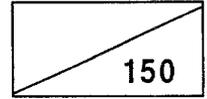


664.2
L293A



19916631

식물 세포벽의 선택적 수용화에 의한 기능성
다당류의 생산기술

Production of Functional Polysaccharides by Selective
Solubilization of Plant Cell Wall

연구기관
한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물 세포벽의 선택적 수용화에 의한 기능성 다당류의 생산기술” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 조 용 진

: 황 재 관 (연세대학교, 구연구책임자)

연 구 원 : 김 철 진

연 구 원 : 김 종 태

연 구 원 : 최 정 선

위탁연구기관명 : 경남대학교

위탁연구책임자 : 이 승 철 (경남대학교)

여 백

요 약 문

I. 제 목

식물 세포벽의 선택적 수용화에 의한 기능성 다당류의 생산기술

II. 연구개발의 목적 및 중요성

- 다당류는 점증제, 안정제, 겔화제, 지방대체제 등의 다양한 기능특성을 제공하는 주요 식품소재의 하나임에도 불구하고 국내 생산기반은 전무한 실정이다.
- 국내의 다당류 원료자원은 풍부함에도 불구하고 다당류 생산기술이 미흡하여 자원이 폐기되다시피 함. 예를 들면, 사과주스 부산물인 사과박은 유용자원으로 재활용되는 수준이 매우 낮은 형편이다.
- 외국의 경우조차 기존의 다당류 생산기술은 강한 산·알칼리법에 의존하고 있어 환경오염이 심각한 실정이다. 예를 들면, 미국의 펙틴생산설비는 멕시코로 이전되어 가동되고 있다.
- 따라서, 본 연구의 목적은 저가의 생물자원으로부터 고품질의 다당류를 생산함에 있어 환경친화적인 생산기술의 개발이 요구되는 바, 사과박과 미역 세포벽의 선택적 수용화에 의한 고품질 및 고수율의 펙틴과 알긴산 생산기술을 개발하는 데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 세포벽 물질 수용화를 위한 물리적 방법 개발

가. 원료물질의 분석 (사과박 및 미역을 대상으로)

나. 압출에 의한 다당류 생산기술 개발

다. 생산된 다당류의 수율 및 품질 분석

2. 세포벽 물질 수용화를 위한 효소적 방법 개발

가. 효소처리에 의한 다당류 생산기술 개발

나. 생산된 다당류의 수율 및 품질 분석

3. 산업화 공정개발

가. 물리적 방법에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화

나. 효소적 방법에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화

다. 공정의 종합적 평가

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 다당류의 물리적 수용화 기술 개발

가. 사과박 및 미역의 주요성분

본 연구에 사용된 사과박은 수분 11.4%, 조단백질 3.7%, 조지방 4.5%, 회분 1.8%, 탄수화물 70.9%(중성당 38.3%, 우론산 27.4%, 전분 5.2%) 등으로 구성된 것으로 분석되었다. 사과박의 탄수화물 가운데 우론산은 갈락투론산으로서

주로 펙틴을 이루고 있다.

건조된 미역의 주요성분은 수분 11.4%, 조단백질 19.4%, 조지방 4.3%, 회분 20.3%, Klason lignin 10.9%, 탄수화물 47.2% 등으로 나타났다. 탄수화물 가운데 우론산은 22.2%로 mannuronic acid와 guluronic acid로서 이루어져 있으며, 이들이 알긴산을 구성하게 된다.

나. 물리적 추출법 설계

세포벽 모형에 근거하여 고온고압 조건하에서 기계적인 전단응력을 식물 세포벽에 가할 경우 수용성 다당류를 효과적으로 분리할 수 있다는 가설을 도입하였다. 압출성형기의 내부가 고온고압에 의한 반응조로서의 역할을 수행할 수 있도록 동방향완전맞물리형 이축압출성형기를 이용하여 압출성형기의 L/D(길이/직경)비가 20:1이 되도록 설치한 후, 공정변수로서 스크류 속도, 원료의 공급률 및 가수률을 제어하여 비기계에너지(specific mechanical energy)가 102~176kWh/ton인 조건하에서의 추출효과를 분석하였다.

다. 추출 수율

사과박으로부터 압출에 의해 수용성 다당류를 추출한 결과, 수율(수세척된 원료기준)은 11.9~19.8%(세척전 최초원료 기준의 수율은 5.6~9.4%)의 범위를 보였는데, 압출시의 비기계에너지가 증가할수록 수율은 향상되는 것으로 나타났다. 비기계에너지와 수율 사이의 상관관계는 0.960으로 나타났다. 압출에 의한 추출수율은 기존의 전형적인 산처리 조건(pH 1.8, 85℃)하에서의 수율 14.4%(최초원료 기준의 수율은 6.8%)에 비하면 크게 향상될 수 있는 것으로 나타났다.

미역의 경우, 압출에 의한 다당류 추출수율은 기존의 알칼리법에 의한 수율과 유사한 수준인 13.5~15.3%로 나타났다.

라. 추출물의 품질

압출에 의해 사과박으로부터 추출된 수용성 다당류의 무수갈락투론산 함량은 53.1~59.3%로 나타났으며, 비기계에너지와의 상관관계는 역상관을 보였다. 기존의 산처리에 의한 추출시 추출물의 무수갈락투론산의 함량은 50.4%로 나타났다.

수용성 다당류의 중성당 함량의 경우, 산처리의 38.3%에 비해 압출의 경우 19.1~30.7%의 범위로 나타났다. 압출시 비기계에너지의 증가에 따라서는 추출물의 중성당 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

고유점도 측정법에 의해 수용성 다당류의 분자량을 분석한 결과, 압출에 의한 추출물의 분자량은 $4.97 \times 10^4 \sim 2.41 \times 10^5$ 의 분포를 보였으며, 비기계에너지의 증가에 따라 분자량은 감소하는 것으로 나타났다. 산처리에 의한 추출물의 분자량은 1.81×10^5 로 나타났다.

이온교환크로마토그래피를 통해 압출에 의한 추출물의 분포를 분석한 결과, 압출시 비기계에너지가 증가할수록 추출물의 순도와 분자량이 감소하는 것으로 나타났다.

한편, 압출에 의해 미역으로부터 추출한 수용성 다당류의 분자량은 알칼리법에 의한 경우와 비슷한 158,000~165,500으로 나타났다.

2. 다당류의 효소적 수용화 기술 개발

가. 효소적 추출법 설계

식물 세포벽은 여러 가지 세포벽 분해효소에 의해 저분자 물질로 분해된다는 현상을 이용하여 분해속도를 제어할 경우 유용한 고분자 물질을 추출할 수

있다는 가설을 도입하였다. 2종의 cellulase, 2종의 hemicellulase, 1종의 glucosidase, 1종의 exo-polygalacturonase를 사용하여 온도, pH, 반응시간, 원료와 효소의 농도비에 따른 수용화 효과를 분석하였다.

나. 추출 수율

cellulose 분자를 무작위적으로 가수분해하는 효소로 알려져 있는 cellulase를 이용하여 사과박의 수용성 다당류의 분획 효과를 분석한 결과, pH 5.0, 40℃의 조건하에서 기질농도(완충용액대비) 1~5%, 효소농도(기질대비) 0.03~5%, 반응시간 12~24hr의 범위에서 추출물의 수율(세척전 최초 원료기준)은 1.5~10.8%로 나타나 추출조건에 따라서 큰 차이를 보였다. cellulase에 의한 최대수율은 5%농도의 기질에 기질대비 4%의 효소를 혼합하여 24시간 추출하였을 때 나타났다.

cellulase에 의한 미역의 수용화 효과는 사과박의 경우와 유사한 추출조건하에서 1.4~3.3%의 수율을 보였다.

hemicellulase를 이용한 수용성 다당류의 추출수율을 분석한 결과, cellulase에 의한 추출효과 분석시 사용한 반응조건과 유사한 조건하에서 사과박의 경우 수율은 2.3~6.6%, 미역의 경우 0.9~3.1%로 나타났다.

glucosidase를 pH 5.5, 40℃의 조건하에서 사과박과 효소를 10:1의 비율로 혼합하여 0.5%의 용액으로 12~72hr 반응시킨 결과, 최대수율은 36시간 경과 후 8.3%로 나타났다.

폴리갈락투론산을 말단에서 순차적으로 하나씩 가수분해하는 것으로 알려진 exo-polygalacturonase(exo-PG)의 수용화 효과를 pH 3~pH 9, 반응온도 30~67℃, 반응시간 12~72hr, 효소대기질비 1/100~1/5의 조건하에서 분석한 결과, 사과박의 경우 최대수율은 pH 7, 반응온도 45℃, 반응시간 60hr, 효소대기질비 1/20의 조건에서 9.3%로 나타났다. 미역의 경우 최대수율은 pH 7, 30℃, 반응시간 24hr의 조건에서 10.6%로 나타났다.

다. 추출물의 품질

exo-PG를 이용하여 사과박으로부터 수용성 다당류를 추출하였을 때 최대수율을 얻을 수 있는 추출조건하에서 펙틴의 순도는 80.1%, 메톡실 함량은 6.36%, 평균분자량은 1.50×10^4 로 나타났다. 반면에 산처리에 의해 추출된 수용성 다당류의 펙틴의 순도는 75.7%, 메톡실 함량은 2.44%, 평균분자량은 7.66×10^4 로 나타났다.

cellulase를 이용하여 수용성 다당류를 추출하였을 때 평균분자량은 추출조건에 따라서 $0.70 \times 10^4 \sim 9.96 \times 10^4$ 의 범위를 보였으며, 최대수율을 얻을 수 있는 조건하에서 평균분자량이 3.1×10^4 로 나타났다.

한편, exo-PG를 이용하여 미역으로부터 알긴산을 추출하였을 때 순도는 20.9%로 매우 낮았다.

3. 산업화 공정개발

가. 물리적 방법에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화

압출에 의해 사과박으로부터 수용성 다당류를 추출하고자 할 때, 수율과 품질은 추출조건에 따라서 크게 달라지는 것으로 나타난 바, 공정 및 품질 관리를 위한 최적화를 효과적으로 수행하기 위하여 추출모형을 개발하였다. 비기계 에너지(SME)에 대한 수용성 다당류의 수율 및 평균분자량의 수학적 모형은 함수의 기울기가 각각 0.0958과 2140을 가지는 1차 함수형으로 표시할 수 있었으며, 이때 수율 모형의 결정계수는 0.921, 평균분자량 모형의 결정계수는 0.893으로 나타났다. 한편, 펙틴의 순도와 관련이 있는 무수갈락투론산 함량에 관한 수학적 모형은 -0.0637의 기울기를 가지는 1차 함수형으로 표시할 수 있

었으며, 모형의 결정계수는 0.865로 나타났다.

압출에 의한 추출모형은 선형함수로 나타났기 때문에 비기계에너지의 투입을 증가시킬수록 수율은 증가하나 수용성 다당류의 품질은 감소하는 것을 알 수 있다. 기존의 산처리에 의해 생산된 다당류와 동일한 분자량을 갖는 제품을 생산하기 위해서는 압출에 의한 추출시 124kWh/ton의 비기계에너지를 투입하여야 하며, 이때의 수율은 13.7%로 나타났다. 이와 같은 결과를 얻기 위한 공정변수의 값들은 공정최적화에 의해 다양한 조합으로 나타날 수 있는 바, 스크류 속도 250rpm, 원료의 공급량 40kg/hr, 원료의 수분함량 25%의 조건이 한 예가 되는 것으로 분석되었다.

나. 효소적 방법에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화

exo-polygalacturonase에 의한 수용성 다당류의 추출시 최적반응조건은 pH 7, 반응온도 45°C, 효소대기질비 1/20의 조건으로 얻어졌으며, 이와 같은 조건 하에서 반응시간에 따른 추출반응의 수학적 모형은 지수함수형의 비선형모형으로 얻을 수 있었다. 효소에 의한 추출모형은 사과박의 경우 불용성의 프로토펙틴이 효소반응에 의해 수용성의 펙틴으로 추출되며, 또한 분자량이 큰 수용성의 펙틴은 다시 저분자 물질로 분해된다는 가정하에 개발되었다. 펙틴 생성을 나타내는 효소반응의 반응속도상수(k_1)는 0.0114hr^{-1} 로 나타났으며, 펙틴이 저분자 물질로 분해되는 반응의 반응속도상수(k_2)는 0.0243hr^{-1} 로 나타났다.

다. 공정의 종합적 평가

식물 세포벽으로부터 기능성 다당류를 생산함에 있어 기존의 산처리 방법을 대체할 수 있는 새로운 방법을 시도하였던 바, 본 연구에서는 압출에 의한 물리적 방법과 효소적 방법을 도입하여 그 효과를 분석하였다. 기존의 산처리 방법은 오래전부터 산업적으로 이용되어 온 방법으로서 경제성이 인정되는 방법

임에도 불구하고 환경오염 문제로 인하여 대체 방법이 요구되고 있다. 더구나 생산설비의 규모와는 별개로 환경설비가 필수적으로 요구되고 있어 이에 대한 비용부담이 증가하는 추세에 있다.

특히, 자원의 규모가 세계규모에 비해 상대적으로 작은 우리나라의 농산물 및 농산부산물을 부가가치가 높은 자원으로 활용하기 위해서는 환경설비에 대한 부담이 거의 없는 새로운 다당류 생산방법이 모색되어야 한다.

SUMMARY

I. Subject

Production of Functional Polysaccharides by Selective Solubilization of Plant Cell Wall

II. Objective and Significance

Functional polysaccharides such as pectin and alginate are being produced by chemical treatment. Because the chemical methods can cause environmental pollution, a new technique for the clean production of polysaccharides is required. In the meanwhile, apple pomace and seaweed which are useful resources as raw materials of pectin and alginate are being littered. The objectives of this study were to develop physical and enzymatic extraction techniques of functional polysaccharides having high yield and quality and minimum environmental pollution.

III. Contents and Scope of Research

1. Development of physical extraction techniques

A. Solubilization of plant cell wall by extrusion

B. Analysis of yield and quality of water soluble polysaccharides

2. Development of enzymatic extraction techniques
 - A. Solubilization of plant cell wall by enzymatic treatment
 - B. Analysis of yield and quality of water soluble polysaccharides

3. Development of industrial pectin manufacture process
 - A. Modeling of physical extraction and optimization
 - B. Modeling of enzymatic extraction and optimization
 - C. Manufacture process and standardization

IV. Results and Recommendation

1. Development of physical extraction techniques

A. Design of physical extraction

Proposition was introduced that plant cell wall be dissolved by mechanical shearing force under high pressure and temperature. For the experiment, a corotating intermeshing type twin-screw extruder with L/D ratio of 20:1 was used. Screw speed, feed rate, moisture content of raw material as process variable were selected.

B. Yield of water soluble polysaccharides

The solubilization of plant cell wall was affected by the specific mechanical energy of extruder. The yield of water soluble polysaccharides increased with the specific mechanical energy. Their relationship showed

the correlation coefficient of 0.960. For apple pomace, the yields by extrusion were the range of 11.9% to 19.8% (based on washed raw material), the maximum of which was higher than that by a traditional acid method. For seaweed, the yield by extrusion was similar to that by a traditional alkali method.

C. Quality of extract

In extrusion, the contents of anhydrogalacturonic acid and neutral sugar of water soluble polysaccharides from apple pomace were 53.1% to 59.3% and 19.1% and 30.7% while those by acid extraction were 50.4% and 38.3%, respectively. The average molecular weight of extract obtained by extrusion was 4.97×10^4 to 2.41×10^5 while that obtained by acid method 1.81×10^5 . In the meanwhile, the average molecular weights of water soluble polysaccharides obtained by extrusion and acid treatment were similar to each other.

2. Development of enzymatic extraction techniques

A. Design of physical extraction

Proposition was introduced that plant cell wall be dissolved by some certain enzymes and the functional water soluble polysaccharides may be obtained by the control of enzymic reaction. For the experiment, cellulase, hemicellulase, glucosidase and exo-polygalacturonase were used. Reaction temperature, pH, reaction time and ratio of concentration of enzyme to that of substrate as process variable were selected.

B. Yield of water soluble polysaccharides

Solubilization of plant cell wall using enzyme was greatly affected by the kind of enzyme and the reaction condition. Out of enzymes used in this experiment, exo-polygalacturonase was effective to solubilize both apple pomace and seaweed while cellulase effective to solubilize apple pomace only. The maximum yields of water soluble polysaccharides using exo-polygalacturonase were 9.3% and 10.6% (based on initial raw material) for apple pomace and seaweed, respectively.

C. Quality of extract

For water soluble polysaccharides obtained by exo-polygalacturonase from apple pomace, purity of pectin, methoxyl content and molecular weight were 80.1%, 6.36% and 1.50×10^4 , respectively, under the extraction condition for maximum yield. In the meanwhile, the purity of alginate obtained by exo-polygalacturonase was no more than 20.9%.

3. Development of industrial pectin manufacture process

A. Modeling of physical extraction and optimization

The yield and quality models were developed to be of forms of linear functions having the independent variables of moisture content and feed rate of raw material and screw speed. The determination coefficients of yield, molecular weight and anhydrogalacturonic acid content models were

0.921, 0.893 and 0.865, respectively. By using these models, the optimization for yield and quality could be done.

B. Modeling of enzymatic extraction and optimization

The yield and quality models for enzymatic extraction were developed to be of forms of nonlinear exponential functions for extraction and degradation of water soluble polysaccharides. In these models, reaction rate constants were 0.0114hr^{-1} and 0.0243hr^{-1} for extraction and degradation of pectin, respectively.

C. Remarks on a new manufacture process

Traditional chemical methods for functional polysaccharides manufacture have some environmental problems in spite of high productivity. The physical and enzymatic extraction techniques developed in this study showed possibility to replace the present chemical methods in the view of yield and quality of polysaccharides.

여 백

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	29
Section 1	Background and Significance	29
1.	Background	29
2.	Significance	30
Section 2	Objective and Scope	34
1.	Objective	34
2.	Scope	34
Chapter 2	State-of-the-Art Report	37
Section 1	International Status	37
1.	Structure of Plant Cell Wall	37
2.	Chemical Solubilization of Plant Cell Wall	40
3.	Physical Solubilization of Plant Cell Wall	41
4.	Enzymatic Solubilization of Plant Cell Wall	45
Section 2	Domestic Status	45
1.	Physical Solubilization of Plant Cell Wall	46
2.	Enzymatic Solubilization of Plant Cell Wall	47
Chapter 3	Solubilization by Extrusion	49
Section 1	Introduction	49
Section 2	Materials and Methods	50

1. Materials	50
2. Chemical Extraction	50
3. Experimental Design of Extrusion	51
4. Fractionation of Water-Soluble Polysaccharides	53
5. Yield of Water-Soluble Polysaccharides	54
6. Contents of Anhydrogalacturonic acid and Neutral Sugar	54
7. Intrinsic Viscosity	54
8. Ion Exchange Chromatography	55
Section 3 Results and Discussion	56
1. Composition of Apple Pomace and Seaweed	56
2. Yield of WSP of Apple Pomace	56
3. Intrinsic Viscosity and Molecular Weight of WSP	62
4. New Dimensionless Parameter for Process Analysis	65
5. Ion Exchange Chromatography	68
6. Yield and Quality of WSP of Seaweed	70
Section 4 Summary	71
Chapter 4 Solubilization by Enzymatic Treatment ..	73
Section 1 Introduction	73
Section 2 Materials and Methods	74
1. Materials	74
2. Pretreatment of Raw Material	75
3. Fractionation of WSP	75
4. Yield of WSP	76
5. Ion Exchange Chromatography	76
6. Purity of WSP	77

7.	Molecular Weight of WSP	77
8.	Chemical Extraction	78
Section 3 Results and Discussion		79
1.	Yield by Chemical Extraction	79
2.	Solubilization Using Exo-polygalacturonase	79
3.	Solubilization Using Cellulase	82
4.	Solubilization Using Hemicellulase	89
5.	Solubilization Using Glucosidase	94
6.	Quality of Extracts	95
Section 4 Summary		98
Chapter 5 Pectin Extraction Using Exo-PG		101
Section 1 Introduction		101
Section 2 Materials and Methods		102
1.	Materials	102
2.	Extraction of WAIP from Apple Pomace	102
3.	Extraction of ASP from WAIP	103
4.	Extraction of ESP from WAIP	103
5.	Purity and Methoxyl Content of Pectin	105
6.	Molecular Weight of Pectin	105
Section 3 Results and Discussion		106
1.	Extraction of WAIP and ASP	106
2.	Extraction of ESP	107
3.	Quality of Pectin	112
Section 4 Summary		114

Chapter 6	Alginate Extraction Using Exo-PG	115
Section 1	Introduction	115
Section 2	Materials and Methods	115
1.	Materials	116
2.	Extraction Using Acid-Alkali	116
3.	Extraction Using Hot Water	116
4.	Extraction Using Exo-PG	117
5.	Purity of Alginate	118
6.	Ion Exchange Chromatography	118
Section 3	Results and Discussion	118
1.	Effect of Reaction Time	118
2.	Effect of pH	119
3.	Effect of Reaction Temperature	120
4.	Quality of Alginate	121
Section 4	Summary	124
Chapter 7	Industrial Pectin Manufacture Process	.	125
Section 1	Introduction	125
Section 2	Extraction Modeling and Optimization	125
1.	Reaction Kinetics	125
2.	Models for Extrusion	127
2.	Models for Enzymatic Extraction	132
Section 3	Manufacture Process and Standardization	133
1.	Manufacture Process	133
2.	Standardization	135

Section 4 Summary	136
Chapter 8 Summary and Conclusions	139
References	145

여 백

목 차

제 1 장 서 론	29
제1절 연구개발의 필요성	29
1. 연구개발의 배경	29
2. 연구개발의 필요성	30
제2절 연구개발의 목적과 범위	34
1. 연구개발의 목적	34
2. 연구개발의 범위	34
제 2 장 연구 및 기술 동향	37
제1절 외국의 경우	37
1. 식물 세포벽의 구조	37
2. 식물 세포벽의 화학적 수용화	40
3. 식물 세포벽의 물리적 수용화	41
4. 식물 세포벽의 효소적 수용화	45
제2절 국내의 경우	45
1. 식물 세포벽의 물리적 수용화	46
2. 식물 세포벽의 효소적 수용화	47
제 3 장 압출에 의한 식물세포벽 수용화 ..	49
제1절 서 론	49

제2절 재료 및 방법 50

- 1. 실험재료 50
- 2. 화학적 추출법 50
- 3. 압출처리 실험설계 51
- 4. 수용성 다당류의 분획 53
- 5. 수용성 다당류의 수율 결정 54
- 6. Anhydrogalacturonic acid 및 중성당 함량 결정 54
- 7. 고유점도 54
- 8. 음이온교환 크로마토그래피 55

제3절 결과 및 고찰 56

- 1. 사과박 및 미역의 주요 성분 56
- 2. 사과박의 압출에 의한 수용성 다당류 생산 56
- 3. 수용성 다당류의 고유점도 및 분자량 62
- 4. 새로운 최적화 공정변수의 개발 65
- 5. 이온교환 크로마토그래피 68
- 6. 미역의 압출에 의한 다당류 생산 기술 70

제4절 요약 및 결론 71

제 4 장 효소처리에 의한 수용화 효과 .. 73

제1절 서론 73

제2절 재료 및 방법 74

- 1. 실험재료 74
- 2. 원료의 전처리 75
- 3. 수용성 다당류의 분획 75
- 4. 수용성 다당류의 수율 결정 76

5. 추출물의 성분 분석	76
6. 추출물의 순도 분석	77
7. 다당류의 분자량 분석	77
8. 화학적 추출	78
제3절 결과 및 고찰	79
1. 화학적 처리에 의한 수율	79
2. Exo-polygalacturonase의 수용화 효과	79
3. Cellulase의 수용화 효과	82
4. Hemicellulase의 수용화 효과	89
5. Glucosidase의 수용화 효과	94
6. 추출물의 품질 분석	95
제4절 요약 및 결론	98

제 5 장 Exo-PG를 이용한 **펙틴 추출** ... 101

제1절 서론	101
제2절 재료 및 방법	102
1. 실험재료	102
2. 사과박으로부터 WAIP의 제조	102
3. WAIP로부터 ASP의 제조	103
4. WAIP로부터 ESP의 제조	103
5. 펙틴의 순도 및 methoxyl 함량 측정	105
6. 펙틴의 분자량 분석	105
제3절 결과 및 고찰	106
1. 사과박으로부터 WAIP 및 ASP의 제조	106

2. WAIP로부터 ESP의 제조	107
3. 추출된 펙틴의 특성	112
제4절 요약 및 결론	114

제 6 장 Exo-PG를 이용한 알긴산 추출 .. 115

제1절 서론	115
--------------	-----

제2절 재료 및 방법	115
-------------------	-----

1. 실험재료
2. 산-알칼리추출법에 의한 알긴산 추출
3. 열수추출법에 의한 알긴산 추출
4. 효소처리법에 의한 알긴산 추출
5. 알긴산의 순도
6. 이온교환 크로마토그래피

제3절 결과 및 고찰	118
-------------------	-----

1. 반응시간의 영향
2. pH의 영향
3. 온도의 영향
4. 종합 고찰

제4절 요약 및 결론	124
-------------------	-----

제 7 장 산업화 공정 개발 125

제1절 서론	125
--------------	-----

제2절 추출 모형 개발 및 최적화	125
--------------------------	-----

1. 기본 모형 설정	125
2. 압출에 의한 추출 모형	127
3. 효소처리에 의한 추출 모형	132
제3절 펙틴의 제조 공정 및 표준화	133
1. 제조 공정	133
2. 제품 표준화	135
제4절 요약 및 결론	136

제 8 장 종합 결론	139
-------------------	-----

참 고 문 헌	145
---------------	-----

여 백

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 배경

다당류는 점증제, 안정제, 겔화제, 지방대체제 등의 다양한 기능 특성을 제공하므로 각종 가공식품의 생산에 광범위하게 사용되고 있으며, 식품 이외에도 제지, 광업, 섬유 등 각종 관련 산업에의 활용성이 매우 높은 생물소재이다.

