

효소에 의한 사과 세포벽 펙틴 추출

최동원

경민전문대학 식품영양과

A Study on Pectin Extraction from Apple Cell Wall by Enzyme

Dong-Won Choi

Dept. of Food and Nutrition, Kyung-Min Junior College, Uijeongbooo ,Kyung Gi-Do, 480-702 Korea

Abstract

Two methods were used to extract pectin from apple cell wall by enzyme(Hemicellulase) and by acid. Hemicellulase was used to extract high functional pectin with higher degree of polymerization. The yield of weight of pectin by hemicellulase treatment was slightly higher than that by acid treatment. The optimal condition for extraction was accomplished by providing 1.5 grams of Hemicellulase at 38°C for 24 hours. The comparison of the pectin purity and the yield of extracts by the portion of galacturonic acid between two methods showed that the purity of pectin extracted by enzymatic method was lower than that by acid treatment.

Key words : pecim, hemicellulase

서 론

펙틴은 과채류의 세포벽에 존재하는 다당으로 과채류의 숙성 중 조직의 firmness, cohesiveness 및 이를 가공제품의 텍스처, consistency 등에 영향을 미친다. 펙틴은 젤화제, 안정제, 점증제 등 기능성이 뛰어나 식품에 널리 사용되고 있다.

펙틴은 일반적으로 물, EDTA, CDTA, ammonium oxalate, sodium hexametaphosphate 등, 산이나 알칼리 처리로 세포벽으로부터 단계적으로 추출할 수 있다. Renard 등은 사과 세포벽의 불용성 펙틴 물질 추출을 위해 여러 가지 화학적 방법을 검토한 결과, 묽은 알카리로 처리하는 것이 가장 효과가 높았고, 퀼레이트 시약인 CDTA도 55%의 펙틴 물질을 추출하지 못하였다고 하였다.¹⁾ 산업적으로는 이 같은 단계적 추출보다 수율을 높이고 생산원가를 줄이기 위하여 고온의 산용액으로 추출한다. 고온의 산용액(염산이나 질산용액)으로 불용성 프로토펙틴을 가수분해시키면, 펙틴을 비롯하여 중성다당류, 겹류, 탄닌물질 같은 다른 수용성 성분들이 같이 추출된다. 추출되는 펙틴의 양과 품질은 원료에 따라 다르며 추출조건에 큰 영향을 미친다. 추출율은 원료의 천연펙틴 함량에 따라 다르며, 건조 감귤류 겹질

은 22~27%, 건조 사과박은 8~11%이다. 펙틴의 추출에는 일반적으로 pH 1.5~2.5, 온도 70~100°C, 교반시간 30분~2시간의 조건이 사용된다. 그러나 산처리 방법은 수율이 높은 반면 펙틴의 중합도를 낮추어 펙틴의 기능성을 저하시키는 단점이 있다. 해결책으로는 세포벽 분해효소를 이용하여 펙틴을 선택적으로 추출하는 방법이 있다. 효소처리로 생산된 펙틴은 기능성이 뛰어나므로 각종 식품에 널리 사용될 수 있다. 따라서 효율적인 효소체계를 개발하는 경우, 펙틴 추출을 위한 기존의 산처리방법을 개선하는 획기적인 방안이 될 수 있으며, 이를 통하여 생산된 펙틴은 국제 경쟁력이 있는 제품이 될 수 있다.

