킨 후 여과하였다. 또 잔사를 chloroform-methanol (1:1, v/v) 용액에 한시간 동안 현탁시킨 후 30분간 방치하여 지용성 물질을 제거하고 다시 acetone 으로 추출, 여과하여 P_2O_5 가 들어있는 감압건조기(37°C)내에서 7일간 두면서 건조시켜 조세포벽으로 하였다.

세포벽 구성다당류의 분획

세포벽다당류의 분획은 Jarvis 등¹⁰⁾, Jarvis¹¹⁾ 및 Gross 와 Wallner¹²⁾의 방법에 준하였다. 즉 조세포벽 1g에 50mM CDTA(trans-1,2-diaminocyclohexane-N, N, N', N'-tetraacetic acid)를 함유하는 50mM의 sodium acetate buffer 용액(pH 6.5)을 가하여 6시간동안 추출한 것을 여과하였다. 같은 조작을 3회 반복하여 모든 여과액을 냉암소에서 72시간 동안 증류수로 투석, 동결건조하여 IA P(ionically associated pectin)로 하였으며 잔사를 다시 2mM CDTA를 함유하는 50mM sodium carbonate buffer 용액(pH 6.5) 100ml로 4°C에서 20시간 동안, 25°C에서 1시간동안 순차적으로 추출한 것을 여과하여 상기와 동일하게 처리, 동결건조시켜 covalently bounded pectin (CBP)으로 하였다.

남은 잔사는 0.1M NaBH₄를 함유하는 4N KOH 용액으로 25°C에서 1시간 동안 추출, acetic acid로 중화시킨 후 투석, 동결건조시켜 KOH soluble hemicellulosic fraction (HF₁)으로 하였으며, 증류수로 KOH가 완전히 제거될때까지 추출하여 투석, 동결건조시켜 0~3N KOH soluble hemicellulosic fraction (HF₂)으로 하였다. 최후로 남은 잔사는 동결건조하여 cellulosic fraction (CF)으로 하였다. 투석막은 분자량 6,000~8,000이하를 제거시키는 membrane tubing을 사용하였다.

Gel 여과와 분자량 측정

세포벽다당류의 gel 여과와 개략적인 분자량의 측정은 Kim 등¹³⁾의 방법에 시료 준하였으며 20mg을 5mM EDTA를 함유하는 50mM MES buffer 용액(pH 6.5) 1ml에 녹여 Sephacryl S-500 coumn(2, 8×42cm; bed volume 258ml)에 loading한 후 동일한 용액으로 분당 0.7 ml의 유속으로 5ml씩 분획하였다.

세포벽다당류의 개략적인 분자량은 분자량 2×10⁶의 blue dextran 2,000과 평균분자량 10⁵ 및 10⁴의 dextran을 사용하여 구한 용출량(Ev)과 분자량의 관계식 $\log MW = -0.0336Ev + 11.8244$, $r = -0.9915$ 로부터 산출하였다.

Polyuronide 함량의 측정

Ahmed 와 Labavitch¹⁴⁾의 방법에 준하여 50mM의 MES buffer 용액에 녹인 다당류 분획물과 gel 여과한 fraction 각 0.5ml에 c-H₂SO₄ 3ml을 가하여 잘 혼합한 후 끓는 water bath에서 20분간 가열하였으며 25°C에서 냉각시켜 carbazole 시약¹⁵⁾ 100μl을 가하여 2시간동안 반응시킨 후 530nm에서의 흡광도를 측정하였다. 함량은 표준품 galacturonic acid의 검량선, $\mu g/0.5 ml = OD_{530} \times 84.1 - 1.84$, $r = 0.997$ 에 의하여 산출하였다.

Hexose의 함량측정

Polyuronide 측정용 시료 0.5ml에 냉 anthrone 시약¹⁶⁾ 3ml을 가하여 잘 혼합한 후 끓는 water bath에서 15분간 가열하여 반응시켰으며 ice bath에서 20분간 냉각, 620nm에서 흡광도를 측정하였다. Hexose 함량은 glucose의 검량선 $\mu g/0.5 ml = OD_{620} \times 180.1 - 0.15$, $r = 0.997$ 에 의하여 산출하였다.

Pentose 함량의 측정

각 분획물의 pentose 함량은 orcinol 비색법¹⁷⁾에 의하여 시료 4ml에 orcinol-FeCl₃ 0.5ml을 가한 후 c-HCl 4.5ml을 가하여 잘 혼합하였다. 다음에 끓는 물속에서 10분간 가열하여 정색시킨 후 620nm에서 흡광도를 측정하였다. Pentose 함량은 arabinose 서 검량선 $\mu g/4 ml = OD_{620} \times 287.77 - 5.61$, $r = 0.995$ 에 의하여 산출하였다.

