

## 당근의 알콜불용성 잔사와 셀룰로오스 분획의 *p*-Hydroxybenzoic Acid 추출에 미치는 시판 식물세포벽분해효소의 영향

- 연구노트 -

강 운 한

원주대학 식품과학과

### Effect of Commercial Plant Cell Wall Degrading Enzymes on Extraction of *p*-Hydroxybenzoic Acid from Carrot Alcohol Insoluble Residue (AIR) and Cellulose Fraction

Yoon-Han Kang

Dept. of Food Science, Wonju National College, Wonju 220-711, Korea

#### Abstract

Five different plant cell wall degrading enzymes were tested for their ability to release *p*-hydroxybenzoic acid from carrot alcohol insoluble residue (AIR) and cellulose fraction. Phenolics of AIR from cell wall materials (CWM) in carrot were found to consist primarily of *p*-hydroxybenzoic acid (1,977  $\mu\text{g/g}$  AIR) with minor contribution from vanillin (55.9  $\mu\text{g/g}$  AIR), ferulic acid (13.6  $\mu\text{g/g}$  AIR) and *p*-hydroxybenzaldehyde (10.6  $\mu\text{g/g}$  AIR). The contents of ferulic acid in Driselase, Cellulase, Macerozyme R-200, Macerozyme R-10 and Sumyzyme MC were 2,319, 2,060, 391, 95.2, 34.1  $\mu\text{g/g}$ , respectively. Incubation of Driselase with AIR released only 2.8% of the total 4 M NaOH extractable *p*-hydroxybenzoic acid. These results indicate that commercial five plant cell wall degrading enzymes can not release *p*-hydroxybenzoic acid from carrot AIR and cellulose fraction.

**Key words:** carrot, cell wall materials, *p*-hydroxybenzoic acid, plant cell wall degrading enzymes

#### 서 론

자연계에 광범위하게 존재하는 페놀산, 플라보노이드, 탄닌, 리그닌 등의 페놀화합물 중 식물 유래의 것을 일명 phyto-phenolics로 명명할 수 있다. 이들은 세포내 기관, 세포질, 섬유질이 많은 외피층 등 부위별로 종류에 차이가 있으며 특히 외피층은 환경과 기후조건의 방어작용을 위해 다량의 유리형 및 축합형 형태로 존재한다. 항산화, 항균, 항암 등의 기능적 특성(1)을 가지고 있으며, 최근에는 식품, 약품, 화장품 등 다방면으로 활용하는 노력이 있어 향후 식물자원의 활용도 증진에 기여할 수 있다. 당근을 열처리하여 마쇄한 즙액의 농축물과 온수, 아세톤추출액 등 용매 추출물에 대한 페놀화합물의 특성과 기능성에 대하여 연구 결과 항변이원성, angiotensin 전환효소(ACE) 저해작용 및 항산화작용이 있는 것으로 나타났으며(2), 항변이원성 및 항암효과 실험(3)에서 이들 추출물이 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그리고 일반적으로 착즙 후 남은 찌꺼기인 잔사는 세포벽 물질(cell wall materials, CWM)이 대부분으로 이에 대한 활용도 증대 연구가 최근 활발히 이루어져 외국에서 관심이 고조되고 있다(4).

절단한 신선편이 당근의 80% 에탄올 추출물의 총페놀화합물 중 60%가 chlorogenic acid이며, 신선물 처리구는 *p*-hydroxybenzoic acid가 없는 것으로 나타났다(5). Chinese water chestnut의 세포벽 물질은 형광을 나타내며 이들 페놀성 화합물의 존재는 조직감 등에 영향을 주는 것으로 확인되었으며, 이로부터 페놀산을 추출, 분석하고, sequential extraction, hot acid(1 M TFA)을 이용한 세포분리, 세포벽 분해효소인 endoxylanase의 영향 연구가 이루어졌다(6). Maize bran의 ferulic acid를 esterases로 유리시키는 연구가 이루어졌으며(7), 이러한 ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid는 아질산염소거작용과 전자공여작용이 있고(8), 특히 당근 세포벽 물질로부터 제조한 알콜불용성 잔사(alcohol insoluble residue, AIR)에는 *p*-hydroxybenzoic acid가 주를 이루고 있음이 보고되었다(9). 당근을 삶은 열처리 조각으로 세포벽 구성 잔사로부터 수용성, 염용성 펙틴과 고분자량의 펙틴이 증가하여 유리되어 조직감의 변화를 주는 것으로 나타났다(10), 당근의 세포벽 섬유를 분리하여 펙틴과 헤미셀룰로오스 등 탄수화물 조성을 조사하였다(11,12). Ferulic acid는 식물체에 광범위하게 분포되어 있고, 각종 미생물의 배지에 에너지원으로 이용되며, 항산화를 기본으로 자외선

