

Research Note

검류를 이용한 단세포 당근 제조 수율 향상 방법

고종호 · 이정노¹ · 김혁화*

한국폴리텍 바이오대학 바이오식품분석과, ¹한국폴리텍 바이오대학 바이오 품질관리과

Method for Increasing the Yield of the Production of Carrot Single Cell by Using Gums

Jong-Ho Koh, Jungno Lee¹ and Hyuk-Hwa Kim*

Dept. of Bio-Food Technology, Korea Bio Polytechnic College

¹Dept. of Bio-Quality Control, Korea Bio Polytechnic College

Abstract

In this study, the effects of gums (guar gum, xanthan gum, locust bean gum) on the activity of polygalacturonase(PGase) were examined. PGase activity was assayed by measuring the release of reducing groups from polygalacturonic acid. Guar gum, xanthan gum and locust bean gum were capable of increasing the catalytic activity of the PGase by 105%, 87% and 90%, respectively. Carrot was macerated by Macerozyme R-200 with gums and the yield of the maceration reaction for the production of carrot single cells was increased up to 13% in the presence of guar gum. This suggested that gums stated above can be used as good enhancers not only for the catalytic activity of the PGase but also for the production of carrot single cell.

Key words: polygalacturonase, guar gum, xanthan gum, locust bean gum, single cells

서 론

일반적으로 식물세포벽은 1차 세포벽, 2차 세포벽 및 중엽의 세부분으로 나누어지며, 이들은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴질, 리그닌, 단백질 등으로 구성되어 있다. 식물체의 중엽과 1차 세포벽의 주성분은 프로토펙틴(protopectin)이며, 식물세포간 유착의 기능을 가진다(Tolbert, 1980).

Polygalacturonase(PGase)는 펙틴의 일종인 polygalacturonic acid의 α -1,4결합을 가수분해하는 효소로 알려져 있다. 이러한 PGase는 식물 내에 존재하고 특히 미숙한 과실이 숙성함에 따라 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 각종 미생물 중에도 존재하고 있다. PGase는 과즙의 펙틴에 의한 혼탁화의 방지, 즉 청징화의 목적으로 이용되고, 식물의 세포간 물질을 선택적으로 분해시켜 각각의 단위세포가 갖고 있는 식물의 천연성분들을 파괴시키지 않고 유지시킬 수 있는 식물 단세포의 생성에도 이용되는 등 식품산업, 화장품산업 등에서 그 응용 가치가 증가되고 있는 효소이다

(Gomez-Ruiz et al., 1988; Call et al., 1985).

한편 PGase를 포함하는 통상의 효소들은 단백질이 가지는 특성상 자연계에서 분리되면 시간이 지날수록 그 활성이 감소하는, 즉 안정성이 저하되는 문제가 있어 그 안정성을 증진시키고자 하는 노력들이 시도되어 왔다. 이는 효소 용액 내에 알부민 혹은 텍스트린과 같이 안정제의 역할을 수행할 수 있는 물질을 첨가하던지 또는 보다 선택적인 방법으로 분자수준에서의 효소 단백질의 정보를 이용하여 그 분자자체를 변형시켜 안정성을 확보 하는 등의 진보된 방법이 보고되고 있다(Mozhaev et al., 1992).

자연에서 얻어지는 교질물질들은 식품에 있어서 겔착제, 칼로리 조정제, 유화제, 피막형성제, 안정제 등의 용도로 사용되고 있으며 이는 수용성 교질물질들이 거의 대부분 친수성 콜로이드를 형성하는 성질을 활용한 것으로서, 예를 들면 젤라틴과 같은 단백질 및 guar gum, xanthan gum, locust bean gum, arabic gum, carrageenan과 같은 다당류들이 이에 속한다. 그러나 일반적으로 교질물질들의 존재 시 효소의 안정성도 증진(Moreau et al., 1994)되는 것으로 보나 교질물질을 사용하여 효소의 활성을 증진시켜 식물 단세포 제조 수율을 향상시키는 방법에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 효소의 활성을 증진시킬 수 있는 새로운 방법의 개발을 위하여 PGase에 guar gum, xanthan gum,