다당류는 크게 전분과 비전분계 하이드로콜로이드(hydrocolloids)로 나눌 수 있다. 다당류의 다양한 기능성은 상이한 구조적 특징을 갖는 비전분계 하이드로콜로이드에 의한 것으로 최근 이들 물질의 생산과 응용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

최근 국내에서 다당류의 수요가 매년 급격히 증가하고 있으나, 국내의 다당류 생산기반은 매우 미약한 실정이다. 현재 국내에서 생산되고 있는 다당류는 카라기난, 한천 등 불과 몇 종에 불과하며 대부분의 다당류 소재가 외국으로부터 수입되고 있다.

다당류 생물소재의 생산에 있어서 반드시 고려되어야 하는 2가지 요인은 첫째 생산기술의 보유와 둘째 원료의 안정적 수급이다.

다당류 가운데 국내에서의 수요가 많고 원료가 다량 발생함에도 불구하고 생산기반이 없는 대표적인 예가 펙틴(pectin)과 알긴산(alginic acid)이다. 펙틴은 지금까지 국내에서 본격적인 연구나 산업적 생산기술의 개발이 진행된 바 없으며, 반면에 알긴산의 경우에는 과거에 일부 생산되었으나 가격 경쟁력이 없어 현재는 국내 생산이 중단된 상태이다.

펙틴과 알긴산의 원료인 사과박과 해조류(미역 등의 갈조류)의 경우에는

원료의 국내공급이 충분히 가능하다. 따라서 기존의 전통적인 생산기술을 향상시켜 외국제품에 대한 기술적 우위를 확보할 경우 국내 생산기반의 확립이 가능하다.

또한, 일반적으로 다당류의 생산기술은 원료 세포벽의 구조적 특징상 추출 과정은 다르지만 기타 다른 제조공정은 비슷하기 때문에 관련 기술의 개발은 다른 다당류의 생산기술에도 응용이 가능하다. 즉, 국내에서 원료가 많이 생산되지 않으나 수요가 많은 갈락토만난, Konjac glucomannan, 아카시아검 등의 경우에도, 산지로부터 원료의 안정적 공급을 확보할 경우 관련 생산기술의 응용을 통하여 국내 생산 기술의 자립화가 가능하다.

결론적으로 다당류에 대한 3가지 측면 즉, (1) 수요의 확산, (2) 국내산 제조원료의 다량 발생, (3) 생산기술의 미흡을 고려할 때 우선적으로 외국의 제품에 대하여 품질과 가격의 우위를 점할 수 있는 관련 생산기술의 개발이 필수적이다. 따라서 기존의 전통적인 방법을 크게 개선시킬 수 있는 새로운 개념의 생산기술 개발이 필요할 것이다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

식물 세포벽을 이루고 있는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴, 단백질 등의 구성성분은 공유결합, 이온결합, 수소결합, 소수결합 등을 통하여 서로 강하게 결합되어 있다. 이와 같은 결합력은 식물의 입장에서 보면 외부로부터의 공격에 대하여 자신을 보호하기 위한 자체 방어수단(self-defence mechanism)으로 작용한다. 반면에 이들 식물체로부터 특정 물질을 얻고자 하는 입장에서 보면 이러한 결합력을 제거할 수 있는 수단의 사용이 필요하다.

다당류는 세포내에 존재하고 있는 물질이 아니라 세포벽을 이루고 있는

물질이기 때문에 어떤 특정한 다당류 성분을 추출하기 위해서는 이들 불용성 결합력을 깨뜨리는 수단을 사용하게 된다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법은 화학적인 방법이다. 예를 들어 펙틴을 생산하기 위해서는 사과박을 고온에서 산처리(pH 1.5~2.5, 온도 80~100°C)하여 수용화시키며, 알긴산의 경우에는 갈조류의 원료에 알칼리(0.1M Na₂CO₃, 온도 60~90°C)를 처리하여 추출한다.

이러한 고전적인 화학제 처리방식은 추출수율이라는 관점에서만 본다면 매우 효율적인 방법이다. 그러나 하나의 소재를 생산하기 위해서는 추출공정 이외에 전 생산공정의 효율성을 고려해야한다. 즉, 화학적 처리방법은 화학제에 의한 각종 단위조작 설비의 부식 및 이에 따른 부대시설의 필요성, 최종 제품 생산을 위한 추출액의 pH 조절, 소재 생산 후에 잔류하는 부산물의 재활용 불가능 등과 같은 많은 문제점을 갖고 있다.

화학적 처리방법은 위와 같은 공정상의 문제점뿐만 아니라 화학제의 특성상 생산하고자 하는 최종 물질의 분자량을 감소시키는 단점이 있다. 예를 들어 산처리를 하면 사과박의 펙틴성분을 수용화 하는데 매우 효율적이지만 펙틴 자체가 산에 의하여 분해되기 때문에 펙틴의 품질이 저하되는 결과를 갖는다. 일반적으로 다당류의 기능성은 분자량에 비례하므로 가능한 한 고분자량의 다당류를 생산할 수 있는 공정의 개발이 필요하다.

이러한 단점에도 불구하고 화학적 처리방법이 주를 이루어 온 것은 지금까지 이를 대체할 수 있는 적절한 공정수단의 개발이 미흡하기 때문이다. 그러나 최근 각종 물리적 처리방법이나 효소적 처리방법에 의해 식물 세포벽을 수용화함으로써 화학적 처리방법의 단점을 극복하면서 생산성을 증가시킬 수 있다는 연구보고가 발표되고 있다. 아직 이러한 시도는 연구단계로서 실용화되어 있지 않으나 이에 대한 보다 구체적이고 실제적인 기술의 개발이 이루어질 경우 기존의 화학적 처리방법을 크게 개선할 수 있는 새로운 개념의 소재생산 공정을 확립할 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

최근 국내 소비자들의 자연건강식품에 대한 선호현상으로 과일 및 야채를 이용한 주스 등 각종 가공제품의 생산과 판매가 급증하고 있다. 특히 사과주스의 경우 1992년도 경북능금조합에 대규모 사과주스 제조공장이 설치된 바 있으며, 또한 해태, 롯데, 동아식품 등 기존 주스 생산업체에서도 사과주스 생산량을 대폭 확대하고 있다. 현재 전국적으로 약 200M/T의 사과가 주스생산에 이용되는 것으로 파악되고 있다.

사과주스는 사과를 세척분쇄후 착즙하여 사과박은 제거하고 액상의 착즙액을 가공처리하여 생산된다. 사과착즙시 사과무게의 약 30%가 사과박으로 발생한다. 따라서 현재 국내에서 사과주스 생산시에 발생하는 사과박은 약 60M/T(습량기준)에 이른다.

현재 국내에서는 사과박을 일부 건조하여 단순히 사료로 이용하고 있으나(예, 경북능금조합), 대부분 건조과정없이 폐기처분하고 있다. 그런데 이들 가공 부산물들은 다량의 수분과 각종 유기물질을 함유하고 있어 쉽게 발효·부패되므로 심각한 환경오염문제를 야기시키고 있다. 앞으로 국가적인 차원에서 이들 환경오염물질에 관한 규제가 강화될 전망이므로 이들 부산물들을 적절히 처리할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

외국의 경우에는 사과박이나 감귤껍질로부터 고부가가치의 펙틴을 추출하여 잼, 젤리, 요구르트 등의 식품에 사용하고 있다. 그러나 국내에서는 풍부한 원료자원이 있음에도 불구하고 펙틴 생산에 관한 연구가 거의 이루어지지 않고 있으며, 국내에서 소비되고 있는 펙틴은 전량 외국으로부터 수입되고 있다. 연간 국내소비량은 약 50억원(1994년도 기준)으로서 다당류 소재 가운데 전분 다음으로 그 소비량이 크다.

따라서 국내에서 발생하는 사과박으로부터 펙틴을 생산할 경우 전량 외국에 의존하고 있는 펙틴의 수입대체효과를 얻을 수 있다. 또한 국내에서 생산

되고 있는 과일의 부가가치를 극대화하여 생산기반을 확고히 함으로써 최근 심화되고 있는 자유무역체계에 대한 하나의 대응방안을 제시할 수 있다.

미역은 국내에서 연간 약 300,000M/T 생산되는 대표적인 해산물로서 현재 대부분은 식단의 부식으로 이용되고 있다. 그러나 실제 이용량은 전체 생산량에 비하여 매우 낮아 대표적인 저이용식량자원(underutilized food resources)으로 분류되고 있다. 그런데 미역에는 대표적인 기능성 다당류인 알긴산이 다량 함유되어 있어 미역 등의 해조류를 이용하여 알긴산을 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

과거에는 국내에서도 알긴산의 생산이 이루어져 왔으나, 최근 중국으로부터 값싼 제품이 유입되면서 국내의 생산기반이 소멸된 상태이다. 이같은 상황에 도달된 가장 큰 이유는 가격경쟁력으로서 국내에서의 생산비용이 중국과 비교하여 2~3배 높은 것으로 파악되고 있다. 따라서 이와 같은 가격차를 극복하기 위해서는 기존의 화학적 처리방식을 크게 개선시킬 수 있는 공정의 개발이 필요하다.

그런데 일반적으로 이들 다당류 식품소재는 생산원료의 특징에 따라 추출 공정에 차이를 두고 있을 뿐 기본적인 생산공정은 추출, 분리, 정제, 제품 표준화 등의 유사한 공정으로 이루어져 있다. 따라서 본 연구에서 수행할 펙틴 및 알긴산의 생산공정은 포괄적 기술로서 기타 다른 탄수화물 소재산업의 자립화에 기여할 수 있다.

나. 사회적 측면

본 연구에서 다루고자 하는 사과박이나 기타 각종 과채류 가공부산물은 대부분 다량의 유기물질과 수분을 함유하여 쉽게 부패된다. 지금까지는 관례적으로 짚은 상태에서 농가에 사료로 제공되거나 폐기되어 지역에 따라서는 많은 민원이 야기되고 있다. 따라서 본 연구에서 수행할 연구는 이들 원료로

부터의 기능성 소재의 생산이라는 목적 달성 이외에 원료처리과정에서 부수적으로 환경오염에 대한 문제점도 해결할 수 있다.

본 연구에서 생산하고자 하는 펙틴과 알긴산은 영양학적 혹은 생리학적인 측면에서 보면 인체내에서 소화흡수 되지 않으면서 각종 기능성을 제공하여 주는 식이섬유로서 분류된다. 특히 이들은 수용성으로서 혈중 콜레스테롤의 함량을 낮추어 주는 생리활성을 갖고 있다. 최근 식이섬유에 대한 생리특성상의 장점이 알려지면서 식이섬유를 첨가한 식품의 개발이 활발히 진행되고 있다. 국내의 경우 주로 저분자량의 수용성 식이섬유 (polydextrose, dextrin)를 이용한 음료의 형태가 주종을 이루고 있으며, 특히 사용되는 소재는 전량 외국으로부터 수입에 의존하고 있다. 따라서 국내산 부존자원을 이용하여 유사한 기능성을 갖는 소재의 개발을 통하여 국민 건강에도 크게 기여할 수 있을 것이다.

제2절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 저가의 생물자원으로부터 고품질의 다당류를 생산함에 있어 환경친화적인 생산기술의 개발이 요구되는 바, 사과박과 미역 세포벽의 선택적 수용화에 의한 고품질 및 고수율의 펙틴과 알긴산 생산기술을 개발하는 데 있다.

2. 연구개발의 범위

(1) 세포벽 물질 수용화를 위한 물리적 방법 개발

- (가) 원료물질의 분석 (사과박 및 미역을 대상으로)
 - (나) 압출에 의한 다당류 생산기술 개발
 - (다) 생산된 다당류의 수율 및 품질 분석
- (2) 세포벽 물질 수용화를 위한 효소적 방법 개발
- (가) 효소처리에 의한 다당류 생산기술 개발
 - (나) 생산된 다당류의 수율 및 품질 분석
- (3) 산업화 공정개발
- (가) 물리적 방법에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화
 - (나) 효소적 방법에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화
 - (다) 공정의 종합적 평가

여 백

제 2 장 연구 및 기술 동향

제1절 외국의 경우

1. 식물 세포벽의 구조

본 연구에서 사용하고자 하는 원료는 사과박과 미역(갈조류)으로서 이들은 각각 다른 세포벽 구조를 갖는다. 이러한 구조적 특징의 차이 때문에 외부로부터의 각종 처리조건에 대한 반응과 그에 따른 구성성분의 수용화 현상이 다르게 나타난다. 지금까지 식물 세포벽의 구조적 구명은 식물 생리학 분야에서 매우 중요한 연구과제로서 다루어져 왔다. 세포벽의 구조는 식물의 종류, 생육조건 및 숙성도 등에 의하여 많은 차이가 나지만, 여기서는 지금까지 제시된 구조적 모델 가운데 널리 인용되고 있는 구조적 특징을 소개한다.

가. 과채류(사과박)

Fig. 1은 과채류의 1차 세포벽 구조를 개략적으로 나타낸 것이다. 그림에서 xyloglucan은 세포벽내에 존재하는 가장 대표적인 헤미셀룰로오스의 일종이며, rhamnogalacturonan과 arabinogalactan은 각각 펙틴의 주골격(main backbone)과 대표적인 측쇄(sidechain)의 구성성분이다. 지금까지의 연구결과에 의하면 식물의 종류에 따라 차이가 있기는 하지만 xyloglucan은 xylan 주골격을 통하여 셀룰로오스와 수소결합을 하며, 반면에 펙틴과 xyloglucan은 펙틴의 arabinogalactan 측쇄를 통하여 공유결합에 의하여 서로 연결되어 있는 것으로 알려져 있다. 즉 펙틴의 rhamnogalacturonan 주골격에 공유결합으로 연결되어 있는 arabinogalactan은 펙틴을 다른 세포벽 구성물질, 즉

xyloglucan 및 cellulose와 연결하는 가교(bridge)로서의 역할을 한다.

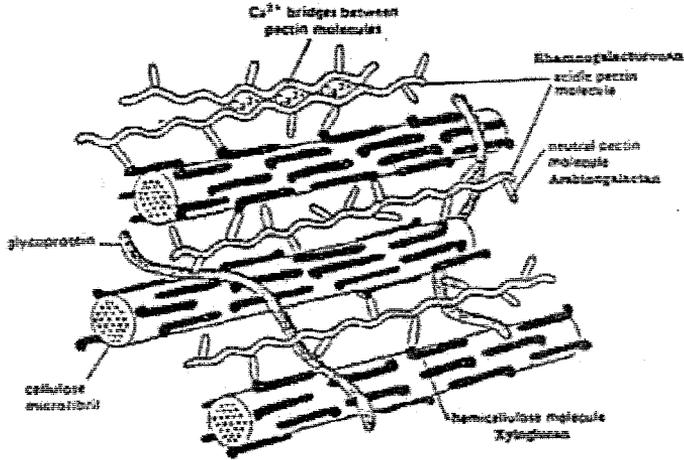


Fig. 2-1. The Primary Cell Wall Model of Dicot⁽¹⁾. Xyloglucan molecules are linked by hydrogen bonds to the surface of surface of the cellulose microfibrils. Some of these xyloglucans are cross-linked to acidic pectin molecules by arabinogalactan sidechains.

나. 해조류(미역)

대표적인 해조류의 하나인 갈조류의 세포벽 구조를 Fig. 2에 나타내었다. 셀룰로오스는 결정성의 microfibrils로서 분포하고 있고 이들 주위에 알지네이트들이 연속적인 그물구조의 형태로서 덮여 있다. 이들 알지네이트들은 분자 내의 polyguluronic acid 부분이 Ca^{+2} 이온들에 의해서, 그리고 polymannuronic acid 부분의 분자상호간 엉킴(intermolecular entanglements)

에 의하여 결합되어 있어 연속적인 그물구조를 형성하게 된다. 한편 xylofucoglucan은 셀룰로오스 microfibrils와 공유결합이나 수소결합에 의하여 연결되어 있는데, 이는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 과채류의 세포벽에서 xyloglucan과 셀룰로오스의 연결방식과 비슷하다는 것을 알 수 있다.

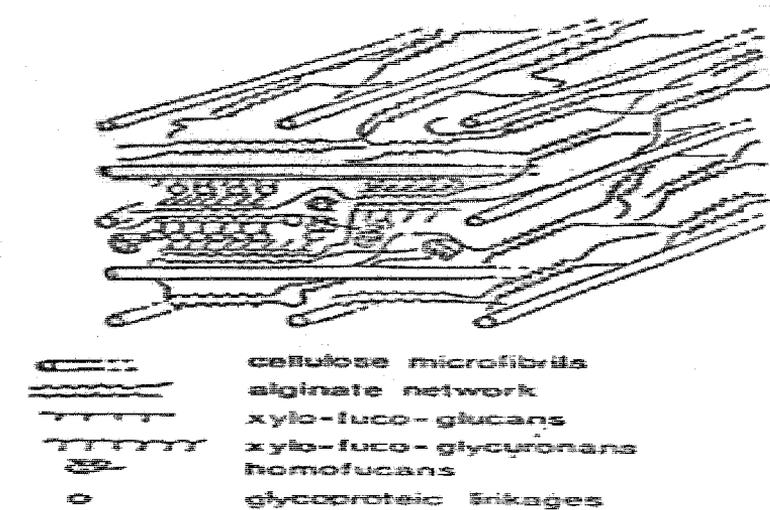


Fig. 2-2. Hypothetical Cell Wall Model of Brown Algae⁽²⁾.

A three-dimensional continuous alginate network is constituted by calcium bridged polyguluronate blocks and more or less entangled polymannuronate chains. The fucose-containing polymers probably play a role in cross-linking cellulose and alginate. Hypothetically, to the cellulose microfibrils are firmly bound xylofucoglucans in the same way as xyloglucan to cellulose in higher plants.

2. 식물 세포벽의 화학적 수용화

가. 펙틴

현재 산업적으로 펙틴은 사과주스나 감귤류 주스 가공부산물인 사과박이나 감귤류 껍질을 이용하여 생산된다⁽³⁾. 이들 원료에 존재하는 펙틴은 기본적으로 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 다른 세포벽 구성물질들과 결합되어 불용성 구조를 이루고 있다. 따라서 사과박으로부터 펙틴을 생산하기 위해서는 불용성 펙틴을 수용화 시킬 수 있는 수단이 필요하다. 현재 산업적으로 이용하고 있는 것은 고온강산 처리 방식으로서 대개 pH 1.5~2.5, 온도 70~100°C, 교반 시간 30분~2시간의 조건으로 추출한다. 추출율은 원료의 천연펙틴 함량의 양과 추출조건에 의존하며, 건조 감귤류껍질에서는 22~27%, 건조 사과박에서는 8~11%로 그 범위가 다양하다.

나. 알긴산

알긴산은 해조류 가운데 갈조류에 존재하는 다당류로서 펙틴의 산처리와는 달리 알칼리처리에 의하여 추출된다⁽⁴⁾. 이같은 처리방법의 차이는 펙틴과 알긴산이 세포벽에 존재하는 상태가 상이하기 때문이다. 앞의 세포벽 구조에서 언급한 바와 같이 알긴산의 지형화적인 위치는 펙틴과 비슷하다. 그러나 펙틴이 다른 구성성분들과 주로 당쇄결합(glycosidic linkages)에 의하여 강하게 연결되어 있는 반면에, 알긴산의 경우에는 세포벽의 Ca^{++} 에 의해 강한 이온결합을 이루고 있다. 따라서 알긴산의 경우에는 산처리보다는 알칼리처리가 이러한 이온결합 상태를 효율적으로 이완시키는 것으로 알려져 있다. 알긴산 추출에 사용되는 일반적 조건은 0.1M Na_2CO_3 를 60~80°C에서 처리한다.

3. 식물 세포벽의 물리적 수용화

식물의 세포벽은 앞에서 설명한 바와 같이 화학적 방법뿐만이 아니라 물리적 수단에 의해서도 수용화될 수 있다. 대표적인 처리방법으로는 압출성형, 초고압, autoclaving, ultrasonication, microwaving, roasting 등이 있다. 이 가운데 경제성이 있으면서 세포벽의 수용화에 적용이 가능한 공정에 대한 연구 현황은 다음과 같다.

가. 압출성형

압출성형을 이용한 식물 세포벽의 수용화는 주로 곡류 브랜(bran)의 물성을 개선하기 위하여 이용되어 왔다^(5,6). 브랜 세포벽의 구성성분은 매우 강하게 결합되어 있어, 자연상태로 식품에 이용할 경우 조직감과 관능성에 문제를 제공한다. 압출성형의 고온고압, 고전단력으로 조직의 결합력을 이완시키면 수용성 성분의 증가와 구조적 변환에 의해 관능성과 물성이 개량되는 효과가 있다. 그러나 곡류의 경우에는 세포벽의 변환에 의하여 어떤 특정한 성분을 얻는 것이 목적이 아니라, 시료 전체의 물성을 향상시키는 것이 주목적이다.

과채류의 세포벽에 대한 압출성형의 수용화 효과는 가공공정 후에 발생하는 가공부산물의 효율적 이용이라는 측면에서 연구가 이루어져 왔다⁽⁷⁾. 예를 들어 사과주스 생산 과정에서 수용성 성분의 대부분은 주스로 용출되기 때문에 사과박은 주로 불용성 상태로 남게 된다. 마찬가지로 사탕무(sugar beet)를 이용하여 설탕을 생산하는 경우에도 수용성성분을 제거하면 불용성의 사탕무박을 얻게 된다. 이들 사과박, 사탕무박 또는 유사한 공정 후에 발생하는 과채류 부산물에는 다량의 불용성 섬유질 성분이 포함되어 있는데, 이들의 불용성은 분자 자체의 구조적인 특성이 아니라 서로간의 밀접한 결합 때문이다.

압출성형은 이러한 불용성 성분의 수용화에 효율적으로 사용되어 왔다. 과채류의 압출성형 처리는 앞의 곡류처럼 전체시료의 물성개량 효과를 목적으로 하기도 하고, 또는 본 연구와 같이 특정 성분의 추출을 얻기 위한 목적으로 사용되기도 한다.

Ralet 등⁽⁸⁾은 여러 가지 압출성형 조건(처리온도범위 100~180°C, 스크류 회전속도 150~250rpm, 사탕무박에 대한 수분 20~30%)에 따른 사탕무박의 수용성 및 물리화학적 특성의 변화에 관하여 보고하였는데, 사탕무박 원료의 용해도(16.6%)가 압출성형 후에 24.4~47.5%로 증가하였다. 이 경우 펙틴의 가지부분에 해당하는 rhamnogalacturonic hairy region이 주로 분해되는데, 압출성형에 의한 펙틴추출은 산추출법에 비해 수율은 높은 반면에 펙틴의 중합도(degree of polymerization) 즉 분자량은 감소하는 것으로 나타났다.

산처리 방식 대신에 압출성형을 이용하여 펙틴을 생산하고자 하는 연구결과는 Ralet와 Thibault⁽⁹⁾에 의하여 1994년도에 최초로 발표되었다. 즉, 레몬껍질로부터 펙틴을 생산하기 위하여 압출성형 공정을 적용하였으며, 이 결과를 산처리 시료와 비교하였다. 압출성형 조건과 그에 따른 수율 및 고유점도에 대한 결과를 Table 1에 나타내었다. 표에서 나타난 바와 같이 압출성형공정에 따른 수율은 12.5~29.4%로서 기존의 산처리 공정의 34.1%보다 낮았다. 또한 분자량을 나타내는 고유점도의 경우에도 압출성형의 경우가 산처리보다 모든 공정조건에서 낮은 것을 알 수 있다. 즉, 레몬껍질의 경우 연구된 공정조건하에서 압출성형을 적용하였을 때 수율과 품질 면에서 기존의 산처리에 비해 전혀 장점을 제공하지 못하고 있는 것을 의미한다. 그러나 이러한 결과는 매우 제한된 공정조건하에서의 연구로서 일반적인 결과로 간주하기는 어렵다. 따라서 좀 더 체계적이고 광범위한 공정조건하에서의 연구가 필요할 것이다.

압출성형이 곡류나 과채류 가공부산물의 물성과 관능성을 증가시키거나 생물소재를 생산하기 위하여 비교적 활발히 연구가 진행된 것에 비해, 해조류에 대한 압출성형의 연구는 거의 이루어져 오지 않았다. 해조류의 경우에는 주로 화학적 처리에 의하여 세포벽으로부터 기능성 다당류인 알지네이트, 카

라기난, 한천 등을 추출하는 연구가 주종을 이루어 왔다. 곡류나 과채류의 세포벽 수용화에 있어 압출성형이 매우 효율적인 시스템인 것을 고려할 때 해조류의 경우에도 압출성형에 의한 세포벽 구조의 변환을 통하여 그 물성을 개선하거나 소재생산에 응용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 1. Effects of extrusion conditions on the yield and intrinsic viscosity of lemon fiber samples⁽⁹⁾

Sample	Temperature of the product (°C)	Screw Speed (rpm)	Water added (% of dry matter)	Feed Rate (kg/h)	SME (kWh/t)	Yield (%)	Intrinsic Viscosity (mL/g)
LF1	92	150	30.0	32	170	12.5	460
LF2	103	240	37.5	32	215	13.8	413
LF3	90	240	50.0	24	245	14.2	450
LF4	94	240	30.0	32	210	16.1	504
LF5	110	240	30.0	32	182	15.1	305
LF6	96	240	25.0	32	228	21.1	314
LF7	110	240	25.0	32	220	23.3	243
LF8	112	240	20.0	32	250	25.4	244
LF9	99	240	20.0	32	236	29.4	191
LFH	Acid Extraction (0.05M HCL, 85°C, 30min)					34.1	588

나. 고온고압

세포벽 구조변환에 대한 고온고압 처리는 주로 autoclaving에 의하여 이루어져 왔다. Guillon 등⁽¹⁰⁾은 사탕수수를 122°C와 136°C에서 1시간 동안 autoclaving(240kPa)한 후 처리하지 않은 시료와 수용성 식이섬유(SDF)의 함량을 비교하였다. 연구 결과에 의하면 무처리 시료의 SDF가 15.4%인데 반하여 autoclaving에 의하여 각각 25.9%와 29.7%로 증가한 것으로 나타났다. 수용성 식이섬유의 증가는 세포벽 성분의 수용화에 기인하기 때문에 autoclaving이 세포벽 성분의 수용화에 기여한 것을 의미한다. 화학적 성분의 분석 결과에 의하면 수용화 부분은 주로 펙틴과 arabinan으로 나타났다.

