

복분자의 효소 추출 공정의 최적화 및 성분 변화

류일환 · 권태오[†]

원광대학교 생명자원과학대학

Optimization of Macerating Enzymatic Extraction Process and Components Change of Extract of *Rubus coreanus* Miq. Fruit

Il Hwan Ryu and Tae Oh Kwon[†]

College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

ABSTRACT : The objective of this study is to investigate the optimal condition for macerating enzymatic extraction process that leads to the highest yield and the largest extracted amount of bio-active contents from *Rubus coreanus* Miq. fruit. The optimal extraction conditions were found as the following: The initial amount of the water added to the fruit was 20 ~ 30% by weight. The mixing ratio used for the macerating enzyme was 4 : 1 : 2 (w : w : w) for cellulase:pectinase:amylogucosidase, and the amount of the macerating enzyme added was 2% by weight. The extraction process was done at a temperature of 45 ~ 50°C for 10 hours. The extraction yields on *Rubus coreanus* Miq. fruit by macerating enzymatic extraction process was increased by 84.3% compared to that of hot-water extraction process. The amounts of organic acids and vitamin found in the extract were also higher. The amount of polyphenol and anthocyanin contents in the extract were 185% and 257% of those from hot-water extraction, respectively. These results suggest that macerating enzymatic extraction is an effective method to boost extraction yield and to increase the amount of extraction of bio-active contents from *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Key Words : *Rubus coreanus* Miq., Macerating Enzymatic Extraction, Extraction Yield, Components

서 언

복분자(raspberry)는 기능성 유색 과일로 건강 기능성 및 유색화 음료가 차지하는 비중이 점점 커져가는 추세에서 가장 주목받는 상품성이 높은 원료의 하나이다 (Kil *et al.*, 2000). 그러나 복분자는 탈수(dehydration), 외부충격, 미생물 오염, 효소활성 및 생화학적 작용에 의해 외관을 유지하기 어려운 특성을 갖고 있어 냉동 및 추출 농축액의 형태로 유통되고 있는 실정이다. 이를 위해 추출물의 구성성분 및 기능성의 증가를 위해 열수추출, 초임계추출, 초음파추출, 용매추출법 및 유산균발효법 등 다양한 추출방법이 개발 보고되고 있다 (Jeong *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2007, 2011, 2012; Ryu and Kwon, 2012). 그 중, 현재까지 berry 주스의 제조에 통상적으로 사용되고 있는 방법은 가수 및 가열 후 압착 추출하는 방법이다. 이 방법은 berry류의 기능성 및 수율

저하로 인해 산업적 방법으로는 개선의 여지가 있는 방법으로 추출 조건에 따라 색도의 안정성, 수율, 기능성 물질의 손실이 발생할 수 있다. 이외 Sreekantiah 등 (1971)에 의해 berry류를 비롯한 식용 fruit의 juice 추출방법으로는 냉동, 가온 그리고 효소적 방법 등 3가지 방법이 제안되었고. 냉동, 가온의 방법에 비해 효소적 방법은 주스의 수율 증가 (Joshi *et al.*, 1991; Solehah *et al.*, 1964), 향의 증진 (Eugeniusz and Agnieszka, 2007), 점도 감소 (Carvalho *et al.*, 2006; Pilnik and Voragen, 1993) 및 과일색의 안정화 (Qin *et al.*, 2005) 등 다양한 효과를 나타내는 방법으로 보고되었다. Haight과 Gump (1994)는 macerating 효소를 사용하여 포도 주스의 제조 시 적절한 pectinolytic, cellulolytic, hemicellulolytic 효소를 혼합하여 수율의 증가 및 여과 속도를 증가시켰다고 보고하였다. 이는 과일의 과피 및 과육의 고형화 성분은 cellulose, hemicellulose 및 pectin으로 구성되어 있으며 과일의 종류에 따라 그 함량이 다

[†]Corresponding author: (Phone) +82-63-850-6681 (E-mail) agrokto@wku.ac.kr

Received 2013 January 29 / 1st Revised 2013 February 4 / 2nd Revised 2013 February 27 / Accepted 2013 March 5

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

르고, 사용되어지는 효소의 종류와 양, 반응 온도, pH에 직접적인 영향을 받기 때문이다 (Baumann, 1981; Neubeck, 1975). 효소 가수분해에 의한 수율의 향상 및 향 증진과 점도의 감소를 위해서는 최적의 조건을 선정하여야 한다 (Diwan and Shukla, 2005). 현재 과일 주스의 생산에 사용되어지는 효소는 주로 펙틴 분해 효소가 이용되고 있다. 그러나 berry 과실의 parenchma cell wall은 두 개의 층으로 구성되어 있다. 외부는 pectin matrix, hemicellulose, 단백질에 의해 둘러싸여진 microfibrils라는 cellulose fiber로 구성되어 있고, 내막은 cellulose microfibril로 구성되어 있으며, berry 과실의 주성분으로 알려진 pectin성 다당류는 과실이 숙성되어 가면서 감소하는 특성을 나타낸다 (Kylie *et al.*, 1998). 펙틴 분해효소의 단독 사용보다는 섬유질 분해효소와 복합 사용이 수율의 증가에 효과적이라는 Haight와 Gump (1994)의 보고와 같이 보다 복합적인 섬유질 분해 효소의 조합이 필요하다. 또한 pectiolytic, cellulolytic 효소 이외에 β -glucosidase, amyloglucosidase와 같은 전분성 분해효소의 사용은 특정 과실의 향과 방향 특성을 증가시키는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 이와 같이 다양한 기능성 성분 및 추출 수율의 증가를 가져온다고 알려진 효소분해 추출법에 대한 보고는 많지 않다.

