

## 추출방법에 따른 사과 펙틴의 특성 비교

최정선 · 조용진

한국식품개발연구원

### Characteristics of Apple Pectins Extracted with Different Extraction Methods

Jung-Sun Choi and Yong-Jin Cho

Korea Food Research Institute

#### Abstract

The characteristics of apple pectin extracted by the enzymatic and acidic treatments were investigated. The cellulase, hemicellulase, amyloglucosidase and Econase® (commercial enzyme) were used to extract pectin from apple pomace produced in apple juice manufacturing. The pectic substances were characterized in terms of the yield, purity, anhydrogalacturonic acid content, neutral sugar content, degree of methoxylation and molecular weight. The yields of water soluble polysaccharides in enzymatic methods were 6.9~11.6% while that in acidic treatment was 10.1%. The purity and methoxyl content for enzymatically extracted pectin were 63.3~82.0% and 9.47~11.08%, respectively, which were higher than 65.8% and 9.37% for acidic treated pectin. The distribution of side chain in pectin was affected by the kind of enzymes.

Key words: pectin, enzymatic treatment, acidic treatment

## 서 론

펙틴은 식물조직에서 세포벽, 또는 세포벽 사이에 존재하는 얇은 층에 주로 존재하며, 세포벽 사이의 얇은 층을 떼우고 세포벽 내부, 또는 세포와 세포 사이를 결합시키는 물질이다(McNeil *et al.*, 1984). 식물조직에서 추출한 펙틴은 물성개량제로서 유제품, 육류제품, 감미료, 제과·제빵 제품, 조리식품, 소스, 드레싱, 음료수 등 식품가공과, 동물사료, 화장품, 제약제품 등에 사용되고 있다(May, 1990). 최근에는 지방대체제로서 아이스크림, 샐러드드레싱, 빵류, 치즈 제조 등에 이용되며 저지방 마요네즈용 펙틴을 개발하여 마요네즈의 지방함량을 60% 이상에서 20% 이하로 감소시키는 등 식품의 기능특성이 다양해지고 있다(식품산업편집부, 1993).

또한, 펙틴은 물에 녹으면서 인체내의 소화효소에

의해 분해되지 않는 식이섬유로서 혈중 콜레스테롤 저하, 당뇨병 환자의 glucose intolerance 감소와 인체 면역활성을 강화시키며, 펙틴 분해물의 항균작용과 생리활성 작용 등이 밝혀지고 있어 관심이 모아지고 있다(Yamada, 1994).

펙틴의 원료로는 주로 사과박, 감귤류, 사탕무박 등이 이용되고 있다. 식물 세포벽으로부터 수용성 다당류를 생산하는 방법으로는 산을 이용한 화학적 처리 방법이 주로 이루고 있으나, 처리과정에 따른 공해문제 및 생산된 다당류의 기능성 저하 등의 문제점이 있다. 이런 단점을 보완하기 위한 효소를 이용한 추출 방법은 식물 세포벽에서 펙틴의 결사슬을 선택적으로 분해시키는 효소를 이용하면 고분자의 펙틴을 얻을 수 있으나 식물의 세포벽을 수용화시키는 대부분의 효소에는 펙틴의 분해효소를 함께 가지고 있어 펙틴의 주 골격이 분해되었을 때는 펙틴의 분자량이 감소되는 문제점이 있다(May, 1990).

펙틴은 그 소비량이 해마다 증가하고 있으나 우리나라의 경우 전량 외국에서 수입되고 있다(관세청, 1998). 우리나라에서는 많은 양의 사과가 주스로 가공

Corresponding author: Yong-Jin Cho, Senior Researcher, Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si 463-420, Korea

되고 있어 부산물인 사과박이 연간 60MT(습량기준)이 나 배출되고 있는 것으로 추정되고 있다. 이러한 자원을 활용하여 펙틴을 생산함에 있어 환경친화적이면서 생산된 다당류의 기능성을 제고하는 생산기술에 관한 연구가 수행된 바 있다(조용진, 1998).