본 연구는 Fig. 1과 같이 가정된 식물 세포벽 모델을 바탕으로 하여 기존의 펙틴 추출법인 산추출법과 hemicellulase 효소추출법을 비교한 결과이다. Hemicellulase는 박테리아에서 널리 발견되며, β -D-xylanase, β -D-galactanase, β -D-arabanase, β -D-mannanase 등이 있으며 그중 xylanase의 분포가 가장 넓다. 본 연구의 목적은 펙틴의 rhamnogalacturonan 골격을 유지하면서 다른 세포벽 구성 물질인 cellulose나 hemicellulosic xyloglucan 등을 효율적으로 제거하고 펙틴의 분자량, 즉 중합도를 높여서 기능성이 뛰어난 펙틴을 생

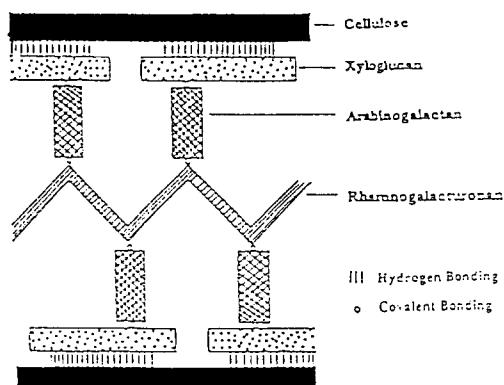


Fig. 1. Suggested scheme showing interconnections between the polysaccharides in the primary cell wall.

산하는 데에 있다. 산 및 효소 추출법의 페틴추출 수율과 추출물의 순도도 비교하였다.

재료 및 방법

1. WAIP(Water-Acid Insoluble Pectins) 제조

사과의 사과바과 씨를 제거한 후 종류수와 동량 혼합하여 빙서로 분쇄한 후, 여과포로 걸렸다. 걸러진 것을 에탄올에 담그어 약 20분간 끓인 후, 에탄올과 아세톤으로 씻은 다음 하루동안 건조하여 물·알코올 불용성 페틴(WAIP)을 제조하였다.

2. 페틴의 추출

제조한 WAIP에서 산추출법으로는 HCl로 acid-soluble pectins(HSP)을 추출하였고(Fig. 2), 효소추출법으로는 *Aspergillus orizae*의 hemicellulase(Sigma Co., H-2125, 0.051 units /mg solid)를 이용하였다. 그 과정은 Fig. 3 과 같다. 효소량과 반응시간, 반응온도 조건은 각각 달리하였다.

추출효율은 WAIP 무게에 대한 추출물의 무게의 비로 총량기준수율(%)을 나타내고, 105°C 건조법으로 건조된 WAIP 무게에 대한 건조된 추출물의 무게의 비로 건조량기준 수율로 나타냈다.

3. 페틴 순도와 수율 측정

페틴의 주골격은 폴리갈락투론산이므로, 추출물 내의 페틴 비율과 페틴 수율은 무수갈락투론산 양을 m-hydroxydiphenyl 법²⁾으로 측정하였다. (Fig. 4).

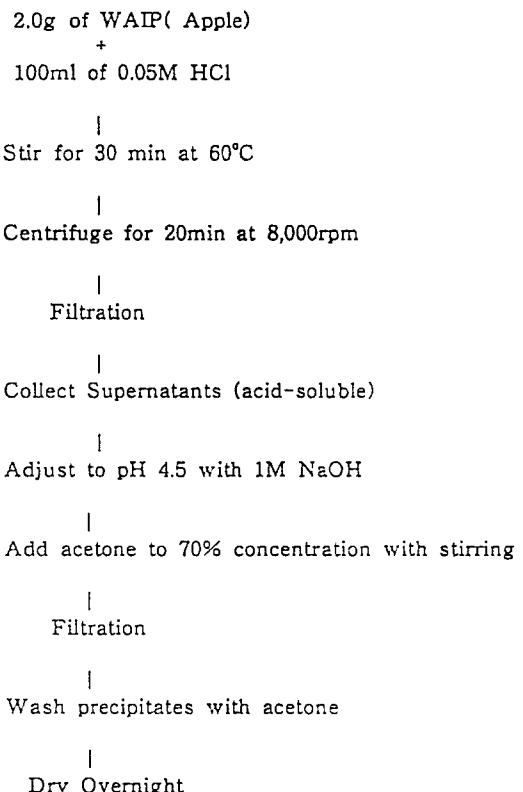


Fig. 2. Extraction process of acid-soluble pectin(HSP) from water-acid insoluble pectins(WAIP).

