

## Protopectinase를 이용한 식물조직의 단세포화

이승철 · 고보성 · 이대희 · 황용일<sup>†</sup>

경남대학교 식품공학과

### Cell Separation of Vegetable Tissues by Protopectinase

Seung-Cheol Lee, Bo-Sung Ko, Dae-Hee Lee and Yong-Il Hwang<sup>†</sup>

Dept. of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

#### Abstract

Protopectinases are heterologous group of enzymes that degrades insoluble protopectin which consists of middle lamella between cells of plant tissues. Tissues of potato and carrot could be separated to single cells by addition of protopectinase isolated from *Rhizopus* sp. Color changes of the suspensions treated with protopectinase and mechanically macerated after 2 weeks at 4°C, were investigated. Color change of the latter was very serious, however, that of the former was insignificant. Furthermore, after heat treatment at 121°C for 5min, the constituents of mechanically macerated carrot suspension were separated into two layers, but those of single celled carrot were not. Yields of carrot juices extracted from single celled suspensions and mechanical maceration were 93.6% and 56.0%, respectively. These results support that treatment of protopectinase can increase yield of juices extracted from plant, and manufacture high value-added products in food processing.

**Key words:** protopectinase, *Rhizopus* sp., single cell suspensions

#### 서 론

식물 세포의 형태 유지 및 특성에 중요한 역할을 하는 세포벽은 cellulose, hemicellulose, pectic substance 등의 탄수화물로 구성되어 있다. 이들 탄수화물들을 구성하는 당당류는 β-결합으로 연결되어 있어 자연상태에서 대체로 분해되기 힘들다. 이들의 대사에 관여하는 효소들이 발견되어 효소를 이용한 산업적 이용이 가능하여졌다. 식품산업에서의 경우, cellulase를 이용한 주류제조공정의 개선(1), pectinase를 이용한 과즙의 청징화(2), 세포벽 분해효소혼합물을 이용한 수용성 고형분 함유식품의 제조공정의 효율성 제고(3) 등에 응용되고 있다.

Pectic substance는 식물조직 중에 다양하게 분포하며, galacturonic acid와 methanol을 주성분으로 하는 heteropolysaccharide로서, 세포벽에서 윤활작용 또는 점착역할을 하는 것으로 알려져 있으며(4), 과실의 숙성(5), 식품가공에서의 역할(6,7), 영양성 섬유로서의 기능 등이 연구되어 있다. Pectic substance는 화학적,

물리적 성상으로 protopectin, pectin(pectinate), pectic acid(pectate) 등으로 나눌 수 있으며, 서로간에 밀접한 관계를 갖는다(Fig. 1).

Protopectin은 불용성으로 pectin의 모체가 되며, 식물세포에 있어 세포와 세포간의 중엽부(middle lamella)의 주성분을 이루고 있으며, 식물체가 숙성됨에 따라 일부가 가용성 pectin으로 전환된다. Protopectin은 pectin에 비해 매우 큰 분자량을 가지며, 카르복시기와 세포벽의 다른 성분들의 수산기와 에스테르 결합을 형성한다. Protopectin을 제한 가수분해하여 수용성 펙틴을 생산하는 효소를 pectin-releasing enzyme, protopectin-solubilizing enzyme, 또는 protopectinase(PPase)라고 명명하고 있으며(8,9) 그 작용기작과 종류가 보고되고 있다(10-13). PPase의 기원은 다양하며 특히 식물의 부패에 관여하는 미생물에 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며, cellulose와 결합된 펙틴의 중성당 결사슬을 분해하거나, homogalacturonan부분을 분해한다(10-13). PPase는 최근 식품, 의약산업에서의 pectin생산(14,15), 식물성 식품소재에 대한 단세포화(16), 식물세포의 pro-