Autoclaving 처리는 습시료를 static 상태에서 가온가압한 것으로 위의 공정조건하에서 수용성 다당류가 약 70~90%가 증가한 것을 알 수 있다. 현재 실험적인 결과는 없으나 이와 같은 처리를 사과박이나 미역 등에 적용하였을 경우에도 세포벽 수용화에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 시료의 상태를 dynamic 상태로 유지하여 즉, pressure reactor에서 시료를 교반하면서 고온고압 처리할 경우 그 효과가 더욱 뚜렷하게 나타날 수도 있을 것이다. 초고압의 경우에는 산업화 단계에서 시설투자에 많은 어려움이 있으나 본 연구에서 수행하고자하는 $\sim 100\text{Kg/cm}^2$ 정도의 압력은 장치설계에 큰 어려움이 없이 그 효율이 입증될 경우 산업화가 가능할 것으로 예상된다.

다. 초음파 및 마이크로파

Panchev 등⁽¹¹⁾은 사과박을 ultrasonic 처리(22KHz, anode current $I_a = 0.75\text{A}$, initial magnetization current $I = 8.5\text{A}$, anode voltage $u_a = 2.6\text{kV}$)하여 펙틴을 생산하는 연구를 시도하였다. 연구결과에 따르면 산처리한 시료의 수율이 10.8%인데 비하여 ultrasonic 처리에 의하여 최대 약 30%까지 수율이 증가하였다고 보고하였다. 한편 Klatchanova 등⁽¹²⁾은 microwave(frequency 2450MHz, power 0.5kW) 처리에 의하여 사과박으로부터 펙틴을 생산하는 연구를 진행하였다. 산처리 시료의 수율이 19.8%인데 비하여 microwave 처리에 의하여 수율이 27.3%로 수율이 약 40% 증가하였다.

위의 결과에서 사과박에 대한 고주파처리에 의하여 수율이 증가하는 현상은 분명히 관찰되었다. 그러나 이같은 수율증가가 품질에 미치는 영향에 대해 상세히 연구된 바가 없으며, 또한 연구된 공정조건이 매우 제한되어 있어 세포벽 수용화에 대한 충분한 고찰이 매우 부족하다. 현재 위와 같은 전기적 장치는 많이 산업화되어 있어 생산소재의 수율과 품질에 효과가 좋을 경우 산업화 단계에서 무리없이 적용이 가능하다.

4. 식물 세포벽의 효소적 수용화

최근에는 지금까지 연구되어온 식물 세포벽 구조에 관한 기본모델을 토대로 효소적 방법에 의하여 펙틴을 추출하는 방법이 시도되고 있다. 즉, Fig. 1의 식물 세포벽 구조에 의하면 펙틴은 arabinogalactan sidechains을 통하여 다른 세포벽 구성물질인 cellulose나 hemicellulosic xyloglucan과 밀접하게 연결되어 있는 것을 알 수 있다. 따라서 pectin의 rhamnogalacturonan 주골격을 유지하면서 이들 결합을 효율적으로 제거할 수 있다면 분자량이 훨씬 큰 즉, 기능이 뛰어난 펙틴을 생산할 수 있다.

효소처리에 의한 펙틴추출방법은 펙틴연구로 유명한 네덜란드 Wageningen University의 Pilnik 박사 연구팀과 프랑스의 Thibault 박사 연구팀을 중심으로 연구가 진행되고 있다. Renard 등⁽¹³⁻¹⁹⁾의 연구결과에 의하면 arabinogalactan sidechains을 분해할 수 있는 arabinase나 galactanase를 처리하였을 경우 펙틴의 추출이 그다지 크게 증가하지 않았으며, 오히려 glucanase를 처리했을 때 펙틴추출이 증가하였다. 이같은 결과는 사과박의 세포벽 결합에 있어서 arabinogalactan보다는 xyloglucan이 펙틴과 다른 세포벽 물질과의 결합에 주도적 역할을 한다는 것을 의미한다. 그러나 사과박의 경우 품종이나 가공원료의 종류에 따라 결합구조의 차이가 나므로 이러한 결과를 일반화하기는 어렵다. 또한 위의 연구에서 사용된 효소 체계는 실험실에서의 배양과 정제과정을 거쳐 생산된 것으로 실용화에는 적합하지 않은 것으로 판단된다.

제2절 국내의 경우

1. 식물 세포벽의 물리적 수용화

국내에서 물리적 방법에 의한 식물 세포벽의 수용화에 대한 본격적인 연구는 1994년도에 본 연구진이 밀기울, 사과박, 미역 등의 국내산 저이용자원의 활용도를 높이기 위하여 압출성형 공정을 적용하면서 시작되었다⁽²⁰⁾. 밀기울의 경우에는 주로 전체적인 물성의 향상을 위해서, 사과박과 미역의 경우에는 물성의 개량이라는 1차적인 목적과 펙틴 및 알긴산을 생산하기 위한 기초 연구로 진행하였다. 여기서는 사과박과 미역에 대한 대표적인 연구결과를 소개하기로 한다.

국내산 건조 사과박(경북능금조합)에 대하여 screw speed 250~300rpm, feed rate 30~40kg/h, sample moisture 20~30% 범위의 14개의 공정조건하에 압출성형을 시행한 후 물리화학적 특성의 변화를 살펴보았다. 세포벽의 수용화에 대한 결과로서 원료시료의 수용성 다당류의 함량이 8.22%인데 반하여 압출성형한 시료의 경우에는 8.4~18.2%로 증가하였다. 이는 압출성형에 의하여 사과박의 불용성 세포벽의 상당부분이 수용화된 것을 의미한다. 한편 전통적인 화학적 추출방법의 수율은 15.40%였다. 즉 공정조건의 선정에 따라 수율 측면에서 보면 압출성형의 경우가 화학적인 처리방법보다 더 효율적이라는 것을 의미한다.

미역에 대해 screw speed 250rpm, feed rate 35kg/h, sample moisture 30%의 조건에서 압출성형 했을 경우 수용성 다당류의 함량이 13.08%로서 원료의 3.60%에 비하여 크게 증가하였다. 반면에 화학적 알칼리 처리의 경우에는 17.68%로서 압출성형보다 수율이 더 높은 것으로 나타났다.

위의 연구를 통하여 현상학적으로 압출성형이 사과박이나 미역의 세포벽 구조의 수용화에 매우 효율적인 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 토대로 사과박이나 미역으로부터 특정 다당류인 펙틴과 알긴산을 생산하기 위해서는 보다 체계적인 접근 연구가 필요할 것이다. 따라서 본 연구에서는 수율과 품질(분자량)을 동시에 고려한 최적화 공정개발 연구가 수행될 것이다.

2. 식물 세포벽의 효소적 수용화

국내에서도 각종 식물체의 연화과정 즉 구성성분의 수용화 과정에 관여하는 효소에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 다당류 추출을 목적으로 한 수용화 기술의 개발에 관한 연구는 매우 미진한 평형이다.

식물체의 연화 과정에 관한 연구에서 주로 다루어지는 것은 과채류의 숙성과정중에 식품에 존재하는 pectinase나 hemicellulases에 의하여 세포벽 구성성분이 분해되면서 조직이 연화되어 가는 과정을 연구하는 것이다. 반면에, 본 연구에서 수행하고자 하는 것은 이러한 자연적 수용화 현상보다는 고분자의 펙틴이나 알긴산을 생산하기 위하여 선택적으로 세포벽 구조를 수용화 하는 것이다.

최근에 펙틴의 가지부분(sidechains)을 형성하고 있는 arabinogalactan의 리올로지적 작용을 구명하기 위하여 상업용 hemicellulases의 arabinogalactanase를 적용한 연구결과가 보고된 바 있다⁽²¹⁾. 이 때 효소내에 존재하는 polygalacturonase의 활성은 효소의 기질인 polygalacturonic acid를 affinity chromatography ligand로 사용하여 성공적으로 제거되었다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 고분자량 펙틴의 효소적 생산을 위해서는 펙틴분자에는 영향을 미치지 않으면서 arabinogalactan을 선택적으로 수용화해야 수단이 필요하다. 따라서 위에서와 같이 상업용 효소의 특성을 개량하는 시도는 본 연구를 완성하기 위한 매우 값진 접근 방법이 될 것이다. 펙틴 추출을 위해서는 세포벽의 arabinogalactan 이외에 다른 구성성분의 수용화도 동반되어야 하기 때문에 여러 가지 상업용 세포벽 분해효소의 활성을 고려한 최적 효소체계의 구축이 요망된다.

여 백

제 3 장 압출에 의한 식물세포벽 수용화

제1절 서 론

식물 세포벽의 수용화를 통하여 다당류를 생산하는 기술은 전통적으로 화학적 방법에 의존하고 있으나 환경 오염에 대한 심각한 우려 때문에 환경친화적 방법의 개발이 관심의 대상이 되고 있다. 현재까지 소개되고 있는 물리적 수용화 방법은 압출, 초고압, 고온고압, 초음파, 마이크로파, 볶음 등을 이용한 방법이 있는데, 특히 압출에 의한 수용화 방법이 부각되고 있다.

압출을 이용한 식물 세포벽의 수용화는 주로 곡류 브랜(bran)의 물성을 개선하기 위하여 이용되어 왔다^(5,6). 압출의 고온고압, 고전단력으로 조직의 결합력을 이완시키면 수용성 성분의 증가와 구조적 변환에 의해 관능성과 물성이 개량되는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 곡류의 경우에는 세포벽의 변환에 의하여 어떤 특정한 성분을 얻는 것이 목적이 아니라, 시료 전체의 물성을 개선하는 것이 목적이었다.

과채류의 세포벽에 대한 압출의 수용화 효과는 가공공정 후에 발생하는 가공부산물의 효율적 이용이라는 측면에서 연구가 이루어져 왔다⁽⁷⁾. 예를 들어 사과주스 생산 과정에서 수용성 성분의 대부분은 주스로 용출되기 때문에 사과박은 주로 불용성 상태로 남게 된다. 마찬가지로 사탕무(sugar beet)를 이용하여 설탕을 생산하는 경우에도 수용성성분을 제거하면 불용성의 사탕무박을 얻게 된다. 압출은 이러한 불용성 성분의 수용화에 효과적으로 사용될 수 있는 것으로 보고되고 있다.

국내에서 물리적 방법에 의한 식물 세포벽의 수용화에 대한 본격적인 연구는 1994년도에 밀기울, 사과박, 미역 등의 국내산 저이용자원의 활용도를 높이기 위하여 압출 공정을 적용하면서 시작되었다⁽²⁰⁾. 이 연구에서 압출은 곡류의 물성 개선 뿐만 아니라 과채류 세포벽의 수용화를 위해 효과적으로 이

용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

따라서, 본 연구에서는 압출 처리에 의한 식물 세포벽의 수용화시 압출 조건에 따른 수용성 분획의 수율과 특성을 분석하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 사과박

본 연구에서 사용한 건조 사과박은 국내 사과주스 생산공장(경북 군위군 경북능금조합)에서 수거한 것으로 먼저 hammer mill로 80 mesh체를 통과하도록 분쇄한 후 이를 -10°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

나. 미역

본 연구에서 사용한 미역은 건조미역으로서 경동시장에서 구입하였다. 건조 미역은 먼저 절단기로 절단한 후 hammer mill로 80 mesh체를 통과하도록 분쇄하여 이를 -10°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

2. 화학적 추출법

가. 펙틴의 산추출법

원료 건조 사과박 또는 세척 사과박 50 g을 1000 ml의 HCl용액(pH 1.8)에

넣고 85°C에서 30분간 교반하였다. 이를 6,500 x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 여과하였다. 다음, 1.0 N NaOH 용액을 이용하여 여과액을 pH 4.5로 조절한 후 4 L의 isopropanol을 넣고 8시간 동안 방치하였다. 이를 여과한 후 isopropanol과 acetone으로 씻고 상온에서 건조하였다. 건조된 시료를 증류수에 녹여 1% 용액을 만든 후 6,500 x g에서 10분간 원심분리하여 불용성 성분을 제거한 후 동결건조하였다.

나. 알긴산의 알칼리 추출법

건조미역 25 g을 1 L의 0.1 M Na₂CO₃ 용액에 넣고 1 시간 동안 교반한 후 6,500 x g에서 10분간 원심분리하였다. 이를 여과한 후 여과액에 4배(v/v)의 isopropanol을 가하여 생성된 침전물을 isopropanol과 acetone으로 씻고나서 이를 건조하였다. 건조된 시료를 증류수에 녹여 1% 용액을 만든 후 6,500 x g에서 10분간 원심분리하여 불용성 성분을 제거한 후 동결건조하였다.

3. 압출처리 실험설계

가. 사과박

본 연구에서 사용한 압출성형기는 동방향 완전 맞물림형 이축압출성형기 (corotating intermeshing type twin-screw extruder: Biex-BNDL 44, Bühler Brothers Co., Swiss)로서 L/D(length:diameter)비가 20:1인 스크류를 이용하였다. 원료의 투입은 분말 원료용 용적식 투입장치인 K-tron L-10을 사용하였고, 원료에 가해지는 수분은 power valve와 flow meter를 통하여 barrel 내부로 주입하여 조절하였다. 운전중의 스크류 회전속도, motor torque, 압출온도,

원료 공급량, 가수량 및 기계적 에너지 소모율 등의 지표는 LCD display panel에 표시됨과 동시에 interface를 이용하여 10초 간격으로 컴퓨터에 수록하였다.

본 연구에서는 압출성형의 공정변수로서 스크류 속도(screw speed: X_1), 원료의 공급량(feed rate: X_2) 및 원료반죽의 수분함량(dough moisture: X_3)을 3개의 독립변수(independent variables)로 결정하였다. 압출성형의 실험설계는 Table 3-1에 나타낸 바와 같이 3요소 3수준의 factorial design으로 구성되어 있으며, 중앙값(screw speed 300 rpm; feed rate 35 kg/hr; dough moisture 25%)의 2회 반복을 포함하여 총 14회의 실험으로 이루어져 있으며, 실험은 무작위 순서(random order)에 의하여 실시하였다. 또한 이러한 모든 공정변수의 영향을 고려한 specific mechanical energy(SME)를 측정하여 Table 1에 나타내었다.

나. 미역

미역은 앞의 사과박과 동일한 기종의 이축압출성형기를 이용하여 세포벽의 수용화를 시도하였다. 미역의 압출성형은 다음의 2 공정조건에서 행하였다: (SW-1) screw speed 250 rpm, feed rate 35 kg/hr, moisture content 30%; (SW-2) screw speed 250 rpm, feed rate 40 kg/hr, moisture content 25%. 이 때 SW-1과 SW-2의 SME는 각각 130, 150 kwh/ton였다.

Table 3-1. Factorial Experimental Design for Extrusion of Apple Pomace.

Treatment	Actual Levels			Coded Levels			SME ¹ (kwh/ton)
	X ₁	X ₂	X ₃	x ₁	x ₂	x ₃	
AP-1	250	40	25	-1	+1	0	123
AP-2	250	35	30	-1	0	+1	102
AP-3	300	30	30	0	-1	+1	118
AP-4	250	40	20	-1	+1	-1	173
AP-5	300	40	30	0	+1	+1	107
AP-6	350	30	25	+1	-1	0	167
AP-7	250	30	25	-1	-1	0	163
AP-8	350	35	30	+1	0	+1	126
AP-9	300	35	25	0	0	0	122
AP-10	300	35	25	0	0	0	122
AP-11	350	40	25	+1	+1	0	151
AP-12	300	30	30	0	-1	+1	113
AP-13	350	35	20	+1	0	-1	176
AP-14	300	40	20	0	+1	-1	173

¹⁾ Specific Mechanical Energy

4. 수용성 다당류(Water soluble polysaccharides: WSP)의 분획

압출성형된 사과박 시료 10 g 혹은 미역 5g을 증류수 200 ml에 넣고 상온에서 1시간 동안 교반한 후 6,500 x g에서 10분간 원심분리하였다. 다음 상등액을 여과한 후 여과액에 800mL의 isopropanol을 넣고 8시간 동안 방치하였다. 이를 여과한 후 isopropanol과 acetone으로 씻고 상온에서 건조하였다. 건조된 시료를 증류수에 녹여 1 %용액을 만든 후 6,500 x g에서 10분간 원심분리하여 불용성 성분을 제거한 후 동결건조하였다.

5. 수용성 다당류의 수율 결정

수용성 다당류의 함량은 위의 생산방식에 따라 분리한 후 초기 시료함량 (사과박 50 g; 미역 25g)에 대한 % 혹은 추출 수용액 상에서의 양(g/dL)으로 나타내었다.

6. Anhydrogalacturonic acid (AGA) 및 중성당 함량결정

수용성 다당류의 AGA 함량은 수용성 분획 가운데 펙틴함량을 나타내는 척도로서 비색법을 이용하여 측정하였다. 즉 황산을 이용하여 펙틴을 가수분해한 후 galacturonic acid를 *m*-hydroxydiphenyl과 반응시켜 흡광분도계로 정량화 하였다. 한편, 중성당 함량은 phenol-sulfuric법에 의하여 결정하였다.

7. 고유점도(Intrinsic viscosity)

수용성 다당류의 고유점도는 Cannon-Fenske capillary viscometer를 이용하여 측정하였다. 일정량의 수용성 다당류를 물(펙틴) 혹은 0.1 M NaCl(알긴산)에 넣고 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 이를 0.45 μ m Millipore filter에서 여과한 후 10 mL의 용액을 Cannon-Fenske 모세점도관(size 50)에 넣고 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 에서 점도를 측정하였다.

비점도(Specific viscosity: η_{sp})와 고유점도(intrinsic viscosity: $[\eta]$)는 각각 다음 식을 이용하여 결정하였다:

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_s) / \eta_s \quad (1)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp} / C \quad (2)$$

여기서 η 은 용액의 점도, η_s 는 용매의 점도, C 는 용액의 농도이다.

다음, 펙틴의 분자량은 위에서 구한 고유점도를 다음의 Mark-Houwink 식에 대입하여 계산하였다:

$$[\eta] = 2.16 \times 10^{-4} M^{0.79} \quad (3)$$

즉

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

한편, 미역의 경우는 다음의 Mark-Houwink 식을 이용하였다:

$$[\eta] = 2.0 \times 10^{-5} M^{1.0} \quad (5)$$

즉

$$M = (50,000 \times [\eta])^{1.0} \quad (6)$$

8. 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)

시료 25 mg을 10 mL의 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)에 넣고 상온에서 1 시간 동안 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하였다. 제조한 용액 4 mL를 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)로 평형 시킨 DEAE Sepharose CL-6B ion exchange column(1.5 x 25 cm)에 주입한 후 100 mL의

50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)를 0.7 mL/min의 속도로 흘려 중성 다당류를 용출하였다. 다음, 펙틴은 50 mM - 1.0 M sodium acetate buffer(pH 4.5)로 용출하였다. 각 분획은 3 mL로 하였으며, phenol-sulfuric법과 m-hydroxydiphenyl법에 의하여 각각 중성당과 우론산을 측정하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 사과박 및 미역의 주요 성분

본 연구에 사용된 사과박은 수분 11.4%, 조단백질 3.7%, 조지방 4.5%, 회분 1.8%, 탄수화물 70.9%(중성당 38.3%, 우론산 27.4%, 전분 5.2%) 등으로 구성된 것으로 분석되었다. 사과박의 탄수화물 가운데 우론산은 갈락투론산으로서 주로 펙틴을 이루고 있다.

건조된 미역의 주요성분은 수분 11.4%, 조단백질 19.4%, 조지방 4.3%, 회분 20.3%, Klason lignin 10.9%, 탄수화물 47.2% 등으로 나타났다. 탄수화물 가운데 우론산은 22.2%로 mannuronic acid와 guluronic acid로서 이루어져 있으며, 이들이 알긴산을 구성하게 된다.

2. 사과박의 압출에 의한 수용성 다당류 생산

그림 3-1은 기계적 에너지 소모율(specific mechanical energy: SME)과 수용성 다당류(water soluble polysaccharides: WSP)와의 관계를 나타낸 것이다. 압출성형한 시료는 가해진 SME의 정도에 따라 11.94~19.75%의 분포를 보였으며, 반면에 산처리한 것은 14.40%로 나타났다. 이는 압출성형의 조건에 따라 식물 세포벽으로부터 수용성 다당류의 수용화 정도가 많은 영향을 받는다는

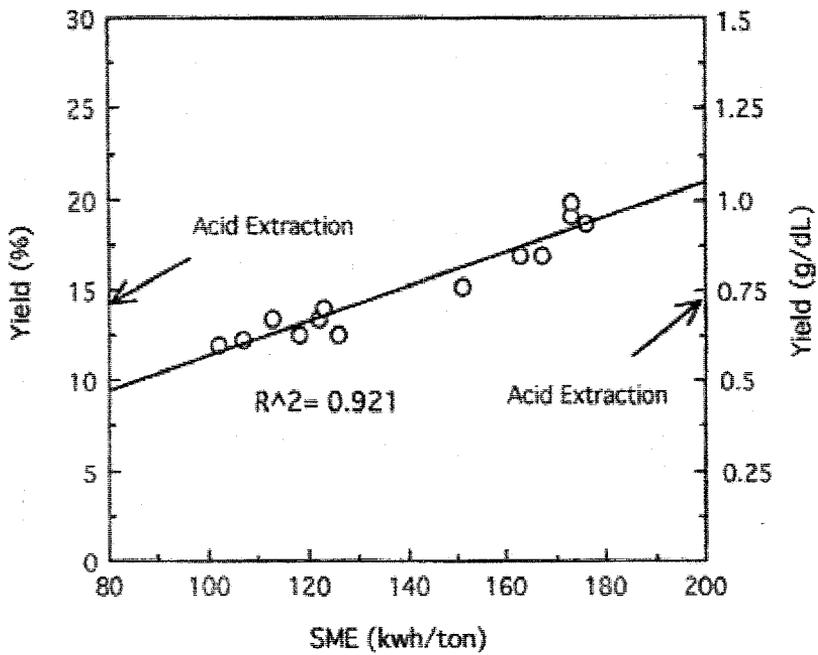


Fig. 3-1. Effect of specific mechanical energy on the yield of water soluble polysaccharides.

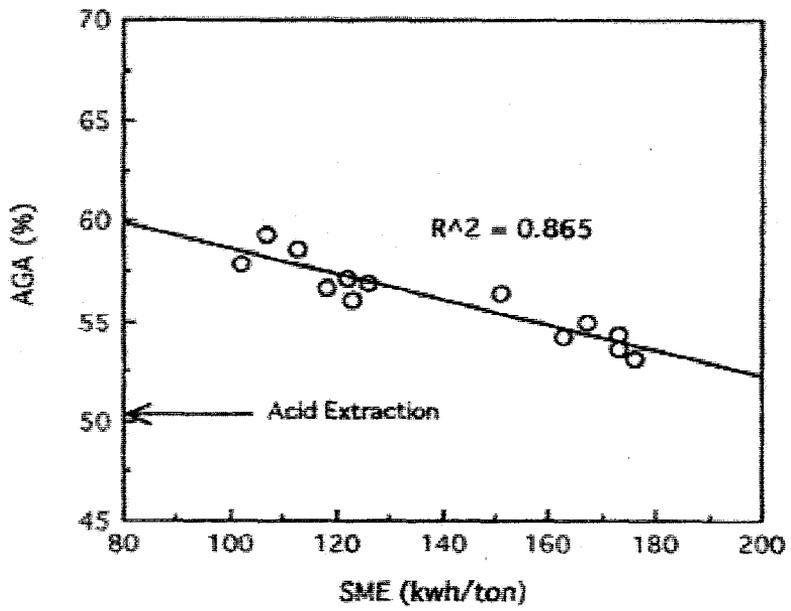


Fig. 3-2. Effect of SME on the AGA content of WSP.

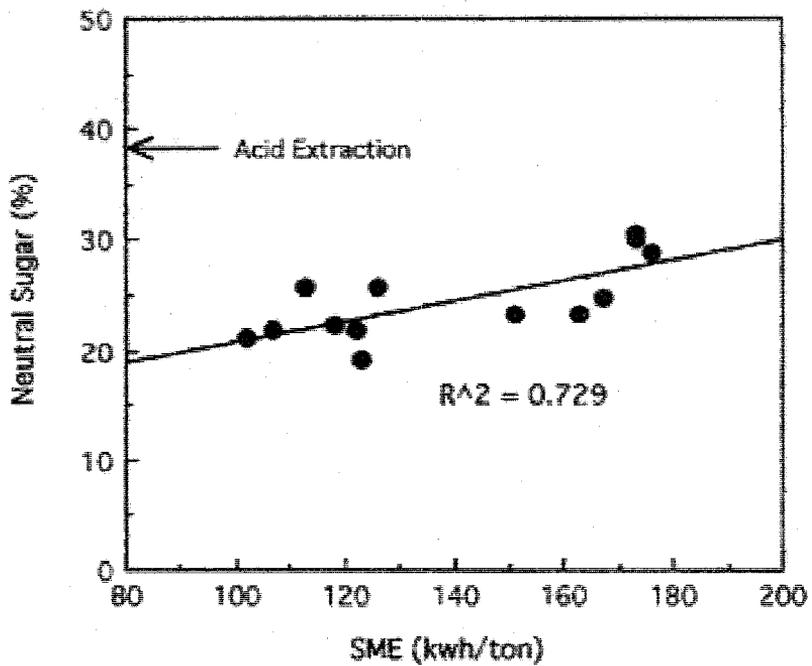


Fig. 3-3. Effect of SME on the neutral sugar content of WSP.