Corresponding author: Hyuk-Hwa Kim, Dept. of Bio-Food Technology, Korea Bio Polytechnic College 315-1, Daehakro Ganggyeong-eup, Nonsan-si, Chungnam 320-905, Korea
Tel: +82-41-746-7355; Fax: +82-41-746-7350
E-mail: biohugh@gmail.com

Received October 23, 2009; revised November 5, 2009; accepted November 6, 2009

locust bean gum 등과 같은 교질물질을 첨가함으로써 효소의 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있는 방법을 살펴보았다. 또한, PGase를 이용한 단세포 야채의 제조에 있어서 교질물질을 첨가하여 야채 단세포화 효소반응의 수율을 증진시키는 새로운 방법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

PGase는 다양한 미생물로부터 발견되는데, *Aspergillus niger*(Maldonado & Saad, 1998), *Sclerotinia sclerotiorum*(Martel et al., 1998), *Sclerotinia borealis*(Takasawa et al., 1997), *Trichosporon penicillatum*(Iguchi et al., 1996), *Saccharomyces cerevisiae*(Gainvors et al., 1994), *Kluyveromyces fragilis*(Sakai et al., 1984), *Saccharomyces fragilis*(Lim et al., 1980) 등이 생산 균주로 알려져 있다. 본 연구에서는 정제된 PGase로서 일본 Yakult사에서 구입한 Macerozyme R-200을 사용하였으며, 교질물질로 사용한 guar gum, xanthan gum, locust bean gum은 미국 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

PGase 활성 측정

PGase의 활성은 Honda et al.(1982)의 방법을 사용하여 측정하였다. 0.5 mg의 polygalacturonic acid sodium salt를 pH 3.5, 35 mM sodium acetate buffer에 녹인 후 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 0.4 mL에 희석된 효소용액 0.1 mL를 가하여, 48°C에서 20분간 반응시킨 후, 1.2 mL의 TBC(100 mM sodium tetraborate decahydrate, 100 mM boric acid, 0.1% 2-cyanoacetamide) reagent를 가하여 반응을 정지시켰다. 100°C에서 10분간 가열하여 실온에서 냉각한 후 276 nm에서 흡광도를 측정하여 D-galacturonic acid의 양을 측정하였다(Shimatzu UV-1601). 효소활성은 48°C에서 1분간 1 μmol의 D-galacturonic acid를 생성하는 것을 1 unit로 3회 반복 실험하였다.

단세포 야채의 제조 및 수율 측정

단세포화물의 제조는 Nakamura et al.(1995)의 방법을 응용하였다. 선별, 세정한 1-3 mm 크기로 절단된 당근을 블랜칭한 후 반응용액에 침지, 단세포화 분리 효소인 PGase와 증진제로서 guar gum을 가한 후 45°C, pH 5.0 조건에서 2시간 동안 교반하면서 단세포화 하였다. 이로써 얻어진 단세포화 페이스트를 여과한 후 광학현미경을 이용하여 단세포화 반응이 효과적으로 수행되었음을 확인 하였다. 제조된 단세포화 페이스트를 원심분리(3,500×g, 4°C)하여 상등액을 제외한 부분의 무게를 측정함으로써 단세포화 수율을 계산하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

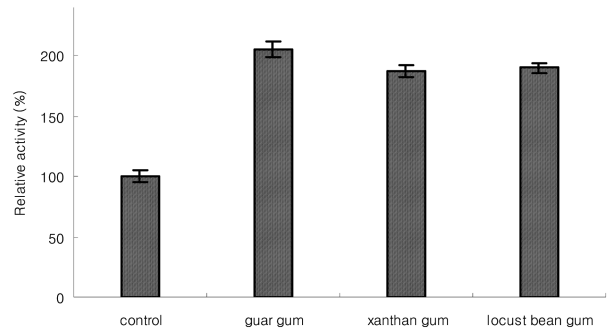


Fig. 1. Comparison of the relative activity of the purified polygalacturonase in the presence and absence of gums