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

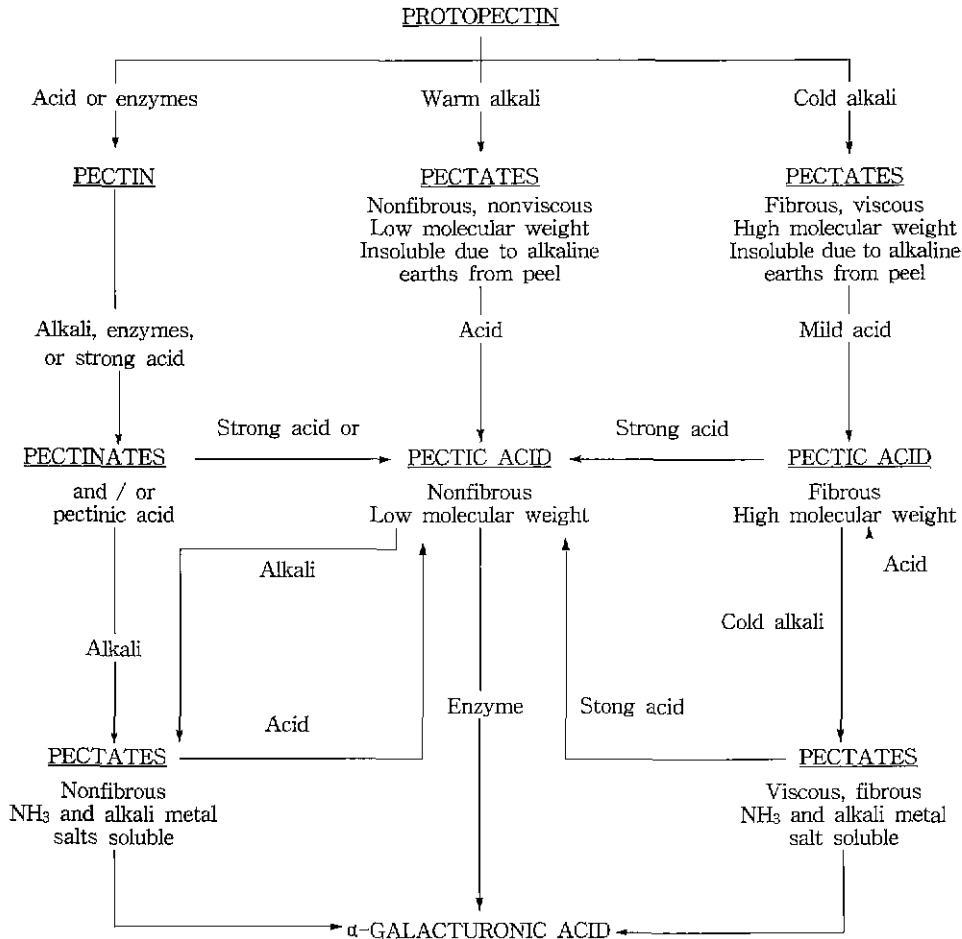


Fig. 1. Schematic illustration for interrelationship of the pectic substances.

toplast 생산(17) 등에 응용성을 가진다고 보고되었으며, 그 중요성은 점차 증가하고 있다.

본 연구진들은 이미 PPase를 생산하는 *Rhizopus* sp.를 토양에서 분리하였으며(18), *Bacillus subtilis* IFO 12113의 배양액으로부터 유가용매를 이용하여 대량 추출하였다(19). 본 연구에서는 *Rhizopus* sp.로부터 생산된 PPase를 여러 식물 조직에 적용시켜 단세포화를 유도하고, 단세포화된 식물 세포의 색도 및 열안정성 등의 가지적인 물성변화를 조사하여 식물성 식품소재의 이용성 증대에 대한 가능성을 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시약

본 연구에서 이용한 비교표품 PPase는 일본의 Yakult

사에서 구입한 Macerozyme-10을 사용하였다. 미생물의 생육배지용 시약은 Difco사에서 구입하였으며, acetone, dextrose, citric acid 등의 시약은 특급품을 구입하여 사용하였다. 단세포화를 위한 감자, 당근 등의 채소는 경남대학교 인근 재래시장에서 구입하여 사용하였다.