본 연구에서는 사과주스의 가공 부산물인 사과박을 이용하여 펙틴을 생산함에 있어 효소적 방법에 의한 추출효과를 구명하고자 효소의 종류에 따른 수율과 펙틴의 품질을 분석하였다. 또한, 그 결과를 기존의 산처리 방법과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

사과박은 국내 사과주스 생산공장(대구경북농협동조합)에서 수거하여 건조된 것을 냉장 보관하면서 사용하였다. 효소는 Sigma사로부터 구입한 cellulase (C-8546), hemicellulase(H-2125), amyloglucosidase (A-7255)와 cellulose의 가수분해에 의한 식물성 원료 가공에 쓰이는 산업용 복합효소인 Econase CEP (Primalco사)를 이용하였다.

### 산처리 방법에 의한 펙틴 추출

사과박 시료 50 g에 HCl 용액(pH 1.8) 1 L를 넣고 85°C에서 30 분간 130 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다. 반응액을 6,500×g에서 10 분간 원심분리한 후 상등액을 여과하였다. 여과액을 1.0N NaOH를 이용하여 pH 4.5로 조절한 후 여과액의 4 배에 해당하는 isopropanol을 넣고 8 시간 방치하였다. 이를 여과시키면서 isopropanol과 acetone으로 씻어서 건조시켰다. 건조된 시료를 증류수에 1% 용액이 되도록 용해시킨 후 6,500×g에서 10 분간 원심분리시킨 후 동결건조하였다.

### 효소를 이용한 펙틴 추출

사과박 시료 2 g에 100 mL 증류수를 넣고 40°C로 유지한 후, 이 용액에 효소를 0.05M pH 4.5 sodium acetate buffer에 용해시켜 사과박 100 g당 1.3 units를 첨가하여 24 시간동안 130 rpm으로 교반시키면서 반응시킨 후 6,500×g에서 10 분간 원심분리시킨 후 여과시켰다. 여과액을 100°C에서 10 분간 가열하여 효소를 불활성시킨 후 산추출법과 동일하게 수용성 분획을 얻었다.

### 수용성 다당류의 수율

분리된 수용성 다당류의 함량을 초기 시료함량에 대한 %로 나타내었다.

### 펙틴의 순도 및 중성당 함량

펙틴의 순도는 수용성 다당류의 anhydrogalacturo-nic acid(AGA) 함량으로부터 구했다. AGA 함량은 McCready와 McComb(1952)의 방법으로 m-hydroxy-diphenyl(Blumenkrantz와 Asboe-Hansen, 1973)을 이용하여 비색법으로 측정하였다. 표준곡선은 galacturonic acid를 이용하여 구하였다.

중성당 함량은 phenol-sulfuric법(Dubois *et al.*, 1956)에 의하여 측정하였다. 표준곡선은 glucose를 이용하여 구하였다.

### 메톡실 함량

Pectin의 methoxyl 함량은 Owens(1952)의 적정법에 의해 측정하였다. 시료 0.5 g을 정확히 평량하여 5 mL의 ethanol로 적신 후 1.0 g NaCl과 증류수 100 mL를 가하였다. pH 7.5가 되도록 0.1N NaOH로 적정하였다.

위 용액에 0.25N NaOH 25 mL를 가하고 혼합하여 실온에서 30 분간 방치하였다. 다시 0.25N HCl 25 mL를 가하여 잘 섞고 0.1N NaOH로 pH 7.5가 될 때까지 적정하였다. 이 적정치로부터 다음 식에 의해 methoxyl 함량과 degree of esterification(DE)을 계산하였다.

$$\% \text{Methoxyl} = \frac{N \times \text{Vol. of alkali (mL)} \times 0.031}{\text{weight of sample (g)}} \times 100$$

여기서 N : Normality of NaOH

$$\text{Degree of esterification (\%)} = \frac{\% \text{Methoxyl}}{16.32} \times 100$$

### 고유점도 및 분자량

수용성 다당류의 고유점도는 Cannon-Fenske capillary viscometer(size 50)를 이용하여 측정하였다. 수용성 다당류를 일정 농도로 용해시킨 후 0.45 μm Millipore filter에 여과한 후 25±0.1°C에서 점도를 측정하였다.