에 대한 피부보호, 보존료 등에 응용되고 있다. 일본에서는 식품첨가물로 적용되고 있고, 식품, 음료, 화장품 등에 천연 첨가물로 사용되어지고 있다. 또한 미국이나 유럽 국가에서도 약용 에센스나 천연 추출물에 고함량으로 함유되어 있다고 보고된 바 있다(13). 독성시험은 수컷과 암컷 쥐에게 ferulic acid를 경구투여할 때의 LD<sub>50</sub>은 각각 2,445 mg/kg, 2,113 mg/kg으로 보고되었다(14). 시판 식물세포벽분해효소인 Macerozyme R-200, Macerozyme R-10 및 Sumyzyme MC를 이용하여 식물체를 단세포화하였으며(15), 또한 당근의 알콜불용성 잔사(AIR) 중 페놀화합물은 추출 용매인 물, imidazole, CDTA, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH 등으로 sequential extraction 하였을 때 유리되는 정도가 추출조건에 따른 각 분획별로 차이가 있었으며, 주 성분인 *p*-hydroxybenzoic acid는 펙틴이 많이 함유된 CDTA분획 혹은 헤미셀룰로오스가 함유된 KOH분획 등에서 함량이 높은 것으로 나타났다. 특히, 최종 셀룰로오스 분획에서도 다량 함유되어 있는 것으로 보고하였다(16). 최근에는 Sumyzyme MC로 제조한 당근 단세포 함유 반응물의 동물실험을 통한 식이섭취의 장기능 개선효과(17) 등이 보고된 바 있다.

본 연구는 당근의 단세포 함유 반응물 제조에 적용된 시판 식물세포벽분해효소에 함유되어 있는 페놀성 물질을 분석하고, 이들 효소를 이용하여 당근으로부터 조제한 AIR과 sequential extraction하여 얻어진 셀룰로오스 분획으로부터 페놀화합물의 유리되는 정도를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 당근(*Daucus carota*)은 외국산(U.K.)으로 신선한 것을 이용했으며, 5 mm로 절단 후 액체질소로 즉시 동결하였으며, 분석전까지 -40°C에 보관하였다. 효소 처리에 사용한 식물세포벽분해효소인 Driselase와 Cellulase는 Sigma사, Macerozyme R-200(학술용), Macerozyme R-10(학술용)은 Yakult사(Japan), Sumyzyme MC(첨가물용)는 신일본화학공업(주)에서 구입하여 사용하였다. 페놀화합물 표준품은 protocatechuic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, *p*-coumaric acid, ferulic acid 및 *trans*-cinnamic acid로 Sigma사 제품을 사용하였다.

세포벽물질(CWM), 알콜불용성 잔사(AIR) 및 셀룰로오스 분획(cellulose fraction)의 제조

CWM의 제조는 Parker와 Waldron(6)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 당근 100 g에 5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>가 함유된 1.5% sodium lauryl sulfate 용액으로 블랜더(Ystral GmbH, Dottingen, Germany)를 사용하여 5분간 마쇄하였다. 거품이 발생하면 몇 방울의 octanol을 첨가하여 3회 세척, 마쇄를

반복하였다. 분쇄물은 100 µm nylon 여과포(John Stannier Co., Manchester, U.K)로 여과하였으며, 얻어진 잔사에는 파쇄되지 않은 조직이 남아 있어 3 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>가 함유된 0.5% sodium lauryl sulfate 용액으로 ball mill(Pascall, 0.5 L pot) 처리를 0°C 항온실에서 60 rpm으로 2 hr 처리하였다. 미분쇄된 볼밀 처리물은 70 µm nylon 여과포로 여과하여 잔사를 얻었다. 이를 3 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 용액으로 5분간 균질 후 여과하였으며, 잔사를 iodine/potassium iodine 염색 후 광학현미경으로 관찰하여 세포 내용물이 없을 때까지 3회 반복하여 균질, 여과 및 세척하였다. 얻어진 CWM은 동결건조하여 저장하고 분석에 사용하였다.