것을 의미한다. 또한, 그림에서 전체적으로 SME와 WSP의 수율이 비례하는 것을 알 수 있는데($R^2 = 0.921$), 이는 SME 증가에 따라 원래 불용성 결합상태로 존재하던 세포벽 구조가 점차 수용화 되는 것으로 해석된다. 즉, 수율을 기준으로 볼 때 압출성형 조건의 적절한 조절을 통해 기존의 산처리 방법보다 추출효율을 증가시킬 수 있다.

압출성형은 일종의 기계적 수용화 작용으로서 시행과정에서 펙틴 뿐만 아니라 식물 세포벽의 다른 구성성분들도 수용화 된다. 따라서 앞에서 구한 WSP에는 본 연구의 대상물질인 펙틴 이외에도 xyloglucan, free arabinogalactan 등 각종 헤미셀룰로오스(hemicelluloses)가 포함된다. 펙틴의 주골격(main backbone)을 형성하고 있는 주성분은 anhydrogalacturonic acid(AGA)로서 본 연구에서는 펙틴함량의 척도로서 AGA를 사용하였다. 그림 3-2에서 WSP의 AGA의 함량은 53.09~59.27%로서 SME가 증가할수록 WSP 가운데 AGA 함량은 점차 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 앞에서 SME가 증가함에 따라 WSP의 함량이 증가하는 현상과 상반되는 것이다. 이는 SME가 증가하면서 세포벽의 펙틴 이외의 다른 구성성분이 다량 수용화된 것으로 보인다. 한편 산추출 WSP의 경우는 AGA의 함량이 50.44%로서 압출성형 시료에 비해 가장 낮은 값을 보였다. 이는 산추출이 식물 세포벽의 수용화에는 매우 효율적이거나 그 과정에서 압출성형에 비해 펙틴 이외의 성분 역시 다량 수용화 시키는 것을 의미한다.

한편, 그림 3-3은 SME의 증가에 따른 WSP의 중성당(neutral sugar) 함량을 나타낸 것이다. 그림에서 압출성형 WSP의 중성당 함량은 19.13~30.66%로서 산추출 WSP의 38.25%에 비하여 훨씬 낮은 값을 보였다. 또한, 그림에서 SME의 증가에 따라 중성 다당류의 함량이 증가하는 것을 알 수 있다. 이는 압출성형 과정에서 과도한 에너지가 사과박에 도입될 경우 펙틴 이외의 성분이 다량 유출되면서 펙틴의 순도가 저해된다는 것을 의미한다.

그림 3-2의 AGA 함량을 기준으로 그림 3-1에서 구한 WSP를 AGA 함량 기준으로서 그림 3-4에 나타내었다. 그림에서 SME의 증가에 따라 WSP의

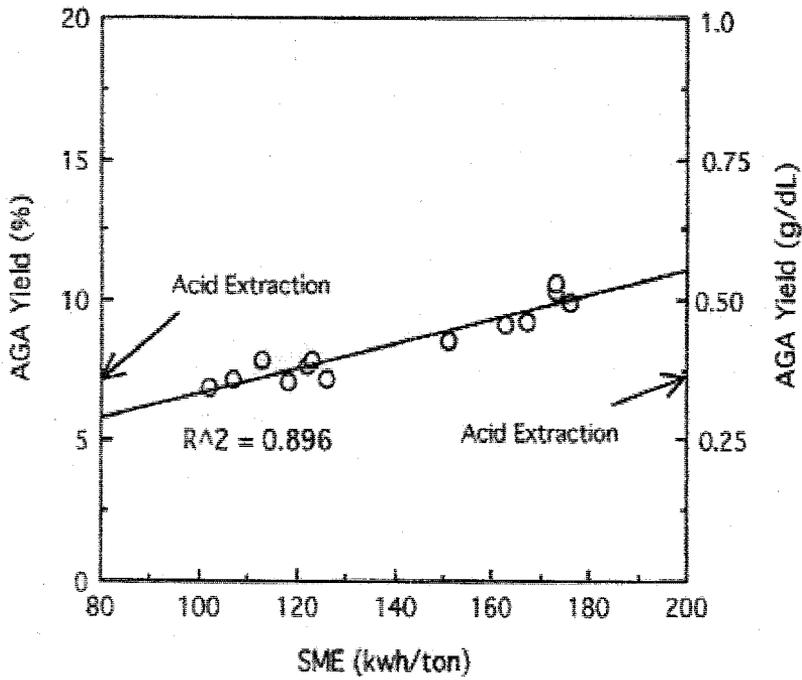


Fig. 3-4. Effect of SME on the AGA yield of WSP.

AGA 함량은 증가하나, 전체적으로 AGA의 증가율이 그림 3-1의 WSP 증가율보다는 낮은 것을 알 수 있다.

3. 사과박의 수용성 다당류의 고유점도 및 분자량

그림 3-5는 압출성형의 SME가 증가에 따라 생산된 수용성 다당류의 고유점도를 나타낸 것이다. 압출성형의 WSP의 고유점도는 1.11~3.86 dL/g이며, 반면에 산처리 WSP의 고유점도는 3.08 dL/g였다. 그림 3-5에서 SME의 증가 즉, 세포벽에 가해진 에너지의 증가에 따라 생산된 WSP의 고유점도가 감소하는 것을 알 수 있다. 따라서 SME의 증가는 세포벽의 수용화를 증가시키는 반면에 수용화된 WSP의 고유점도는 감소시킨다는 것을 알 수 있다.

한편, 식(3)의 Mark-Houwink 식에 나타난 바와 같이 고유점도는 분자량에 비례한다. 그림 3-5에서 구한 고유점도를 식 (4)에 대입하여 구한 WSP의 분자량을 그림 3-6에 나타내었다. 예상한 바와 같이 SME의 증가는 결과적으로 분자량의 감소를 가져온다는 것을 알 수 있다. 압출성형 WSP의 분자량은 $4.97 \times 10^4 \sim 2.41 \times 10^5$ 의 분포를 보였으며, 반면에 산처리 WSP의 분자량은 1.81×10^5 였다. 이와 같은 결과는 사과박에 가해지는 에너지가 증가할수록 전체적인 수용화가 증가하나, 아울러 수용성 고분자의 분자구조가 파괴되면서 전체적인 분자량이 감소한다는 것을 의미한다.

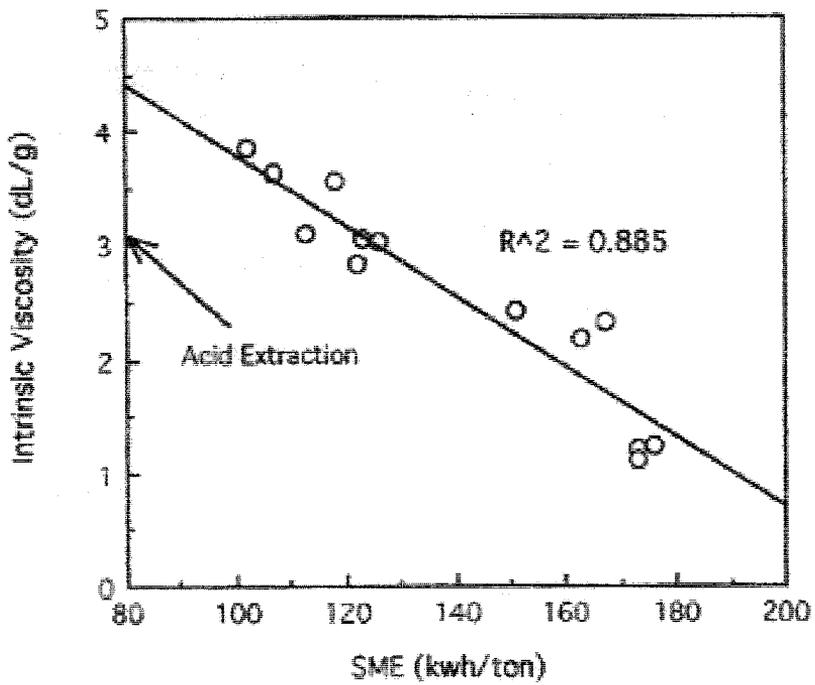


Fig. 3-5. Effect of SME on the intrinsic viscosity of WSP.

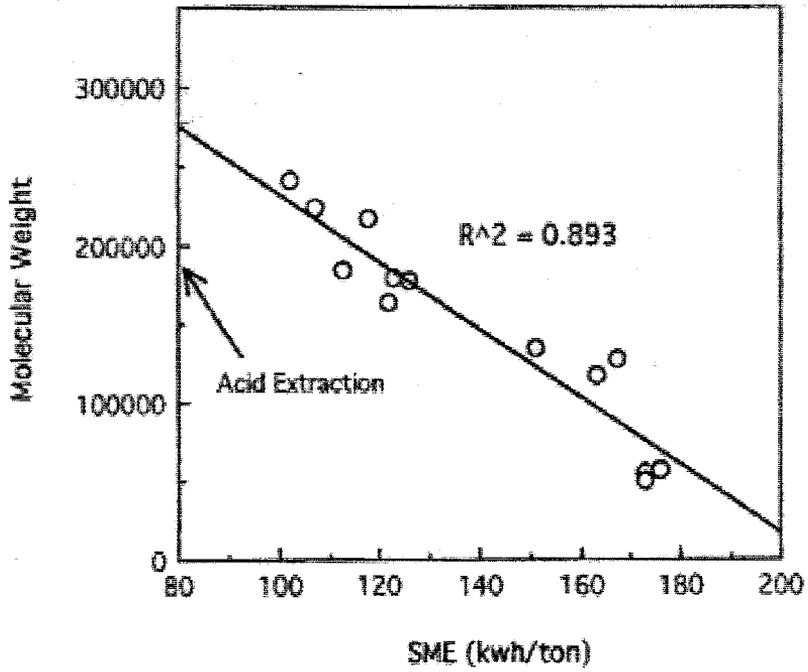


Fig. 3-6. Effect of SME on molecular weight of WSP.

4. 새로운 최적화 공정변수의 개발

위의 그림 3-1과 3-6에서 나타난 바와 같이 압출성형의 공정조건이 격렬해질수록 수율은 증가하는 반면에 분자량은 감소하는 것을 알 수 있다. 즉 수율과 품질은 압출성형의 조건에 따라 서로 상반되게 나타나고 있으므로, 압출성형의 공정 최적화라는 측면에서 보면 이 둘을 고려한 새로운 공정변수의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 수율(g/dL)과 고유점도(dL/g)의 단위가 반대인 것에 주목하여 새로운 공정변수로서 (수율 x 고유점도)를 최적화 인자로서 사용하였다.

그림 3-7에 SME에 따른 WSP의 (수율 x 고유점도)의 관계를 나타내었다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이 SME에 따라 크게 3단계로 나누어져 있는 것을 알 수 있다. 또한, 압출성형의 (수율 x 고유점도)는 1.10~2.30이며, 반면에 산처리의 WSP는 2.22였다. 즉, 압출성형 공정의 적절한 선정을 통하여 산처리에 필적하는 수율과 분자량을 얻을 수 있다는 것을 의미한다.

그러나 수용성 다당류 가운데는 펙틴 이외의 여러 가지 중성 다당류가 존재하는데 이들은 펙틴과는 구별되는 불순물이다. 따라서 수용성 다당류 전체에 대한 수율 보다는 펙틴을 나타내는 AGA를 고려하는 것이 본 연구의 목적에 더욱 부합된다. 따라서 그림 3-8에 SME와 AGA (수율 x 고유점도)의 관계를 나타내었다. 그림에서 압출성형 시료의 경우 0.59~1.34의 범위를 보였으며, 반면에 산처리 시료는 1.12의 값을 보였다. 이는 펙틴을 대상으로 하는 경우 압출성형 공정이 기존의 산처리 공정을 수율과 분자량 측면에서 충분히 대체할 수 있는 기술이라는 것을 증명하고 있다.

결론적으로 사과박의 압출성형에 의한 펙틴생산 측면에서 보면 그림 3-8로부터 기계적 에너지소모율(SME)이 110~130 kwh/ton의 범위일 때 펙틴의 수율과 분자량을 고려하여 기존의 산추출법을 대체할 수 있는 최적 공정조건으로 생각된다.

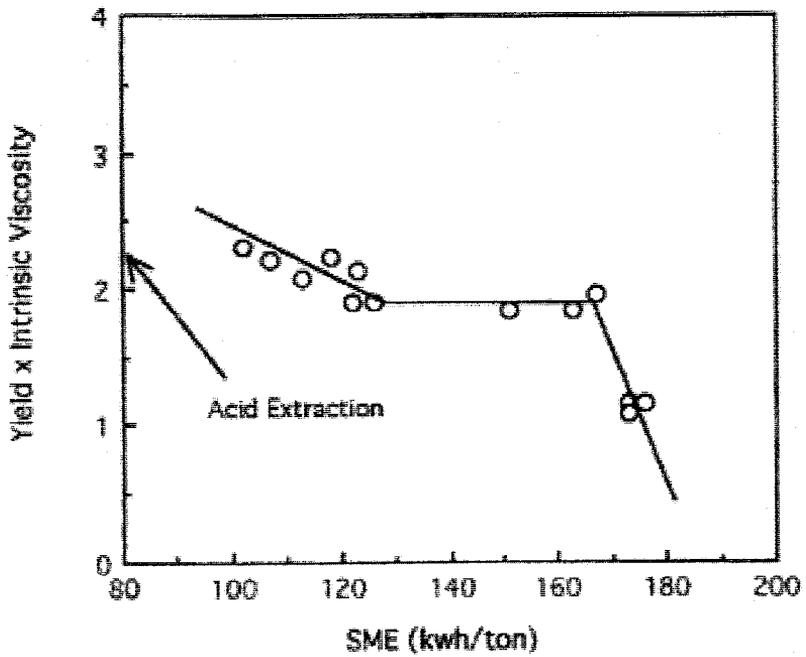


Fig. 3-7. Effect of SME on (Yield × Intrinsic Viscosity) of WSP.

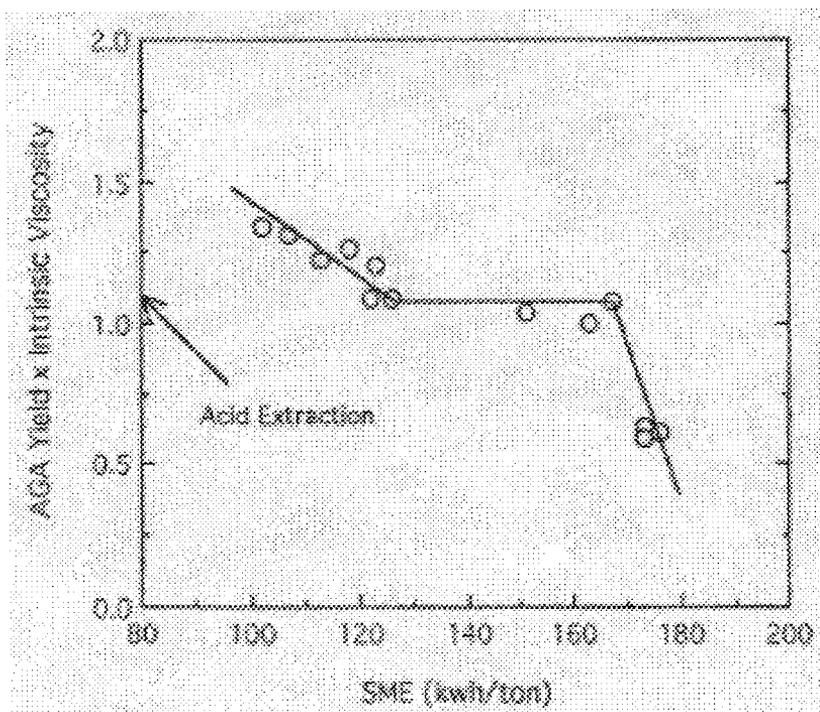
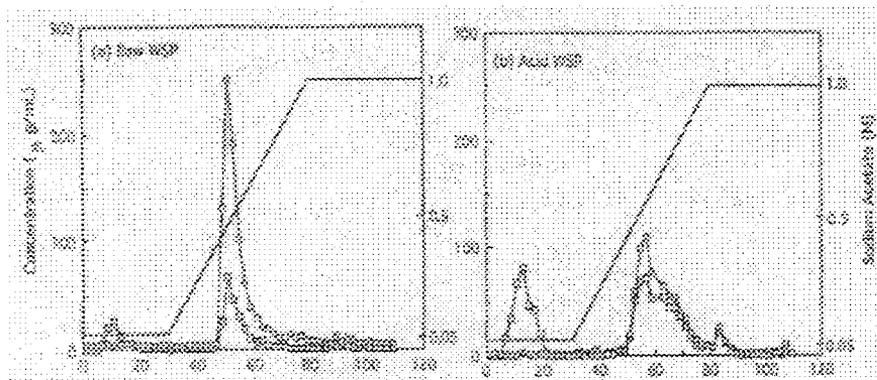


Fig. 3-8. Effect of SME on (AGA Yield \times Intrinsic Viscosity) of WSP.

5. 이온교환 크로마토그래피

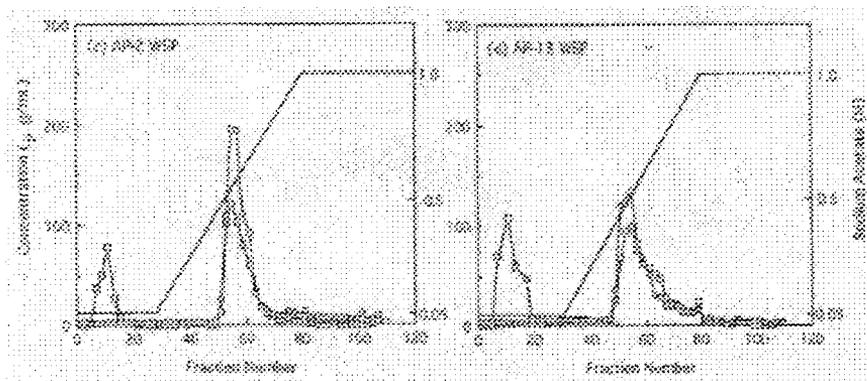
그림 3-9는 원료, 산처리 및 압출성형 WSP의 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)를 나타낸 것이다. 초기에 용출되는 분획은 자유 중성 다당류(free neutral polysaccharides)를 나타내며, 반면에 후반에 AGA와 함께 용출되는 중성 다당류는 펙틴의 주골격에 공유결합에 의하여 연결되어 펙틴분자의 일부분으로 간주된다. 펙틴의 가지 부분을 이루는 중성 다당류는 주로 arabinan, galactan, arabinogalactan으로 구성되어 있는 것으로 보고되고 있다.

우선 원료와 산 및 압출성형 시료를 비교해 보면 원료 WSP의 자유 중성 다당류의 함량이 매우 낮은 것을 알 수 있다. 이는 산추출 및 압출성형 과정에서 불용성 세포벽의 가지부분, 즉 주로 arabinogalactan 부분으로 이루어진 분획이 다량 수용화 되었다는 것을 의미한다. 한편, 산처리 시료(ACID)와 비교적 온화한 조건에서 압출성형된 EX-2 시료를 보면 산처리한 시료의 경우가 불순물인 자유 중성당의 함량이 낮은 것을 알 수 있다. 반면에, 격렬한 조건에서 압출성형된 시료인 EX-13인 경우에는 상대적으로 자유 중성 다당류가 다량 존재하는 것을 알 수 있다. 이는 앞의 그림 3-8에서 온화한 조건에서의 압출성형이 분자량과 수율에서 산처리보다 우수하다는 결과를 뒷받침하고 있다.



(a) Raw WSP

(b) Acid WSP



(c) AP-2 WSP

(d) AP-13 WSP

-□- Neutral Sugar

-○- AGA

Fig. 3-9. Ion exchange chromatography of water soluble polysaccharides obtained from apple pomace.

6. 미역의 압출에 의한 다당류 생산기술

미역의 압출성형에 따른 수용성 다당류의 수율, 고유점도 및 분자량을 표 3-2에 나타내었다. 표에서 알 수 있는 바와 같이 미역의 경우, 압출에 의한 다당류 추출수율은 기존의 알칼리법에 의한 수율과 유사한 수준인 13.5~15.3%로 나타났다. 한편, 압출에 의해 미역으로부터 추출한 수용성 다당류의 분자량은 알칼리법에 의한 경우와 비슷한 158,000~165,500으로 나타났다.

Table 3-2. Yield, intrinsic viscosity and molecular weight of water polysaccharides extracted from seaweed.

Samples	Yield	Intrinsic Viscosity		Molecular Weight
		(%)	(mL/g)	
SW-0 ^b	4.12	7.22	361,000	
SW-1	13.45	3.31	165,500	
SW-2	15.28	3.16	158,000	
SW-Alkali	17.68	3.60	180,000	

^a Based on the Mark-Houwink equation

$$[\eta] = 2.0 \times 10^{-5} M^{1.0}$$

^b WSP from raw seaweed without treatment

미역의 세포벽 구조를 보면, 셀룰로오스는 결정성의 microfibrils로서 분포하고 있고 이들 주위에 알지네이트들이 연속적인 그물구조의 형태로서 덮여 있다. 이들 알지네이트들은 분자내의 polyguluronic acid 부분이 Ca^{+2} 이온들에 의해서, 그리고 polymannuronic acid 부분의 분자상호간 엉킴 (intermolecular entanglements)에 의하여 결합되어 있어 연속적인 그물구조를 형성하게 된다. 이와 같이 미역의 세포벽은 매우 단단한 결합구조를 가지므로 알칼리법에 의한 수율 및 품질과 유사한 수준에 머물고 있으나 미역의 세포벽을 압출에 의한 수용화 기술을 적용할 경우, 알칼리법에 비해 공정을 단순화시킬 수 있을 뿐만 아니라 환경오염 문제를 크게 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

제4절 요약 및 결론

세포벽 모형에 근거하여 고온고압 조건하에서 기계적인 전단응력을 식물 세포벽에 가할 경우 수용성 다당류를 효과적으로 분리할 수 있다는 가설을 도입하였다. 압출성형기의 내부가 고온고압에 의한 반응조로서의 역할을 수행할 수 있도록 동방향완전말물리형 이축압출성형기를 이용하여 압출성형기의 L/D (길이/직경)비가 20:1이 되도록 설치한 후, 공정변수로서 스크류 속도, 원료의 공급률 및 가수율을 제어하여 비기계에너지(specific mechanical energy)가 102~176kWh/ton인 조건하에서의 추출효과를 분석하였다.

사과박으로부터 압출에 의해 수용성 다당류를 추출한 결과, 수율(수세척된 원료기준)은 11.9~19.8%(세척전 최초원료 기준의 수율은 5.6~9.4%)의 범위를 보였는데, 압출시의 비기계에너지가 증가할수록 수율은 향상되는 것으로 나타났다. 비기계에너지와 수율 사이의 상관관계는 0.960으로 나타났다. 압출에 의한 추출수율은 기존의 전형적인 산처리 조건(pH 1.8, 85°C)하에서의 수율 14.4%(최초원료 기준의 수율은 6.8%)에 비하면 크게 향상될 수 있는 것으로

나타났다.

미역의 경우, 압출에 의한 다당류 추출수율은 기존의 알칼리법에 의한 수율과 유사한 수준인 13.5~15.3%로 나타났다.

압출에 의해 사과박으로부터 추출된 수용성 다당류의 무수갈락투론산 함량은 53.1~59.3%로 나타났으며, 비기계에너지와의 상관관계는 역상관을 보였다. 기존의 산처리에 의한 추출시 추출물의 무수갈락투론산의 함량은 50.4%로 나타났다.

수용성 다당류의 중성당 함량의 경우, 산처리의 38.3%에 비해 압출의 경우 19.1~30.7%의 범위로 나타났다. 압출시 비기계에너지의 증가에 따라서는 추출물의 중성당 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

고유점도 측정법에 의해 수용성 다당류의 분자량을 분석한 결과, 압출에 의한 추출물의 분자량은 $4.97 \times 10^4 \sim 2.41 \times 10^5$ 의 분포를 보였으며, 비기계에너지의 증가에 따라 분자량은 감소하는 것으로 나타났다. 산처리에 의한 추출물의 분자량은 1.81×10^5 로 나타났다.

이온교환크로마토그래피를 통해 압출에 의한 추출물의 분포를 분석한 결과, 압출시 비기계에너지가 증가할수록 추출물의 순도와 분자량이 감소하는 것으로 나타났다.

한편, 압출에 의해 미역으로부터 추출한 수용성 다당류의 분자량은 알칼리법에 의한 경우와 비슷한 158,000~165,500으로 나타났다.

제 4 장 효소처리에 의한 수용화 효과

제1절 서 론

최근에는 지금까지 연구되어온 식물 세포벽 구조에 관한 기본모델을 토대로 효소적 방법에 의하여 수용성 다당류를 추출하는 방법이 시도되고 있다.

효소처리에 의한 펙틴추출방법은 펙틴연구로 유명한 네덜란드 Wageningen University의 Pilnik 박사 연구팀과 프랑스의 Thibault 박사 연구팀을 중심으로 연구가 진행되고 있다. Renard 등⁽¹³⁻¹⁹⁾의 연구결과에 의하면 arabinogalactan sidechains을 분해할 수 있는 arabinase나 galactanase를 처리하였을 경우 펙틴의 추출이 그다지 크게 증가하지 않았으며, 오히려 glucanase를 처리했을 때 펙틴추출이 증가한다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 사과박의 세포벽 결합에 있어서 arabinogalactan보다는 xyloglucan이 펙틴과 다른 세포벽물질과의 결합에 주도적 역할을 한다는 것을 의미한다. 그러나 사과박의 경우 품종이나 가공원료의 종류에 따라 결합구조의 차이가 나므로 이러한 결과를 일반화하기는 어렵다. 또한 위의 연구에서 사용된 효소 체계는 실험실에서의 배양과 정제과정을 거쳐 생산된 것으로 실용화에는 적합하지 않은 것으로 판단된다.