결과 및 고찰

감의 연화중 세포벽다당류의 함량변화

신선한 감과 연화된 감으로부터 추출한 조세포벽의 함량은 Table 1과 같다.

감조직 100g당의 조세포벽 함량은 신선한 감에서는 1.40g이었으나 연화된 감은 이의 74%인 1.04g으로서 연화에 따른 감소현상을 볼 수 있다. Table 2에서는 감소현상과 관련한 구성다당류의 함량변화를 조사한 결과이다. 즉 감세포벽 다당류는 CF > HF₂ > HF₁ > CBP > IAP

Table 1. Crude cell wall content of fresh and soft persimmon

	Fresh	Soft*
Crude Cell Wall (g/100g of tissue)	1.40	1.04 (74.29)

* The fruit was prepared by storing the fresh persimmon for 10 days at 20°C. Parenthesis represented percent of fresh.

순으로 pectin질에 비하여 hemicellulose의 함량이 높음을 볼 수 있으며 HF₂, CBP, IAP는 연화에 따라 59, 60 및 74%의 감소율을 나타내어 pectin과 hemicellulose가 분해되는 현상을 볼 수 있으며, 그 중에서도 비교적 용해성이 높은 HF₂의 감소가 큼을 알 수 있다. 용해성이 비교적 낮은 HF₁은 세포벽 g당으로 보면 오히려 증가하는 경향이나 감소된 일정한 양으로 환산한 값에서 보면 큰 증가현상은 관찰되지 않았다. CF역시 HF₁과 같은 경향으로 Peris 등¹⁸⁾, Pharr¹⁹⁾ 및 Platt-Aloia²⁰⁾가 보고한 바와 같이 cellulose의 변화가 연화에 미치는 영향이 적음을 알 수 있다.

Table 3에서는 연화중에 감소율이 높은 pectin질과 hemicellulose의 구성성분과 그 변화를 조사하였다. 그 결과 IAP와 CBP에서는 uronic acid 외에 hemicellulose 유

래의 hexose와 pentose가 5~17% 함유하였으며 HF₁과 HF₂에서는 각각 10~16% 및 39~51%의 uronic acid를 함유하였다.

세포벽 pectin질은 이온결합성 pectin^{21, 22, 23)}과 공유결합성 pectin²⁴⁾으로 나눌 수 있는데 추출중에 다같이 hemicellulose와 혼합되어 용출되고^{2, 25)} hemicellulose역시 pectin질과 함께 용출된다²⁵⁾. 이와같은 현상은 세포벽 구성에 pectin-hemicellulose-cellulose의 형태로 상호결합되어 있기 때문으로 생각된다.

또 연화에 따른 구성성분의 변화를 살펴보면 IAP는 uronic acid, hexose, pentose의 함량변화가 거의 없으나 CBP에서는 hexose의 감소율이 높았다. 이와같은 현상은 hemicellulose-bound CBP에서 hemicellulose의 손실을 뜻하며, Pilmik²⁶⁾과 Pressey⁷⁾가 과실의 연화가 세포벽다당류의 효소적 가수분해 현상이라고 말한 점으로 미루어 본다면 이들 다당류의 조성변화는 곧 효소의 작용상태를 의미하는 것이라 하겠다.

HF₁에서는 pentose의 손실율이 높았는데 Ahmed와 Labavitch²⁷⁾는 배과실이 연화되는 동안에 arabinose의 손실이 컸다고 하였다. 그러나 HF₁은 연화에 따른 양적 변화가 적는데 비하여 HF₂에서는 uronic acid와 hexose의 감소율이 높아서 이들의 결과에서처럼 arabinose의 손실이 연화의 주된 원인이 된다고는 생각되지 않았다.

Gel 여과에 의한 변화

감과실의 연화에 따른 IAP, CBP, HF₁ 및 HF₂의 구성 polyuronide의 변화를 보다 구체적으로 검토하기 위하여 Sephacryl S-500에 의하여 gel 여과 하였는데 Fig. 1은 IAP의 결과를 나타낸 것이다.