AIR의 제조는 알콜 가용성 물질을 제거하기 위해 20 mg의 CWM에 에탄올을 첨가 후 비등하고 있는 항온수조에서 5분간 유지 후 얼음이 함유된 냉각조에서 급속히 냉각하고 원심분리하여 잔사를 얻었다. 잔사를 아세톤으로 탈수하고 최종 건조물을 얻기 위해 40°C hot block에서 건조한 것으로 하였다.

Cellulose fraction의 제조는 Waldron과 Selvendran(18)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 물, imidazole, cyclohexane-*trans*-1,2-diamine-*NNN'*N' tetra acetate(CDTA), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH 등으로 sequential extraction 하였다. 최종 알칼리 추출 후 남는 분획을 pH 5.0로 조정 후 여과하여 잔사(*α*-cellulose)를 동결건조하여 셀룰로오스 분획으로 하였다.

### HPLC에 의한 페놀화합물의 정량

당근 AIR과 5종의 시판 식물세포벽분해효소 및 5종의 효소 반응물을 각각 25 mL 캡시험관에 반응물을 넣고 4 M NaOH를 첨가하여 질소가스로 충전 후 봉하여 실온 암소에서 12 hr 추출하였다. 원심분리하여 얻어진 상등액은 HCl을 가하여 산성으로 한 후 여기에 HPLC 내부표준물질로 50% 메탄올로 조제한 100 mg% *trans*-cinnamic acid 100 µL를 가하여 3배량의 에틸아세테이트로 3회 추출하였다. 추출물을 진공회전농축기로 용매를 제거하고 50% 메탄올 200 µL로 용해하여 HPLC 분석용 시료로 하였다. 페놀화합물의 함량은 Waldron 등(19)의 방법에 준하여 분석조건은 Table 1과 같다.

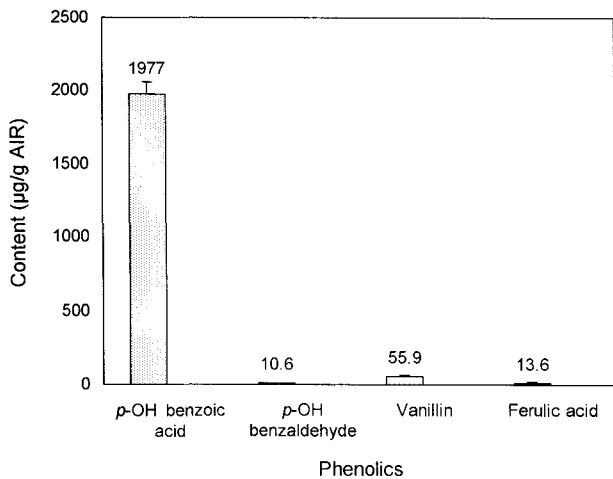
### 식물세포벽분해효소의 영향

Driselase, Cellulase, Macerozyme R-200, Macerozyme R-10 및 Sumyzyme MC 등 시판 식물세포벽분해효소를 당근 AIR과 반응하여 얻어진 반응물에서 유리된 페놀화합물을 분석하였다. 반응에 사용한 Driselase는 Kroon 등(20)의 방법으로 정제하여 사용하였다. 반응물은 위의 5가지 효소를 각각 25 mM sodium acetate buffer(pH 5.0) 1 mL로 현탁하여 혼합하고 페이스트로 만들었으며, 효소 최종 농도가 0.6% 되도록 하였다. 진탕기로 37°C에서 18 hr 분해하고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 여과(0.45 µm)하여 최종 반응물로 하였다.