본 연구는 복분자의 영양성분의 안정화와 추출 수율의 증가를 목적으로 효소분해 추출방법의 최적화 조건을 연구한 것으로 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 시험에 사용한 복분자는 2012년 고창군 선운산 농협에서 구입하여 초저온 냉동고 (-70°C)에 보관하면서 실험 시료로 사용하였다. 또한 효소분해에 사용된 cellulase, pectinase 및 amyloglucosidase는 Novozymes Co. (Denmark)에서 구입하여 4°C 이하에서 냉장 보관하면서 사용하였다.

2. Macerating enzyme 추출 조건

1) 가온 정제수 첨가량의 영향

복분자의 효소분해 추출 시 초기 가수 비율에 의한 수율 변화를 측정하였다. 이는 복분자 추출물을 제조하는 과정에서 발생하는 오염도를 최소화하고 효소의 원활한 작용을 위한 유용성을 증가시킬 목적으로 시행하였다. 복분자의 냉동 생과 5 kg에 가온 정제수를 0~50% (v/w) 첨가 후 효소분해 추출을 시행하였다. 이때 효소 첨가량은 cellulase : pectinase : amyloglucosidase를 동량인 1 : 1 : 1 (w : w : w)의 비율로 혼합하여 생과량의 2% (w/w)를 첨가하고, 45°C에서 10시간 반응하여 정제수 첨가 비율에 따른 추출물의 액상의 당도, 수득량

및 수율을 기준으로 최적 정제수 첨가량을 결정하였다. 이때 액상의 당도 (° brix)는 당도측정기 (RA-510, Kyoto Electronics, Japan)를 이용하여 측정하였고, 수득량은 오차를 줄이기 위하여 30° brix로 농축 후 추출물의 무게를 측정하였다. 수율은 원과의 무게에서 추출된 추출물을 30° brix로 농축하여 얻은 수득량의 무게 비율로 나타내었다. 또한 효소분해 추출과 비교하기 위하여 가온 정제수를 생과량의 30% (v/w) 첨가하여 열수 추출을 행하여 얻은 추출물의 당도와 수율을 비교하였다.

2) 효소의 혼합 비율 및 첨가량의 영향

복분자의 냉동 생과 5 kg에 가온 정제수를 30% (v/w) 첨가 후 효소 cellulase : pectinase : amyloglucosidase를 3 : 2 : 1, 3 : 2 : 2, 4 : 1 : 2의 비율 (w : w : w)로 혼합하여 각각 생과량의 2% (w/w)를 첨가하여 45°C, 10시간 동안 추출 후 생성된 액상의 당도 및 30° brix 농축물 수득량을 기준으로 최종 효소의 혼합 비율을 결정하였다. 효소 혼합비율의 설정은 복분자의 비수용성 섬유질의 양은 전체 건조 중량의 59.76%, hemicellulose와 cellulose의 함량은 22.27%, pectin의 함량은 15.38%라는 Laroze 등 (2010)의 보고와 Crandall과 Daubeny (1990), Jennings (1988) 및 Jennings와 Brennan (2002)의 보고에서도 복분자 생과의 수용성 및 불용성 분획은 9%이고, pectins 함량은 0.1~1.0%이며 숙성이 되어가면서 그 함량이 감소한다고 하였고, 복분자는 pectin의 함량이 일반 과일에 비해 낮은 특성을 갖고 있다. 이들 함량 비율을 고려하여 효소의 함량 비율을 결정하였다.

또한 효소의 첨가량은 복분자의 냉동 생과 5 kg에 가온 정제수 30% (v/w), 효소 cellulase : pectinase : amyloglucosidase를 4 : 1 : 2 (w : w : w)로 혼합하여 생과량의 1~3% (w/w)를 첨가하고 45°C, 10시간 동안 추출하여 생성된 액상의 당도 및 30° brix 농축물 수득량을 기준으로 효소 첨가량을 결정하였다.

3) 추출온도 및 추출시간의 영향

추출온도의 영향은 복분자의 냉동 생과 5 kg에 가온 정제수 30% (v/w), 효소 cellulase : pectinase : amyloglucosidase를 4 : 1 : 2 (w : w : w)로 혼합하여 생과량의 2% (w/w)를 첨가하고 30~50°C에서 10시간 추출 후 생성된 액상의 당도 및 30° brix 농축물 수득량을 기준으로 적정 추출온도를 결정하였다.

추출 시간의 영향은 복분자의 냉동 생과 5 kg에 가온 정제수 30% (v/w), 효소 혼합물 (cellulase : pectinase : amyloglucosidase = 4 : 1 : 2)을 생과량의 2% (w/w)를 첨가하고 45°C에서 5~10시간 동안 추출 후 생성된 액상의 당도 및 30° brix 농축물 수득량을 기준으로 추출시간을 결정하였다.