Table 2. Content of cell wall fractions isolated from crude cell wall of fresh and soft persimmon

	Cell Wall Fractions*				
	IAP	CBP	HF ₁	HF ₂	CF
	<i>mg/g of crude cell wall</i>				
Fresh	16.2 (22.7)	43.7 (61.2)	159.1 (222.7)	391.8 (548.5)	390.3 (546.4)
Soft	9.1 (9.5)	24.0 (25.0)	259.4 (269.8)	189.1 (196.7)	518.4 (539.1)

* The abbreviations of cell wall fractions; IAP, ionically associated pectin; CBP, covalently bounded pectin; HF₁, 4N KOH soluble hemicellulosic fraction; HF₂, 0.3N KOH soluble hemicellulosic fraction; CF, cellulosic fraction.
The values in parenthesis were calculated as mg per 100g of persimmon tissue.

Table 3. Composition of cell wall fractions from crude cell wall of fresh and soft persimmon

Cell Wall Fraction		Sugar Composition (%)		
		Uronic Acid	Hexose	Pentose
		IAP	Fresh	75.85
	Soft	72.50	10.66	16.84
CBP	Fresh	77.11	10.81	12.08
	Soft	84.39	5.07	10.54
HF ₁	Fresh	10.12	43.33	46.55
	Soft	16.75	64.97	18.28
HF ₂	Fresh	50.65	4.96	44.39
	Soft	38.79	2.39	58.82

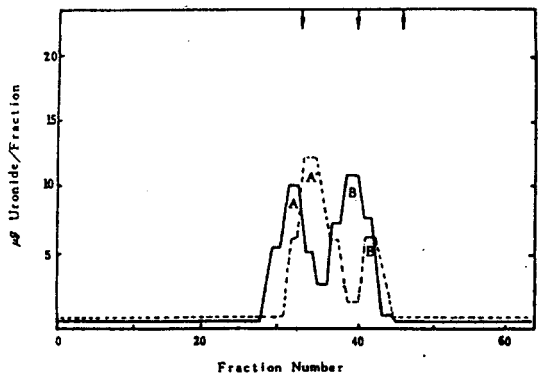


Fig. 1. Sephacryl S-500 column chromatography of the ionically associated pectin extracted from persimmon cell wall material

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000 (M.W., 2×10⁶); dextrans of average molecular weight of 10⁵ and 10⁴. The solid line was result of the fresh persimmon and the dotted line that of the soft persimmon.

그 결과 신선한 감에서는 분자량 400만과 25만의 A, B 두개의 uronic acid peak이 분리 되었으며 연화된 감에는 이보다 저분자인 130만의 peak A'와 6만의 B'가 분리 되었다. 즉 연화에 따른 IAP의 저분자화 현상을 볼 수 있다.

또 Fig. 2의 CBP에서는 분자량이 400만이 넘는 peak A가 분리 되었으나 연화된 감에서는 60만의 peak B'와 20만의 C'가 분리 되어 IAP보다 CBP의 저분자화율이 높음을 알 수 있었다.

Pressey와 Avants²⁸⁾는 토마토과실의 연화는 주로 middle lamella에 존재하는 IAP의 변화에 기인된다고 하였

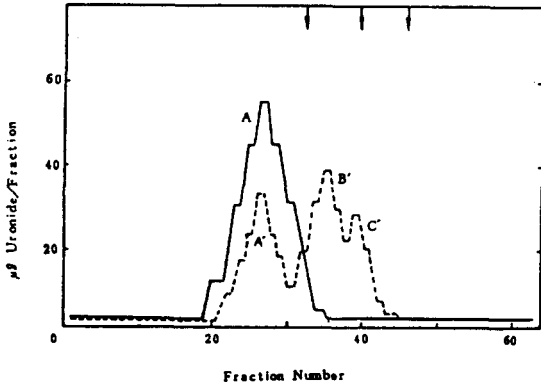


Fig. 2. Sephacryl S-500 column chromatography of the covalently bounded pectin extracted from persimmon cell wall material

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000; dextrans of average molecular weight of 10^5 and 10^6 . The solid line was result of the fresh persimmon and the dotted line that of the soft persimmon.

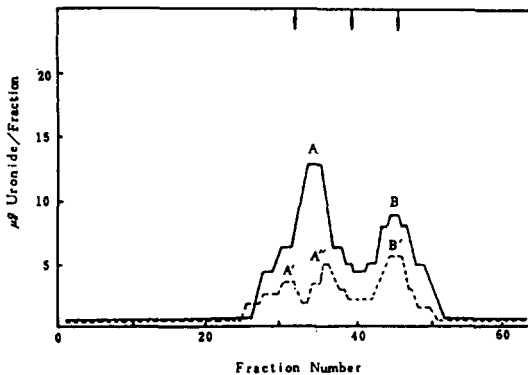


Fig. 3. Sephacryl S-500 column chromatography of the 4N KOH soluble hemicellulosic fraction extracted from persimmon cell wall material

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000; dextrans of average molecular weight of 10^5 and 10^6 . The solid line was result of the fresh persimmon and the dotted line that of the soft persimmon.