#### PPase 생산균주 및 전배양

PPase 생산균주는 경남 마산 부근의 토양으로부터 분리된 *Rhizopus* sp.의 PPase 생산균주 중 효소 생산능이 우수한 것으로 나타난 균주를 선택하였다(18). 균주의 보존은 PDB(Potato dextrose broth; potato 30%, dextrose 2%, initial pH 5.5) 사면배지에 접종하여 보존하였으며, 효소 생산용 전배양은 PDB액체 배지에서 하룻밤 배양하여 사용하였다.

### PPase 건조분말 제조

PPase 생산균주의 전배양액을 200g 왕겨배지(왕겨 : 수돗물=60 : 40)에 옮겨 집중한 후 1일 3회씩 용기를 가볍게 흔들며, 교반하면서 5일간 배양하고 배지의 양에 2.5배에 해당하는 40°C 온수 500ml를 넣어 교반한 후 탈지면을 이용하여 여과하고 5,000rpm(2,881×g)으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이후 상등액의 양의 55%에 해당하는 아세톤을 서서히 첨가하여 하룻밤 정치한 후 12,000rpm(12,000×g)으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물은 동결건조기에서 동결건조하여 PPase 건조분말을 회수하여 식물조직의 단세포화에 이용하였다.

### 식물조직의 단세포화

PPase 건조분말을 0.5%가 되도록 증류수에 용해한 후 효소용액에 대해 10% 구연산용액으로 pH 4가 되게 보정하여 효소용액을 제조하였다. 50ml의 효소용액에 식물조직시료를 직경 1×1×1cm<sup>3</sup> 절단하여 5조각 넣은 후 40°C 진탕 배양기에서 1시간 30분 반응시켜 단세포화하였다(18). 대조구는 효소를 첨가하지 않은 증류수에 동일량의 시료를 넣고 homogenizer(Nihonseiki Co.)로 10,000rpm에서 10분간 마쇄하였다.

### 색조변화 관찰

당근조직에 PPase를 처리하여 단세포화된 야채즙과 기계적으로 마쇄하여 얻은 야채즙을 4°C 냉장고에서 2주간 냉장보관한 후 색조의 변화를 관찰하였다.

### 열안정성 관찰

당근조직에 PPase를 처리하여 단세포화된 야채즙과 기계적으로 마쇄한 야채즙을 얻은 후 가압살균용 autoclave를 이용하여 121°C에서 5분 가열처리하여 열안정성을 관찰하였다.

### 회수율 측정

당근조직에 PPase를 처리하여 단세포화시킨 야채즙과 기계적으로 마쇄한 후 얻은 야채즙의 회수율을 비교하였다. 시료에 PPase를 처리하여 조직 전체를 죽화시킨 후 삼베천을 이용 착즙하여 과즙을 얻었다. 대조구는 homogenizer(Nihonseiki Co.)로 마쇄한 후 마쇄물을 위와 동일한 방법으로 착즙하여 과즙을 얻었다. 회수율은 건물의 중량에 대한 착즙 후 잔사의 중량비를 백분율로 환산하여 표시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 식품소재를 이용한 단세포화

PPase를 생산하는 토양곰팡이 *Rhizopus* sp.의 배양액으로부터 PPase 건조분말을 회수하여 감자조직에 처리하여 현미경으로 관찰하였다(Fig. 2). PPase가 처리된 경우에는 효소작용에 의해 조직세포가 단일의 세포로 유리되어 넓게 분포하고 있으며 동일한 크기의 세포로 분리되어 액상에서의 균일성을 보여주고 있다. 이는 PPase가 식물의 중엽부에 존재하는 protopectin을 분해하여 세포와 세포를 유리하는 것을 보여주는 것으로 식물성 식품소재에 대한 효소처리의 가능성을 보여주고 있다. 비교군인 기계적으로 마쇄한 경우에는 이와 대조적으로 조직을 구성하는 여러 세포가 기계적 작용에 의해 파괴되어 있으며 마쇄된 형태가 불규칙적이고 세포구조가 확인되지 않았다. 또한, 감자의 경우 전체 조직의 많은 부분이 전분질임을 감

