

효소처리에 의한 유자 고미성분 제거의 최적 조건 연구

김용두[†] · 김경제
순천대학교 식품공학과

Optimum Condition for Removing Bitter Substance of Yuzu(*Citrus junos*) by Enzyme Treatment

Yong Doo Kim[†] and Kyung Je Kim

Dept. of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

The content of naringin and hesperidin of Yuzu were 95.54 and 103.99 in peel ; 65.77 and 77.18 in flesh ; 16.49 and 15.88 mg% in seed, respectively. When 10 mg% of naringin and 5 mg% hesperidin were treated with 10.0 units naringinase and 2.0 units of hesperidinase, they were decreased to 0.11 and 0.45 mg%, respectively. One percent of Japanese naringinase digested naringin and hesperidin that their final concentration were 0.54 and 0.09 mg% in 30 minutes, while 5% Amorepacific enzyme did until 0.26 and 0.04 mg%, respectively.

Key words : Yuzu(*Citrus junos*), bitter substances, naringin, hesperidin, naringinase

서 론

Naringin은 자몽, 왕귤나무, 여름밀감, 유자 등의 감귤류과 식물의 미숙과실, 꽃, 바깥 껍질 등에 함유되어 있는 flavonoid 배당체로 고미성분의 주체로 알려져 있다. Naringin은 과실이 완숙됨에 따라 naringinase에 의한 가수분해로 naringenin으로 되어 고미가 없어지게 된다(1). 그러나 수확후에도 과실의 종류와 산지, 수확시기에 따라 과실에 남아있는 naringin의 양이 다양하다.

감귤류의 일종으로 잘 알려진 유자(*Citrus junos*)는 쓴맛이 강하여 향기, 비타민 및 무기질 성분 등이 풍부하게 함유되어 있음에도 불구하고 그 기호성이 떨어져 유자를 이용한 가공제품 개발에 어려움을 주고 있다. 유자에 관한 국내의 연구로는 일반성분, 아미노산 및 화학적 성분에 관한 연구(2-4), 착즙방법에 따른 유자과즙의 품질 비교와 유자 착즙액의 화학적 특성(5-7), 제주 재래종 감귤류 미숙과의 neohesperidin, naringin 및 hesperidin 함량에 대한 보고(8) 등이 있으며 외국의 연구로는 유자의 저장성(9), 유자과피 색조 조성의 계절적 변화(10)와 감귤류에 함유된 limonoid 성분(11-15)에 관한 것 등이 보고되어 있다. 이에 유자의 고미 성분 중의 하나로 알려진 naringin과 감귤류 시럽 제조시 백

탁의 원인물질로 알려진 hesperidin의 제거를 위한 효소의 선택과 효소분해의 최적 조건을 찾고자 naringin과 hesperidin 표준물질을 대상으로 시판되고 있는 naringinase와 hesperidinase, 복합효소를 이용하여 조사하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 유자는 2001년 11월에 전남 고흥군 풍양면에서 수확한 중량 120 g내외의 생과를 구입하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였으며, 유자 착즙액은 수확 후 착즙하여 냉동 보관한 것을 전남 고흥군 두원 농협에서 구매하여 사용하였다.

사용시약

본 실험에서 naringin과 hesperidin 표준물질과 naringinase와 hesperidinase는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, 고미성분 제거 효과를 비교하기 위해 복합효소로서 Naringinase는 天野製藥株式會社(Japan) 제품을, Viscozyme L과 Ultrazyme 100G는 Novo Nordisk Ferment Ltd.(Switzerland) 제품을 사용하였으며, 탁주용 당화 효소는 Amorepacific Co.(Korea) 제품을 사용하였다. 추출, 분석 및