비점도(Specific viscosity:  $\eta_{sp}$ )와 고유점도(intrinsic viscosity:  $[\eta]$ )를 다음과 같이 구한 후

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_s) / \eta_s$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp} / C$$

여기서  $\eta$ : 용액의 점도,  $\eta_s$ : 용매의 점도, C: 용액의 농도

펙틴의 분자량은 Mark-Houwink식(Launay *et al.*, 1986)을 이용하여 구했다.

$$[\eta] = 2.16 \times 10^{-4} M^{0.79}$$

$$M = (4,630 \times [\eta])^{1.2658}$$

### Ion exchange chromatography

시료 25 mg을 pH 4.5, 0.05M sodium acetate buffer 10 mL에 용해시킨 후 0.45  $\mu$ m Millipore filter에 여과하여 4 mL를 column에 주입하였다. Column은 0.05M pH 4.5 sodium acetate buffer로 DEAE Sepharose CL-6B를 평형시켰다(column size: 1.5 $\times$ 25 cm). Buffer를 0.7 mL/min의 속도로 0.05M에서 1.0M로 linear gradient로 증가시키면서 3 mL씩 분획하였다. 각 분획에서 AGA와 중성당을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 수용성 다당류의 수율

사과박에서 수용성 다당류를 얻기 위하여 효소처리 하였을 때의 수율은 Table 1과 같다. 효소처리를 하지 않은 대조구에서의 수율은 3.6%이었으며, 화학적 방법인 산처리시 수율은 10.1%로 약 2.8배 증가하였으며, 효소 hemicellulase와 amylo-glucosidase 처리시 수율이 6.9%와 7.9%로 산처리에 비해 낮았으나, cellulase를 사용하였을 때는 10.7%로 산처리와 거의 비슷한 수율을 얻을 수 있었다. 반면, 식물세포벽을 분해시키는 효소인 cellulase와 함께 사용하였을 때 매우 효율적이라는 amyloglucosidase를 cellulase와 동시에 이용하였을 때는 수율이 11.6%로 산처리에 비해 증가하였다. 또한 상업용 복합효소로 이용되고 있는 Econase 이용시 수율은 11.5%로 단일 효소이용에 비해서 수율이 상승하였으며 cellulase와 amyloglucosidase를 함께 이용하였을 때와 비슷한 것으로 나타났다. Econase는 *Trichodema longibrachiatum*로부터 추출한 cellulase,  $\beta$ -glucanase, hemicellulase 효소로서 endo-1,4-D-glucanase, cellodio-hydrolase, exo-1,4- $\beta$ -D-glucosidase, endo-1,3(4)- $\beta$ -D-glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xylanase 활성을 지니고 있다(Econase 제품사양서 참조).

### 펙틴의 순도 및 중성당 함량

추출한 수용성 다당류의 pectin 순도를 측정한 결과, 산처리시는 65.8%이었으며 cellulase, amyloglucosidase, cellulase+amyloglucosidase와 Econase를 이용한 경우는 각각 73.3%, 82.0%, 66.1% 및 73.1%로 산처

**Table 1. The yield of water soluble polysaccharides extracted from apple pomace**

Treatment	Yield (%)	% Increase
Control	3.6	-
Acid	10.1	281
Cellulase	10.7	297
Hemicellulase	6.9	192
Enzyme Amyloglucosidase	7.9	219
Cellulase+amyloglucosidase	11.6	322
Econase	11.5	319

**Table 2. The purity, anhydrogalacturonic acid (AGA) content and neutral sugar content of water soluble polysaccharides extracted from apple pomace**

Treatment	Purity (%)	AGA (mg/mL)	Neutral sugar (mg/mL)
Control	75.0	80.9	37.2
Acid	65.8	66.4	59.1
Cellulase	73.3	78.5	58.5
Hemicellulase	63.3	69.1	52.3
Enzyme Amyloglucosidase	82.0	87.8	50.4
Cellulase+amyloglucosidase	66.1	70.7	54.0
Econase	73.1	78.2	55.1

리보다 순도가 높게 나타났다(Table 2). 이는 효소를 이용하여 pectin을 분해할 경우 식물 세포벽에서 펙틴의 결사슬에 선택적으로 작용하여 cellulose와 기타 불순물이 적게 생산되었기 때문이라고 생각된다. Pectin 추출시 불순물에 해당되는 중성당의 함량은 효소이용시 50.4~58.5 mg/mL로 산처리시의 59.1 mg/mL에 비해 낮았다.