표준물질은 0.001~0.012% 갈락투론산을 사용하였다.

4. 페틴의 에스테르화도 측정

갈락투론산내 카르복실기의 에스테르화 정도, 즉 DE는 Klavons & Bennett 법³⁾으로 측정하였다. (Fig. 5) 표준 물질로는 0.001~0.010% 메탄올을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 수율

산추출법과 hemicellulase 추출법에 의한 페틴 수율은 Table 1과 같다. 수율은 total base yield 와 수분 함량을 제외한 dry base yield로 나타냈다. 추출 수율은 total base yield 나 dry base yield 모두 효소추출법이 7배 이상 높았다. 성상도 산 추출물과 효소 추출물은 확연히 구분되었다. 산 추출물은 진한 녹색을 띤 반면, 효소 추출물은 점성을 띤 듯한 물질이 군데군데 보

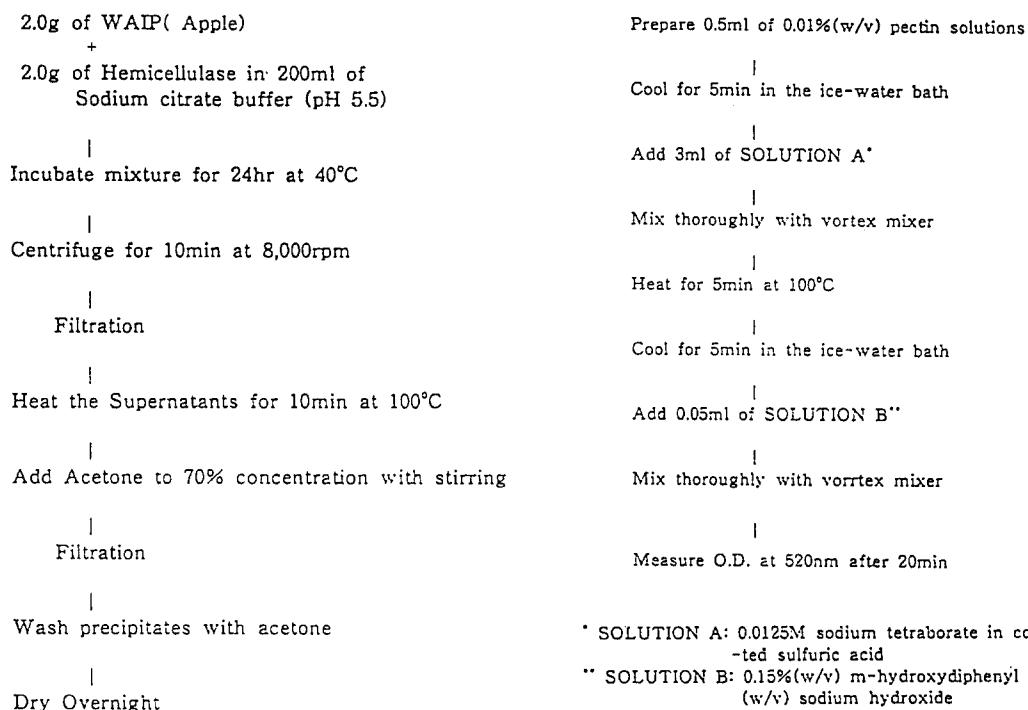


Fig. 3. Enzymatic extraction process of pectins from water-acid insoluble pectins(WAIP).

였고 색깔도 황토색을 띠었고, 전체적으로 덩어리 모양을 하였다. 펙틴 중합도가 클수록 점도가 증가한다. 이에 비추어 효소 추출물은 산 추출물 보다 중합도가 큰 펙틴이 첨가되어 있는 것으로 볼 수 있다.