결과 및 고찰

PGase의 활성 및 안정성

PGase를 pH 5.0의 20 mM sodium acetate 완충용액 또는 0.2%의 guar gum, xanthan gum, locust bean gum을 함유하는 동일한 완충용액에 잘 혼합시켜 30°C에서 배양하였다. 교질물질 처리 여부에 따라 상대 활성을 비교하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 대조군에 비해 guar gum 첨가 시는 PGase의 상대 활성이 105%증가 되었으며, xanthan gum 첨가 시는 87%, locust bean gum 첨가 시는 90% 증가되었다. 텍스트린 등과 같이 안정제의 역할을 수행할 수 있는 물질을 첨가(Moreau et al., 1994)함으로써 효소의 안정성을 증진시키는 연구 결과가 보고된 바 있으며, 상술한 교질물질들 또한 안정제 및 효소 활성 촉진제로서의 기능이 있음을 확인할 수 있었다.

단세포 야채의 제조 및 구아검 농도별 단세포 제조 수율

선별, 세정, 절단한 등황색의 당근 10 g을 95°C 물에서 2분간 블랜칭한 후 food cutter로 1-3 mm로 다시 세절하여 반응용기에 투입하고 증류수 10 mL을 가한 후 20 mM sodium acetate buffer를 사용하여 pH 5.0로 맞추었다. 단세포화 분리 효소인 PGase 0.005 g과 PGase의 활성 증진 및 안정성 실험에서 가장 우수한 결과를 확인한 guar gum을 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 g 농도별로 가하고,

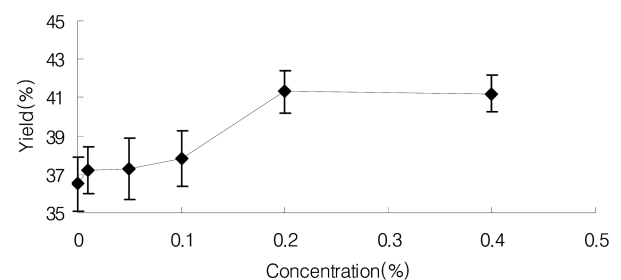


Fig. 2. Effect of the concentration of guar gum on the yield for the production of carrot single cell by the polygalacturonase

PGase 0.005 g만을 가하여 대조군으로 하였다. 45°C, pH 5.0에서 2시간 동안 교반하면서 얻어진 단세포화 페이스트를 여과한 후 원심분리(3,500×g, 4°C)하여 상등액을 제외한 부분의 무게를 측정함으로써 단세포화 수율을 계산하였다. Guar gum 농도에 따른 수율을 비교한 결과 0.2% 이상의 농도에서는 더 이상 수율이 증가하지 않았다(Fig. 2). 이상의 결과에 따라 단세포 제조 수율 실험에서의 guar gum 사용량을 0.2% 농도로 정하였다.

Guar gum 첨가 시 반응시간에 따른 단세포 제조 수율

단세포화 분리 효소인 PGase 0.005 g과 증진제로서 guar gum 0.02 g을 가하고, 다른 반응용기는 PGase 0.005 g만을 가하여 대조군으로 하였다. 45°C, pH 5.0에서 4시간 동안 교반하면서 얻어진 단세포화 페이스트를 여과한 후 원심분리(3,500×g, 4°C)하여 상등액을 제외한 부분의 무게를 측정함으로써 단세포화 수율을 계산하였다. 모든 반응시간에서 guar gum을 가했을 때가 PGase만을 가하여 단세포화 반응을 수행한 경우 보다 높은 수율을 보였으며, 단세포화 반응 후 2시간째에 41.2% 수율로 36.5% 수율을 보인 대조군 대비 13% 가량의 수율 향상을 보였다(Fig. 3). Park &