3. Macerating enzyme 추출물의 유기산 및 비타민 함량 측정

복분자 macerating enzyme 추출물의 유기산 및 비타민 함

Table 1. The effect of amount of initial water addition on yield, sugar content of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Water addition amount [†] (v/w, %)	Sample weight (kg) (A)	Initial sugar content (° brix)	Extract sugar content (° brix)	Yield (kg/30° brix) (B)	Yield ratio (%) (B/A)*100
Control [‡]	5	8.74	6.25±0.47 ^d	1.27±0.22 ^{b**}	25.4
0	5	8.74	8.88±0.39 ^b	1.04±0.15 ^c	20.8
10	5	8.74	8.89±0.40 ^b	1.32±0.20 ^b	26.4
20	5	8.74	9.40±0.42 ^a	1.56±0.19 ^a	31.2
30	5	8.74	8.97±0.51 ^{ab}	1.75±0.20 ^a	35.0
40	5	8.74	7.85±0.47 ^c	1.31±0.23 ^b	26.2
50	5	8.74	7.47±0.39 ^c	1.24±0.19 ^b	24.8

[†]The initial amount of the water added was water volume by fruit weight (v/w).

[‡]The control was value by hot-water extraction method. The initial amount of the water added to the fruit was 30% by weight.

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

량은 생과량 5 kg에 가운 정제수 30% (v/w), 효소혼합물 (cellulase : pectinase : amyloglucosidase = 4 : 1 : 2)을 생과량의 2% (w/w) 첨가하고 45°C에서 10시간 동안 추출하여 얻어진 추출물과, 같은 량의 복분자에 가운 정제수 30% (v/w)를 가하여 열수 추출한 추출물을 30° brix로 농축하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 유기산의 측정은 식품의약품안전청 건강 기능 식품공전 구연산시험법 (2008a)에 준하여 C18 카트리지에 acetonitrile/distilled water (1:1) 10 mL에 추출액 10 mL를 가하여 초기 용출액 4~5 mL를 제거 후 HPLC system (Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 분석은 prevail organic acid, 5 µm (4.6 × 250 mm) column을 사용하였고 이동상으로 25 mmol KH₂PO₄ (pH 2.5)를 1 mL/min로 용출하여 PDA(Photodiode Array) detector (210 nm)로 검출하였다.

복분자 macerating enzyme 추출물의 비타민 측정은 식품의약품안전청 건강 기능 식품공전 비타민시험법 (2008b)에 준하여 HPLC system (Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 분석은 capcell pak C18 UG 120 (3.0 × 250 mm) column을 사용하였다. 이동상은 비타민의 종류에 따라 달리 사용하였다. 분석에 사용한 이동상으로는 B₁, B₆, niacin, folic acid는 A 용액: distilled water (DW) 957 mL + MeOH 25 mL + PicB7 (sodium 1-heptanesulfonate) 20 mL와, B 용액: DW 500 mL + MeOH 500 mL + PicB7 20 mL를 사용하였으며, B₂는 10 mmol NaH₂PO₄ (pH 5.5)과 MeOH을 78:22로 혼합한 액을 사용하였고, pantothenate, C는 20 mmol NaH₂PO₄ (pH 2.1)과 acetonitrile을 98:2로 혼합한 액, biotin은 A 용액: 5 mmol NaH₂PO₄과 0.1% H₃PO₄을 1:1로 혼합한 액과, B 용액: 5 mmol KH₂PO₄과 MeOH을 80:20으로 혼합한 액을 사용하였고, K는 MeOH을 이동상으로 사용하여 각각 1 mL/min로 용출하여 PDA detector (210 nm, 248 nm) 및 UV detector (200 nm, 270 nm)로 검출하였다.

4. Macerating enzyme 추출물의 총 폴리페놀 및 안토시아닌 함량 측정

복분자 macerating enzyme 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정은 Bello 등 (2011), Cho 등 (2008)의 방법에 따라 10배 희석한 추출물 5 mL에 Folin-Ciocalteu 시약 5 mL를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na₂CO₃ 용액 (w/v) 5 mL를 넣어 1분간 진탕하고 실온에서 30분간 방치한 후 700 nm에서 비색정량 하였다. 복분자의 주 폴리페놀 성분인 tannic acid를 표준물질로 작성한 검량곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

복분자 macerating enzyme 추출물의 안토시아닌 함량 측정은 추출물 10 mL를 0.1% HCl-80% MeOH 용액 (v/v) 40 mL에 혼합하고 24시간 진탕 추출하였다. 추출된 색소는 3,000 × g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.1% HCl-80% MeOH 용액 (v/v)으로 100 mL로 정용한 후 528 nm에서 비색정량하였다. Cyanidin-3-glucoside을 표준물질로 작성한 검량곡선으로부터 안토시아닌 함량을 측정하였다 (Ryu et al., 2010).

결과 및 고찰

1. Macerating enzyme 추출 조건

1) 가운 정제수 첨가량의 영향

가운 정제수 첨가량에 따른 당도, 30° brix 농축물 수득량 및 수율 변화를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 복분자 원과에 비해 수분 첨가량 증가에 따라 0~30%까지는 당도의 증가를 나타내었으나 40~50%에서는 감소되었다. 정제수 20~30%를 첨가하였을 경우 복분자 원과에 비해 3~8%의 당도 증가를 가져왔으며, 열수추출에 비해서는 44~50% 당도 증가를 보였다. 30° brix 농축물 수득량에 있어서는 열수추출 1.27 kg/30° brix 보다는 20~30%의 정제수를 첨가할 경우 1.56~1.75 kg/30° brix로 23~38%의

Table 2. The effect of mixing ratio of macerating enzyme on yield, sugar content of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Mixing ratio [†] (w/w/w)	Sample weight (kg) (A)	Initial sugar content (° brix)	Extract sugar content (° brix)	Yield (kg/30° brix) (B)	Yield ratio (%) (B/A)*100
Control [‡]	5	8.74	6.25±0.47 ^c	1.27±0.22 ^{*c**}	25.4
3:2:1	5	8.82	8.32±0.42 ^b	1.60±0.14 ^b	32.0
3:2:2	5	8.82	8.74±0.41 ^b	1.62±0.16 ^b	32.4
4:1:2	5	8.82	9.40±0.57 ^a	1.82±0.17 ^a	36.4

[†]The mixing ratio used for the macerating enzyme was the weight ratio to cellulase:pectinase:amylogucosidase. The amount of the macerating enzyme added to the fruit was 2% by weight.