효소량에 따른 추출 수율은 Table 2와 같이 Hemicellulase를 1.5g 첨가하였을 경우 최대를 나타냈다.

반응 온도(추출 온도)에 따른 추출 수율은 Table 3과 같이 26°C, 30°C에서 추출하였을 때보다 38°C에서 추출하였을 때 추출 수율이 2배 이상 증가였다.

반응 시간에 따른 추출 수율은 Table 4와 같았다. Renard 등⁴⁾과 마찬가지로 40°C에서 24시간 까지 반응 시킨 결과 반응 시간이 길수록 추출 수율은 높았다.

Table 1. Comparison of the yields of extractions for different extraction method

Extracts	total base Yield(%)	Dry base Yield(%)
Acid extract	11.24	10.06
Enzyme extract	82.21	77.69

* SOLUTION A: 0.0125M sodium tetraborate in concentrated sulfuric acid

** SOLUTION B: 0.15%(w/v) m-hydroxydiphenyl in 0.5% (w/v) sodium hydroxide

Fig. 4. m-Hydroxydiphenyl method for determining anhydrogalacturonic acid content of pectins.

Table 2. Comparison of the yields for the amounts of hemicellulases in the enzymatic extraction

Enzyme(g)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Total base yield(%)	46.86	62.15	78.24	70.80	45.40
Dry base yield(%)	40.13	46.14	57.77	48.39	34.85

Table 3. Comparison of the yields for the reaction temperature of hemicellulase in the enzymatic extraction

Reaction temperature	26	30	38
Total base yield(%)	23.73	32.03	69.02
Dry base yield(%)	17.61	25.06	52.93

Dissolve 3mg of pectin samples in 5ml of deionized water
 Add 5ml of 1.0 N potassium hydroxide solution
 Mix gently for 30min at room temperature
 Adjust to pH 7.5 with 5% (v/v) o-phosphoric acid
 Add 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) to 20ml of the total volume (STOCK SOLUTION)
 Pipet 1ml aliquots out of the stock solution
 Add 1ml of alcohol oxidase SOLUTION A*
 Incubate for 10min at 25°C
 Add 2ml of SOLUTION B**
 Mix thoroughly with vortex mixer
 Heat for 15min at 60°C
 Cool to room temperature
 Measure O.D. at 412 nm

* SOLUTION A: 1 unit of alcohol oxidase in 1ml of 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.5
 ** SOLUTION B: 0.02 M pentan-2,4-dione in 2.0 M ammonium acetate and 0.05 M acetic acid

Fig. 5. Enzymatic method for determining methoxyl content of pectins.

Table 4. Comparison of the yields for the reaction time of hemicellulase in the enzymatic extraction

Reaction time (hr)	13	15	18	21	24
Total base yield(%)	24.66	35.02	40.05	45.82	69.02
Dry base yield(%)	24.75	32.47	37.11	42.04	52.93

Table 5. Degree of pectin purity and yields of pectins of the extracts

Extracts	GA concentration (%)	Degree of purity(%)	Yields of pectins(%)
Acid extract	0.016	65.6	28.25
Enzyme extract	0.0033	12.5	46

2. 산 추출물과 효소 추출물의 페틴 순도

추출물의 페틴 순도는 galacturonic acid 함량으로 측정하였다. m-Hydroxybiphenyl법으로 산 추출물과 효소 추출물의 갈락투론산 함량을 측정한 결과는 Table 5와 같이 같은 양의 추출물에 대해 갈락투론산 함량은 산 추출물의 경우가 약 5배 가량 높았다.

Table 1의 추출 수율과 갈락투론산 함량을 이용하여 추출물들의 페틴 순도와 페틴 수율을 비교한 결과, 산 추출물의 경우는 페틴 순도가 65.6 (%)로, 12.5 (%)의 효소 추출물에 비해 상당히 높은 반면, 페틴 수율의 경우는 효소 추출물이 산 추출물보다 더 높았다. 이것은 효소 추출물이 산 추출물보다 7배 이상의 높은 전체 수율을 가졌기 때문으로 보인다.