국내에서도 각종 식물체의 연화과정 즉 구성성분의 수용화 과정에 관여하는 효소에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 다당류 추출을 목적으로 한 수용화 기술의 개발에 관한 연구는 매우 미진한 평형이다.

식물체의 연화 과정에 관한 연구에서 주로 다루어지는 것은 과채류의 숙성과정중에 식품에 존재하는 pectinase나 hemicellulases에 의하여 세포벽 구성성분이 분해되면서 조직이 연화되어 가는 과정을 연구하는 것이다. 반면에, 본 연구에서 수행하고자 하는 것은 이러한 자연적 수용화 현상보다는 고분자의 펙틴이나 알긴산을 생산하기 위하여 선택적으로 세포벽 구조를 수용화 하

는 것이다.

식물 세포벽 구조에 의하면 펙틴은 arabinogalactan sidechains을 통하여 다른 세포벽 구성물질인 cellulose나 hemicellulosic xyloglucan과 밀접하게 연결되어 있는 것을 알 수 있다. 따라서 pectin의 rhamnogalacturonan 주골격을 유지하면서 이들 결합을 효율적으로 제거할 수 있다면 환경오염을 최소화하면서 양질의 펙틴을 생산할 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 사과박과 미역에 대해서 여러 가지 식물 세포벽 분해 효소를 이용하여 수용화 효과를 분석하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 사과박

본 연구에서 사용한 건조 사과박은 국내 사과주스 생산공장(경북 군위군 경북능금조합)에서 수거한 것으로 먼저 hammer mill로 80 mesh체를 통과하도록 분쇄한 후 이를 -10°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

나. 미역

본 연구에서 사용한 미역은 물미역으로서 서울 가락동 농수산물시장에서 구입하였다. 먼저 물미역을 흐르는 물에 여러번 세척하여 염을 제거하고, 열풍건조기를 이용하여 60°C 에서 건조 시킨 후 hammer mill로 분쇄하여 60mesh 체를 통과한 입자를 모아 실험에 사용하였다.

다. 효소

본 연구에서 사용한 효소는 표 4-1과 같다.

Table 4-1. 효소의 종류와 제조업체.

Enzyme	Model	Activity	Manufacture
Cellulase	C-8546	5.8 units/mg solid	Sigma, USA
Hemicellulase	H-2125	0.026 units/ mg solid	Sigma, USA
β -glucosidase	G-0395	3.2 units/mg solid	Sigma, USA
Cellulase	Cellulast 1.5L	1,500 Novo Cellulase Unit/g	Novo Nordisk Ferment, Switzerland
Hemicellulase	Pectinex Ultra SP-L	26,000 PG/ml	Novo Nordisk Ferment, Switzerland
Exo-polygalacturonase		4,000 Maceration Units/g	Yakult Honsha, Japan

2. 원료의 전처리

원료 사과박 100g에 4 l의 물을 가하여 교반한 후 여과포를 이용하여 여과한 후 60°C에서 건조하였다. 수세척 후의 원료의 회수율은 47.4%였다.

3. 수용성 다당류(Water soluble polysaccharides: WSP)의 분획

전처리된 사과박 또는 미역 시료의 일정량을 sodium acetate buffer 1000ml 에 가한 후 일정량의 효소를 첨가하여 교반하는 방법으로 반응시켰다. 이때, 시료의 농도, 시료에 대한 효소의 농도, buffer의 pH, 반응온도와 반응시간 등은 여러 가지 조건으로 구분하여 반응시켰다.

반응이 끝나면 6,500xg에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 여과한 후 여과액에 800ml의 isopropanol을 넣고 8시간 동안 방치하였다. 이를 여과한 후 isopropanol과 acetone으로 씻고 상온에서 건조하였다. 건조된 시료를 증류수에 녹여 1% 용액을 만든 후 6,500xg에서 10분간 원심 분리하여 불용성 성분을 제거한 후 동결 건조하였다.

4. 수용성 다당류의 수율 결정

수용성 다당류의 함량은 위의 생산방식에 따라 분리한 후 회수된 무게를 전처리 전의 최초 시료의 무게에 대한 %로 나타내었다.

5. 추출물의 성분 분석

추출물의 성분은 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)를 이용하여 분석하였다. 시료 25 mg을 10 mL의 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)에 넣고 상온에서 1 시간 동안 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하였다. 제조한 용액 4 mL를 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)로 평형 시킨 DEAE Sepharose CL-6B ion exchange column(1.5 x 25 cm)에 주입한 후 100 mL의 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)를 0.7 mL/min의 속도로 흘려 중성 다당류를 용출하였다. 다음, 펙틴은 50 mM - 1.0 M sodium acetate buffer(pH 4.5)로 용출하였다.

다. 각 분석은 3 mL로 하였으며, phenol-sulfuric법과 m-hydroxydiphenyl법에 의하여 각각 중성당과 우론산을 측정하였다.

6. 추출물의 순도 분석

펙틴의 순도는 추출 펙틴의 galacturonic acid를 m-hydroxydiphenyl법으로 측정하여 측정된 galacturonic acid양을 시료양에 대한 백분율로 나타내었다. 0.01%(w/v)의 펙틴 용액 0.5 mL를 얼음 상자에서 5분 동안 식힌 뒤 황산을 용매로 하여 만든 0.0125 M의 sodium tetraborate 3 mL를 첨가하여 혼합시켰다. 그 후 100°C에서 5분간 끓이고 나서 다시 얼음 상자에서 5분간 식히고 0.5%(w/v) sodiumhydroxide에 녹인 0.15%(w/v) m-hydroxydiphenyl를 0.05 mL를 첨가하고 잘 혼합한 뒤 20분 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 0.001 ~ 0.010% galacturonic acid를 사용하였다.

7. 다당류의 분자량 분석

수용성 다당류의 분자량은 고유점도로부터 산출되었다. 수용성 다당류의 고유점도는 Cannon-Fenske capillary viscometer를 이용하여 측정하였다. 일정량의 수용성 다당류를 물(펙틴) 혹은 0.1 M NaCl(알긴산)에 넣고 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 이를 0.45 μ m Millipore filter에서 여과한 후 10 mL의 용액을 Cannon-Fenske 모세점도관(size 50)에 넣고 25 \pm 0.1°C에서 점도를 측정하였다.

비점도(specific viscosity: η_{sp})와 고유점도(intrinsic viscosity: $[\eta]$)는 각각 다음 식을 이용하여 결정하였다.

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_s) / \eta_s \quad (1)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp} / C \quad (2)$$

여기서 η 은 용액의 점도, η_s 는 용매의 점도, C 는 용액의 농도이다.

다음, 펙틴의 분자량은 위에서 구한 고유점도를 다음의 Mark-Houwink 식에 대입하여 계산하였다.

$$[\eta] = 2.16 \times 10^{-4} M^{0.79} \quad (3)$$

즉,

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

한편, 미역의 경우는 다음의 Mark-Houwink 식을 이용하였다:

$$[\eta] = 2.0 \times 10^{-5} M^{1.0} \quad (5)$$

즉,

$$M = (50,000 \times [\eta])^{1.0} \quad (6)$$

8. 화학적 추출

효소적 방법에 의한 수용성 다당류의 추출 수율을 기존의 산처리법에 의한 수율과 비교하기 위하여 pH 1.8, 60°C와 pH 1.8, 85°C의 두 가지 조건의 화학적 방법에 의한 수율을 분석하였다.

세척 사과박 50 g을 1000 ml의 HCl용액(pH 1.8)에 넣고 60°C 또는 85°C에서 30분간 교반하였다. 이를 6,500 x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 여과하였다. 다음, 1.0 N NaOH 용액을 이용하여 여과액을 pH 4.5로 조절한 후

4 L의 isopropanol을 넣고 8시간 동안 방치하였다. 이를 여과한 후 isopropanol과 acetone으로 씻고 상온에서 건조하였다. 건조된 시료를 증류수에 녹여 1% 용액을 만든 후 6,500 x g에서 10분간 원심분리하여 불용성 성분을 제거한 후 동결건조하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 화학적 처리에 의한 수율

효소적 처리에 의한 수용성 다당류의 추출 수율과 비교하기 위하여 화학적 처리에 의한 수율을 분석하였던 바, pH 1.8, 60℃의 조건하에서는 사과박으로부터의 수율이 2.93%였으며, pH 1.8, 85℃의 조건하에서는 6.82%로 나타나 조건에 따른 차이가 매우 큼을 보였다.

2. Exo-polygalacturonase의 수용화 효과

Exo-polygalacturonase(Exo-PG)는 펙틴 분자의 말단에서 차례로 하나씩 가수분해하는 효소로서 사과박으로부터의 WSP 추출시 pH, 반응온도 및 반응 시간에 따른 수용화 효과를 분석하였다.

그림 4-1은 Exo-polygalacturonase를 이용하여 사과박으로부터 수용성 다당류 추출시 온도에 따른 수율(사과박 농도:0.5%; 효소 농도: 10%; 반응조건: pH 5.5, 36시간)을 나타낸 것이다. 35℃일 수율은 7.41%로 최대가 되었다가 다시 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 온도가 높을수록 반응이 활발해 그에 따라 수율도 증가하지만 반응이 지나치게 일어나면 Exo-PG에 의한 가수분해가 지나쳐 저분자로 분해되는 양이 많아지는 것으로 판단된다.

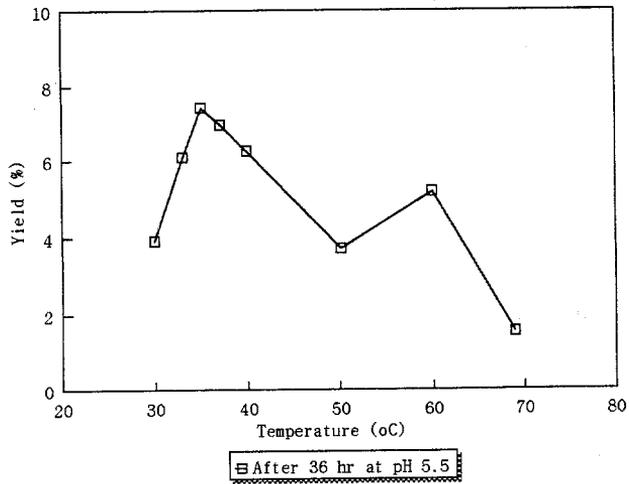


Fig. 4-1. Exo-polygalacturonase를 이용하여 사과박 으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 온도에 따른 수율(사과박 농도:0.5%; 효소 농도: 10%; 반응조건: pH 5.5, 36시간).

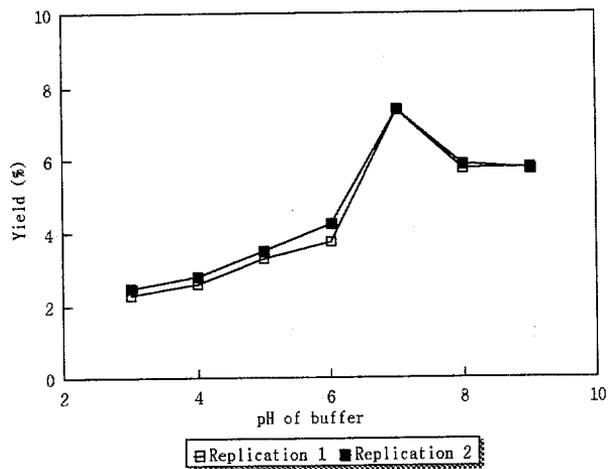


Fig. 4-2. Exo-polygalacturonase를 이용하여 사과박 으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 pH에 따른 수율(사과박 농도:0.5%; 효소 농도: 10%; 반응조건: 35°C, 36시간).

그림 4-2는 Exo-polygalacturonase를 이용하여 사과박으로부터 수용성 다당류 추출시 pH에 따른 수율(사과박 농도:0.5%; 효소 농도: 10%; 반응조건: 35℃, 36시간)을 나타낸 것이다. pH 7.0일 때 WSP 수율은 7.41%로 최대를 보였다. 이러한 결과는 산도가 강해져 반응조건이 지나치게 활성적일 때 가수분해가 지나쳐 WSP의 수율이 감소하는 것으로 판단된다. 동일 조건에서 2반복의 분석 결과는 거의 일치하는 것으로 나타났다.

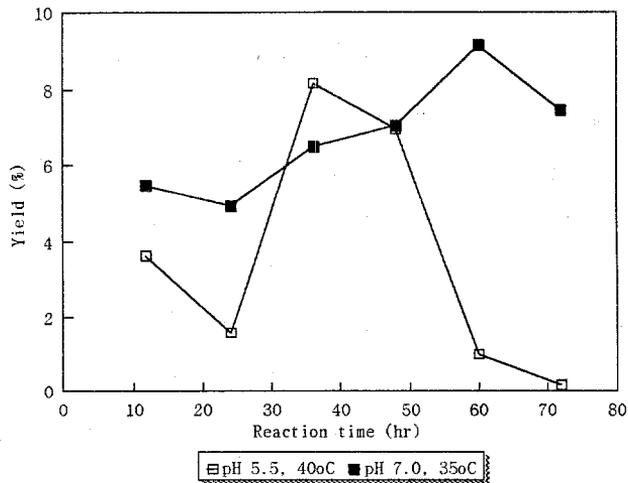


Fig. 4-3. Exo-polygalacturonase를 이용하여 사과박 으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 시간에 따른 수율(사과박 농도:0.5%; 효소 농도: 10%).

그림 4-3은 pH 5.5, 40℃와 pH 7.0, 35℃의 두 가지 반응조건하에서 Exo-PG를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 시간별 수율(사과박 농도:0.5%; 효소 농도: 10%)을 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 반응조건이 활성적일수록 최대 수율을 얻을 수 있는 반응시간은 단축되지만 수율을 향상시키는 데는 불리한 것으로 나타났다. pH 5.5, 40℃의 반응조건하에서는 48시간 경과하였을 때 수율이 8.13%로 최대를 보였으며, pH 7.0, 35℃에서는 60시간 경과하였을 때 수율은 9.13%나 되었다.

3. Cellulase의 수용화 효과

cellulase는 cellulose 분자를 무작위적으로 가수분해하는 효소로 알려져 있으며 본 연구에서는 2종의 cellulase를 이용하여 사과박 및 미역의 세포벽을 분해하여 각각 펙틴 및 알길산을 추출하는 효과에 대해서 분석하였다.

그림 4-4에서 4-6은 사과박 농도가 각각 1%, 3% 및 5%에서 Cellulase(C-8546)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(반응조건: pH 5.0, 40℃)을 나타낸 것이다. 전체적으로 살펴보면, 동일한 기질의 농도 하에서는 효소의 농도가 증가할수록 수율은 증가하는 것으로 나타났으며, 최대 수율을 얻을 수 있는 반응시간이 단축되는 것으로 나타났다. 그러나, 기질의 농도가 증가함에 따라 WSP의 수율은 크게 향되지 않는 것으로 나타난 바, 이러한 결과는 효소의 농도가 전체적으로 낮은 수준이기 때문에 기질 농도의 증가에 따른 영향이 비교적 작게 나타난 것으로 판단된다.

그림 4-7은 pH 5.0, 40℃, 24hr의 반응조건하에서 효소가 고농도일 때 기질 농도별 효소농도에 따른 추출 효과를 나타낸 것이다. 그림 4-4에서 4-6의 경우와는 달리 효소의 농도뿐만 아니라 기질의 농도가 WSP의 수율에 영향을 크게 주는 것을 알 수 있다. 이 경우, 기질의 농도가 5%이고 효소의 농도가

4%일 때 수용성 다당류의 수율은 10.75%로 나타났으며, 이러한 수율은 기존의 산처리에 의한 수율 2.93%~6.82%보다도 월등히 높은 수준이다.

한편, 그림 4-8과 4-9는 상업용 Cellulase(Cellulast 1.5L)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(반응조건: pH 5.0, 40°C, 24hr)을 기질의 농도가 각각 1% 및 5%일 때 나타낸 것이다. 이 경우, 그림 5에서 8과 같은 시약용 효소의 경우에 비해 다소 낮은 수율을 보였고 최대 수율을 얻기 위해서는 시약용 효소의 경우보다 더 긴 반응시간이 필요한 것으로 나타났는데, 이러한 원인은 효소의 순도 때문인 것으로 판단된다. 그러나, 기질과 효소의 배합비에 관해서는 유사한 경향임을 알 수 있다. 따라서, 효소의 순도 및 역가(activity)를 고려하여 공정을 설계한다면 실용성이 매우 높은 것으로 판단된다.

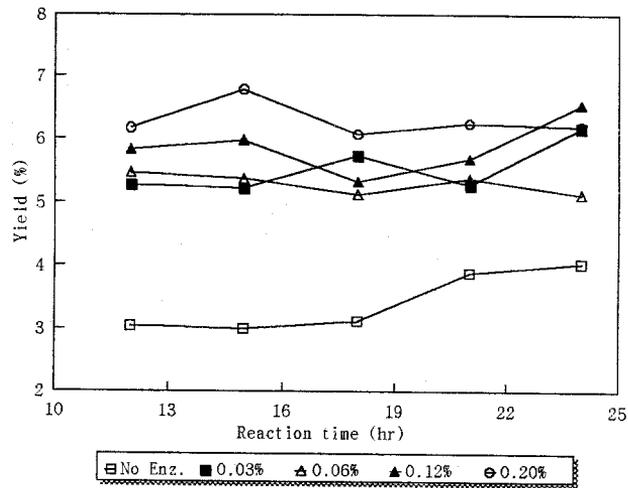


Fig. 4-4. Cellulase(C-8546)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(사과박 농도: 1%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

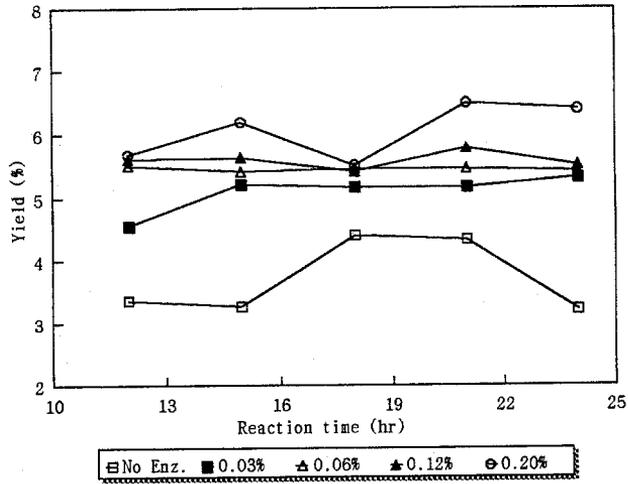


Fig. 4-5. Cellulase(C-8546)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(사과박 농도: 3%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

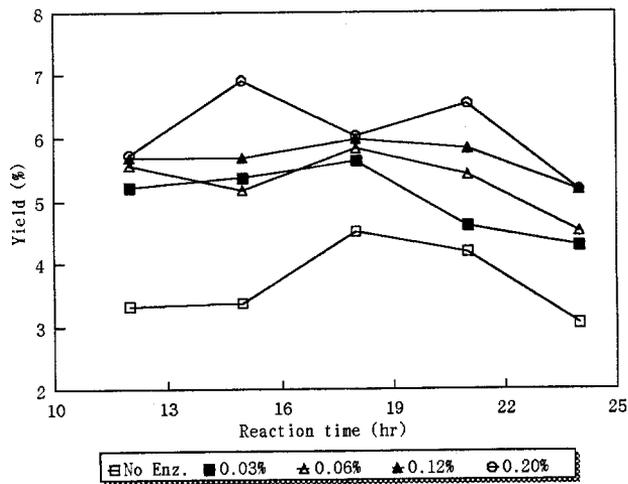


Fig. 4-6. Cellulase(C-8546)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(사과박 농도: 5%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

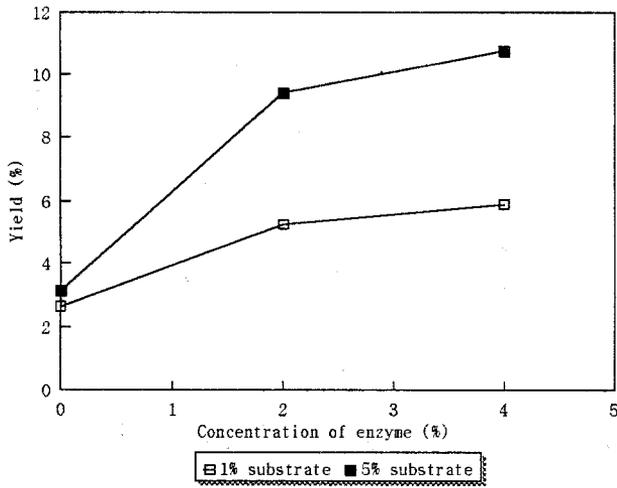


Fig. 4-7. Cellulase(C-8546)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 기질농도별 효소농도에 따른 수율 (반응조건: pH 5.0, 40°C, 24hr).

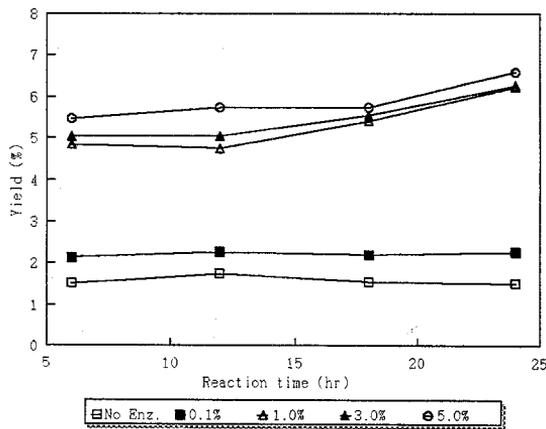


Fig. 4-8. 상업용 Cellulase(Cellulast 1.5L)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율 (기질농도: 1%; 반응조건: pH 5.0, 40°C, 24hr).

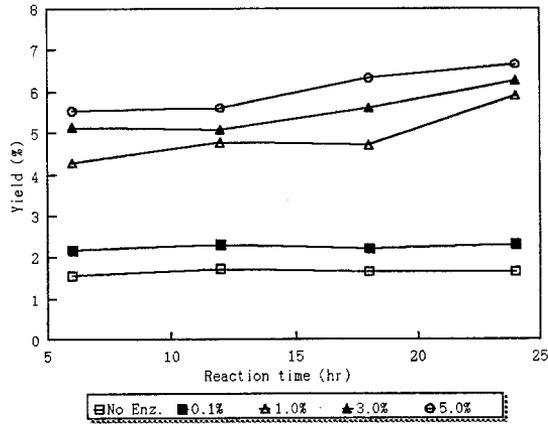


Fig. 4-9. 상업용 Cellulase(Cellulast 1.5L)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(기질농도: 5%; 반응조건: pH 5.0, 40°C, 24hr).

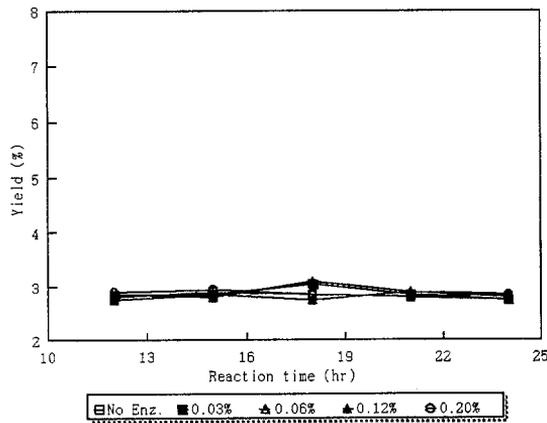


Fig. 4-10. Cellulase(C-8546)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(미역 농도: 1%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

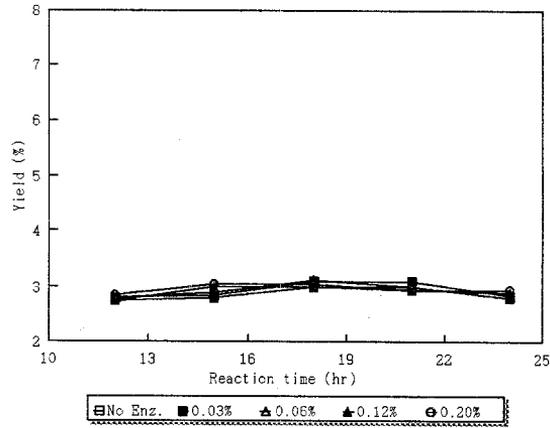


Fig. 4-11. Cellulase(C-8546)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출 시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(미역 농도: 3%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

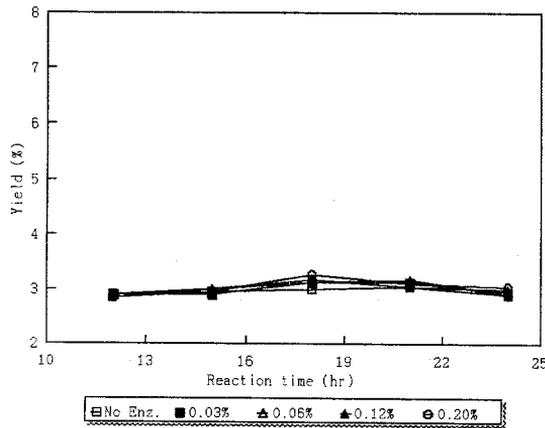


Fig. 4-12. Cellulase(C-8546)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출 시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(미역 농도: 5%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

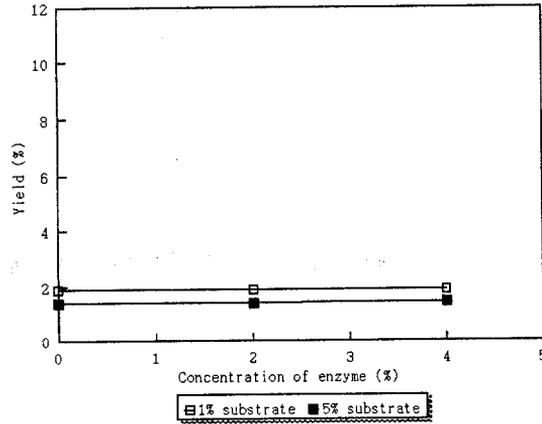


Fig. 4-13. Cellulase(C-8546)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 기질농도별 효소농도에 따른 수율(반응조건: pH 5.0, 40°C, 24hr).