[‡]The control was value by hot-water extraction method. The initial amount of the water added to the fruit was 30% by weight.

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 3. The effect of adding amount of macerating enzyme on yield, sugar content of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Adding amount [†] (w/w, %)	Sample weight (kg) (A)	Initial sugar content (° brix)	Extract sugar content (° brix)	Yield (kg/30° brix) (B)	Yield ratio (%) (B/A)*100
Control [‡]	5	8.74	6.25±0.47 ^c	1.27±0.22 ^{*d**}	25.4
1	5	9.18	9.40±0.42 ^b	1.60±0.15 ^c	32.0
2	5	9.18	10.00±0.48 ^a	2.32±0.14 ^a	46.4
3	5	9.18	9.08±0.31 ^b	2.17±0.12 ^b	43.4

[†]The amount of the macerating enzyme added was macerating enzyme (cellulase : pectinase : amyloglycosidase = 4 : 1 : 2) weight ratio to fruit weight.

[‡]The control was value by hot-water extraction method. The initial amount of the water added to the fruit was 30% by weight.

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

수득량 증가를 나타내었다. *Fusarium oxysporum* Dzf17로부터 mycelial polysaccharide의 추출 최적화 조건을 설정 시 적정 농도의 수분량의 첨가가 수율의 증가를 가져온다는 Li 등 (2012)의 보고와 일치하였다. 이 보고서에 따르면 수분의 양이 증가하면 포화되어 있는 수용성 성분의 가용화가 증가되어 수율이 향상된다고 하였다. 또한 가온 정제수 40~50%에서는 희석이 되는 효과를 나타내었다. 복분자 착즙액의 pH는 3.43~3.52의 산성 식품임에도 불구하고 많은 미생물을 포함하고 있다. 저온 가수분해를 행하는 효소 분해는 미생물의 오염에 의해 손실이 발생할 가능성이 크다. 특히 저온 및 고산성 조건에서 생육하는 곰팡이류 및 효모는 berry 주스의 제조에 큰 장애를 유발한다. 1차적 오염도의 저하가 효소 추출의 안정성을 확보하는 방안이라고 판단하여 열수를 첨가하였다. 열수의 첨가는 일시적인 살균의 효과 및 표피의 왁스층을 용해하여 효소의 활성이 원활 하도록 하는 조작이다. 따라서 추출물의 용도에 따라 정제수의 첨가량을 조절함으로써 농축물의 당도 및 추출물의 수율을 조절할 수 있을 것으로 판단된다.

2) 효소의 혼합비율 및 첨가량의 영향

효소 혼합비율의 영향은 복분자 냉동 생과 5 kg에 가온 정

제수 30% (v/w), 효소 cellulase : pectinase : amyloglycosidase 를 3 : 2 : 1, 3 : 2 : 2, 4 : 1 : 2의 비율 (w : w : w)로 혼합하여 각각 생과량의 2% (w/w)를 첨가하여 45°C, 10시간 동안 추출하여 생성된 액상의 당도 및 30° brix 농축물 수득량은 Table 2에서 보는 바와 같이 효소 혼합비율 3 : 2 : 1, 3 : 2 : 2에서 30° brix 농축물 수득량에 차이가 없는 것으로 보아 amyloglycosidase의 함량과 농축물 수득량에는 큰 영향이 없었으나, 혼합비율 3 : 2 : 2보다 4 : 1 : 2에서는 당도 및 농축물 수득량에 있어서 큰 차이를 나타내었다. cellulase : pectinase : amyloglycosidase를 4 : 1 : 2 혼합 시 당도는 9.40° brix로 원과에 비해 6.6% 상승하였으며, 농축물 수득량은 1.82 kg/30° brix로 혼합비율 3 : 2 : 2의 1.62 kg/30° brix보다 12% 증가하였고, 열수추출에 비하여는 43.3% 증가를 나타내어 pectinase에 비해 cellulase의 첨가량이 증가할수록 농축물 수득량이 증가하였다. 이는 복분자 과피의 cellulose 함량이 높고 구조가 pectin질에 비해 견고한 것으로 판단된다. 또한 최적의 효소 혼합비율에 대하여는 다양한 처리로 추후 시험을 하여야 할 것으로 생각된다. Hamzah 등 (2011)은 oil palm (Elaeis) 과일의 섬유질을 효소분해 시 cellulase와 glucosidase의 첨가 비율이 5 : 1일 경우 수용성 단당류의 양이 증가하였다고 보고하였

복분자의 효소 추출 공정

Table 4. The effect of extraction temperature on yield, sugar content of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Extraction temperature (°C)	Sample weight (kg) (A)	Initial sugar content (° brix)	Extract sugar content (° brix)	Yield (kg/30° brix) (B)	Yield ratio (%) (B/A)*100
Control [†]	5	8.74	6.25±0.47 ^d	1.27±0.22 ^{*d**}	25.4
35	5	9.10	6.74±0.32 ^c	1.74±0.18 ^c	34.8
40	5	9.10	8.26±0.40 ^b	2.08±0.12 ^b	41.7
45	5	9.10	10.01±0.42 ^a	2.33±0.15 ^a	46.6
50	5	9.10	9.96±0.38 ^a	2.30±0.13 ^a	46.0

[†]The control was value by hot-water extraction method. The initial amount of the water added to the fruit was 30% by weight.