위 실험 결과들은 산 추출물이 효소 추출물보다 페틴 순도가 더 높고, 효소 추출물이 산 추출물보다 페틴 수율이 높은 것을 보여주고 있다. 이것은 효소 추출시 페틴물질외의 다른 세포벽 물질이 상당 부분 함께 추출된 것을 의미한다.

3. 산 추출물과 효소 추출물의 메톡실 함량

페틴은 구조, 형태, 기능 등에 따라 분류할 수 있다. 그 중 가장 중요한 분류 방법의 하나는 페틴 분자 속의 전체 카르복실기에 대한 메틸에스테르화된 카르복실기의 퍼센트를 기준으로 한 분류 방법이다. 산 추출물과 효소 추출물의 메톡실 함량을 측정하고 그에 따른 에스테르화도를 계산한 결과는 Table 6과 같다.

효소적 방법으로 측정한 각 추출물의 농도는 모두 약 0.004 (% v/v)였다. 이를 메톡실함량 (% w/w)으로 계산한 결과 산 추출물과 효소 추출물은 각각 5.46, 5.66 (% w/w)로 저메톡실 페틴으로 나타났다. 또한 두 추출물의 에스테르화도는 Schultz의 방법⁵⁾으로 각각 32.79, 34.06%로 계산되었다. 일반적으로 시판페틴의 메톡실 함량은 10% 정도이고⁶⁾, 보통 가공 식품에 사용되는 페틴은 고메톡실 페틴, 즉 메톡실 함량이 7~14%에 이르는 것으로, 실험에서 추출된 저메톡실 페틴과는 다르다.

Table 6. Methoxyl contents and DE of the extract

Extracts	Methoxyl content (% w/w)	DE (%)
Acid extract	5.46	32.79
Enzyme extract	5.66	34.06

4. 효소 추출법에 대한 고찰

Renard 등⁴⁾은 사과 세포벽의 효소추출 페틴과 화학적 추출 페틴을 비교하여 pectin lyase가 가장 높은 페틴 추출 수율을 나타낸다고 하였다. 그들은 정제된 hemicellulase의 일종인 arabinanase와 galactanase 등으로 페틴 결사슬의 분해를 시도해 보았지만 적은 페틴밖에 얻지 못하였고, 람노갈락토로닉 골격에만 영향을 미치는 pectin lyase 단독 처리로 상당한 양의 결사슬 성분들이 함께 추출되었다고 하였다. 그들은 실험 결과를 토대로 기존의 세포벽 모델을 부인하는 결론을 내렸다.

본 실험에서 사용한 기존의 세포벽 모델에 따라 람노갈락토로닉 골격을 분해시키지 않으면서 페틴의 골격과 셀로로오스까지 함께 분해시켜 순수 페틴의 수율을 향상시키기 위해서 hemicellulase를 사용한 것이다. 본 실험에서는 산추출법과 효소추출법의 수율에 중점을 두었기 때문에 페틴 수율과 페틴 순도 비교를 제외하고는 추출물의 구체적인 내용물 분석이 이루어지지 않아서 기존의 세포벽 모델을 검증해 보기는 힘들었다.

세포벽 모델의 구체적인 정보를 얻을 수 있고, 높은 페틴 추출 효율을 얻기 위하여, 여러 혼합 hemicellulase를 사용하기 앞서 arabinanase, galactanase, cellulase 등의 정제효소를 단독 적용시켜 보면 결사슬의 결합 상태를 추측할 수 있다. 또 복합 다당을 분해하는 arabinogalactanase, xyloglucanase 등도 페틴 추출 효율을 높일 수 있다. 그리고 페틴 주골격의 분해가 페틴 추출 효율을 높이는 연구 결과도 있으므로 페틴분해 효소를 적절히 적용하면 수율이 증가될 것이다.