으나 본 결과에서 보면 IAP보다 CBP의 변화가 큼을 볼 수 있다.

Fig. 3은 HF₁의 gel 여과 결과를 나타낸 것으로서 신선한 감에서는 200만의 peak A와 2만의 peak B가 분리되었다. 그러나 연화된 감에서는 peak A가 분해된 것으로 보이는 peak A', B'와 peak B와 동일한 위치에 peak B'가 분리 되었다.

한편 상당량의 pectin질과 결합하고 있는 HF₂는 양적 면에서 볼 때 감의 연화와 가장 큰 관련성이 있을 것으로 추정 됨으로 Fig. 4에서는 hexose와 pentose의 분포 상태를, Fig. 5에서는 uronic acid의 분포상태를 조사하

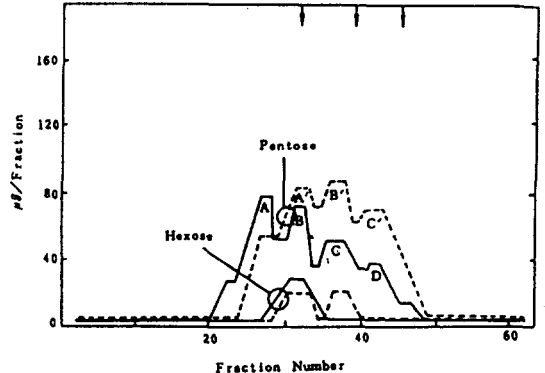


Fig. 4. Sephacryl S-500 column chromatography of the 0-3N KOH soluble hemicellulosic fraction extracted from persimmon cell wall material

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000; dextrans of average molecular weight of 10^5 and 10^6 . The solid line was result of the fresh persimmon and the dotted line that of the soft persimmon.

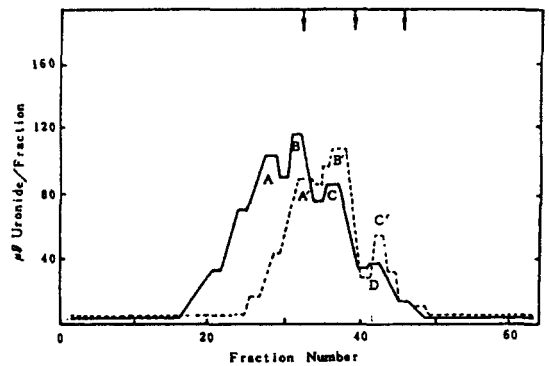


Fig. 5. Sephacryl S-500 column chromatography of the 0-3N KOH soluble hemicellulosic fraction extracted from persimmon cell wall material

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000; dextrans of average molecular weight of 10^5 and 10^6 . The solid line was result of the fresh persimmon and the dotted line that of the soft persimmon.

었다.

그 결과 HF₂를 구성하는 중성당은 hexose에 비하여 pentose가 많음은 볼 수 있으며 신선한 감에서는 A, B, C, D의 4개의 peak이 분리되었는데 A는 uronic acid와 pentose가 주성분이고 B에서는 uronic acid, pentose, hexose가 검출되었으나 C, D에서는 hexose가 존재하지 않았다. 또 분리된 hemicellulose 유래의 pentose와 hexose의 peaks (Fig. 4)과 polyuronide의 peaks (Fig. 5)이 우측으로 shift한 것과 같은 양상을 띠고 있으므로 "A→A', B→B', C→C', D→소실"으로 수백만에서 만단위까지 크게 저분자화 하는 것으로 추정된다.

요 약

감의 연화에 따른 세포벽다당류의 조성 및 함량 및 gel 효과를 통한 개략적인 분자량의 변화를 조사하였다.

조세포벽의 함량은 연화된 감에서 현저히 감소되었는데 구체적으로 ionically associated pectin (IAP)은 59%, covalently bounded pectin (CBP)은 60%, 0~3N KOH soluble hemicellulosic fraction (HF₂)은 74%가 감소된 반면 4N KOH soluble hemicellulosic fraction (HF₁)과 cellulosic fraction (CF)은 큰 변화가 없었다.

