

고추과실 세포벽 Pectin질의 연화에 따른 변화

金順東 · 尹水弘* · 姜明秀 · 朴南淑

효성여자대학교 식품가공학과

*효성여자대학교 약학과

(1986년 4월 28일 접수)

Softening Related Changes in Cell Wall Pectin of Hot Pepper Fruit

Soon-Dong Kim, Soo-Hong Yoon*, Meung-Su Kang and Nam-Sook Park

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

**Department of Pharmacy, Hyosung Women's University*

(Received April, 28, 1986)

Abstract

Pectic substance of hot pepper crude cell wall was fractionated during ripening and softening. The pectic substance was divided ionically associated pectin(IAP) and covalently bounded pectin with hemicellulose(CBP). And then, the composition and the modification of the pectic substance using gel filtration chromatography were studied.

The polyuronide associated with the CBP increased owing to decreasing of pectin bound hemicellulose linked to galactose by the turning stage showed softening. The molecular weight profiles of IAP shifted from low molecular weight profiles of IAP shifted from low molecular weight to high molecular weight polymers. While, the CBP changed from high molecular weight to low molecular weight polymers during ripening.

It is suggested that the changes in the pectic substance associated with fruit softening should involve the alteration of CBP-bound hemicellulose like galactan.

서 론

과실의 성숙, 유통 및 저장중에 일어나는 연화(softening)는 품질평가에 영향을 미치는 주된 변화로서 세포벽 구성 다당류의 변화에 의한 것으로 설명되고 있다^{1,2)}.

그 가운데서 pectin질은 중층(middle lamella)과 1차 세포벽에서 이온결합^{4,5)} 또는 공유결합⁶⁾ 형태로 벽을 형성하거나, 세포와 세포를 접촉시키고 있는 거대분자이며, 과실의 숙성과 함께 또는

유통, 저장중에 일어나는 생체내의 각종 생화학적 기전에 의하여 분해되고 그 결과 연화된다⁷⁾. 그러나 고추의 경우에는 polygalacturonase의 활성이 검출되지 않아서³⁾ 존재에 의문이 있으며 아울러 pectin질에 결합된 hemicellulose의 분해로 pectin질의 변화에 영향을 미칠 가능성이 있다^{2,8)}.

따라서 본 실험에서는 고추과실의 성숙·연화중 pectin질의 구체적인 변화양상을 조사하기 위하여 성숙 단계별로 추출한 이온결합성 pectin과 공유결합성 pectin을 gel 여과법으로 분리하여,

개략적인 분자량의 변화와 hemicellulose에 유래하는 구성 hexose의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

실험용 고추는 신미종(*Capsicum annuum* L. CV. ChooraeHong)으로써 전보⁹⁾에서와 같이 개화후 20일째의 미숙과(immature green, IG), 30일째의 완숙과(mature green, MG), 48일째의 적변개시과(turning, T:30~40% red surface color) 및 60일째의 완적과(red ripe, RR)를 사용하였다.

2. 조세포벽의 추출

Selvendran¹⁰⁾과 Jarvis등⁷⁾의 방법에 따라 고추 과피의 100g을 chloroform 용액에 30분간 담근 후 200ml의 20mM Hepes-NaOH용액(pH 6.9)으로 균질화하여 miracloth(Calbiochem-Behring Cap. La Jolla. Cal. USA)로 여과하였다. 잔사는 mg/ml의 α -amylase를 함유하는 상기와 동일한 Hepes 용액에 현탁시켜 37℃에서 24시간 반응시키고 반복 세척하였다. 이렇게 얻은 잔사는 다시 chloroform-methanol(1:1) 용액에 현탁시켜 2시간 동안 방치한 후, acetone으로 무색이 될 때까지 세척하였으며 P₂O₅를 넣은 감압건조기(37℃)에 1주야 동안 두면서 충분히 건조시켜 조세포벽으로 하였다.

3. 세포벽 다당류의 분획

조세포벽으로부터 세포벽 다당류의 분획은 Jarvis등⁷⁾과 Jarvis¹¹⁾ 및 Gross등¹²⁾의 방법에서와 같이 조세포벽 1g에 50mM CDTA(trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)를 함유하는 50mM의 Na-acetate buffer(pH 6.5)용액 100ml를 가하여 25℃에서 6시간 동안 추출하였다. 잔사는 동일한 buffer용액으로 반복 추출한 후, 여과액을 모아서 membrane tubing(spectrum medical industries, Inc, M.W. cut off: 6000~8000)에 넣어 magnetic stirrer를 사용하여 계속 저어주면서 4℃의 압소에서 72시간 투석, 동결 건조하여, 이를 이온결합성 pectin(ionically associated pectin, IAP)으로 하였다. 이때 투석용액은 증류수로 하였으며 3회 교환하였다.