효소 추출물도 산 추출물보다 높은 불순물을 함유하고 있었다. 이 문제를 해결하기 위해서는 효소 추출 공정중에 불순물을 제거하기 위한 단계를 추가하거나 추출 후 별도의 추출물 정제 단계를 추가해야 할 것이다. 페틴을 정제하는 방법으로는 투석 알코올 침전법, 이온교환 크로마토그래피법, 금속침전법 등이 있다.

화학적 추출 공정과는 달리 본 효소 추출 공정에서는 WAIP를 곧바로 효소와 반응시켰기 때문에 WAIP 내의 불순물들이 효소 반응시 제거되지 못하고 덩어리로 남아있었다고 생각된다. Hwang 등⁷⁾은 금속 침전법으로 페틴 추출공정시 페틴의 다량의 불순물들을 효율적으로 제거하였다.

또한 효소 추출법은 반응 조건에 따라 결과에 차이가 많다. 따라서 효소 추출법은 반응 조건을 신중히 고려해야 되고 기질 선정도 신중해야 효율이 높다. 예를 들어 앞서 언급한 pectin lyase는 고 메톡실 페틴에 대한 활

성이 큰 반면, pectate lyase는 저 메톡실 페틴이나 페트산 등에만 작용한다. 따라서 페틴추출시 원료에 따라 효소를 적절히 선택해야 할 것으로 생각된다.

요약

식물 세포벽으로부터 페틴을 추출하는데 있어 페틴의 중합도를 높인 고 기능의 페틴을 추출하기 위해 페틴의 효소추출법을 사용하여 기존의 고온 산처리 페틴 추출법과 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 불용성의 WAIP로부터 일련의 산 추출 공정과 hemicellulase를 이용한 일련의 효소 추출 공정을 거친 결과, 추출물의 수율은 효소 추출법이 더 높았다.
- 효소 추출법에 있어 추출 조건을 다양하게 변화시켜 가며 수율을 검토한 결과, 최적의 추출 조건은 hemicellulase 1.5g을 24hr동안 38℃에서 반응시킨 것으로 나타났다.
- 페틴의 주요 성분인 galacturonic acid 함량으로 추출물의 페틴 순도와 수율을 비교한 결과 산 추출물에 비해 효소 추출물은 수율은 높은 대신 순도가 낮았고 메톡실 함량은 비슷하였다.
- 효소 추출법에서 추출한 페틴물질은 중성당 분석, GC, HPLC 등을 통해 성분을 정밀하게 분석하고 다양한 방법으로 고기능 페틴을 추출할 수 있는 조건도 찾고, 그를 통해 정확한 식물 세포벽 모델이 제시 될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Renad, C. M. G. C., Voragen, A. G. J., Thibault, J. F. and Pilnik, W., Extraction of Insoluble pectin by chemical means., *Carbohydr. Polym.*, **40**, 169 (1990).
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G., New Method for quantitative determination of uronic acid, *Anal. Biochem.*, **54**, 484 (1973).
- J. A. Klavons and R. D. Bennett., Determination of Methanol Using Alcohol Oxidase and Its Application to Methyl Ester Content of Pectins., *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 597-599 (1986).
- Renard, C. M. G. C., voragen, A. G. J., Thibault, J. F. and Pilnik, W., Comparison between enzymatically and chemically extracted pectins from apple cell walls, *Animal Feed Sci. Technol.*, **32**, 69-75 (1991).
- Schultz, T., Determination of the degree of esterification of pectin. *Methods in Carbohydr. Chem.*, **5**, 189 (1965).
- McCready, R. M., *J. Agr. Food Chem.*, **1**, 1166 (1953).

7. Hwang, J., Roshdy, T. H. and Kokini, J. L., Effect
of Metal Precipitation on Chemical Composition of
Pectins, *Foods and Biotechnology*, 1(2), 111-116
(1992).

(1992년 11월 18일 접수)