그림 4-10에서 4-12는 미역 농도가 각각 1%, 3% 및 5%에서 cellulase(C-8546)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 효소농도별 반응시간에 따른 수율(반응조건: pH 5.0, 40°C)을 나타낸 것이다. 전체적으로 살펴보면, 미역의 경우는 사과박의 경우와는 달리 cellulase에 의한 효소적 처리에 의해서는 수용성 다당류를 효과적으로 추출하기가 곤란한 것으로 나타났다.

그림 4-13은 pH 5.0, 40°C, 24hr의 반응조건하에서 효소가 고농도일 때 기질농도별 효소농도에 따른 추출 효과를 나타낸 것이다. 미역의 경우에는 고농도의 cellulase를 처리하여도 WSP를 효과적으로 추출하기 어려운 것으로 나타났다.

4. Hemicellulase의 수용화 효과

여기서는 식물 세포벽의 주요 분해효소의 하나인 hemicellulase 2종을 사용하여 사과박과 미역으로부터의 수용성 다당류의 추출 효과를 검토하였다. 실험에 사용된 2종 중 H-2125는 시약용 hemicellulase로서 hemicellulase activity가 0.026 units/mg solid이고 cellulase activity가 0.027 units/mg solid이다. 한편, Pectinex Ultra SP-L은 상업용 효소로서 pectinase, hemicellulase 및 cellulase를 함유하고 있는 효소로서 역가는 26,000 PG/ml이다.

그림 4-14는 hemicellulase(H-2125)를 이용하여 사과박으로부터 수용성 다당류 추출시 기질농도별 효소농도에 따른 수율(반응조건: pH 5.0, 40℃, 24hr)을 나타낸 것이다. 그림 4-15에서 4-17은 각각 기질 1%, 3% 및 5%에 대해서 상업용 hemicellulase (Pectinex Ultra SP-L)를 처리하였을 때 반응시간별 효소농도에 따른 사과박으로부터의 WSP 수율(반응조건: pH 5.0, 40℃)을 나타낸 것이다. 기질농도 및 효소농도에 따른 WSP 수율의 경향은 cellulase를 처리한 경우와 유사하나 수율의 크기가 cellulase를 처리한 경우에 비해 작은 것으로 파악되었다. 이러한 결과는 hemicellulase에 cellulase 성분을 일부 함유하고 있기 때문인 것으로 판단된다. 따라서, 세포벽 수용화를 위해서는 hemicellulase 처리보다 cellulase 처리가 효과적인 것으로 판단된다.

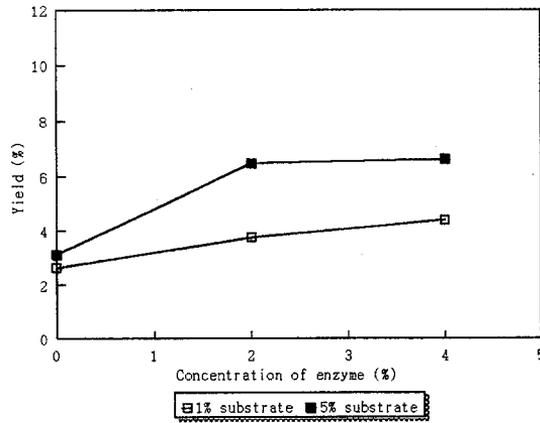


Fig. 4-14. Hemicellulase(H-2125)를 이용하여 사과박에서 water-soluble polysaccharides 추출시 기질농도별 효소농도에 따른 수율(반응 조건: pH 5.0, 40°C, 24hr).

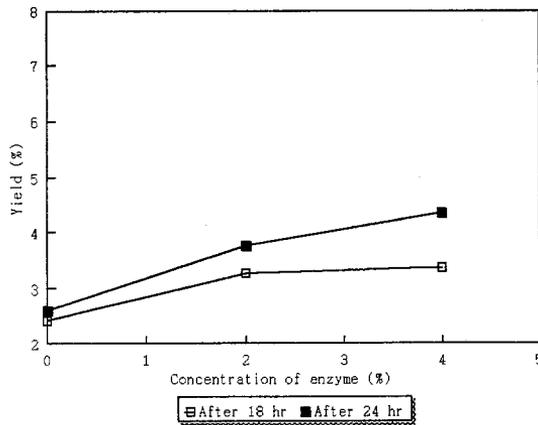


Fig. 4-15. 상업용 Hemicellulase(Pectinex Ultra SP-L)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 반응시간별 효소농도에 따른 수율(기질농도: 1%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

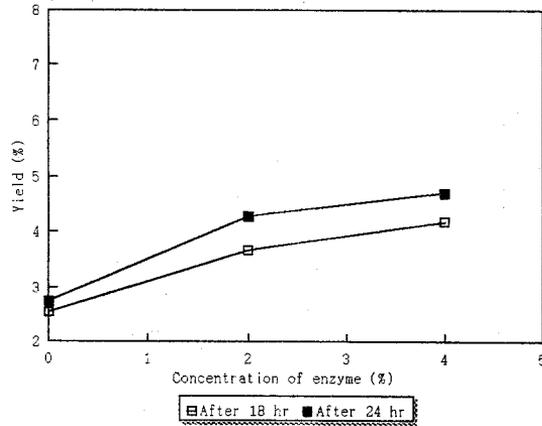


Fig. 4-16. 상업용 Hemicellulase(Pectinex Ultra SP-L)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 반응시간별 효소농도에 따른 수율(기질농도: 3%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

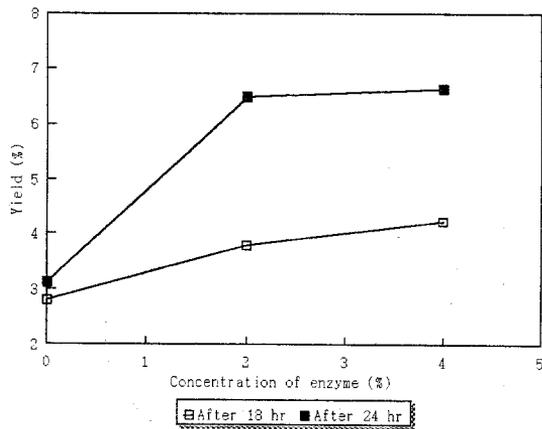


Fig. 4-17. 상업용 Hemicellulase(Pectinex Ultra SP-L)를 이용하여 사과박으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 반응시간별 효소농도에 따른 수율(기질농도: 5%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

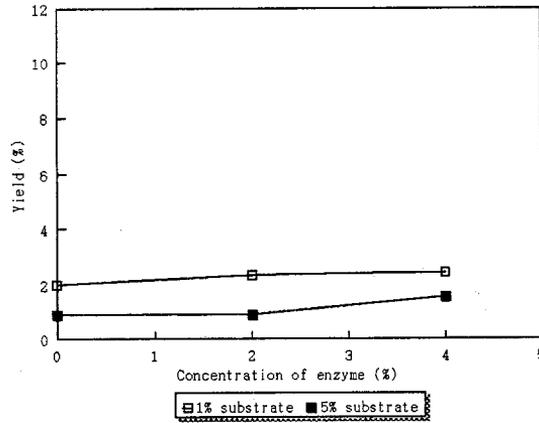


Fig. 4-18. Hemicellulase(H-2125)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 기질농도별 효소농도에 따른 수율(반응조건: pH 5.0, 40°C, 24hr).

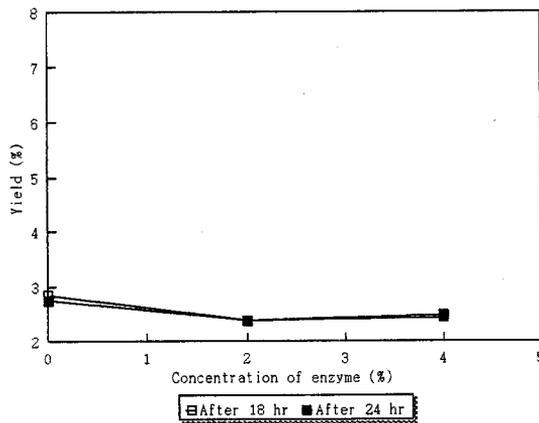


Fig. 4-19. 상업용 Hemicellulase(Pectinex Ultra SP-L)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 반응시간별 효소농도에 따른 수율(기질농도: 1%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

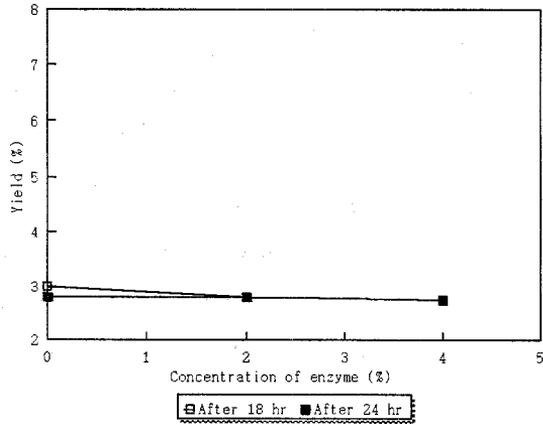


Fig. 4-20. 상업용 Hemicellulase(Pectinex Ultra SP-L)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 반응시간별 효소농도에 따른 수율(기질농도: 3%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

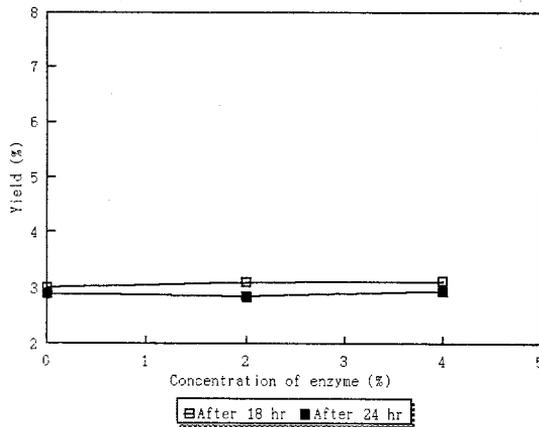


Fig. 4-21. 상업용 Hemicellulase(Pectinex Ultra SP-L)를 이용하여 미역으로부터 water-soluble polysaccharides 추출시 반응시간별 효소농도에 따른 수율(기질농도: 5%; 반응조건: pH 5.0, 40°C).

그림 4-18은 hemicellulase(H-2125)를 이용하여 미역으로부터 수용성 다당류 추출시 기질농도별 효소농도에 따른 수율(반응조건: pH 5.0, 40℃, 24hr)을 나타낸 것이다. 그림 4-19에서 4-21은 각각 기질 1%, 3% 및 5%에 대해서 상업용 hemicellulase (Pectinex Ultra SP-L)를 처리하였을 때 반응시간별 효소농도에 따른 미역으로부터의 WSP 수율(반응조건: pH 5.0, 40℃)을 나타낸 것이다. 미역의 경우에는 기질농도 및 효소농도에 따른 WSP 수율의 경향은 cellulase를 처리한 경우와 유사하게 hemicellulase에 의한 추출 효과가 거의 나타나지 않았다. 따라서, 미역의 세포벽 분해기작은 사과박의 경우와는 다른 것으로 판단된다.

5. Glucosidase의 수용화 효과

그림 4-22는 β -glucosidase(G-0395)를 처리하여 사과박으로부터 수용성 다당류 추출시 반응시간에 따른 수율(사과박농도: 0.5%; 효소농도: 10%; 반응조건: pH 5.5, 40℃)을 나타낸 것이다. 반응시간이 36시간 경과하였을 때 최대 수율을 보이다가 감소하는 경향을 보였다. 여기서 최대 수율은 8.32%였다.

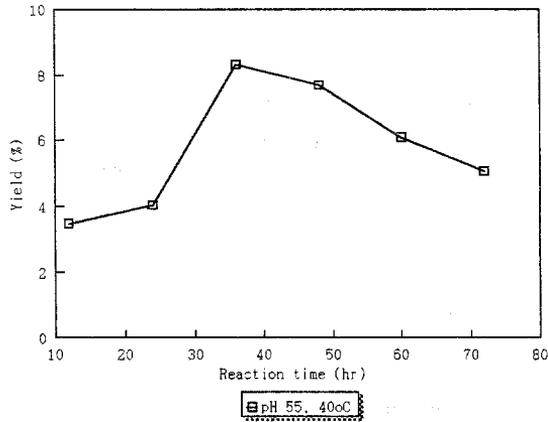


Fig. 4-22. β -glucosidase(G-0395)를 이용하여 사과박에서 water-soluble polysaccharides 추출시 반응시간에 따른 수율(사과박농도: 0.5%; 효소농도: 10%; 반응조건: pH 5.5, 40°C).

6. 추출물의 품질 분석

표 4-2와 4-3, 그리고 그림 4-23은 cellulase 및 hemicellulase 처리에 의해 사과박으로부터 추출된 수용성 다당류의 품질을 산처리에 의한 경우와 비교하기 나타낸 것이다. 효소 처리에 의한 수용성 다당류의 수율이 산처리의 경우보다 양호한 조건하에서는 표와 그림에서 보는 바와 같이 다량의 불순물이 추출될 뿐만 아니라 펙틴의 분자량도 감소하는 것으로 나타났다.

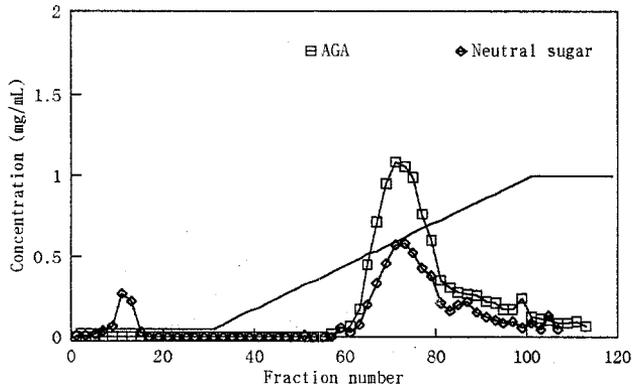
따라서, cellulase와 hemicellulase를 이용하여 펙틴을 추출하고자 하는 경우 추출조건이 엄격하게 관리되어야 하는 것을 알 수 있다.

Table 4-2. The purity and anhydrogalacturonic acid (AGA) and neutral sugar contents of water soluble polysaccharides extracted from apple pomace

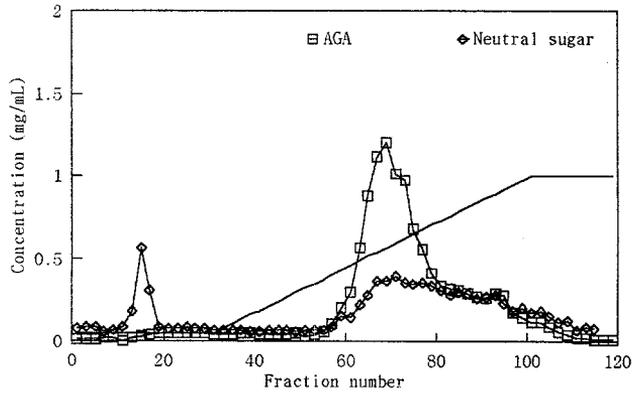
	Purity (%)	AGA (mg/ml)	Neutral Sugar (mg/ml)
Acid Treatment	84.6	0.92	0.59
Enzyme Treatment	Cellulase	68.5	0.75
	Hemicellulase	63.3	0.69

Table 4-3. The intrinsic viscosity and molecular weight of water soluble polysaccharides extracted from apple pomace

	Intrinsic Viscosity (ml/g)	Molecular Weight
Control	1.48	7.20×10^4
Acid Treatment	0.32	1.03×10^4
Enzyme Treatment	Cellulase	0.25
	Hemicellulase	0.28

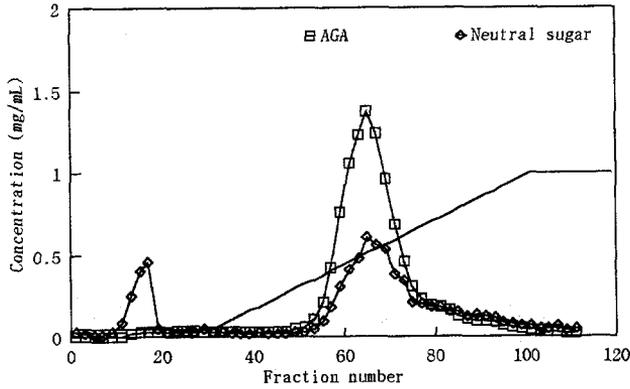


(a) Acid



(b) Cellulase

Fig. 4-23. Ion exchange chromatography of water-soluble polysaccharides.



(c) Hemicellulase

Fig. 4-23. (continued)

제4절 요약 및 결론

지금까지 식물 세포벽으로부터 다당류를 생산하는 경우 대개 산이나 알칼리를 고온에서 처리하는 화학적 처리방법이 주를 이루어 왔다. 이러한 화학적 처리방법은 수용화 자체에는 효율적이나, 화학적 처리에 따라 수질오염, 용기부식, 과도한 생산설비의 필요성, 생산고분자의 분해 등과 같은 많은 문제점을 야기시켜 왔다. 본 연구에서는 효소 기작을 이용하여 사과박 및 미역의 세포벽 수용화 효과에 대해서 연구하였다.

본 연구에서는 2종의 cellulase, 2종의 hemicellulase, 1종의 β -glucosidase, 1종의 exo-polygalacturonase를 사용하여 원료의 전처리 방법, 온도, pH, 반응 시간, 원료와 효소의 농도에 따른 수용화 효과를 분석하였던 바, 효소의 종류와 처리 조건에 따라서 수율의 차이가 매우 크게 나타났으며, 수율을 최대로 하는 적정 효소처리 조건을 확보할 수 있었다.

기존의 화학적 처리에 의해 사과박으로부터 수용성 다당류를 추출하였을 때의 수율은 처리 조건에 따라서 큰 차이를 보여 pH 1.8, 60°C의 조건에서는 2.93%(전처리 전의 최초 사과박 중량 기준), pH 1.8, 85°C의 조건에서는 6.82%로 나타났다. 효소적 처리에 의해 추출하였을 때는 조건에 따른 수율 차이가 더욱 크게 나타났으며, 양호한 처리 조건에서는 10.75%의 수율을 얻을 수 있었다. 이와 같은 효소적 방법에 의한 수율은 기존의 산처리에 의한 수율을 훨씬 증가하는 수준일 뿐만 아니라 매우 단순한 공정이 가능한 바, 기존의 산처리 방법을 대체할 수 있는 가능성을 보였다.

본 연구에서는 효소적 처리에 의해 사과박과 미역으로부터 각각 펙틴과 알긴산과 같은 다당류를 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 탐색하고자 수행되었던 바, 사과박을 대상으로 한 효소적 처리에 대해서는 수율면에서 매우 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 반면에 미역을 대상으로 하였을 때는 cellulase와 hemicellulase의 처리시 처리조건에 따른 영향이 크게 다르지 않은 것으로 나타나 현재까지 두드러지게 효과적인 효소는 드러나지 않았다.

여 백

제 5 장 EXO-PG를 이용한 펙틴 추출

제1절 서 론

펙틴은 galacturonic acid와 methanol을 주성분으로 하는 다당류로서, 식물 조직의 세포벽이나 중엽에서 발견된다⁽²⁶⁻²⁷⁾. 펙틴은 식물세포의 기계적 강도를 유지하거나 세포간의 결합, 조직의 강도, 응집성 및 점조성 등에 영향을 미친다⁽²⁸⁾. 펙틴은 특유의 성질로 말미암아 식품에서 겔화제, 안정제, 점증제 등으로 이용되며, 또한 의약, 화장품 등에 널리 이용되어져 왔다⁽²⁹⁾. 최근에는 정장 작용, 콜레스테롤 저하 효과, 지방대체제로서의 기능성 등이 보고되어 그 사용량이 계속 증가하고 있다⁽³⁰⁾.

펙틴은 산이나 알칼리 처리를 통하여 식품으로부터 단계적으로 얻을 수 있으며, 산업적으로는 감귤류의 껍질이나 사과박에 고온의 산 용액을 처리하는 화학적 방법을 사용하고 있다⁽³¹⁾. 그러나 산처리 방법은 불순물을 함유하여 펙틴의 순도를 낮추어 기능성을 저하시키고 기기를 부식시키며 수질오염을 야기하는 등의 단점을 가지고 있다. 이러한 단점들을 보완하기 위한 방안으로 hemicellulase, cellulase 등의 효소를 이용하여 펙틴을 추출하는 연구가 보고되었다⁽³²⁾.

EPG는 protopectinase의 일종으로서 protopectin으로부터 pectin을 방출하며, 식물의 부패에 관여하는 미생물과 토양 미생물에 많이 존재한다^(33,34). EPG는 cellulose와 결합된 펙틴의 중성당 결사슬을 분해하거나, homogalacturonan 부분을 분해한다⁽³⁵⁻³⁷⁾. EPG는 식물성 식품소재에 대한 단세포화^(38,39), 식물세포의 protoplast 생산⁽⁴⁰⁾ 등에 응용성을 가진다고 보고되었었으며, 그 중요성은 점차 증가하고 있다. 사과의 펙틴은 세포벽의 cellulose나 hemicellulose에 에스테르결합화되어 protopectin의 형태로 존재하고 있으며, 사과의 숙성에 따라 일부가 가용성 pectin으로 전환된다. EPG는 protopectin을 제한 가수분해하고, 토양 미생물로부터 대량 생산이 가능하므로 펙틴 추출에 매우 효과적이라 기대된다.

따라서, 본 연구에서는 EPG라는 효소를 이용하여 효소가 가지고 있는 식물 세포벽의 선택적 수용화에 의한 고품질, 고수율의 펙틴 생산기술을 개발하고자 *Rhizopus* sp.에서 생산된 EPG⁽⁴¹⁾를 이용하여 사과박의 펙틴 추출 효과를 분석하였으며, 추출된 펙틴의 특성을 조사하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서 사용한 건조 사과박은 국내 사과음료수 생산공장(경북 군위군 경북능금조합)에서 수거한 것으로 hammer mill로 분쇄하여 80 mesh체를 통과시켜 -10℃에서 저장하면서 실험에 사용하였다. 실험에 이용한 exo-polygalacturonase는 Yakult Honsha(Tokyo, Japan)에서 구입했고, alcohol oxidase(EC 1.1.3.13)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo. U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 기타 시약들은 특급품 이상을 사용하였다.

2. 사과박으로부터 Water-Alcohol Insoluble Pectin(WAIP)의 제조

사과박(10 g)을 증류수(20 mL)에 혼합한 후 마쇄기(AM-T, Nihonseiki Kaisha LTD, Japan)를 이용하여 30초간, 2회에 걸쳐서 사과박을 잘게 마쇄하였다. 여과지(Whatman 2)로 사과박의 마쇄물을 걸러낸 후, 그 여과물에 ethanol(20 mL)을 가하여 20분간 가열하였다. 이것을 다시 여과한 후 그 여과물에 ethanol(20 mL)을 가하여 한번 더 여과한 후 여과물을 동결건조시켜서 WAIP를 얻었다.

3. WAIP로부터 Acid Soluble Pectin(ASP)의 제조

WAIP 2 g에 0.05 M의 HCl 100 mL를 첨가한 후 60°C에서 30분간 가열하였다. 냉동 원심분리기(Hitachi, 20PR-502, Japan)에서 10,500×g, 20분간 원심분리한 후 여과지로 여과하고 여과액에 1 M NaOH를 첨가하여 용액의 pH를 4.5로 조절하였다. 이 용액에 acetone량이 70%가 되도록 첨가하여 19,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 최종적으로 침전물을 acetone으로 씻은 후 동결건조시켰다.

4. WAIP로부터 Enzyme Soluble Pectin(ESP)의 제조

20 mM의 각 buffer 100 mL(pH 3.0, citrate buffer; pH 4.0, acetate buffer; pH 5.0, acetate buffer; pH 6.0, sodium phosphate buffer, pH 7.0, sodium phosphate buffer; pH 8.0, Tris buffer; pH 9.0, glycine buffer)에 WAIP 1 g과 효소 적당량을 첨가한 후 배양기(HB-201 SF)에서 온도와 시간을 달리하여 100 rpm에서 반응시켰다. 배양이 끝난 후 10,500×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 여과지로 여과한 후 100°C에서 10분간 가열한 후, acetone량이 70%가 될 때까지 잘 저으면서 첨가하였다. 그후 19,000×g에서 10분간 원심분리시켜 침전물(enzyme soluble pectin)을 acetone으로 씻은 후 동결건조기에서 건조시켰다(Fig. 1).