신선한 감과 연화된 감의 IAP와 CBP 구성다당류의 조성은 uronic acid 외에 hemicellulose에 유래한 pentose와 hexose가 함유되어 있었고 연화에 따라 IAP에서는 pentose가 CBP에서는 hexose가 감소되었다. 개략적인 분자량은 IAP의 400만과 25만의 peak이 130만과 6만으로, CBP의 경우는 400만 이상의 peak이 60만과 20만으로 CBP에서의 저분자화 정도가 현저하였다.

HF₁과 HF₂역시 polyuronide의 함유율이 높았는데 HF₂가 현저하였다. 또 연화에 따라 HF₁은 pentose가 HF₂는 uronic acid와 hexose의 손실율이 높았다. HF₁의 연화에 따른 개략적인 분자량은 200만의 peak이 2개로 분리되었고 HF₂는 수백만 단위의 거대분자가 만단위까지 저분자화 하였다.

이상의 결과에서 감의 연화는 CBP에 연결된 hemicellulose중 특히 HF₂의 저분자화와 CBP자체의 분해 내지 가용화 현상과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단되었다.

문 헌

1. Hobson, G.E.: *J. Biochem.*, **92**, 324 (1964)
2. Bartley, I.M. and Knee, M.: *Food Chem.*, **9**, 47 (1982)
3. Shewfelt, A.L., Payner, V.A. and Jen, J.J.: *J. Food Sci.*, **36**, 753 (1971)
4. Shewfelt, A.L. and Smit, C.J.B.: *Technology*, **3**, 175

(1972)

5. Pressey, R.: *Plant Physiol.*, **71**, 132 (1983)
6. Knee, M.: *Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci.* **238**, 341 (1974)
7. Pressey, R., Hiton, D.M. and Avants, J.K.: *J. Food Sci.*, **36**, 1070 (1971)
8. Huber, D.J.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **180**(3), 405 (1983)
9. Selvendran, R.R.: *Phytochem.*, **14**, 1011 (1975)
10. Jarvis, M.C., Hall, M.A., Thelfall, D.R. and Friend, J.: *Planta*, **152**, 93 (1981)
11. Jarvis, M.C.: *Planta*, **154**, 344 (1982)
12. Gross, K.C. and Wallner, S.J.: *Plant Physiol.*, **63**, 117 (1979)
13. Kim, S.D., Kang, M.S. and Kim, K.S.: *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **14**(2), 157 (1985)
14. Ahmed, A.E. and Labavitch, J.M.: *J. Food Biochem.*, **1**, 361 (1977)
15. Bitter, T. and Muir, H.M.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962)
16. Spiro, R.G.: Analysis of sugars found in glycoprotein, *In Method in Enzymology* (ed. E.F. Newfeld and V. Ginsburg), Vol. 8, Academic Press, New York, pp. 4 (1966)
17. Yoon, I.S., Kim, J.H., Oh, T.S. and Hong, Y.S.: *Food Analysis*, Hyung Seol, Seoul, pp. 82 (1982)
18. Peris, E., Fuchs, Y. and Zauberman, G.: *Plant Physiol.*, **61**, 416 (1978)
19. Pharr, D.M. and Dickinson, D.B.: *Plant Physiol.*, **51**, 577 (1973)
20. Platt-Aloia, K.A., Thomson, W.W. and Young, R.E.: *Bot. Gaz.*, **141**, 366 (1980)
21. Ginsburg, B.Z.: *J. Exp. Bot.*, **12**, 85 (1961)
22. Letham, D.S.: *Exp. Cell Res.*, **27**, 352 (1962)
23. Lineham, D.J. and Hughes, J.C.: *J. Sci. Food Agri.*, **20**, 119 (1969)
24. Monro, J.A., Penny, D. and Bailey, P.W.: *Phytochem.*, **15**, 1193 (1976)
25. Jermyn, M.A. and Isherwood, F.A.: *J. Biochem.*, **64**, 123 (1956)
26. Pilnik, W. and Woragen, A.J.G.: Pectic substances and other uronides, *In The Biochemistry of Fruit and Their Products* (ed A.C. Hulme). Academic Press, London, pp. 53 (1970)
27. Ahmed, A.E. and Labavitch, J.M.: *Plant Physiol.*, **65**, 1009 (1980)
28. Pressey, R. and Avants, J.K.: *Biochimica et Biophysica Acta.*, **309**, 363 (1973)

(1986년 2월 17일 접수)