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 5. The effect of extraction time on yield, sugar content of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Extraction time (hrs)	Sample weight (kg) (A)	Initial sugar content (° brix)	Extract sugar content (° brix)	Yield (kg/30° brix) (B)	Yield ratio (%) (B/A)*100
Control [†]	5	8.74	6.25±0.47 ^c	1.27±0.22 ^{*c**}	25.4
4	5	9.15	4.28±0.32 ^d	0.76±0.12 ^d	15.2
6	5	9.15	7.24±0.38 ^b	1.42±0.16 ^c	28.4
8	5	9.15	9.76±0.40 ^a	1.88±0.12 ^b	37.6
10	5	9.15	10.05±0.38 ^a	2.34±0.14 ^a	46.8

[†]The control was value by hot-water extraction method. The initial amount of the water added to the fruit was 30% by weight.

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

으며, Prabuddha (2011)는 섬유질을 효소분해 시 cellulase와 glycosidase가 20 : 1이 적합하다고 보고하였다. 이와 같이 glycosidase의 양은 전반적으로 효소 분해 속도에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며 실제적인 효소 추출 속도는 cellulase의 양에 관련이 있는 것으로 판단된다.

효소 첨가량의 영향을 살펴본 결과는 Table 3에 나타내었다. 효소 첨가량이 1%에서는 농축물 수득량 1.60 kg/30° brix로 열수추출 대비 26.0% 증가를 보였으나, 2% 첨가 시 2.32 kg/30° brix로 82.7% 증가를 나타내었고, 3% 첨가 시 2.17 kg/30° brix로 2% 첨가 시 보다 다소 감소되었다. 따라서 효소의 첨가량은 2%를 사용하는 것이 가장 바람직한 것으로 판단하였다. 반면 원과 당도에 따라 30° brix 농축물 수득량의 차이가 크게 나타나 원과의 당도가 높을수록 농축물 수득량도 증가하는 경향이였다.

3) 추출온도 및 추출 시간의 영향

추출온도의 영향은 복분자 냉동 생과 5 kg에 가운 정제수 30% (v/w), 효소 cellulase : pectinase : amyloglycosidase를 4 : 1 : 2의 비율 (w : w : w)로 혼합하여 생과량의 2%를 첨가하고 30~50°C에서 10시간 동안 추출 후 액상의 당도 및 30° brix 농축물 수득량의 결과를 Table 4에 나타내었다. 추출온도 45~50°C에서 당도는 9.96~10.01° brix, 농축물 수득량은 2.30~2.33 kg/30° brix로 가장 높은 당도나 농축물 수득량을

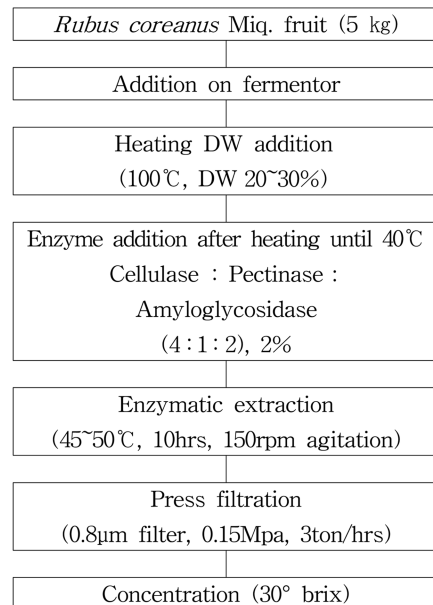


Fig. 1. Procedures for the preparation of macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

나타내었다.

또한, 45°C에서 4~10시간 추출 후 당도 및 30° brix 농축물 수득량을 조사한 결과 Table 5에서와 같이 추출시간이 증가할수록 당도 및 수율이 증가하는 경향이였다. 10시간 이상

Table 6. The composition of organic acids of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Extraction processes	Organic acids (mg/g)				
	L-Tartaric acid	L-Malic acid	L-Lactic acid	Acetic acid	Citric acid
Hot-water extraction	1.23±0.09 ^b	1.95±0.07 ^b	ND ^{***}	8.56±0.45 ^b	35.28±0.92 ^{*b**}
Enzymatic extraction	1.77±0.09 ^a	2.34±0.14 ^a	ND	20.27±1.35 ^a	82.34±1.32 ^a