공유결합성 pectin(covalently bounded pectin, CBP)은 IAP를 추출하고 남은 잔사에 2mM CDTA를 함유하는 50mM의 Na₂CO₃ 100ml를 가하여 4℃에서 20시간, 25℃에서 1시간동안 현탁시킨 후 얻은 여액을 같은 방법으로 투석, 동결 건조한 것으로 하였다.

4. Polyuronide의 함량측정

조세포벽 분획물 10mg에 c-H₂SO₄를 vortex상에서 가하여 분해시킨 후, carbazole시약¹⁴⁾으로 반응시켜 530nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 표준품 galacturonic acid의 검량선(mg/0.5ml=OD×84.1-1.84, r=0.997)에 의하여 함량을 산출하였다.

5. 비섬유성 중성당(non-cellulosic neutral sugar)의 측정

세포벽 분획물 10mg에 내부 표준물질로써 0.5mg/ml의 myo-inositol을 함유하는 2N TFA용액을 가하여 121℃에서 한시간 동안 autoclave하고, 50℃에서 N₂ gas기류하에서 건조시킨후, 30mg의 hydroxylamine-HCl을 함유하는 0.5ml의 pyridine용액을 가하여 100℃에서 30분간 가열한 후 냉각하였다. 여기에 0.5ml의 acetic anhydride를 가하여 100℃에서 20분간 반응시켜 aldonitrile acetate 유도체¹⁵⁾로 만들어 gas chromatography를 행하였다.

6. Hexose의 함량

Gel 여과한 후의 시료를 anthrone법¹⁶⁾으로 측정하여 glucose의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

7. Gel여과와 분자량 측정

세포벽 다당류의 gel여과와 개략적인 분자량 측정은 Kim 등⁹⁾의 방법에 준하였으며 Sephacryl S-500 column(2.8×42cm: bed volume 258ml)에 의한 분획은 시료 20mg을 5mM CDTA를 함유하는 50mM MES(2[N-morpholino] ethane sulfonic acid)buffer(pH 6.5) 1ml에 녹여 loading한 후 동일 buffer로 0.7ml/min의 유속으로 fraction당 5ml씩 분획하였다. 개략적인 분자량 측정은 표준품으로 분자량 2×10⁶의 blue dextran과 평균분자량

10⁵ 및 10⁴의 dextran을 사용하였으며 용출량(*E_v*)과 분자량과의 관계식 $\log M.W. = -0.0336E_v + 11.8244$, $r = -0.915$ 에 의하여 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 고추과실의 연화와 Pectin질

고추는 과피가 적색으로 착색되기 시작할 무렵인 turning stage에서부터 연화현상을 띤다²⁾. 많은 연구자들의 보고^{1~3)}에 의하면 연화는 세포벽 구성 다당류의 분해에 의한 것으로 세포와 세포를 접촉하고 있는 pectin질이 이 시기에 생성되는 노화촉진 hormone의 일종인 ethylene의 작용¹⁷⁾으로 활성화된 PG(polygalacturonase)에 의하여 분해, 가용화되는 것으로 설명되고 있다. 그러나, 고추의 경우에는 PG의 활성이 미약한 반면에 β-galactosidase와 같은 세포벽 다당류 분해효소의 활성이 높게 나타나고 있어³⁾ pectin질보다 pectin질과 결합하고 있는 hemicellulose의 분해가 주된 원인일 가능성이 높다. 이에 대한 검토를 위하여 pectin질의 양적변화를 비교하는 것은 난점이 없지 않다. 즉 화학적추출법은 pectin이외의 물질이 상당량 용출되기 때문이다.

Fig. 1에서는 고추 과실의 세포벽 pectin을 화학적인 방법에 의하여 IAP와 CBP로 분획하여 그 구성 성분을 성숙단계별로 조사한 것인데, pectin질 일정량에 차지하는 polyuronide의 함량은 IAP의 경우는 연화기인 T 이후에 완만한 증가를 보인 반면에 CBP에서의 경우는 급속적인 증가를 보였다. 이 증가는 구성하고 있는 hemicellulose의 함유율이 MG의 29%에서 T의 11%로 크게 감소하는데 영향을 받은 것으로, 연화와 관련하여 pectin에 결합된 hemicellulose의 변화가 현저함을 알 수 있다. 또, hemicellulose를 구성하는 중성당으로는 rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose, galactose의 6종이 분리되었는데(투고중) 이중 galactose가 hemicellulose 전량에 차지하는 비율의 손실은 IAP에서 43%, CBP에서 54%로서 hemicellulose변화의 주축을 이루고 있다.