[†]Corresponding author. E-mail : kyd4218@sunchon.ac.kr,
Phone : 82-61-750-3256, Fax : 82-61-750-3256

chromatography용 시약은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

Naringin 과 hesperidin의 분석

유자의 고미와 백탁의 원인으로 알려진 flavonoid 배당체인 naringin 및 hesperidin의 측정은 유자의 각 부위별 10 g에 증류수를 가하여 homogenizer로 마쇄한 후 100 mL로 정용한 다음 80°C 항온수조에서 30분간 가온 추출하고 원심분리 (15,000 rpm, 30 min)시켜 상등액을 취하여 Sepak C₁₈ 카트리지로 정제시킨 다음 0.45 µm membrane filter(Millipore Co. USA)로 여과한 여액을 HPLC를 이용하여 분석하였다(14-16). 분석조건은 Table 1과 같으며, 함량은 외부표준법으로 계산하였다.

Table 1. The operating conditions of HPLC for naringin and hesperidin

Items	Conditions
Instrument	Waters Associate (USA)
Detector	UV 280 nm
Column	Symmetry C18 5 µm (Waters Co., 4.6 × 250 mm)
Mobile phase	Acetonitrile : Water = 20 : 80
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	30 µL

효소처리 최적조건 검색

효소처리 최적조건을 알아보기 위해 naringin 60 mg을 40°C로 가온한 증류수 100 mL에 녹이고 naringinase 1, 10, 20, 30 units를 각각 첨가한 후 40°C 항온수조에서 2시간동안 반응시키면서 30분 간격으로 naringin의 잔량을 측정하였다.

복합효소의 naringin 및 hesperidin 분해능 비교

현재 시판되고 있는 naringinase와 탁주용 당화효소 그리고 Viscozyme L과 Ultrazyme 100G의 각 제조사별 복합 효소의 naringin 과 hesperidin의 분해능을 보기 위하여 표준효소와 비교하였다. 즉 naringin 10 mg을 40°C로 가온한 증류수 100 mL에 녹이고, hesperidin은 1N-NaOH를 이용하여 pH 11.0으로 조정된 증류수 100 mL에 5 mg을 완전히 녹인 다음, 다시 1N-HCl을 이용하여 각각의 효소활성 최적 조건인 pH 4.0과 3.8로 한 후, 이미 역가를 알고 있는 표준 naringinase(320 units/g)와 hesperidinase(7 units/g)를 각각 6.0 units와 2.0 units로 고정시켜 첨가하여 40°C 항온수조에서 30분간 반응시켰으며, 반응 이후 효소의 활성을 억제하기 위해 95°C에서 15분간 가열처리하였다.

또한 각 제조사별 복합효소의 경우는 단백질로 환산하여 동량의 농도로 조절하여 Table 2와 같이 각각 첨가한 후 표

준효소와 똑같이 처리하여 naringin과 hesperidin의 잔량을 측정하여 비교하였다.

Table 2. Conditions for various enzyme complex treatment

Enzymes	Added amount (%)			
A ¹⁾	0.1	1	3	5
B ²⁾	0.1	1	3	5
C ³⁾	-	-	-	0.025
D ⁴⁾	-	-	-	0.01

¹⁾A : Naringinase(Japan).

²⁾B : Amorepacific enzyme.

³⁾C : Viscozyme.

⁴⁾D : UltraZyme 100G.

결과 및 고찰

유자 부위별 naringin 과 hesperidin 함량

유자의 부위별 naringin 과 hesperidin의 함량은 Table 3에 나타낸 바와 같이 과피가 95.54 mg%, 103.99 mg% 과육이 65.77 mg%, 77.18 mg%, 씨에는 16.49 mg%, 15.88 mg% 순으로 각각 검출되었으며, naringin과 hesperidin 모두 과피에서 가장 많았다. 또한 유자즙에는 naringin 61.94 mg%, hesperidin 이 9.98 mg% 의 함량을 보였다. 이는 James 등 (16)이 보고한 자몽과 비교해 볼 때 다소 적은 양이다.