### 고유점도 및 분자량

추출한 pectin의 고유점도와 분자량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 고유점도는 대조구에서는 1.47 dL/g이었으며, 효소 cellulase, hemicellulase, amyloglucosidase의 이용시는 각각 0.84 dL/g, 0.81 dL/g 및 0.83 dL/g으로 산처리 0.84 dL/g와 유사하게 나타났으나, cellulase+amyloglucosidase, Econase 이용시는 각각 0.65 dL/g 및 0.59 dL/g로 더 낮았다. 또한 고유점도로부터 Mark-Houwink식을 이용하여 분자량을 계산한 결과, 대조군은  $7.11 \times 10^4$  Dalton이었으며 산처리시는  $3.50 \times 10^4$ , 효소처리시는  $2.24 \times 10^4 \sim 3.52 \times 10^4$  Dalton이었다. 이는 산과 효소처리에 의해 식물세포벽을 수용화

**Table 3. The intrinsic viscosity and molecular weight of water soluble polysaccharides extracted from apple pomace**

Treatment	Intrinsic viscosity (dL/g)	Molecular weight
Control	1.47	$7.11 \times 10^4$
Acid	0.84	$3.50 \times 10^4$
Cellulase	0.84	$3.52 \times 10^4$
Hemicellulase	0.81	$3.34 \times 10^4$
Enzyme Amyloglucosidase	0.83	$3.45 \times 10^4$
Cellulase+amyloglucosidase	0.65	$2.53 \times 10^4$
Econase	0.59	$2.24 \times 10^4$

**Table 4. The methoxyl contents and DE values of water soluble polysaccharides extracted from apple pomace**

Treatment	%Methoxyl	DE*(%)
Control	11.43	70.02
Acid	9.37	57.42
Cellulase	10.37	63.54
Hemicellulase	10.31	63.17
Enzyme Amyloglucosidase	11.08	67.89
Cellulase+amyloglucosidase	10.66	65.32
Econase	9.47	58.03

\*Degree of esterification.

할 경우 식물의 분자구조가 파괴되면서 전체적인 분자량이 감소하기 때문인 것으로 생각된다. 효소처리가 산처리에 비하여 고유점도와 분자량이 낮은 것은 효소내 pectin의 주골격을 분해시키는 pectinase에 의해 pectin이 분해됨으로써 나타나는 결과로 순도가 높은 효소 이용시 pectin의 수율이 높으면서 분자량이 큰 pectin을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

#### 메톡실 함량

추출한 pectin의 methoxyl 함량은 Table 4와 같다. 산처리에 의한 펙틴의 메톡실 함량은 9.37%였으며, 효소처리에 의해 추출된 pectin의 methoxyl 함량은 9.47~11.08%로 high methoxyl pectin이었다. 효소처리 중에서 Amyloglucosidase 처리시의 메톡실 함량은 11.08%로서 대조구의 11.43%와 비슷한 수준이었다. 한편, 최동원(1996)은 산처리와 hemicellulase처리시 추출된 pectin의 methoxyl 함량은 각각 5.46%와 5.66%인 low methoxyl pectin으로 보고한 바 있다.

#### Ion exchange chromatography

산처리와 효소처리에 의해 추출한 pectin의 ion exchange chromatography 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 펙틴은 buffer의 농도가 점차 증가함에 따라 용출되어 2개의 peak로 나타났다. 처음 용출되는 분획은 0.05M sodium acetate buffer에서 pectin에 결합되어 있지 않은 중성당으로 pectin 생산시 생성되는 불순물에 해당되며, 0.5~0.6M sodium acetate buffer에서 galacturonic acid와 함께 용출되는 중성당은 pectin의 주골격에 결합되어 있는 결사슬로 생각된다. 1M sodium acetate buffer에서는 pectin이 거의 용출되지 않았다.

대조구에서는 자유중성당이 발견되지 않았으나 산처리시 전체 중성당의 11%, 효소처리시 8.6~27%로 나타났다. 이는 산처리와 효소 처리에 의해 식물세포벽이 분해된 것을 의미한다. 효소 처리 중에서 amyloglucosidase 처리시 불순물인 자유중성당이 가장 적게 나타났다.

한편, 중성당과 결합되어 용출되는 galacturonic acid 분획에서 galacturonic acid/neutral sugar의 비율은 산처리시 2.0, cellulase는 2.1, hemicellulase는 1.9, amyloglucosidase는 2.1, cellulase+amyloglucosidase는 1.0, Econase는 1.4이었다. 단일효소를 이용하였을 때보다 Econase와 cellulase+amyloglucosidase 복합효소를 이용하였을 때 중성당에 대한 galacturonic acid의 비율이 낮았으며, 이는 고유점도의 결과와도 유사한 경향을 보이는 것이다.