**Table 1. Operating condition of HPLC**

Items	Condition
Instrument	Perkin Elmer HPLC
Column	Inertpak ODS reverse phase, 25 cm×4.6 mm i.d., 5 μm
Flow rate	1 mL/min
Mobile phase <sup>1)</sup>	Solvent A: 10% (v/v) aqueous acetonitrile plus TFA(trifluoroacetic acid) to 1 mM Solvent B: 40% (v/v) aqueous methanol, 40% (v/v) aqueous acetonitrile, and 20% water plus TFA to 1 mM
Detector	Perkin Elmer Model 235 C DAD

<sup>1)</sup>Gradient profile: initially, A 90%, B 10%; linear gradient over 25 minutes to A 25%, B 75%; exponential gradient over 5 minutes to A 0%, B 100%; exponential gradient over 10 minutes to A 90%, B 10%; held isocratically at A 90%, B 10% for a further 2 minutes. The solvents were sparged with helium prior to use.



**Fig. 1. Content of phenolics released from carrot alcohol insoluble residue (AIR) at room temperature with 4 M NaOH.**

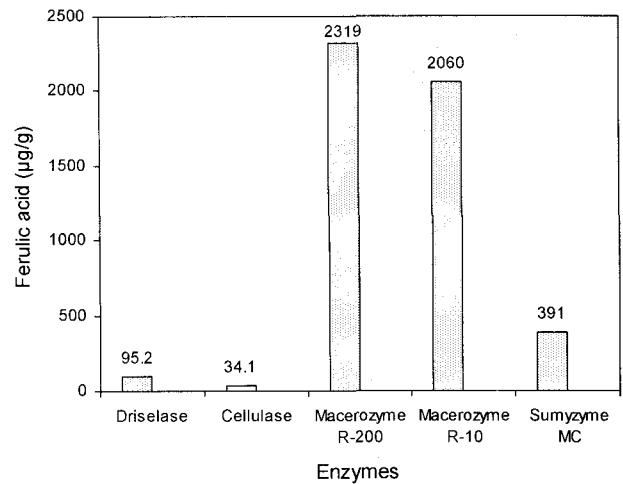
**결과 및 고찰**

**AIR 중 *p*-hydroxybenzoic acid 등 페놀화합물 함량**

Fig. 1은 당근 CWM로부터 비등하는 에탄올로 가용성 물질을 제거한 후 얻어진 AIR로부터 유리된 세포벽 결합 페놀화합물을 나타낸 것이다. 당근 AIR로부터 4종의 주요 페놀화합물은 *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin 및 ferulic acid인 것으로 나타났다. 당근 세포벽 AIR의 페놀화합물 함량은 주된 물질인 *p*-hydroxybenzoic acid 1,977 μg/g AIR이었으며 vanillin, ferulic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde가 각각 55.9, 13.6, 10.6 μg/g AIR인 것으로 나타났다.

**식물세포벽분해효소 중 페놀화합물 함량**

Fig. 2는 시판 식물세포벽분해효소인 Driselase, Cellulase, Macerozyme R-200, Macerozyme R-10, Sumyzyme MC 등 각종 효소 중에 함유되어 있는 효소 자체의 페놀화합물을 HPLC 분석하였다. 특히 Macerozyme R-200, Macerozyme R-10 및 Sumyzyme MC는 *Rhizopus* sp.로부터 생산된 protopectinase로 식물조직에 적용시켜 단세포 함유 반응물을 얻는데 이용되었다(3,21). 효소 중 ferulic acid 함량은 Macerozyme R-200과 R-10에서 각각 2,319 μg/g, 2,060 μg/g



**Fig. 2. Content of ferulic acid in various plant cell wall degrading enzymes.**

였으며, Sumyzyme MC, Driselase, Cellulase에서 각각 391 μg/g, 95.2 μg/g, 34.1 μg/g로 나타났다. 그러나 다른 페놀성 화합물은 전 효소에서 미량으로 검출되지 않았다. Macerozymes 효소는 ferulic acid 함량이 매우 높았으나 Cellulase와 페놀화합물을 제거하여 정제한 Driselase의 경우 함량이 낮은 것으로 나타났다. 따라서 식품가공 첨가물용으로 이용될 경우 효소에 함유된 페놀성 물질에 대한 분석이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