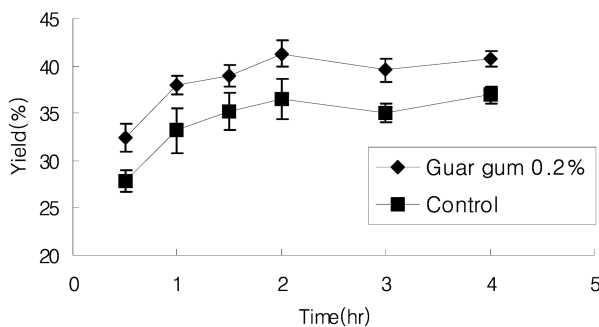
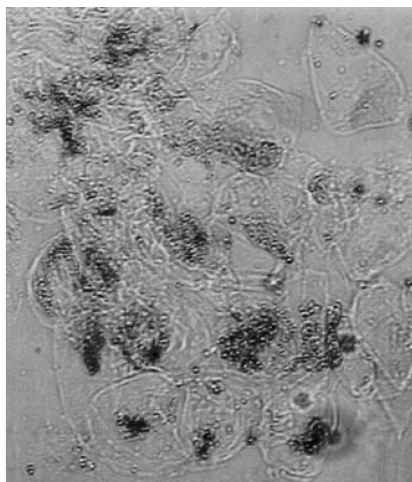


Fig. 3. Comparison of the yield for the production of carrot single cell by the polygalacturonase with and without guar gum



Kang(2004)은 연구에서 식물세포분리효소를 이용하여 수박과 참외의 단세포화 반응을 시킨 결과 수박은 반응 2시간째에 12.4%, 참외는 1.5시간째에 20.2%의 수율을 얻은 바 있다. 본 실험에서 식물단세포화 반응이 성공적으로 잘 수행되었음을 확인할 수 있었으며, 현미경으로 반응물을 관찰한 결과, 분리된 당근 단세포를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

이상의 결과에서 PGase에 guar gum, xanthan gum, locust bean gum 등과 같은 교질물질을 첨가함으로써 효소의 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있으며, 이를 이용한 단세포 당근의 제조에 있어서 효소반응의 수율 증진을 위한 방법으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

PGase를 포함한 통상의 효소들은 단백질이 갖는 특성상 자연계로부터 분리되면 시간이 경과함에 따라 그 활성이 점차 감소하는, 즉 안정성이 저하되는 문제점이 있으므로 그 안정성을 증진시키고자 하는 노력들이 시도되어 왔는데, 효소 용액 내에 알부민(Chang & Mahoney, 1995) 또는 텍스트린 등과 같이 안정제의 역할을 수행할 수 있는 물질을 첨가(Moreau et al., 1994)하는 연구가 진행된 바 있다. 본 연구에 이용된 교질물질들 또한 PGase를 안정화시켜 그 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있으며, 이를 이용한 단세포 야채의 제조에 있어 효소반응 수율을 증진할 수 있었리라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 효소의 활성을 증진시킬 수 있는 새로운 방법의 개발을 위하여 정제된 polygalacturonase(PGase)에 guar gum, xanthan gum, locust bean gum 등과 같은 교질물질을 첨가함으로써 효소의 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있는 방법 조사하였다. 정제된 PGase를 0.2%의 상술한 교질물질을 함유하는 동일한 완충용액에 잘 혼합시켜 30°C에서 배양하여 상대활성을 구한 결과, guar gum 첨가 시