## 요 약

식물 세포벽으로부터 수용성 다당류를 생산하는 경우 산을 이용하는 화학적 처리 방법이 주를 이루고 있으나, 추출 수율이라는 관점에서만 본다면 효율적이나 처리과정에 따른 공해문제 및 생산된 다당류의 기능성 저하 등의 문제점이 있다. 본 연구에서는 효소를 이용하여 식물세포벽을 수용화함으로써 화학적 처리방법의 단점을 극복하면서 수율과 품질을 향상시킬 수 있는 효소적 방법을 찾고자 하였다. 이를 위하여 효소는 cellulase, hemicellulase, amyloglucosidase와 Econase를 이용하였다. 수용성 다당류의 수율은 무처리인 대조군에서는 3.6%이었으나 cellulase와 amyloglucosidase 처리시 10.7%와 7.9%로 대조군에 비해 3.0 배와 2.2 배로 증가하였다. Cellulase와 amyloglucosidase를 복합하여 이용하였을 때 수율은 11.6%로 상승되었으며, 상업적으로 식물 세포벽을 수용화하는 데 이용되고 있는 Econase 이용시는 11.5%로 나타났다. 이는 산처리시의 수율 10.1%보다 높았

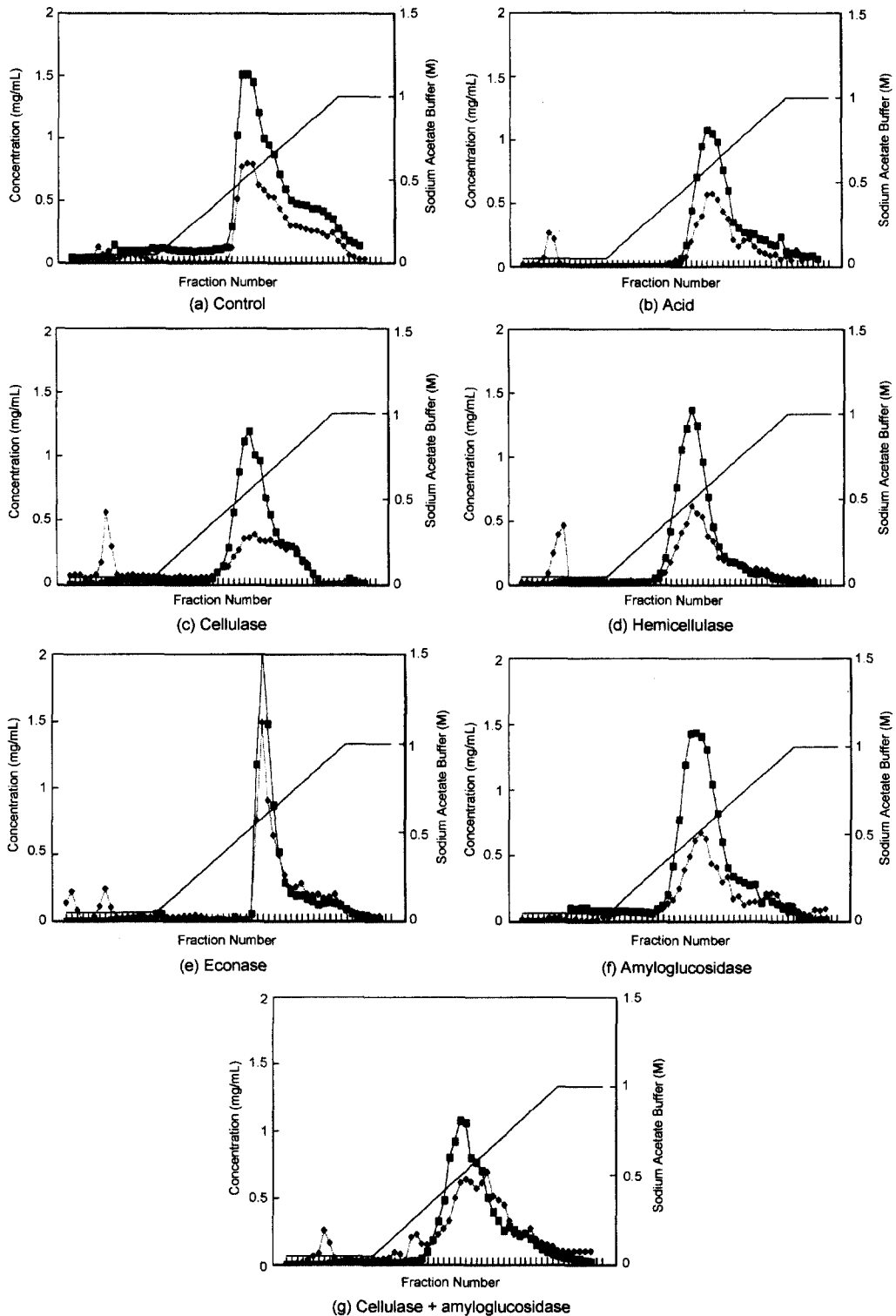


Fig. 1. Ion exchange chromatography of water soluble polysaccharides. - □ -: AGA, - ◇ -: neutral sugar.

다. Pectin의 순도는 대조군은 75.0%이었으며 산처리 시 65.8%로 낮아졌으나 cellulase, amyloglucosidase와 Econase 처리시는 각각 73.3%, 82.0%와 73.1%로 산처리보다 높게 나타났다. 효소로 추출한 수용성 다당류의 methoxyl 함량은 9.47~11.08%로 high methoxyl pectin이었으며, 분자량은 산처리시  $3.50 \times 10^4$ 이었으며, cellulase와 hemicellulase 처리시  $3.52 \times 10^4$ 와  $3.34 \times 10^4$ 이었으나 cellulase와 amyloglucosidase를 동시에 사용하거나 삼업용 효소인 Econase 사용시 각각  $2.53 \times 10^4$ ,  $2.24 \times 10^4$ 로 감소되었다. 이는 효소내에 pectin의 주골격을 분해시키는 효소에 의해 pectin의 주골격이 분해되었기 때문으로 생각되며 순도가 높은 효소를 이용하면 수율이 높으면서 분자량이 높은 pectin을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

## 문 헌

- 관세청. 1998. 무역통계연보. 서울
- 식품산업편집부. 1993. 일본내 저칼로리용 식품소재 동향. 식품산업 6월호: 105-108
- 조용진, 황재관, 김철진, 김종태, 최정선, 이승철. 1998. 식물 세포벽의 선택적 수용화에 의한 기능성 다당류의 생산기술. 농림부 연구보고서 GA0044-0982
- 최동원. 1996. 효소에 의한 사과 세포벽 펙틴 추출. 한국식품영양학회지 9(4): 413-418
- Bluemenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical Biochemistry* 54: 484-489
- De Vres, J.A., F.M. Rombouts, A.G.J. Voragen and W. Pilnik. 1982. Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymer* 2: 25