Table 3. Contents of naringin and hesperidin of Yuzu

Component	Peel	Flesh	Seed	Yuzu juice (mg%)
Naringin	95.54	65.77	16.49	61.94
Hesperidin	103.99	77.18	15.88	9.98

효소처리 농도별 naringin 제거 효과

유자내 고미원인 물질의 한 종류로 알려진 naringin을 제거하기 위한 naringinase 첨가의 최적조건을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 naringin 60 mg을 40°C로 가온한 증류수 100 mL에 녹이고, 이에 naringinase(Sigma Co. USA)를 1.0, 10, 20, 30 units를 각각 첨가하여 40°C에서 반응시킨 후 naringin량을 HPLC를 이용하여 측정한 결과 naringinase 10 units 첨가구의 경우 반응 30분 후에 24.2 mg%, 1시간 후에 15.9 mg%, 1시간 30분 후에 5.9 mg%로 감소하였으며, 2시간 이 경과하면서 대부분 분해되었으며, 20 units와 30 units의 경우는 90분이 경과하면서 거의 대부분 분해되었다.

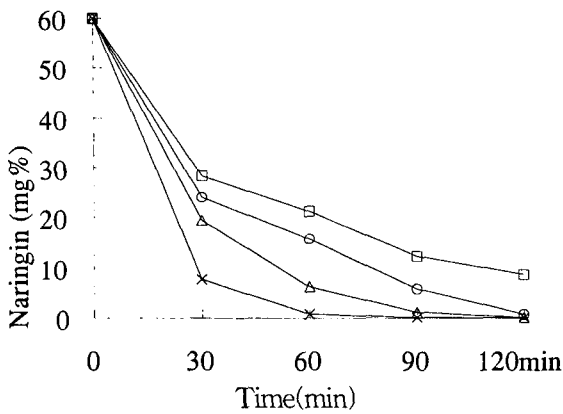


Fig. 1. Change in contents of the naringin by reaction at 40°C.

□ : 1 unit, ○ : 10 units, △ : 20 units, × : 30 units.

Table 4. Contents of naringin and hesperidin treated with various enzyme complex for 30 min

Enzymes	Enzyme amount(%)	Naringin (mg%)	Hesperidin (mg%)
	Control	10	5
Naringinase (Sigma Co. U.S.A)	10.0 units	0.11	-
Hesperidinase (Sigma Co. U.S.A)	2.0 units	-	0.45
	0.1	8.68	3.26
Naringinase (Japan)	1.0	0.54	0.09
	3.0	0	0
	5.0	0	0
	0.1	9.52	4.68
Amorepacific enzyme	1.0	7.54	1.46
	3.0	3.23	0.12
	5.0	0.26	0.04
Viscozyme L	0.025	9.68	3.72
Ultrazyme 100G	0.01	8.52	2.65

복합효소의 naringin 및 hesperidin 분해능

표준시약을 이용하여 현재 시판되고 있는 복합 효소의 분해능을 살펴본 결과는 Table 4와 같다. 즉, naringin과 hesperidin 각 농도가 10 mg%, 5 mg%인 완충용액 100 mL에 naringinase 10.0 units 와 hesperidinase 2.0 units를 각각 처리하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 HPLC로 측정된 결과 표준시약 처리구에서 0.11 mg%와 0.45 mg%로 감소하였고, naringinase는 1% 처리구에서 0.54 mg%와 0.09 mg%로 감소하였으며, 탁주용 당화 효소는 5% 처리구에서 0.26 mg%, 0.04 mg%로 감소하였다. 그러나 유자 착즙시 착즙 수율을 높이기 위해 처리하는 Viscozyme L과 Ultrazyme 100G에서는 착즙시 첨가하는 최적 조건에 해당하는 양임에도 불구하고 naringin과 hesperidin 제거에는 큰 효과가 없었다.