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

***ND: Not Detected.

Table 7. The composition of vitamins of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Vitamins	Extraction processes	
	Hot-water extraction	Enzymatic extraction
A (μgRE/100g)	2.01±0.24 ^b	2.38±0.31 ^{*a**}
β-Carotin (mg/100g)	ND ^{***}	ND
D (μg/100g)	ND	ND
E (mgα-TE/100g)	ND	0.75±0.19
K (μg/100g)	ND	ND
B1 (mg/100g)	ND	0.05±0.02
B2 (mg/100g)	ND	ND
B6 (mg/100g)	ND	0.09±0.03
Niacin (mg/100g)	1.67±0.29 ^b	3.25±0.59 ^a
Pantothenate (μg/100g)	ND	4.26±0.48
Folic acid (μg/100g)	108.25±6.89 ^b	222.71±7.48 ^a
B12 (μg/100g)	ND	ND
Biotin (μg/100g)	ND	ND
C (mg/100g)	ND	46.44±1.13

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

***ND: Not Detected.

에서의 시험 결과는 없지만 10시간 추출과 큰 차이를 보이지 않을 것으로 생각되어진다. Kabkab date fruit에서 효소 추출 시 45°C에서 46%의 수율 증가를 나타내었다는 Bahramian 등 (2011)의 보고와 유사한 결과를 나타내었으나 *Hypericum perforatum*으로부터 macerating 효소에 의해 hypericine을 추출 시 5시간이 최적이었다는 Hao 등 (2011)의 보고보다는 긴 시간이 요구되었다. Unripe apples로부터 polyphenol의 효소추출의 최적조건은 50°C, 12시간이었다는 Zheng 등 (2009)의 보고와는 유사하였다. 이는 대상 과실의 특성에 의한 것으로 판단된다. 이상의 결과에 의해 추출공정 및 추출 조건을 다음 Fig. 1에 요약하였다.

2. Macerating enzyme 추출물의 유기산 및 비타민 함량

열수추출과 효소분해 추출의 추출 공정에 의한 복분자 추출물의 유기산 함량을 분석한 결과 (Table 6), 열수추출에 비해 효소분해 추출은 tartaric acid나 malic acid는 함량의 변화가

Table 8. The amount of total polyphenol and anthocyanin of extract by macerating enzymatic extraction of *Rubus coreanus* Miq. fruit.

Extraction processes	Total polyphenol (mgTA/100g) [†]	Anthocyanin (mgCG/100g) [‡]
Hot-water extraction	1330.3±30.6 ^b	241.8±12.8 ^{*b**}
Enzymatic extraction	2460.0±43.0 ^a	620.5±24.2 ^a

[†]Tannic acid (TA) was used as a standard for measuring of the total phenolics content.

[‡]Cyanidin-3-glucoside (CG) was used as a standard for measuring of the anthocyanin content.

*Each value represents the mean ± SD (n=3).

**Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

크지 않은 반면, acetic acid 및 citric acid는 열수추출에 비해 효소분해 추출에서 2.37 및 2.33배 증가되는 경향이였다. 이는 첨가된 수분량의 증가로 인한 유기산 용해량의 증가 및 효소에 의한 세포벽의 분해로 인한 추출효율이 증가한 것으로 판단된다.

또한, 효소분해 추출 공정에 의한 복분자 추출물의 비타민 함량을 분석한 결과를 Table 7에 나타내었다. 지용성 비타민인 A와 E는 추출공정에 따라 약간의 증가를 보인 반면, 열이나 산화의 영향을 받지 않는 B1, B6도 열수 추출에 비해 효소분해 추출 시 함량이 증가되었다. 가장 큰 변화를 보인 비타민은 비타민 C로 열수 추출의 경우 검출되지 않은 반면 효소분해 추출은 46.44 mg/100 g이었다. 이는 비타민 C가 70°C 이상의 고온에서 불안정하여 dehydroascorbic acid로 전환되기 때문에 고온에서 장시간 추출하는 열수추출법에서는 잔존하지 않는 것으로 판단되며 (Juhasz *et al.*, 2012), pantothenate도 열에 민감한 특성을 갖고 있다고 하며 (Kreutler and Czajka, 1987), 비타민 E 또한 100°C 이상 고온에서 파괴되는 것으로 알려져 있다 (Tyopponen and Hakkarinena, 1985). 이상의 결과로부터 효소분해 추출방법은 영양성분의 증가 및 보존에 유용한 방법임이 확인되었다.