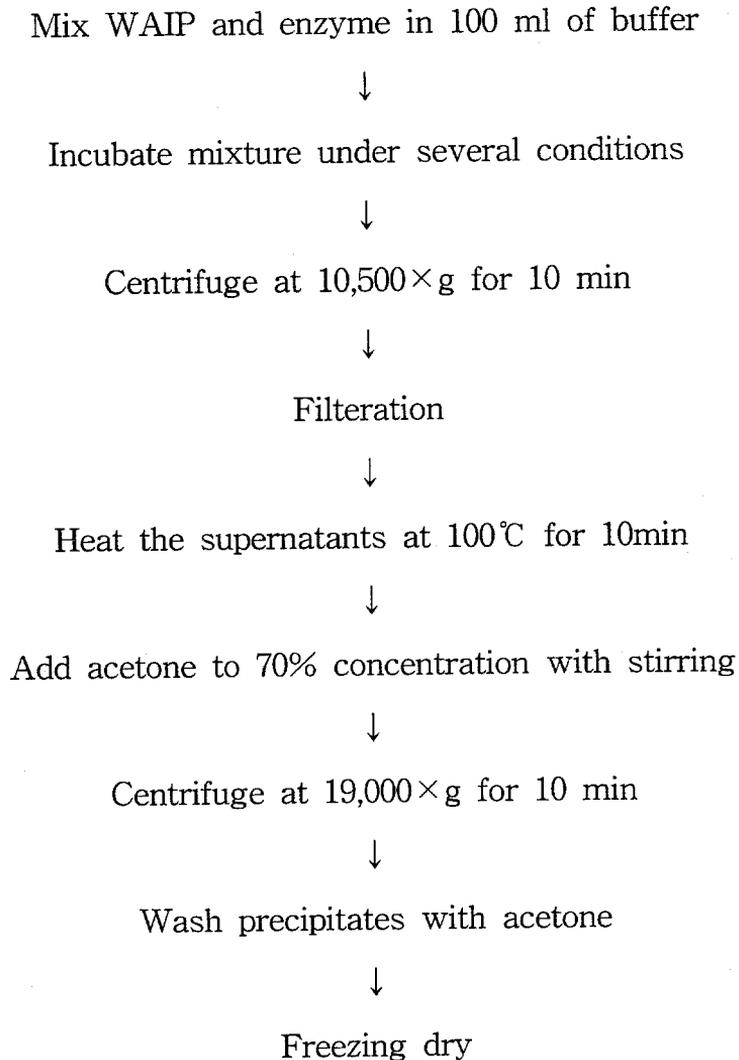


Fig. 5-1. Extraction process of enzyme-soluble pectin(ESP) from water alcohol insoluble pectin(WAIP).

5. 펙틴의 순도 및 methoxyl함량 측정

펙틴의 순도는 추출 펙틴의 galacturonic acid를 m-hydroxydiphenyl법으로 측정하여 측정된 galacturonic acid양을 시료양에 대한 백분율로 나타내었다⁽⁴²⁾. 0.01%(w/v)의 펙틴 용액 0.5 mL를 얼음 상자에서 5분 동안 식힌 뒤 황산을 용매로 하여 만든 0.0125 M의 sodium tetraborate 3 mL를 첨가하여 혼합시켰다. 그 후 100°C에서 5분간 끓이고 나서 다시 얼음 상자에서 5분간 식히고 0.5%(w/v) sodiumhydroxide에 녹인 0.15%(w/v) m-hydroxydiphenyl를 0.05 mL를 첨가하고 잘 혼합한 뒤 20분 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 0.001 ~ 0.010% galacturonic acid를 사용하였다.

펙틴의 methoxyl함량은 0.001 ~ 0.010% methanol을 표준물질로 사용하여 추출된 galacturonic acid내의 carboxyl기의 에스테르화 정도를 Klavonos & Benett법⁽³²⁾으로 측정하였다. 추출 펙틴 3 mg을 증류수 5 mL에 녹인 뒤 1.0 N potassium hydroxide 용액을 5 mL를 첨가하고 실온에서 30분간 정치시킨 후, 5%(v/v) o-phosphoric acid를 이용하여 용액의 pH를 7.5로 맞춘 뒤 전체 용액이 20 mL가 되게끔 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 첨가하여 stock solution을 제조하였다. Stock solution 중 1 mL를 취하여 1 unit/mL의 alcohol oxidase를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 용해시킨 용액 1 mL를 첨가한 후 25°C 10분간 반응시키고, 2.0 M ammonium acetate와 0.05 M acetic acid에 용해된 0.02 M pentan-2,4-dione용액 2 mL를 첨가하고 잘 혼합한 뒤 60°C에서 15분간 열처리를 하고 실온에서 식힌 뒤 412 nm에서 흡광도를 측정했다.

6. 펙틴의 분자량 분석

펙틴의 분자량은 고유 점도로부터 산출하였다. 펙틴의 고유점도는

Cannon-Fenske capillary viscometer를 이용하여 측정하였다. 일정량의 펙틴을 증류수에 넣고 상온에서 1시간 교반한 후, 이를 0.45 μm Millipore filter에서 여과하여 10 mL의 용액을 Cannon-Fenske 모세점도관(size 50)에 넣고 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 에서 점도를 측정하였다.

비점도(specific viscosity: η_{sp})와 고유점도(intrinsic viscosity: $[\eta]$)는 각각 다음 식을 이용하여 결정하였다.

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

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

여기서 η 은 용액의 점도, η_s 는 용매의 점도, C는 용액의 농도이다. 펙틴의 분자량은 위에서 구한 고유점도를 다음의 Mark-Houwink 식에 대입하여 계산하였다.

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

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

제3절 결과 및 고찰

1. 사과박으로부터 WAIP의 제조 및 ASP의 제조

본 연구에 이용된 건조 사과박의 화학적 성분은 수분 11.4%, 조단백질 3.7%, 조지방 4.5%, 회분 1.8%, 탄수화물 70.9% (중성당 38.3%, 우론산 27.4%, 전분 5.2%) 이었다. 사과박으로부터 효소를 이용하여 펙틴을 추출하기 위하여 불용성 펙틴을 함유한 WAIP를 제조하였다. Table 5-1에 단계별 추출률을 표시한 바와 같이 사과박 질량의 약 32.5%가 WAIP로 회수되었다. 한편, 효소에 의해 추출된 펙틴을 기존의 산처리 방법에 의한 펙틴과 비교 분석하기 위하여 사과박의 불용성 펙틴인 WAIP에 산을 처리하여 수용성 펙틴을 추출한 결과, 약 8%의 펙틴 추출 수율이 나타났다.

Table 5-1. Galacturonic acid content on each steps for WAIP preparation process.

Step	Total galacturonic acid (g)	Yield(%)
Apple pomace	6.767	100.0
Distilled water washing ¹⁾	1.600	23.6
EtOH boiling ¹⁾	0.374	5.5
EtOH washing ¹⁾	0.398	5.9
Acetone washing ¹⁾	0.062	0.9
WAIP	2.199	32.5

¹⁾ Filtered liquids after each filtration were used samples.

2. WAIP로부터 ESP(enzyme soluble pectin)의 제조

EPG는 일본 Yakult사에서 판매하고 있는 상업용 효소로서, galacturonic acid의 말단에서 프로토펙틴을 분해하는 작용을 한다. 이 효소는 식물 조직의 세포벽에 존재하는 프로토펙틴을 분해하여 식물세포를 단세포화하는 기능이 밝혀져 식물 기원의 식품 원료의 가공에 이용될 수 있다⁽⁴¹⁾.

사과박으로부터 EPG에 의한 펙틴 추출의 최적 조건을 구하기 위하여 먼저 pH를 변화시키면서 효소 반응을 수행하였다(Fig. 5-2). 효소 반응 조건은 36 ℃, 40시간의 반응시간으로 고정하고, 반응용액 100 mL에 기질인 WAIP 1 g 과 효소 EPG 0.1 g을 가하고 pH만을 변화시켜 추출된 수용성 펙틴을 측정하였다. 이 결과, 산성에서 중성으로 갈수록 추출되는 펙틴의 양이 증가하여 pH 7에서 WAIP의 22.8%가 수용성 펙틴으로 추출되었으며, 염기성 pH로 갈수록

추출률은 감소하였다. 단세포화를 위한 EPG의 반응 최적 pH는 일반적으로 산성(pH 5)으로 보고되어 있으나, 사과박에서의 불용성 펙틴에 대한 반응은 중성에서 최적을 나타내어 기질에 대한 효소의 반응 기작이 다소 차이가 있음을 보였다.

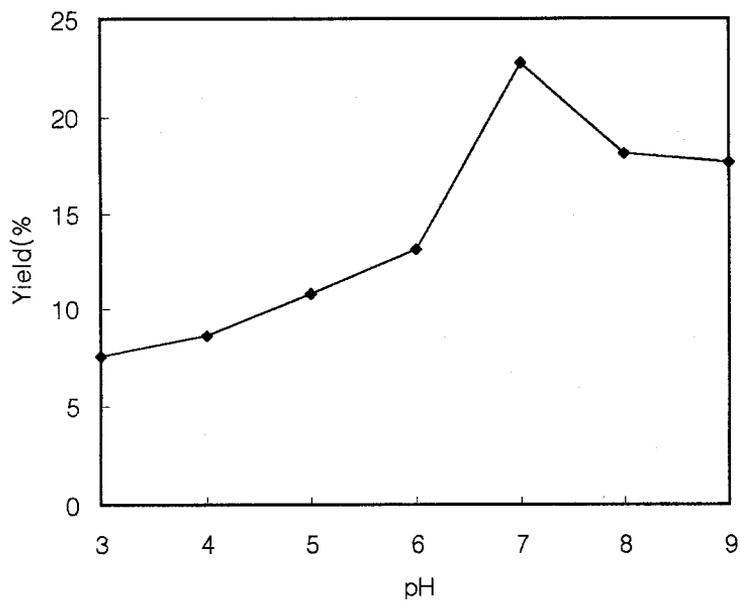


Fig. 5-2. Effect of pH on the extraction of pectin from WAIP by exo-polygalacturonase(EPG) under the condition of temperature at 36°C, and incubation time of 40 hours.

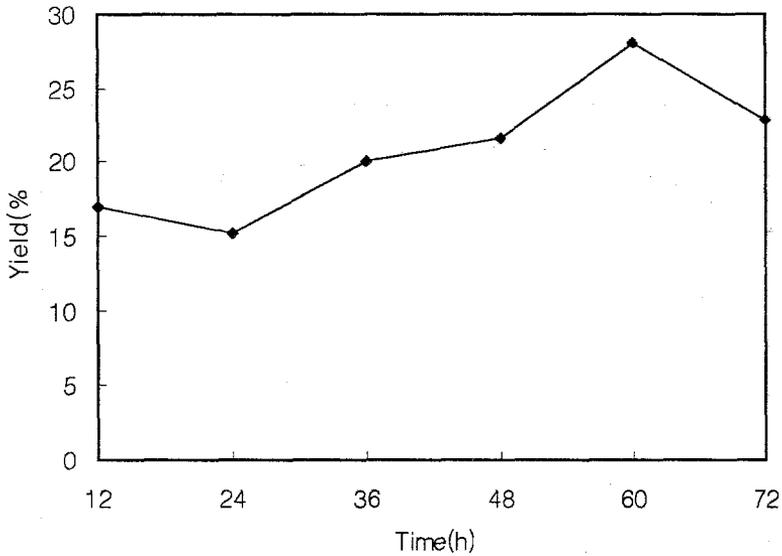


Fig. 5-3. Effect of incubation time on the extraction of pectin from WAIP by exo-polygalacturonase(EPG) under the condition of temperature at 36°C, and incubation pH at 7.

효소 반응 시간의 영향을 조사하기 위하여 pH를 7로 고정하고 그 외의 조건은 Fig. 5-2와 같이 하면서 반응시간을 변화시켜 EPG의 펙틴 추출에 대한 영향을 조사하였다(Fig. 5-3). 반응시간이 증가하면서 추출되는 펙틴의 양도 증가하여 60시간의 반응에서 28.1%로 가장 추출률이 높았으며, 그 이상의 시간에서는 감소하였다. 이는 추출된 펙틴이 EPG에 의하여 부분적으로 분해되는 것으로 추측된다.

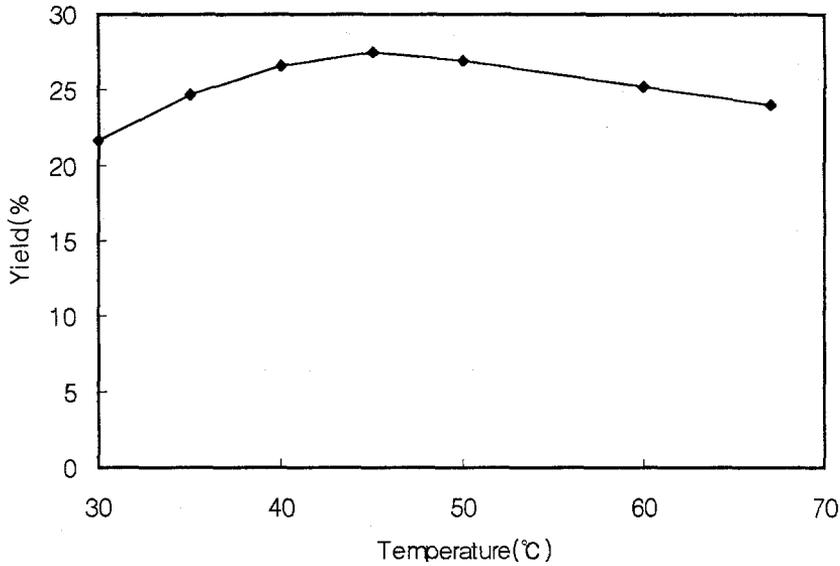


Fig. 5-4. Effect of incubation temperature on the extraction of pectin from WAIP by exo-polygalacturonase(EPG) under the condition of incubation time of 60 hours at pH 7.

반응온도에 따른 EPG의 영향을 조사하기 위하여 반응시간은 60시간으로, 반응 pH는 7.0으로 고정하고 그 외의 조건은 Fig. 5-2와 같이 하면서, 온도를 변화시키면서 펙틴 추출률을 측정하였다(Fig. 5-4). 본 연구에서 조사한 30°C에서 70°C까지의 온도 범위에서 온도의 영향은 비교적 적었으며, 45°C에서 27.5%로 가장 추출률이 높았다. 온도에는 효소의 안정성과 기질의 안정성, 그리고 효소의 반응속도가 인자로 작용하며, 이들의 복합적 연관작용 결과 45°C

에서 최적 조건이 형성됨을 알 수 있었다.

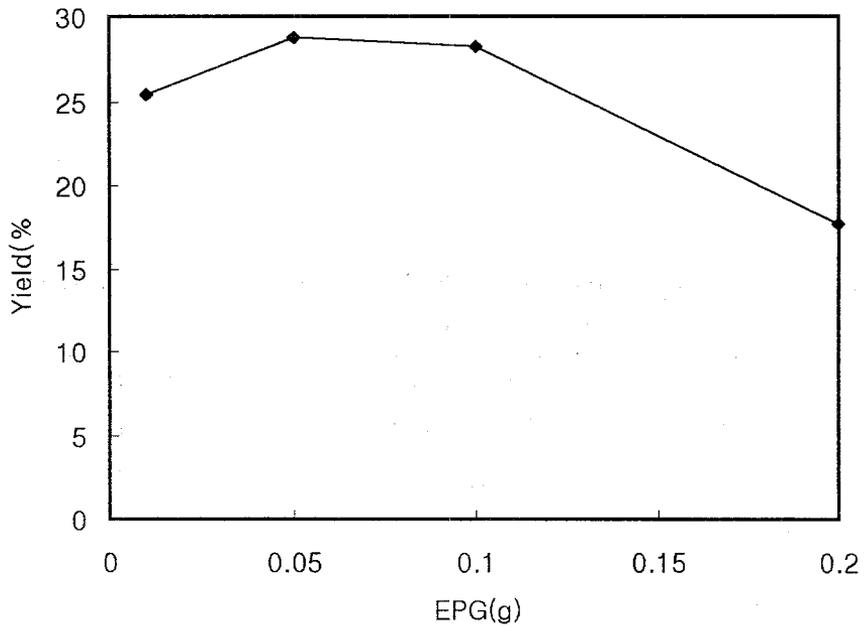


Fig. 5-5. Effect of the ratio of EPG to WAIP of 1g on the extraction of pectin under the reaction condition of temperature at 45°C, incubation pH at 7, and incubation time of 60 hours.

WAIP에 대한 EPG의 적정 첨가량을 조사하기 위하여 pH 7, 반응시간 60 시간, 반응온도 45°C에서 효소량을 변화시키면서 추출된 펙틴의 양을 조사한

결과, WAIP 1 g에 대하여 0.05 g의 EPG가 작용할 때, 즉 기질과 효소의 비가 20:1(w/w)일 때 가장 많은 수용성 펙틴을 회수할 수 있었다(Fig. 5-5). 한편, 반응용액에서의 고형분의 비율이 펙틴의 추출에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기질과 효소의 비를 20:1로 유지하면서 농도만을 변화하면서 측정한 결과(Table 5-2), 지금까지 수행하였던 바와 같이 반응용액에서 기질인 WAIP를 1% 첨가하고 효소를 0.05% 가하였을 때 31.0%의 펙틴이 추출되어 가장 수율이 높았다.

Table 2. Comparison of the yields for the concentration ratio of WAIP and EPG in enzymatic extraction.

Concentration of WAIP (%)	Concentration of EPG (%)	Yield (%)
2.0	0.100	5.0
1.0	0.050	31.0
0.5	0.025	20.8

3. 추출된 펙틴의 특성

추출된 펙틴의 순도를 galacturonic acid 함량으로 측정한 결과, 산 추출물의 경우 75.7%였고 효소의 경우 80.1%로 산 추출물보다 순도가 높았다(Table 5-3). EPG를 이용하여 펙틴을 추출한 경우에는 사과박의 불용성 펙틴층의 galacturonan 부분에 선택적으로 작용하여 펙틴을 유리시키므로, 불순물인

cellulose나 hemicellulose가 적게 추출되어 순도가 높게 나온 것으로 추측된다. 최⁽⁷⁾의 결과에 의하면 hemicellulase를 이용하여 사과와 배의 펙틴을 추출하였을 때 12.5%의 순도를 보였다고 하였으며, 이에 비해 본 연구에서 이용한 EPG는 펙틴의 추출에 선택성이 높음을 알 수 있다.

Table 5-3. Comparison of purity, methoxyl content, viscosity on extracted pectins.

	Purity(%)	Methoxyl content(%)	Intrinsic Viscosity($[\eta]$)	Average Molecular Weight ³⁾
ASP ¹⁾	75.7	2.44	1.559	7.66×10^4
ESP ²⁾	80.1	6.36	0.430	1.50×10^4

¹⁾ Acid soluble pectin

²⁾ Enzyme soluble pectin obtained by EPG

³⁾ Molecular weights were calculated from intrinsic viscosity

펙틴의 galacturonic acid 부분에 에스테르결합되어 있는 methoxyl기는 펙틴의 응용에 대해 큰 영향을 미친다. 이론적으로 펙틴의 모든 galacturonic acid가 methoxyl기와 결합되어 있으면 16.32%의 methoxyl 함량을 나타내며, 일반적으로 7% 이상의 methoxyl 함량인 펙틴은 고 methoxyl 함량 펙틴으로 분류되어 식품에 널리 이용된다. 본 연구의 경우, 산 추출물의 경우 2.44%의 methoxyl 함량으로 나타났고 효소 추출물의 경우 6.36%로 약 4% 높게 나타났다. 최⁽³²⁾의 hemicellulose에 의해 추출된 펙틴은 5.66%의 methoxyl 함량을 나타낸 것에 비해 본 연구의 EPG는 methoxyl 함량에 영향을 덜 미쳤다고 볼 수 있으며, 식품 응용에 대한 가능성을 높게 시사한다. 따라서 향후 조효소 형

태의 EPG가 아니라 보다 높은 순도의 EPG를 이용하면 산업적인 응용성이 뛰어난 펙틴을 얻을 수 있을 것이다. 한편, 추출된 펙틴의 고유점도를 측정하여 평균 분자량을 산출한 결과, 산 추출 펙틴은 7.66×10^4 이며 효소로 추출된 펙틴은 1.50×10^4 으로 나타났다.

제4절 요약 및 결론

사과박에서 WAIP의 함량은 32.5%로 추출되었으며, 산 처리를 통한 pectin 추출수율은 약 8%로 나타났다. EPG는 불용성의 protopectin을 수용화시켜 pectin을 생산하는 효소로 최적조건시 높은 수율을 나타낼 수 있기 때문에 EPG를 이용하여 pectin추출 조건을 pH, 시간, 온도, 효소 첨가량 등을 조사하였다. 먼저 최적조건을 조사한 결과 pH 7, 60시간, 45°C로 그 추출률은 27.1%로 측정되었다. 펙틴의 순도를 측정한 결과 산 추출 펙틴은 75.7%이었고, 효소를 이용하여 추출한 펙틴은 80.1%로 나타났다. 또한 methoxyl함량을 측정한 결과 산 추출 펙틴은 2.44%, 효소 추출 펙틴은 6.36%로 저 메톡실펙틴으로 나타났다.

따라서 효소 추출물의 경우 저 메톡실 펙틴으로 설탕을 전혀 첨가하지 않아도 2가 이상의 금속이 존재하면 겔의 망상구조를 만들 수 있으므로 저 칼로리 식품에 대한 겔화제로서 이용이 기대된다.

제 6 장 EXO-PG를 이용한 알긴산 추출

제1절 서 론

예로부터 미역은 몸의 혈액순환을 원활하게 해주며, 비만예방에 좋은 효과를 발휘함에 있어 우리의 식생활에서 많은 사랑을 받아왔다. 미역에서의 영양, 특성에 가장 큰 영향을 미치는 것은 미역에 23~30%(건물기준) 함유되어 있는 갈조 특유의 해조다당류인 알긴산(alginate)으로 알려져 있다. 알긴산은 정상작용으로 인한 소화운동의 증가와 식이섬유로서의 콜레스테롤 저하기능, 또한 노화 촉진의 유해산소의 생성과 이를 제거하는 효소의 증가, 그리고 여기에 혈압 조절의 효과, 증금속을 흡착·제거하는 기능이 있으며 식품산업에서는 물에 가용성으로 점성, 겔화성, 수화성, 보수성, 결착성, 필름형성성 등과 같은 많은 특성으로 여러 가지로 이용범위가 넓어지고 있으며, 나아가 완화제, 유화안정제로서 의약품 및 화장품, 호료, 제지산업에 이용이 되고 있다.

알긴산은 수용성, 알칼리성, 산-알칼리성에 가용화되는 성질이 있고, 이러한 특성을 이용하여 AASA (Acid-Alkali Soluble Alginate), ASA (Alkali Soluble Alginate), 그리고 HWEM (Hot-Water Extractable Material) 등의 알긴산을 추출한 바 있다. 산업적으로는 알칼리 처리에 의한 추출법이 보편적으로 이용되고 있으나, 화학적 방법을 이용하여 알긴산을 생산할 때 환경오염이 가장 큰 문제점으로 대두되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 알긴산 추출시 높은 수율을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 환경오염을 최소화하고자 새로운 효소적 추출법을 개발하고, 기존의 산-알칼리추출법 및 열수추출법과 비교하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서 사용한 미역은 물미역으로서 서울 가락동 농수산물시장에서 구입하였다. 먼저 물미역을 흐르는 물에 여러번 세척하여 염을 제거하고, 열풍 건조기를 이용하여 60℃에서 건조 시킨 후 hammer mill로 분쇄하여 60mesh 체를 통과한 입자를 모아 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 효소로 exo-polygalacturonase (EPG)는 Yakult Honsha (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약들은 1급품을 사용하였다.

2. 산-알칼리추출법(AASA)에 의한 알긴산 추출

건조미역 5 g을 0.025% H₂SO₄ 200 ml에 1시간 세척하고, 1% Na₂CO₃ 200 ml를 첨가하여 65℃에서 5시간 교반하였다. 여기에 1 L의 물을 첨가 및 여과하여, 여액에 2배량의 methanol을 가하여 응고·침전시킨 후 하루밤동안 정치하였다. 이후 원심분리(8,000×g, 20 min)를 하여 침전물을 99.5% methanol로 다시 4회 세정·탈수하여 원심분리(8,000×g, 20 min)하고 동결·분말화하였다.

3. 열수추출법(HWEM)에 의한 알긴산 추출

건조미역 5 g에 formaldehyde 3.7% 50 ml를 첨가하여 30℃에서 하루정도 반응시킨 후, 증류수 100 ml를 첨가하고, 100℃에서 4시간 동안 교반하여 삼베 천에 여과하였다. 여과액을 수돗물로 투석(overnight)하고 다시 Filter paper(Toyo No.2)에 여과하였다. 여과액을 1/4 부피로 농축한 다음 최종농도가 80% 되게 ethanol을 첨가하고, 원심분리(3,000×g, 10 min)를 하였다. 그리

고 침전물을 ethanol과 acetone으로 세척(3,000×g, 5 min)하고, 30℃, 12시간 건조하였다.

4. 효소처리법에 의한 알긴산 추출

건조미역 5 g에 Exo-PG 50mg을 혼합한 후 완충용액 50 ml를 첨가하여 온도 25~60℃, pH 5~9, 반응시간 0~36hr의 조건에서 반응시켰다. 나머지 과정은 열수추출법과 동일하게 하였다(그림 6-1).

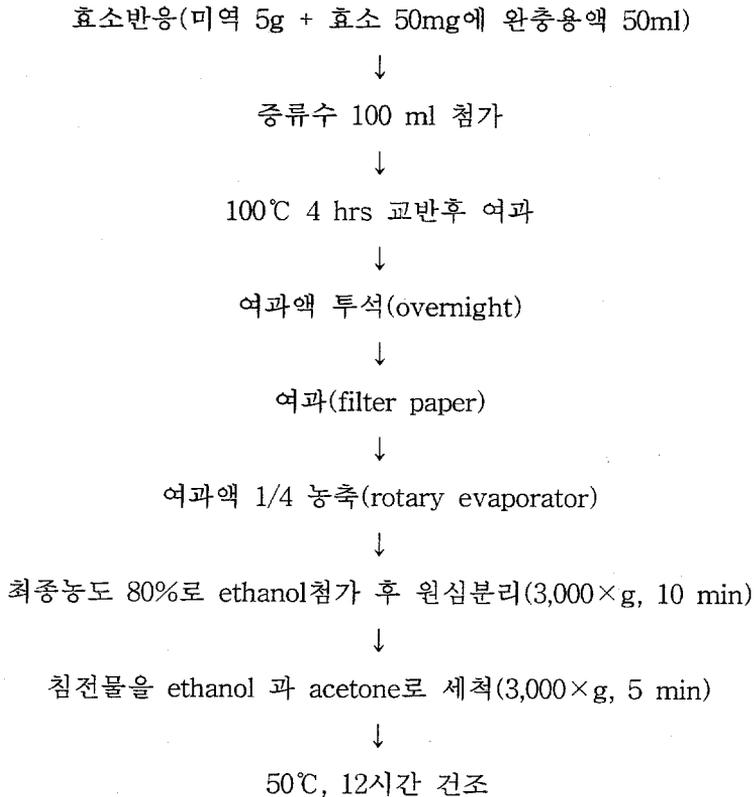


Fig. 6-1 건조미역으로부터 효소처리법에 의한 알긴산 추출

5. 알긴산의 순도

알긴산의 순도는 추출된 다당류의 uronic acid를 m-hydroxydiphenyl법으로 측정하여 측정된 uronic acid양을 시료양에 대한 백분율로 나타내었다.