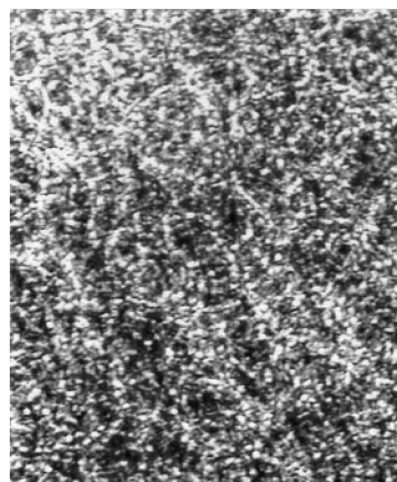


Fig. 4. Photomicrograph of carrot single cell and mechanically crushed carrot (×125)

는 PGase의 상대활성이 105%가 증가 되었으며, xanthan gum 첨가 시는 87%, locust bean gum 첨가 시는 90%가 증가되어 상술한 교질물질들이 효소의 활성 촉진제로서의 기능이 있음을 확인할 수 있었다.

Guar gum 처리에 의해 당근 단세포 생성 반응을 수행한 결과 모든 반응시간에서 guar gum을 가했을 때가 PGase만을 가하여 단세포화 반응을 수행한 경우 보다 높은 수율을 보였으며, 단세포화 반응 2시간 경과 후에 대조군 대비 13%의 가장 높은 수율 향상을 보였다.

이상의 결과에서 PGase에 guar gum, xanthan gum, locust bean gum 등과 같은 교질물질을 첨가함으로써 효소의 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있으며, 이를 이용한 단세포 당근의 제조에 있어서 효소반응의 수율 증진을 위한 방법으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

- Call HP, Waler J, Emeis CC. 1985. Maceration activity of an endo-polygalacturonase from *Candida macedoniensis*. J. Food Biochem. 9: 325-348.
- Chang BS., Mahoney RR. 1995. Enzyme thermostabilization by bovine serum albumin and other proteins. Biotechnol. Appl. Biochem. 22: 203-214.
- Gainvors A, Frezier V, Lemaesquire H, Lequart C, Aigle M, Belbarbi A. 1994. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. Yeast 10: 1311-1319.
- Gomez-Ruiz L, Garcia-Garibay M, Barana E. 1988. Utilization of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. J. Food Sci. 53: 1236-1240.
- Honda S, Nishimura Y, Takahashi M, Chiba H, Kakehi K. 1982. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. Anal. Biochem. 119: 194-199.
- Iguchi K, Kishida M, Sakai T. 1996. Purification and characterization of three extra cellular protopectinases with polygalacturonase activity from *Trichosporon penicillatum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 603-667.
- Lim JY, Yamasaki Y, Ozawa J. 1980. Multiple forms of endo-polygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. Agric. Biol. Chem. 44: 473- 480.
- Maldonado MC, Saad AM. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 20: 34-38.
- Martel MB, Letoublon R, Fevre M. 1998. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. PFEMS Microbiol. Lett. 158: 133-138.
- Moreau A, Shareck F, Kluepfel D, Morosoli R. 1994. Increase on catalytic activity and thermostability of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1362 by site-specific mutagenesis. Enz. Microb. Technol. 16: 420-424.
- Mozhaev VV, Melik-Nuvarov NS, Levitsky VY, Siksnis VA, Martnek K. 1992. High stability to irreversible inactivation at elevated temperatures of enzymes covalently modified by hydrophilic reagent. Biotechnol. Bioeng. 40: 650-662.
- Nakamura T, Hours RA, Sakai T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. J. Food. Sci. 60: 468-472.
- Park YK, Kang YH. 2004. Characteristics of suspension containing single cells from watermelon and muskmelon treated with cell separation enzymes. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 58-63.
- Sakai T, Okushima M, Yoshidake S. 1984. Purification, crystallization, and some properties of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. Agric. Biol. Chem. 48: 1951-1961.
- Takasawa T, Sagisaka K, Yagi K, Uchiyama K, Aoki A, Takaoka K, Yamamoto K. 1997. Polygalacturonase isolated from the culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. Can. J. Microbiol. 43: 417-424.
- Tolbert NE. 1980. The Biochemistry of Plants. Vol. 1, Academic Press, New York, USA, pp. 101-116.