요 약

유자의 부위별 naringin 및 hesperidin의 함량은 과피가 95.54 mg%, 103.99 mg%, 과육이 65.77 mg%, 77.18 mg%, 씨에는 16.49 mg%, 15.88 mg% 순으로 검출되었다. 유자에서 고미의 원인 물질인 naringin을 제거하기 위한 naringinase 최적 첨가량을 검토한 결과, naringinase 20 units 첨가구의 경우 90분 경과후 대부분 분해되었다. 표준시약으로 naringin 10 mg%와 hesperidin 5 mg%의 기질에 naringinase 10.0 units 와 hesperidinase 2.0 units를 각각 첨가하여 측정된 결과 0.11 mg%와 0.45 mg%로 감소하였고, naringinase 1% 처리구에서 0.54 mg% 와 0.09 mg%로 감소하였으며, 탁주용 당화효소 5% 처리구에서는 0.26 mg%, 0.04 mg%로 감소하였다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 농림기술개발사업의 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. 정동효 (1987) 효소학. 선진문화사, 서울. p.147-149
2. Chung, J.H. (1972) Studies on contents of amino acid in *Citrus junos Sieb.* J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 15, 175-180
3. Chung, J.H. (1974) Studies on the chemical compositions of *Citrus junos* in Korea. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 17, 63-80
4. Chung, J.H. (1972) Studies on the chemical components of *Citrus junos sieb* and physical and chemical properties of *Citrus junos sieb.* J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 15, 169-173
5. Jeong, J.W., Park, K.J., Jung, S.W. and Kim, J.H. (1995) Changes in quality of citron juice by storage and extraction conditions. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 38, 141-146
6. Jeong, J.W., Kwon, D.J., Hwang, J.H. and Jo, Y.J. (1994) Influence of the extraction method on quality of citron juice. Korean J. Food Sci. Technol., 26, 704-708
7. Jeong, J.W., Lee, Y.C., Jung, S.W. and Lee, K.M. (1994) Flavour components of citron juice as affected by the extraction method. Korean J. Food Sci. Technol., 26, 709-712
8. Rhyu, M.R., Kim, E.Y., Bae, I.Y. and Park, Y.K. (2002)

- Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korea Citrus fruits. Korean J. Food Sci. Technol., 34, 132-135
9. Tanaka, M., Aoki, T., Nakano, K. and Tanioka, H. (1992) Effect of temperature pretreatment on Yuzu (*Citrus junos* Sieb.ex Tanaka) fruits before low temperature storage. Bull.kochi Agric. Res. Ctr., 1, 85-89
 10. Masayo, K. and Ryonosuke, S. (1987) Seasonal change in color and carotenoid composition of Yuzu(*Citrus junos* Tanasa) and Lisbon lemon(*Citrus limon* Burm.f.) peel. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 34, 28-32
 11. Lam, L., K. T., Zhang, J. and Hasegawa, S. (1994) Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. Overview NOV., p.104-106
 12. Miller, E.G., Gonzales, S.A.P., Couvillion, A.M., Hasegawa, S. and Lam, K.T. (1994) Citrus limonoids as inhibitors of oral carcinogenesis. Overview NOV., p.110-111
 13. Fumio H., Herman, Z. and Hasegawa, S. (1990) Limonoids in seeds of Yuzu, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 380-383
 14. Herman, Z., Fong, C.H., Ou, P. and Hasegawa, S. (1990) Limonoid glucosides in orange juices by HPLC. J. Agric. Food Chem., 38, 1860-1864
 15. Bracke, M.E., Bruyneel, E.A., Vermeulen, S.J. and Mareel, M.M. (1994) Citrus flavonoid effect on tumor invasion and metastasis. Overview NOV., p.121-123
 16. James, F.F. and Wheaton, T.A. (1976) A High pressure liquid chromatographic method for the resolution and quantity of naringin and naringenin retinoside in grapefruit juice. J. Agric. Chem., 24, 899-901

(접수 2004년 1월 14일, 채택 2004년 2월 28일)