이상의 결과에서 고추과실에서 볼 수 있는 연화현상은 pectin질 주로 CBP에 결합된 galactose가 충분히 함유한 hemicellulose의 분해에 기인되는 것으로 판단된다.

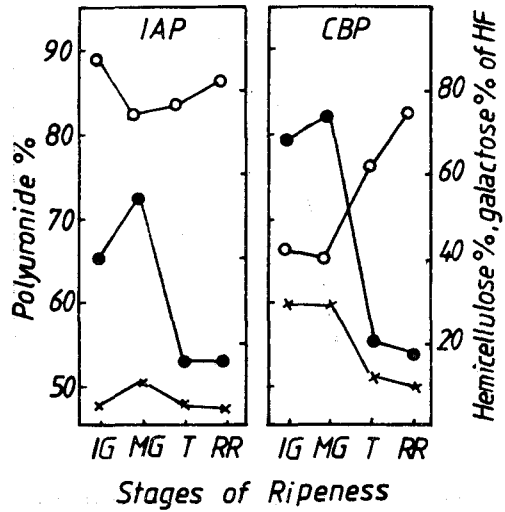


Fig. 1. Changes in polyuronide and hemicellulose content composed of pectic substance fractionated from hot pepper crude cell wall at various stages of ripeness.

Symbols: -○-, polyuronide %; -●-, galactose % of hemicellulose; -×-, hemicellulose %.

Abbreviation: IAP, ionically associated pectin; CBP, covalently bounded pectin; IG, immature green; MG, mature green; T, turning; RR, red ripe.

2. 겔여과에 의한 Pectin질의 변화

Pectin질에 대한 보다 상세한 변화를 조사하기 위하여는 정제도를 더욱 높이는 것이 요구됨으로 조세포벽으로부터 화학적인 방법에 준하여 분획된 IAP와 CBP를 겔 여과하였다.

Fig. 2는 IAP를 Sephacryl S-500에 의하여 겔 여과한 결과로써 개략적인 평균분자량은 IG와 MG에서는 60만이던 것이 연화가 시작되는 T와 RR에서는 250만으로 크게 고분자화 하였다.

이러한 결과에 대한 해석은 매우 어려우나 두 가지 면에서 생각해 볼 수 있는데, 비교적 분자량이 적은 IAP가 연화에 따라 분해 제거되는 것과 연화에 의하여 생성된 탈이온성 IAP가 상호간에 재결합할 가능성도 있다고 하겠다. 그리고 IAP를 겔여과한 각 fraction에서는 Fig. 1에서와 달리 hexose가 검출되지 않았는데 이것은 IAP와 결합한 hemicellulose가 여과중에 제거된 현상

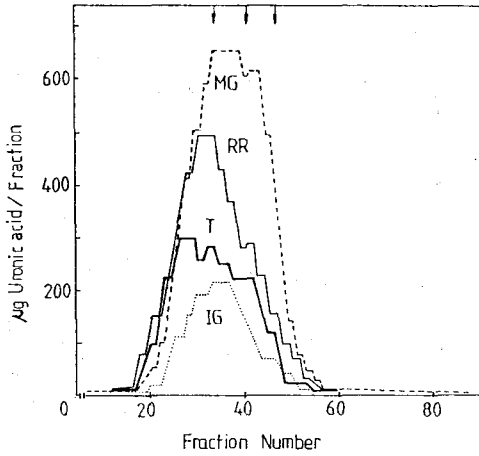


Fig. 2. Sephacryl S-500 gel-filtration profile of a IAP fraction extracted from "ChooraeHong" hot pepper fruit of various stages of ripeness.

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000; dextrans of average molecular weight of 10^5 , 10^4 .

Abbreviation: IG, immature green; MG, mature green; T, turning; RR, red ripe. The flow rate was 0.7 ml/min and fraction volume was 5 ml .

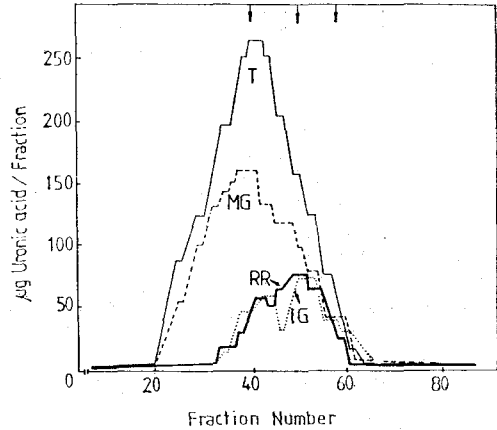


Fig. 3. Sephacryl S-500 gel-filtration profile of a CBP fraction extracted from "ChooraeHong" hot pepper fruit of various stages of ripeness.

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000; dextrans of average molecular weight of 10^5 , 10^4 .