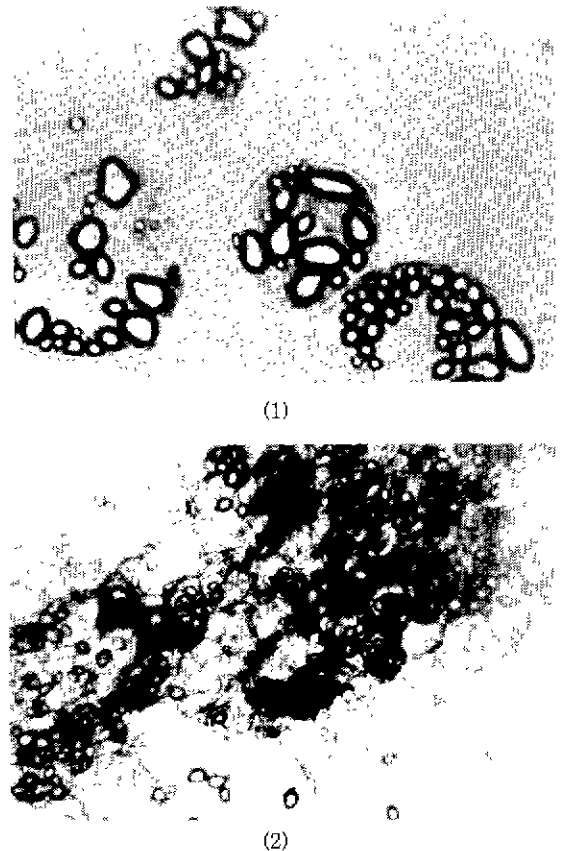


Fig. 2. Microphotographs of potato suspensions at different treatments.  
(1): Treated with protopectinase(×50)  
(2): Mechanically macerated(×100)

안할 때, 이들 전분입자들이 PPase로 처리된 단세포화 물에서는 세포내의 타원형의 파괴상태로 관찰되었으나 마쇄물에서는 전분 과립이 훨씬 적은 입자형태로 관찰되었다. 상기 결과에서, PPase는 식물조직으로부터 세포벽을 파괴하지 않으면서 단세포 형태로 세포를 유리시키며, 세포내의 기능성, 영양성 성분 등과 관련된 세포 고유의 구성물질들이 단세포 내에 함유되어 있음을 보여준다. 일반적으로 행해지고 있는 식물조직의 기계적 마쇄물에서는 세포 내의 성분의 파괴된 세포로부터 방출되어 존재하는 것을 확인할 수 있으며, 이를 통해 영양성 성분의 외부유리로 인한 영양성, 기능성의 손실을 추측할 수 있다.

당근조직에 대한 PPase 처리에서도 단세포화를 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 단세포화된 결과에서 감자에서의 경우와 같이 유리된 당근 세포를 관찰할 수 있었으며, 단세포화된 세포의 형태는 대부분이 타원형인 감자와는 달리 비교적 다양한 형태이었다. 당근의 단세포물에서 감자의 경우와는 달리 뚜렷한 전분 과립체가 발견되지 않았으나 당근의 유색색소체인 카로티노이드가 주황색으로 관찰되었으며, 다른 식물성 식품소재에 대한 PPase의 처리에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다(미보고 결과). 이상의 결과에서 PPase 처리가 식물조직으로부터 단세포를 유리할 수 있으며, 세포 구성물질을 세포내에 함유할 수 있음을 확인하였다.