**AIR과 cellulose fraction에 대한 식물세포벽분해효소의 영향**

Table 2는 Driselase, Cellulase, Macerozyme R-200, Macerozyme R-10 및 Sumyzyme MC를 이용하여 당근 AIR과 cellulose fraction에서 추출한 페놀산을 분석한 결과 *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, *p*-coumaric acid, ferulic acid 중에서 비교적 함량이 많은 *p*-hydroxybenzoic acid와 ferulic acid의 추출량을 나타낸 것으로, 일반적으로 이들 효소 공히 AIR보다는 cellulose fraction에서 유리된 함량이 다소 높게 나타났다. Driselase에 의해 AIR로부터 유리된 *p*-hydroxybenzoic acid 함량은 56 μg/g AIR로 이는 앞서 당근 세포벽 물질로부터 조제한 AIR 중 함량인 1,977 μg/g의 약 2.8%에 해당된다. 이상

Table 2. Release of *p*-hydroxybenzoic acid and ferulic acid in carrot AIR and cellulose fraction by plant cell wall degrading enzyme preparations at 37°C for 18 hr

	AIR <sup>1)</sup>		Cellulose fraction	
	Ferulic acid	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	Ferulic acid	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
Driselase	40.6 <sup>2)</sup>	56.0	24.3 <sup>3)</sup>	70.0
Cellulase	-	-	28.0	15.4
Macerozyme R-200	2608	21.0	412	49.7
Macerozyme R-10	450	14.9	60.0	41.4
Sumyzyme MC	397	11.2	21.0	30.9

<sup>1)</sup>AIR: alcohol insoluble residue.

<sup>2)</sup>µg/g AIR. <sup>3)</sup>µg/g cellulose.

의 결과는 *p*-hydroxybenzoic acid가 세포벽 polymers와 강하게 결합되어 5종의 식물세포벽분해효소에 의해 분리되기 어려운 것으로 나타났다. Sumyzyme MC를 사용하여 제조한 효소 반응물 연구에서 식이섬유가 풍부한 당근 단세포 반응물 식이는 흰쥐의 배변특성과 대장의 구조 등에 영향을 미치는 것으로 보고(17)되었으며, 딸기, 단감, 오이, 키위, 양파, 마늘 등 농산물을 이용한 음료 제조에 적용된 바 있어(22), 식이섬유와 결합된 *p*-hydroxybenzoic acid 등 항산화 물질은 소장, 대장에 이르는 동안 장내 환경에 작용하여 당근 세포벽 물질의 분해에 영향을 줄 것으로 추정된다. 당근의 세포벽 물질에 존재한 페놀성 화합물 중 *p*-hydroxybenzoic acid 다음으로 함량이 높은 ferulic acid는 보고에 의하면 일반적으로 유리형은 소장 등에서 흡수되며, 추출물 섭취시 인체 소장에서 esterase 효소 활성으로 diferulate esters형도 분해하지만 95% 정도는 대장에서 분해되며, bound ferulic acid 등 페놀산은 microbial esterases에 의해 유리되고 흡수되어야 한다고 하였다(23).

결론적으로 식물세포벽에 함유된 *p*-hydroxybenzoic acid 등 페놀성 물질은 십이지장과 대장 등 장기에 이르는 동안 대사, 발효되면서 장내 대사, 생리적·기능적 특성 등에 영향을 미치는 것으로 생각되며, 향후 연구가 기대된다.

## 요 약

Driselase, Cellulase, Macerozyme R-200, Macerozyme R-10 및 Sumyzyme MC 등 5종의 시판 식물세포벽분해효소가 당근의 세포벽물질(CWM)로부터 제조한 알콜불용성 잔사(AIR)와 cellulose fraction의 *p*-hydroxybenzoic acid 추출에 미치는 영향을 조사하였다. 당근 AIR의 주된 페놀화합물은 *p*-hydroxybenzoic acid로 1,977 µg/g AIR였으며, vanillin, ferulic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde가 각각 55.9, 13.6, 10.6 µg/g AIR인 것으로 나타났다. 효소에 함유되어 있는 ferulic acid의 함량은 Driselase, Cellulase, Macerozyme R-200, Macerozyme R-10, Sumyzyme MC에서 각각 2,319, 2,060, 391, 95.2, 34.1 µg/g인 것으로 나타났다. 이들 효소와 세포벽물질과의 반응을 조사한 결과, Driselase와 AIR의 반응 후 유리된 *p*-hydroxybenzoic acid의 함량은 56 µg/g AIR

로 알칼리(4 M NaOH) 추출한 총량의 2.8%에 해당한다. 따라서 *p*-hydroxybenzoic acid는 AIR와 셀룰로오스 분획으로부터 이들 효소에 의해 분리되기 어려운 것으로 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연수지원비에 의하여 연구되었음.