Abbreviation: IG, immature green; MG, mature green; T, turning; RR, red ripe. The flow rate was 0.7 ml/min and fraction volume was 5 ml .

으로 그 결합정도가 약하거나 혼재한 탓이라 생각된다.

Fig.3은 CBP의 gel여과 결과로써 IAP와 달리 IG의 20만에서 MG의 450만으로 크게 증가하였다가 T 50만, RR 20만으로 감소하였다. 또 gel여과후에 측정된 polyuronide의 함량은 T에 이르기까지 줄곧 증가하다가 RR에서 감소하였다. 또 CBP에 함유된 hexose의 측정결과 MG에서는 분자량이 서로 다른 두개의 peak가 검출되었으나 (Fig.4), T와 RR 즉 연화가 이후에서는 검출되지 않았다.

이러한 결과는 연화와 함께 hemicellulose가 CBP로부터 분해, 제거되는 현상으로 이에 따라 CBP의 저분자화가 이루어지는 것이라 사료된다.

요 약

고추과실의 연화와 관련한 pectin질의 변화를 조사할 목적으로 성숙단계별 조세포벽 시료로부터

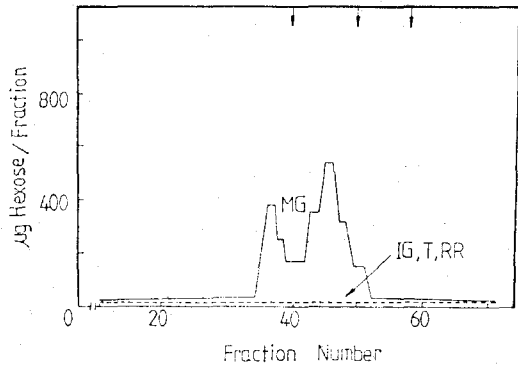


Fig. 4. Sephacryl S-500 gel-filtration of a CBP fraction extracted from "ChooraeHong" hot pepper fruit of various stages of ripeness.

Arrows at the top of the figure represent the elution position of: Blue dextran 2000; dextrans of average molecular weight of 10^5 , 10^4 .

Abbreviation; IG, immature green; MG, mature green; T, turning; RR, red ripe. The flow rate was 0.7 ml/min and fraction volume was 5 ml .

터 분리한 pectin질을 화학적인 방법에 의하여 IAP와 CBP로 분획한 후 gel여과를 통한 개략적인 분자량변화를 살펴보았다.

고추과실이 연화되는 동안 세포벽 pectin을 구성하는 polyuronide는 IAP에서 보다 CBP에서 증가율이 높았는데 이것은 이와 결합한 hemicellulose의 분해에 기인하였고 이 hemicellulose분해물 중에서는 galactose가 가장 많았다.

IAP의 개략적인 평균분자량은 성숙 연화하는 동안 60만에서 250만으로 고분자화하였고 CBP는 450만에서 20만으로 저분자화하였는데 CBP저분자화의 주된 원인은 이에 결합된 hemicellulose의 분해에 기인되는 것 같았다.

참 고 문 헌

1. Bartley, I.M. and Knee, M.: *Food Chem.*, **9**, 47(1982)
2. Huber, D.J.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **108**(3), 405(1983)
3. Kim, S.D., Kang, M.S. and Kim, K.S.: *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **14**(2), 157(1985)
4. Ginsburg, B.Z.: *J. Exp. Bot.*, **12**, 85 (1961)
5. Letham, D.S.: *Exp. Cell Res.*, **27**, 352 (1962)
6. Monro, J.A.: *Phytochem.*, **15**, 1193(1976)
7. Jarvis, M.C., Hall, M.A., Threlfall, D.R. and Friend, J.: *Plant*, **152**, 93(1981)
8. Pressey, R.: *Plant Physiol.*, **71**, 132(1983)
9. Jermyn, M.A. and Isherwood, F.A.: *J. Biochem.*, **64**, 123(1956)
10. Selvendran, R.R.: *Phytochem.*, **14**, 1011 (1975)
11. Jarvis, M.C.: *Planta*, **154**, 344(1982)
12. Gross, K.C. and Wallner, S.J.: *Plant Physiol.*, **63**, 117(1979)
13. Ahmed, A.E. and Labavitch, J.M.: *J. Food Biochem.*, **1**, 361(1977)
14. Bitter, T. and Muir, H.M.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330(1962)
15. Lehrfeld, J.: *Anal. Biochem.*, **115**, 410 (1981)
16. Spiro, R.G., In "Methods in Enzymology" (Neufeld, E.F. and Ginsburg, V, eds): Academic Press, N.Y., **8**, 4(1966)
17. Lee, S.W.: *J. Kor. Sci. Hort.*, **9**, 13 (1971)