색조변화

당근의 색소체인 카로티노이드는 천연색소로서 가시적으로 쉽게 확인할 수 있을 뿐 아니라 비타민 A의 전구체로서 당근의 중요한 영양적 성분이 되는 물질이다. 효소처리에 의한 당근의 단세포물에서 색소의 안정성을 검토하기 위하여 장기저장을 하며 관찰하였다(Fig. 4). PPase를 처리하여 얻은 과즙과 기계적 마쇄

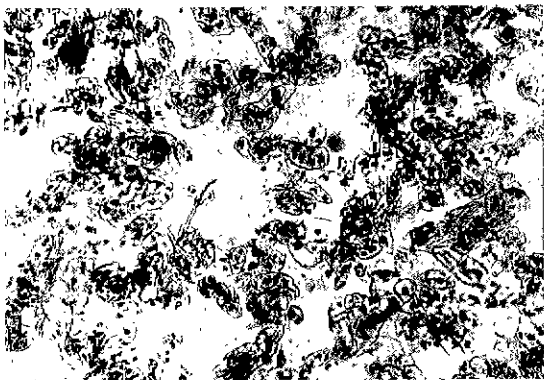


Fig. 3. Microphotograph of carrot suspensions treated with protopectinase(×50).

에 의한 과즙을 4°C에서 2주간 보관하여 색조의 변화를 관찰한 결과, PPase를 처리한 경우는 2주 보관 후에도 색조가 보존되었지만 기계적 마쇄의 경우에는 변색이 되었다. 이는 Fig. 3에서와 같이 당근 세포내의 색소체인 carotenoid가 PPase 처리의 경우에는 두터운 세포벽과 세포막에 쌓여 보호되나, 기계적 마쇄의 경우에는 세포의 파괴에 의하여 세포의 용액으로 유리되어 외부요인에 노출되었으며 이로 인해 변색이 일어난 것으로 추측되어진다. 상기의 결과는 식물세포내의 성분이 PPase를 처리한 경우에는 세포내에 그대로 존재하여 외부요인에 대해 보호될 수 있으나, 기계

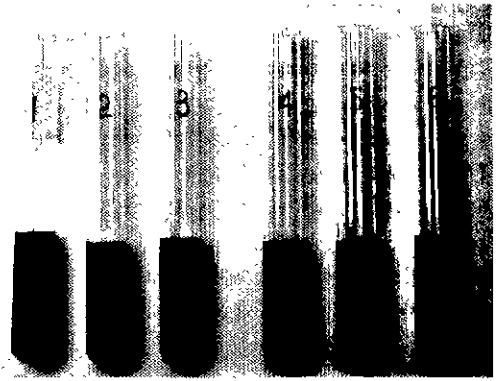


Fig. 4. Color changes of carrot suspensions treated with protopectinase of *Rhizopus* sp.(1,4), macerazyme (2,5) and mechanically macerated(3,6). No 1, 2, and 3 are samples just after preparation, and No 4, 5, and 6 are those of after preservation at 4°C for two weeks.

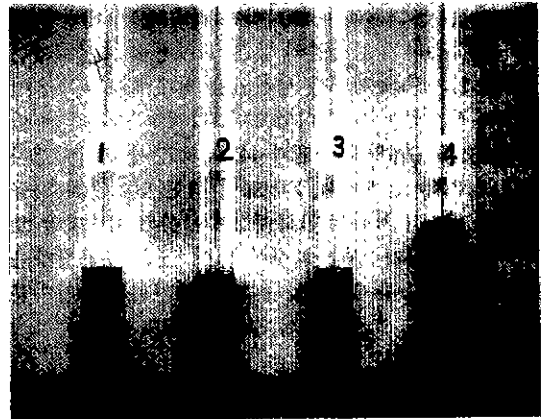


Fig. 5. Heat stability of carrot suspensions at different treatments. (1): Treated with protopectinase without heating, (2): Mechanically macerated without heating, (3): Treated with protopectinase after heating(121°C, 5min), (4): Mechanically macerated after heating(121°C, 5 min.)

적 마쇄에 의한 경우에서는 세포내 구성분이 노출되어 쉽게 변화될 수 있음을 알 수 있다. 따라서 식물세포를 가공할 때, PPase로 처리하면 일반적 기계마쇄에 의한 공정 보다 세포내에 존재하는 일반 구성물질 및 영양물질이 세포내에 안정된 상태로 유지됨을 의미한다.