3. Macerating enzyme 추출물의 총 폴리페놀 및 안토시아닌 함량

복분자에는 다량의 폴리페놀 및 안토시아닌 색소를 함유하는 것으로 알려져 있다. 각각의 추출 공정에 의해 추출된 농축물의

폴리페놀 및 안토시아닌 함량을 분석한 결과 (Table 8), 폴리페놀은 복분자 열수추출 1330.3 mgTA/100 g이나 효소분해 추출 2460.0 mgTA/100 g으로 열수 추출에 비해 효소분해 추출 시 1.85배 증가를 나타내었고, 안토시아닌 함량은 열수추출 241.8 mgCG/100 g, 효소분해 추출 620.5 mgCG/100 g으로 2.57배 증가하였다. Kammer 등 (2005)은 grape를 5000 ppm의 펙틴 분해효소와 2500 ppm 섬유소 분해효소로 분해 시 폴리페놀 p-coumaric acid가 0.32 mg/L에서 4.59 mg/L로 13.34배 증가하였으며 cyanidin-3-O-glucoside는 219.80 mg에서 252.01 mg로 14.65% 증가하였다고 보고하였고, Lee와 Wrolstad (2004)는 pectinase와 cellulase를 사용하여 blueberry waste로부터 페놀 화합물 및 안토시아닌을 추출 시 82.9 mg/100 g에서 101.0 mg/100 g 및 20.5 mg/100 g에서 28.1 mg/100 g으로 각각 21.8% 및 37.1% 증가하였다는 보고와 같이 페놀화합물 및 안토시아닌의 추출에 복합 효소의 처리가 유효함을 확인하였다. Johanna 등 (2005)의 효소추출 시 bilberry로부터 안토시아닌의 함량이 증가하였다는 보고와도 유사하였으며, Wrolstad 등 (1994)과 Wightman와 Wrolstad (1996)는 fruit의 안토시아닌 함량 증가에 β -glucosidase가 중요한 역할을 한다는 보고 및 Hanmoungjai 등 (2002)이 8 units/g의 amyloglucosidase로 전처리 시 안토시아닌의 함량이 증가하였다는 보고와 같이 전분질 효소의 사용 또한 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 복분자의 안토시아닌은 우수한 항산화 활성을 나타내는 성분으로 cyanidin-3-O-sambubioside, cyanidin-3-O-xylosyl-rutinoside, cyanidin-3-O-rutinoside, pelargonidin-3-O-rutinoside, delphinidin-3-O-rutinoside group, delphinidin-3-O-glucuronide와 같은 보다 다양한 성분으로 구성되어 있다 (Ku and Mun, 2008).

이상의 결과를 요약하면 복분자를 macerating enzyme을 이용한 추출에 있어서는 생과량에 가온 정제수를 20~30% (v/w) 첨가하고, macerating enzyme cellulase : pectinase : amyloglucosidase를 4 : 1 : 2의 비율 (w:w:w)로 혼합하여 생과량의 2% (w/w)를 첨가하여 45~50°C, 10시간 이상 추출 시 최고의 수율을 얻는 추출방법이었으며, 실제로 생과량 5 kg에 가온 정제수를 30% (v/w) 첨가하고, macerating enzyme cellulase : pectinase : amyloglucosidase를 4 : 1 : 2의 비율로 혼합하여 생과량의 2%(w/w)를 첨가하고 45°C, 10시간 추출 시 농축물 수득량 2.34 kg/30° brix로 원과량에 대하여 46.8%의 수율을 얻었으며, 열수추출에 비하여는 초기의 당도가 조금 다르지만 수율 25.4% 보다는 높은 수율을 얻을 수 있었다 (Table 5). 또한, 추출물의 유기산 acetic acid 및 citric acid는 열수 추출에 비해 효소분해 추출에서 2.37, 2.33배 증가되었으며, 온도에 영향을 받는 비타민 pantothenate, C 및 E 등의 안정성을 확보할 수 있었다. 폴리페놀 및 안토시아닌의 함량도 열수 추출에 비해 효소분해 추출에서 1.85, 2.57배 증가되어 macerating enzyme을 이용한 효소분해 추

출방법이 열수 추출방법보다는 성분함량이 증가됨을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2011학년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Bahramian S, Azin M, Chamani M and Gerami A. (2011). Optimization of enzymatic extraction of sugars from *Kabkab date* fruit. Middle-East Journal of Scientific Research. 7:211-216.
- Baumann JW. (1981). Application of enzymes in fruit juice technology. In Birch GG, Blakebrough N and Parker KJ. (eds.). Enzymes and food processing. Applied Science Publishers Ltd. London, England. p.129-147.
- Bello A, Aliero AA, Saidu Y and Muhammad S. (2011). Phytochemical screening, polyphenolic content and alpha-glucosidase inhibitory potential of *Leptadenia hastata*(Pers.) Decne. Nigerian Journal of Basic and Applied Science. 19:181-186.
- Carvalho LMJ, Castro IM, Silva CAB, Fonseca RB and Silva EMM. (2006). Effect of enzymatic hydrolysis on particle size reduction in lemon juice(*Citrus limon* L.), cv. Tahiti. Brazilian Journal of Food Technology. 9:277-282.
- Cho WG, Han SK, Sin JH and Lee JW. (2008). Antioxidant of heating pork and antioxidative activities of *Rubus coreanus* Miq. extracts. Journal of Korean Society Food Science Nutrition. 37:820-825.
- Crandall PC and Daubeney HA. (1990). Raspberry management. In Galletta GJ and Himeirick DG (eds.). Small fruit crop management. Prentice Hall Press. Upper Saddle River. New Jersey, USA. p.157-213.
- Diwan A and Shukla SS. (2005). Process development for the production of clarified guava juice. Journal of Food Science and Technology. 42:245-249.
- Eugeniusz P and Agnieszka W. (2007). Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: A review. Flavour and Fragrance Journal. 22:251-254.
- Haight KG and Gump BH. (1994). The use of macerating enzymes in grape juice processing. American Journal of Enology and Viticulture. 45:113-116.
- Hamzah F, Idris A and Shuan TK. (2011). Preliminary study on enzymatic hydrolysis of treated oil palm(*Elaeis*) empty fruit bunches fibre(EFB) by using combination of cellulase and β -1-4 glucosidase. Biomass and Bioenergy. 35:1055-1059.
- Hanmoungjai P, Pyle DL and Niranjana K. (2002). Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 77:771-776.
- Hao PF, Lei GM, Liu FG and Yang Y. (2011). Study on the enzyme extraction process of hypericin by pectinase. Zhong Yao Cai. 34:1133-1137.
- Jennings DL. (1988). Raspberries and blackberries: their breeding,