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Robers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350
- Launay, B., J.L. Doublie, G. Cuvelir. 1986. Flow properties of aqueous solutions and dispersions of polysaccharides. In: *Functional Properties of Food Macromolecules*. J. R. Mitchell and D. A. Ledward (eds.). Elsevier Applied Science Publishers, New York. pp1-78
- May, C.D. 1990. Industrial pectins: sources, production and application. *Carbohydrate Polymers* 12: 79-99
- Massiot, P. and J.F. Thibault. 1989. Enzymic analysis of carrot cell-wall polysaccharides. *Carbohydrate Polymer* 10: 124-136
- McCready, R.M. and E.A. McComb. 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Analytical Chemistry* 24: 1630
- McNeil, M., A.G. Darvill, S.C. Fry and P. Albersheim. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry* 53: 625-663
- Owens, H.S. 1952. Methods used at western regional research laboratory for extraction and analysis of pectic materials. U.S. Department of Agriculture, Bureau of Agricultural and Industrial Chemistry
- Renard, C.M., A.G.J. Voragen, J.F. Thibault and W. Pilnik. 1991. Studies on apple protopectin V: structural studies on enzymatically extracted pectins. *Carbohydrate Polymer* 16: 137-154
- Renard, C.M., J.F. Thibault, A.G.J. Voragen and W. Pilnik. 1993. Studies on apple protopectin VI: extraction of pectins from cell walls with rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Polymer* 22: 203-210
- Talmadge, K.W., K. Keegstra, W.D. Bauer and P. Albersheim. 1973. The structure of plant cell walls. *Plant Physiology* 51: 158
- Yamada, H. 1994. Pectic polysaccharides from Chinese ferbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymer* 25: 269-276