### 열안정성 비교

열처리 공정은 식품가공 중에 흔히 행해지는 조작이다. PPase 처리에 의한 단세포화물의 열안정성을 조사하기 위해 일반적인 멸균 처리조건인 121°C에서 5분간 가압멸균기에서 가열한 후, PPase에 의한 당근의 단세포화물과 기계적 마쇄물의 변화를 관찰하였다(Fig. 5). 기계적 마쇄의 경우에는 가열처리 후에는 내용물의 열변성의 결과로 유수분리와 같은 두개의 층으로 극명한 분리가 일어났으나, 단세포화물은 가열 후에도 열에 의한 가시적인 변화가 거의 없음을 보여주고 있다. 이상의 결과는 PPase에 의해 생성된 단세포화물이 멸균 또는 가열과 같은 식품의 산업적 가공에 별다른 영향을 받지 않을 뿐 아니라 가공 중에 발생하는 내용물의 품질변화 및 층분리를 방지할 수 있어 식물성 식품 소재의 가공 및 응용에 유리함을 의미한다.

### 회수율 측정

과일과 채소류에 대한 가공 중, 과즙 제조공정에서는 착즙 후 잔사물(찌꺼기)이 부산물로 발생하며 이들 폐기물을 줄이는 것은 착즙율의 향상 및 환경 오염물질의 감소라는 측면에서 바람직하다. 당근의 가공시, PPase처리와 기계적 마쇄처리를 거친 후, 삼배천을 이용하여 착즙하여 잔사물의 양 및 회수율을 조사하였다(Table 1). PPase처리를 행하였을 경우에는 회수율이 93.6%, 잔사물이 6.4%이었으나, 기계적 마쇄를 행한 경우에는 56.0%의 회수율과 44.0%의 잔사물이 발생하였다. 상기의 결과에서, PPase에 의한 단세포화 가공시에는 기계적 처리에 비하여 2배 이상의 회수율을 보여 PPase처리가 과즙 회수에 있어 높은 수율향상을 가져올 수 있음을 알 수 있다. 또한 폐기화되는 잔사물의 경우에서도 효소처리의 경우 6.4%로 기계적 마쇄

한 경우의 44.0%에 비해 착즙 후의 폐기물량이 약 7배감소되었음을 보였다. 기존의 과즙생산 과정은 과실 중의 과피를 제거하고 가식부를 마쇄한 후 착즙하는 공정을 취하고 있으므로, 과즙제조시 PPase에 의한 효소처리가 착즙의 수율 향상과 아울러 폐기물 감소의 장점이 있었다.

이상의 연구결과에서 PPase는 식물조직으로부터 파괴되지 않은 단세포를 유리할 수 있으며, 저장기간 중 세포내 성분의 변화를 억제하며, 내열성 향상을 유발하였다. 또한 과즙제조시 수율향상과 더불어 폐기물을 감소시켜 식물성 소재에 대한 이용성을 증대시켜 경제적인 측면에서도 적합함을 알 수 있었다. 따라서 PPase를 산업적으로 이용할 경우 식품제조 가공공정에 많은 장점을 부여할 수 있으며, 기능성 및 영양성 측면에서도 고부가가치의 기능성 식품제조에 적합하리라 생각된다.