- diseases and growth. Academic Press. London, England. p.230.
- Jennings SN and Brennan RM.** (2002). Improvement of raspberry cultivars in Scotland. *Acta Horticulturae*. 585:179-183.
- Jeong HS, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH and Lee HY.** (2009). Effects of *Rubus coreanus* extracts on ultraviolet-a irradiated cultured human skin fibroblasts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:321327.
- Johanna B, Jani MK, Marjaana S, Annikka M, Martina L, Riitta T and Kaisa P.** (2005). Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:2548-2556.
- Joshi VK, Chahan SK and Lal BB.** (1991). Extraction of juice from peaches, plums and apricots by pectinolytic treatment. *Journal of Food Science and Technology*. 28:65-66.
- Juhasz M, Kitahara Y, Takahashi S and Fujii T.** (2012). Thermal stability of vitamin C: Thermogravimetric analysis and use of total ion monitoring chromatograms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 59:190-193.
- Kammer D, Claus A, Schieber A and Carle R.** (2005). A novel process for the recovery of polyphenols from *Vitis vinifera* L. pomace. *Journal of Food Science*. 70:157-163.
- Kil BS, Kim YS, Kim CH and Yoo HG.** (2000). Studies on herbal resources plants in Chollabuk-do area. *Korean Journal of Plant Resources*. 13:61-65.
- Kim JH, Kim DH, You JH, Kim CH, Kwon MC, Seong NS, Lee SE and Lee HY.** (2005). Immuno-regulatory activities of various fractions from *Ehpedrae sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Angelica gigas* Nakai extracts with ultrasonification. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 13:161-171.
- Korea Food & Drug Administration.** (2008a). Health Functional Food Code. Section III.3.5.5 Citric Acid. Food and Drug Administration. Seoul, Korea. p.III.3.5.51-III.3.5.52.
- Korea Food & Drug Administration.** (2008b). Health Functional Food Code. Section III.3.1 Vitamins. Food and Drug Administration. Seoul, Korea. p.III.3.1.11-III.3.1.145.
- Kreutler PA and Czajka-Narins DM.** (1987). Nutrition in perspective(2nd ed.). Prentice Hall Press. Englewood Cliffs. New Jersey, USA. p.218-219.
- Ku CS and Mun SP.** (2008). Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja(*Rubus coreanus* Miq.) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. *Bioresource Technology*. 99:8325-8330.
- Kwon JW, Lee HK, Park HJ, Kwon TO, Choi HR and Son JY.** (2011). Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:325-333.
- Kwon JW, Lee HK, Park HJ and Son JY.** (2012). Physiological activities of *Rubus coreanus* Miq. extracts using different extraction methods. *Korean Journal of Food Cookery Science*. 28:25-32.
- Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC and Lee HY.** (2007). Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:398-404.
- Kylie JN, Ian MS, Antony B, Simon PR and Geoffrey BF.** (1998). Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*. 118:783-792.
- Laroze L, Soto C and Zuniga ME.** (2010). Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13:1-11.
- Lee J and Wrolstad RE.** (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Journal of Food Science*. 69:564-573.
- Li P, Lu S, Shan T, Mou Y, Li Y, Sun W and Zhou L.** (2012). Extraction optimization of water-extracted mycelial polysaccharide from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* Dzf17 by response surface methodology. *International Journal of Molecular Sciences*. 13:5441-5453.
- Neubeck CE.** (1975). Fruits, fruit products, and wines. In Gerald R. (ed.). *Enzymes in food processing*. Academic Press. New York. USA. p.397-442.
- Pilnik W and Voragen AGJ.** (1993). Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. In Nagodawithana T and Reed G. (eds.). *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. London, England. p.363-399.
- Prabuddha B.** (2011). Computational and experimental investigation of the enzymatic hydrolysis of cellulose. Ph. D. Thesis. Georgia Institute of Technology. Georgia, USA. p.50-57.
- Qin L, Xu S and Zhang W.** (2005). Effect of enzymatic hydrolysis on the yield of cloudy carrot juice and the effects of hydrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:505-512.
- Ryu IH, Lee EJ, Kwon JW, Lee KS and Kwon TO.** (2010). Fermentation property by novel cellulolytic lactic acid bacteria *Enterococcus* sp. TO-94 on Omija(*Schizandra chinensis* Baillon). *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:429-438.
- Ryu IH and Kwon TO.** (2012). Sensory characteristics of granular tea and the components of mulberry fruit extracts by different extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:331-338.
- Solehah A, Balaumani VT and Amiza MA.** (1964). Enzyme for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice. *Journal of Food Science and Technology*. 31:508-510.
- Sreekantiah KR, Jaleel SA and Ramachandra Rao TN.** (1971). Utilization of fungal enzyme in the liquefaction of soft fruits and extraction and clarification of fruit juice. *Journal of Food Science and Technology*. 8:201-203.
- Tyopponen JT and Hakkarainen RVJ.** (1985). Thermal stability of vitamin E in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 35:136-138.
- Wightman JD and Wrolstad RE.** (1996). β -Glucosidase activity in juice processing enzymes based on anthocyanin analysis. *Journal of Food Science*. 61:544-548.
- Wrolstad RE, Wightman JD and Durst RW.** (1994). Glycosidase activity of enzyme preparations used in fruit juice processing. *Food Technology*. 48:90-98.
- Zheng HZ, Hwang IW and Chung SK.** (2009). Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Journal of Zhejiang University Science B*. 10:912-919.