## 문 헌

1. Waldron KW, Selvendran RR. 1993. Bioactive cell wall and related components from herbal products and edible organs as protective factors. In *Food and cancer prevention: chemical and biological aspects*. Waldron KW, Johnson IT, Fenwick GR, eds. Royal Society of Chemistry, London. p 307-326.
2. Park MH, Park YK, Kang YH, Seog MS, Seog HM. 1993. Studies on the development of functional beverages from carrot (*Daucus carota*). Report of Korea Food Research Institute (I-1112-0388). p 50-52.
3. Park YK, Kang YH, Cha HS, Kim HM, Seog HM. 1995. Studies on the utilization of domestic radish, cabbage, soybean sprout and carrot. Report of Korea Food Research Institute (E-1323-0661). p 79-89.
4. Institute of Food Research (U.K). 2005. Food processors to reduce disposal of co-product wastes. IFR, www.repro-food.net.
5. Babic I, Amiot MJ, Nguyen-The C, Aubert S. 1993. Changes in phenolic content in fresh ready-to-use shredded carrots during storage. *J Food Sci* 58: 351-356.
6. Parker ML, Waldron KW. 1995. Texture of chinese water chestnut: involvement of cell wall phenolics. *J Sci Food Agric* 68: 337-346.
7. Faulds CB, Kroon PA, Saulnier L, Thibault JF, Williamson G. 1995. Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. *Carbohydr Polym* 27: 187-190.
8. Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239.
9. Parr AJ, Ng A, Waldron KW. 1997. Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *J Agric Food Chem* 45: 2468-2471.
10. Ng A, Waldron KW. 1997. Effect of cooking and pre-cooking on cell-wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. *J Sci Food Agric* 73: 503-512.
11. Massiot P, Rouau X, Thibault JF. 1998a. Isolation and char-

- acterization of the cell-wall fibres of carrot. *Carbohydr Res* 172: 217-227.
12. Massiot P, Rouau X, Thibault JF. 1998b. Characterization of the extractable pectins and hemicellulose of the cell wall of carrot. *Carbohydr Res* 172: 229-242.
  13. Graf E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med* 13: 435-448.
  14. Tada Y, Tayama K, Aoki N. 1999. Acute oral toxicity of ferulic acid, natural food additive, in rats. *Ann Rep Tokyo Metr Lab PH* 50: 311-313.
  15. Park YK, Kang YH. 2000. Enzymatic maceration of vegetables with cell separating enzymes. *Korean J Food Preserv* 7: 184-188.
  16. Kang YH. 2003. Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls. Paper presented at 23th Annual Meeting of Korean Society of Food Preservation, October 31, Daejeon, Korea.
  17. Park YK, Kang YH. 2004. Effects of single cells of carrot and radish on the fecal excretion properties, minimal absorption rate and structure of small intestine and colon in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 505-511.
  18. Waldron KW, Selvendran RR. 1992. Cell wall changes in immature asparagus stem tissue after excision. *Phytochemistry* 31: 1931-1940.
  19. Waldron KW, Parr AJ, Ng A. 1996. Cell wall esterified phenolic dimers: identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array. *Phytochem Anal* 7: 305-312.
  20. Kroon PA, Garcia-Conesa MT, Fillingham IJ, Hazlewood GP, Williamson G. 1999. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J Sci Food Agric* 79: 428-434.
  21. Lee SC, Ko BS, Lee DH, Hwang YI. 1997. Cell separation of vegetable tissues by protopectinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 430-435.
  22. Park YK, Kang YH. 2003. Development of new beverages containing single cells from plant materials. *J Korean Soc Ind Food Technol* 7: 83-94.
  23. Ou S, Kwok KC. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agric* 84: 1261-1269.

(2005년 9월 2일 접수; 2005년 11월 24일 채택)