## 요 약

Protopectinase는 식물조직의 세포사이의 중엽부를 구성하는 불용성 protopectin을 분해하는 효소이다. 토양으로부터 분리한 *Rhizopus* sp.에서 얻어진 protopectinase를 감자 및 당근 조직에 작용시켜 고유의 세포내 성분들이 함유된 파손되지 않은 단세포를 유리하였다. Protopectinase로 처리된 당근 단세포화물을 4°C에서 2주간 저장하며 색조를 관찰한 결과, 기계적 마쇄물에서는 변색이 되었으나 단세포화물에서는 변색이 되지 않았다. 또한 protopectinase로 처리된 당근 단세포화물을 121°C에서 5분간 열처리한 후 관찰한 결과, 기계적 마쇄물에서는 구성 성분들이 분층화되었으나 단세포화물에서는 변화가 보이지 않아 높은 열안정성을 나타내었다. 당근조직으로부터 제조된 단세포화물의 착즙 후 관찰된 회수율과 잔사물은 각각 93.6%와 6.4%로써, 기계적 마쇄물에서의 56.0%, 44.0%에 비하여 높은 회수율과 낮은 잔사율을 나타내었다. 이 결과는 protopectinase에 의해 제조된 단세포화물이 식품제조 가공공정의 효율성 제고와 고부가가치의 기능성 식품 제조에 이용될 수 있음을 의미한다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 농업진흥청 농업특정연구과제 연구비의 지원에 의하여 수행된 연구결과와 일부이며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1 Nielsen, E. B. : Brewing with barley and enzymes-A

Table 1. The ratio of recovery and waste from suspensions treated with enzymes and mechanical maceration

	Recovery (%)	Waste (%)
PPase treated suspension	93.6	6.4
Macerozyme treated suspension	94.2	5.8
Mechanically macerated suspension	56.0	44.0

- review. *Proc. Eur. Brew. Conv.(Estoril)*, **15**, 149(1971)
2. Kertesz, Z. I. : A new method for enzymic clarification of unfermented apple juice. New York State Agricultural Experimental Station(Geneva) Bull. No. 689. U.S. Patent No. 1. 932. 833(1930)
  3. Rombouts, F. M. and Pilnik, W. : Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem.*, **13**, 9 (1978)
  4. Rees, D. A. and Wight, N. J. : Molecular cohesion in plant cell walls. *Biochem. J.*, **115**, 431(1969)
  5. Knee, M. : Metabolism of polymethylgalacturonate in apple fruit cortical tissue during ripening. *Phytochemistry*, **17**, 1261(1978)
  6. Rombouts, F. M. and Pilnik, W. : Utilization of pectic enzymes in food production. *Dev. Food Sci.*, **2**, 264 (1979)
  7. Van Buren, J. P. : The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Text. Stud.*, **10**, 1(1979)
  8. Dore, W. H., Brinton, C. S., Wichmann, H. J., Willaman, J. J. and Wilson, C. P. : Definitions written by the committee on nomenclature of pectin. *J. Am. Chem. Soc.*, **49**, 38(1927)
  9. Sakai, T. and Okushima, M. : Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2427(1978)
  10. Sakai, T. and Okushima, M. : Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 667(1982)
  11. Sakai, T. and Yoshitake, S. : Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reessii* strain L. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1941(1984)
  12. Sakai, T., Okushima, M. and Yoshitake, S. : Purification crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1951(1984)
  13. Sakai, T. and Sakamoto, T. : Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity on sugar beet protopectin. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 879(1990)
  14. Miyazaki, H. and Terata, I. : Treatment of waste rind of citrus fruits and extraction of the components. *Shokuhin Kogyo*, **17**, 81(1974)
  15. Sakai, T. and Okushima, M. : Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 908(1980)
  16. Sakai, T., Hours, R. and Nakamura, T. : Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J. Food Sci.*, **60**, 468(1995)
  17. Mitsui, T., Hashimoto, N., Deguchi, K., Hirano, M. and Igau, I. : Isolation of plant mesophyll protoplasts with an endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum*. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **7**, 14(1990)
  18. Lee, S. C., Ko, B. S., Kim, H. M., Kim, K. W. and Hwang, Y. I. : Isolation and characterization of protopectinase producing mold. *Microorganisms and Industry*, In press (1997)
  19. Lee, S. C., Yuk, H. G. and Hwang, Y. I. : Recovery yields of protopectinase depending on treatments of organic solvents. *Agric. Chem. Biotechnol.*, **40**, 107(1997)

(1997년 2월 20일 접수)