6. 이온교환 크로마토그래피

시료 25 mg을 10 mL의 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)에 넣고 상온에서 1 시간 동안 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하였다. 제조한 용액 4 mL를 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)로 평형 시킨 DEAE Sepharose CL-6B ion exchange column(1.5 x 25 cm)에 주입한 후 100 mL의 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)를 0.7 mL/min의 속도로 흘려 중성 다당류를 용출하였다. 다음, 펙틴은 50 mM - 1.0 M sodium acetate buffer(pH 4.5)로 용출하였다. 각 분획은 3 mL로 하였으며, phenol-sulfuric법과 m-hydroxydiphenyl법에 의하여 각각 중성당과 우론산을 측정하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 반응시간의 영향

Fig. 6-2는 반응시간에 따른 알긴산의 추출율을 측정한 결과이다. 24시간의 효소반응에서 가장 추출율이 높았으며, 그 이상의 반응에서는 추출된 알긴산의 양이 감소되었으며, 이는 불순물로 인한 부반응의 발생 또는 알긴산의 분

해에 기인하는 것으로 추측된다.

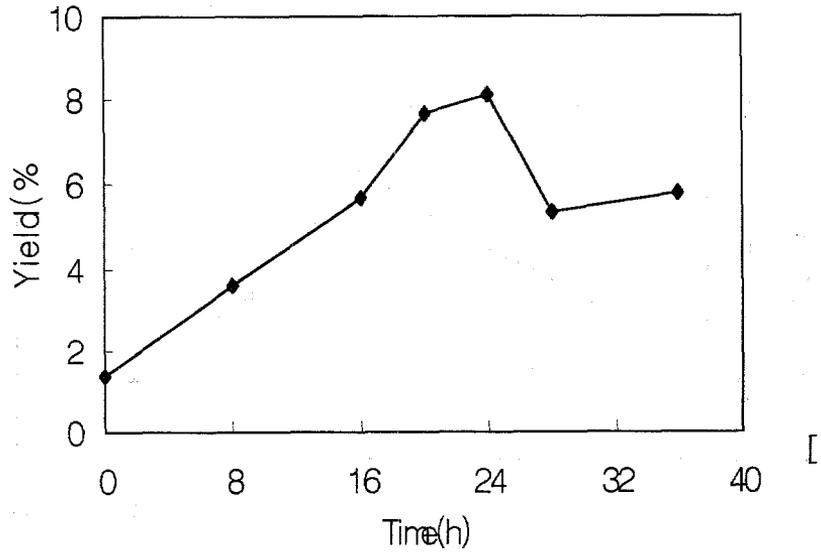


Fig. 6-2. 효소처리시 반응시간에 따른 미역의 갈킨산의 추출수율(반응조건: 30°C, pH 7).

2. pH의 영향

Fig. 6-3은 pH에 따른 갈킨산의 추출률을 측정된 결과이다. 반응시간은 24시간으로 고정시키고, 온도는 30°C에서 pH를 변화시키면서 측정된 결과, pH 7에서 가장 추출률이 높았다. 앞서 사용한 pH 7의 완충용액에서와 마찬가지로의 결과를 나타내어 효소 EPG의 최적 pH는 7.0임을 알 수 있었다. 본 실험에 사

용한 pH별 완충용액은 다음과 같다. pH 5, Acetate buffer ; pH 6, Sodium phosphate buffer ; pH 7, Potassium phosphate buffer ; pH 8, Tris buffer ; pH 9, Glycine buffer.

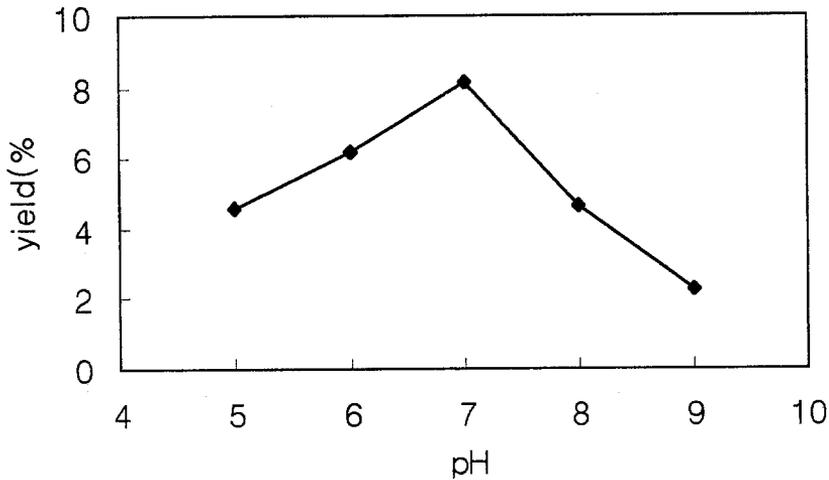


Fig. 6-3. 효소반응(반응조건: 30°C, 24hr)에 대한 pH의 영향(pH 5: Acetate buffer ; pH 6: Sodium phosphate buffer ; pH 7: Potassium phosphate buffer ; pH 8: Tris buffer ; pH 9: Glycine buffer).

3. 온도의 영향

Fig. 6-4는 반응온도에 따른 알긴산의 추출율을 측정한 결과이다. 반응시간은 24시간으로 고정시키고, pH 7에서 온도를 변화시키면서 측정한 결과, 30°C에서 가장 추출율이 높았다. 반응온도는 효소의 안정성과 기질의 안전성, 그리

고 효소의 반응속도의 인자로 작용한다.

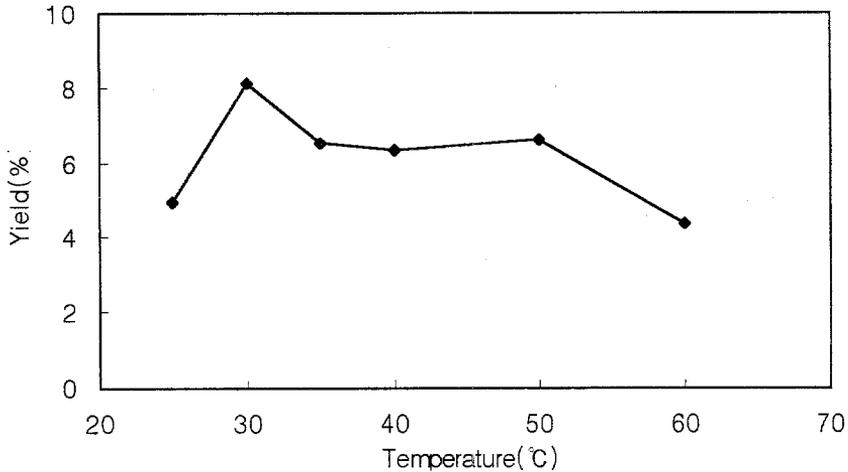


Fig. 6-4. 효소반응(반응조건: pH 7.0, 24hr)에 대한 온도의 영향.

4. 종합 고찰

Table 6-1은 추출방법에 따른 알긴산의 수율과 순도를 나타낸 것이다. 수율이 가장 높은 방법은 산-알칼리추출법으로 20.80%로 나타났다. EPG 효소처리시 최대수율은 8.14%였으며, 이 때 순도는 20.91%로 나타났다. 반면에 기존의 열수처리법에 의한 수율은 2.40%, 순도는 15.50%였다. 이것은 효소처리법과 열수처리법의 순수율은 각각 0.37%와 1.70%임을 의미하는 것이다. 효소처리시의 최대수율을 얻을 수 있는 최적조건은 pH 7.0, 반응온도 30°C, 반응시간

24시간으로 분석되었다.

한편, 미역에 함유되어 있는 알긴산의 최대함유량에 대한 추출된 알긴산의 비를 회수율로 정의한다면, 열수처리법에 의한 알긴산의 회수율은 1.68%에 불과하였으나, 효소처리시 회수율은 7.73%로 나타나 열수처리법의 4.6배나 되었다. 산-알칼리추출법의 알긴산 회수율은 22.27%였다.

Table 6-1. 추출방법에 따른 알긴산 수율 및 순도

Extraction method	Yield(%)	Purity(%)	Pure yield(%) ¹⁾	Recovery(%) ²⁾
AASA ³⁾	20.80	23.57	4.90	22.27
HWEM ⁴⁾	2.40	15.50	0.37	1.68
EPG ⁵⁾	8.14	20.91	1.70	7.73

¹⁾ Pure yield = Yield × Purity

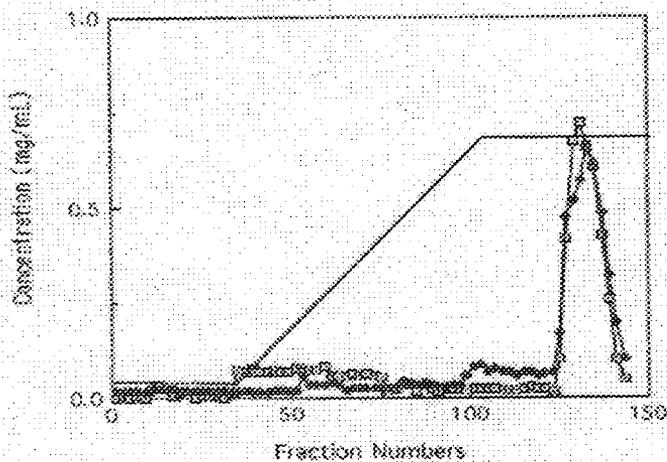
²⁾ Recovery: Ratio of the extracted amount to the maximum amount of alginic acid

³⁾ AASA: Acid-alkali Soluble Alginate

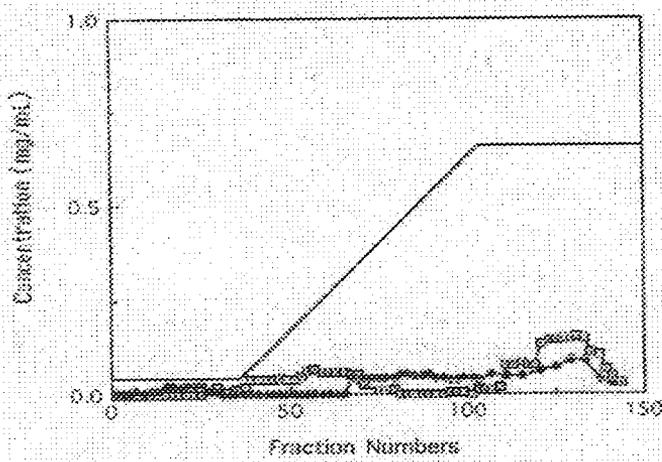
⁴⁾ HWEM: Hot-Water Extractable Material

⁵⁾ EPG: Exo-polygalacturonase

그림 6-5는 효소 및 산-알칼리에 의한 추출물의 이온교환 크로마토그래피를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 효소를 이용하여 알긴산을 추출하는 방법에서 분자량이 큰 고품질의 제품을 효과적으로 얻을 수 있음을 알 수 있다. 이러한 결과를 수율 측면과 함께 고려해 볼 때, EPG를 이용하는 방법은 미역으로부터 분자량이 큰 알긴산을 효과적으로 추출할 수 있을 뿐만 아니라 환경오염도 크게 개선할 수 있는 방법으로 기대되며, 여러 가지 전처리에 대한 연구가 계속될 경우 수율도 향상될 수 있을 것으로 기대된다.



(a) extracted by EPG



(b) extracted by acid-alkali

-♦- : AGA
 -□- : Neutral sugar

Fig. 6-5. Ion exchange chromatography of water-soluble polysaccharides obtained from seaweed.

제4절 요약 및 결론

알긴산은 알칼리 및 산-알칼리에 의해 추출되나, 화학적 방법을 이용하여 알긴산을 생산할 때 환경오염이 가장 큰 문제점으로 대두되고 있다. 최근 알긴산 추출시 높은 수율을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 환경친화적인 새로운 추출법의 개발에 관한 관심이 커지고 있다.

EPG 효소처리시 최대수율은 8.14%였으며, 이 때 순도는 20.91%로 나타났다. 이것은 효소처리법의 순수율은 1.70%임을 의미하는 것이다. 효소처리시의 최대수율을 얻을 수 있는 최적조건은 pH 7.0, 반응온도 30℃, 반응시간 24시간으로 분석되었다. 한편, 효소처리시 미역에 함유되어 있는 알긴산의 총합량에 대한 알긴산의 회수율은 7.73%로 나타났다.

제 7 장 산업화 공정 개발

제1절 서 론

식물세포벽의 수용화에 의한 다당류의 생산은 전통적으로 산처리 방법을 이용하여 생산되고 있는 바, 산처리 방법은 수율과 품질 관리 측면에서 많은 기술이 축적되어 있는 방법이다. 그러나, 산처리 방법은 무엇보다도 환경 오염을 유발하는 문제점으로 인하여 최근 새로운 환경친화적 생산기술의 개발에 대한 관심이 지대하다.

일반적으로 다당류 식품소재는 생산원료의 특징에 따라 추출공정에 차이를 두고 있을 뿐 기본적인 생산공정은 추출, 분리, 정제, 제품 표준화 등의 유사한 공정으로 이루어져 있다.

여기서는 식물세포벽의 수용화 기술 중에서 핵심 기술의 하나인 추출 과정을 기존의 산처리법을 대체하기 위하여 압출 및 효소처리에 의한 추출법을 도입하여 새로운 펙틴 제조 공정을 제시하고자 하였다.

제2절 추출 모형 개발 및 최적화

1. 기본 모형 설정

본 연구에서는 사과박으로부터 펙틴을 추출할 때, 추출 과정을 다음과 같이 2단계 과정으로 설정하여 기본 모형을 개발하였다.

1단계: 세포벽에 존재하는 불용성 펙틴이 가용성 펙틴으로 전환되는 과정

2단계: 가용성 펙틴이 저분자로 분해되는 과정

이와 같은 현상을 반응기작으로 모형화하면 다음과 같다.



여기서, [IP]: *insoluble pectin (or protopectin)*
[SP]: *soluble pectin*
[DP]: *degradation of pectin*

이 모형을 미분방정식의 수학적 모형으로 표시하면 다음과 같다.

$$\frac{d[\text{IP}]}{dt} = -k_1 [\text{IP}]$$

$$\frac{d[\text{SP}]}{dt} = k_1 [\text{IP}] - k_2 [\text{SP}]$$

$$\frac{d[\text{DP}]}{dt} = k_2 [\text{SP}]$$

여기서, k_1 : *the rate constant for the transformation of the insoluble pectin into soluble pectin*
 k_2 : *the rate constant for degradation of soluble pectin*

그리고, 물질보존의 법칙을 적용하여 다음의 식을 얻었다.

$$[\text{IP}_0] = [\text{IP}] + [\text{SP}] + [\text{DP}]$$

여기서, $[\text{IP}_0]$: *the initial concentration of insoluble pectin*

한편, 추출물의 평균분자량은 각 성분의 구성비에 의해 결정되므로 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

$$\bar{M} = \frac{\sum M_i w_i}{\sum w_i}$$

여기서, \bar{M} : average molecular weight
 M_i : molecular weight of each component
 w_i : mole fraction of each component

이와 같이 개발된 기본 모형에서 반응속도상수 k_1 , k_2 는 추출 방법과 그에 따른 추출 조건에 의해 결정되므로 다음과 같이 추출 방법별로 여러 가지 인자의 함수로 설정하였다.

2. 압출에 의한 추출 모형

본 연구에서 압출성형기를 반응조로 이용하는 물리적 추출 방법에서 주어진 screw의 configuration 하에서 반응속도상수는 실험자료를 분석한 결과에 따라 다음과 같은 인자들의 함수로 나타낼 수 있었다. 이 때 수율은 수세척한 원료 사과박 무게에 대한 백분율을 나타낸다.

$$\%Y = h_1(k_1, k_2) = f_1(E_m) = 1.80 + 0.0958E_m \quad (R^2 = 0.921)$$

$$M = h_2(k_1, k_2) = f_2(E_m) = 446200 - 2140E_m \quad (R^2 = 0.893)$$

$$\%AGA = h_3(k_1, k_2) = f_3(E_m) = 65.1 - 0.0637E_m \quad (R^2 = 0.865)$$

여기서, %Y: yield of pectin (%)

M : average molecular weight

%AGA: content of anhydrogalacturonic acid (%)

E_m : specific mechanical input energy (kWh/ton)

한편, 압출기에서 비기계에너지는 축의 회전속도(screw speed), 원료의 공급률(feed rate) 및 원료의 수분함량(moisture content)에 결정되는 바, 다음과 모형으로 나타낼 수 있었다.

$$E_m = 327.7 + 0.1276X_1 - 1.586X_2 - 6.675X_3 \quad (R^2 = 0.817)$$

여기서, E_m : specific mechanical input energy (kWh/ton)

X_1 : screw speed (rpm)

X_2 : feed rate (kg/hr)

X_3 : moisture content (%)

위와 같은 추출 모형을 이용하여 압출에 의한 펙틴을 생산하기 위한 추출 공정을 설계 또는 운전할 수 있게 된다. 추출 공정 최적화의 한 예로서, 산처리 에 의해 생산된 펙틴과 동일한 분자량을 갖는 제품을 압출을 이용하여 생산하기 위해서는 124kWh/ton의 비기계에너지를 투입하여야 하며, 이 때 13.7%의 수율을 얻을 수 있다. 이와 같은 결과를 얻기 위해서는 3개의 공정변수에 대해서 여러 가지 조합의 값을 가질 수 있으며, 스크류 속도 250rpm, 원료의 공급량 40kg/hr, 원료의 수분함량 25%의 조건이 한 예가 되는 것으로 분석되었다.

그림 7-1에서 7-6은 3개의 공정변수 즉, 원료의 수분함량, 원료의 공급률 및 스크류 속도가 펙틴의 수율, 분자량 및 AGA 함량에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 3개의 공정변수 중에서 원료의 수분함량의 영향이 가장 큰 것으로 나타났다. 원료의 수분함량이 낮을수록 수율은 크게 증가하는 것으로 나타났는데, 이러한 현상은 원료의 수분함량이 낮을수록 압출기 내에서 받는 전단력이 크기 때문이다. 따라서, 압출에 의해 펙틴을 생산하기 위해서는 이와 같은 공정변수의 영향을 고려해야 한다.

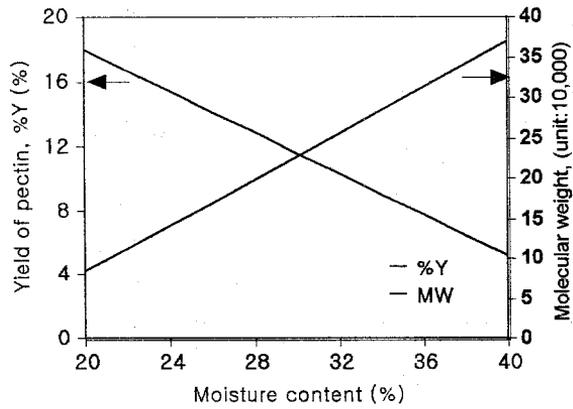


Fig. 7-1. Effect of moisture content on the yield and molecular weight of pectin at the screw speed of 300rpm and feed rate of 40kg/hr.

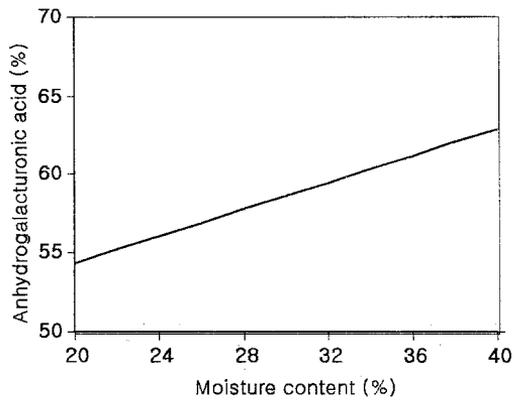


Fig. 7-2. Effect of moisture content on the AGA content of pectin at the screw speed of 300rpm and feed rate of 40kg/hr.

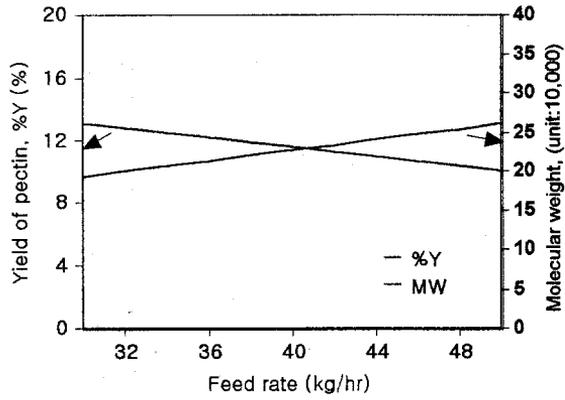


Fig. 7-3. Effect of feed rate on the yield and molecular weight of pectin at the screw speed of 300rpm and moisture content of 30%.

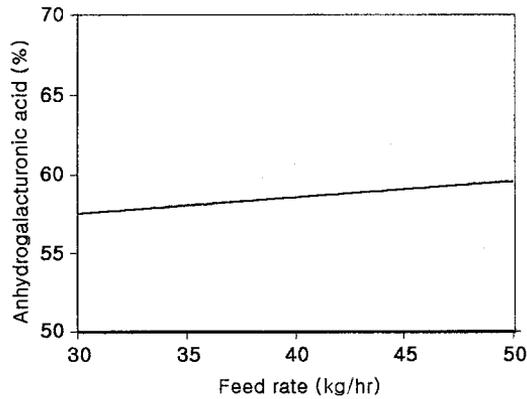


Fig. 7-4. Effect of feed rate on the AGA content of pectin at the screw speed of 300rpm and moisture content of 30%.

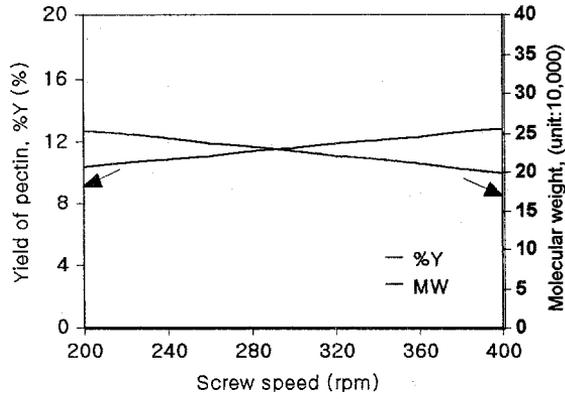


Fig. 7-5. Effect of screw speed on the yield and molecular weight of pectin at the feed rate of 40kg/hr and moisture content of 30%.

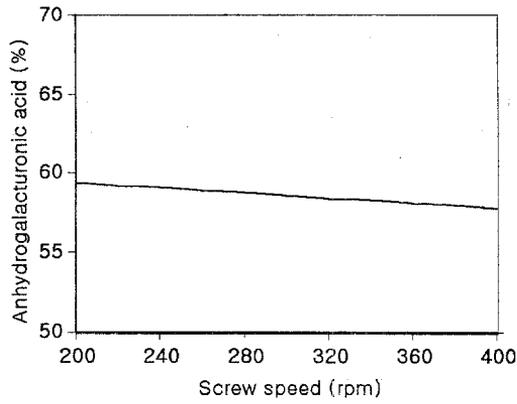


Fig. 7-6. Effect of screw speed on the AGA content of pectin at the feed rate of 40kg/hr and moisture content of 30%.

3. 효소처리에 의한 추출 모형

Exo-PG를 이용한 펙틴 추출시 최적의 반응조건은 pH 7.0, 45°C로 분석되었으며, 반응시간에 대한 펙틴의 수율과, 추출된 펙틴이 분해된 저분자 물질의 양은 다음의 모형으로 나타낼 수 있었다. 이 때 수율과 저분자 물질의 양은 불용성 펙틴(WAIP)의 무게에 대한 백분율을 나타낸다.

$$\%Y = 100 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t))$$

$$\%D = 100 \left(1 + \frac{k_2}{k_1 - k_2} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right)$$

$$k_1 = 0.0114$$

$$k_2 = 0.0243$$

여기서, %Y : *yield of pectin (%)*

%D : *degradation of the extracted pectin (%)*

k_1 : *the rate constant for the transformation of the insoluble pectin into soluble pectin (1/hr)*

k_2 : *the rate constant for degradation of soluble pectin (1/hr)*

그림 7-7은 효소처리에 의해 펙틴을 추출할 때 반응시간에 따른 수율과 저분자 물질의 생성율에 대한 예측치를 나타낸 것이다. 펙틴의 수율은 반응시간이 60hr 경과하였을 때 최대치 24.0%를 얻을 수 있으나, 펙틴이 분해되어 생성되는 저분자 물질의 생성율도 25.5%에 달해 보다 양질의 펙틴을 얻기 위해서는 반응시간을 단축해야 하는 것을 알 수 있다. 반응시간이 30hr 경과하였을 때는 펙틴의 수율은 약간 낮아져 20.1%를 얻을 수 있으나 저분자 물질의 생성율이 8.8%에 불과하여 보다 분자량이 큰 양질의 펙틴을 얻을 수 있을 것이다.

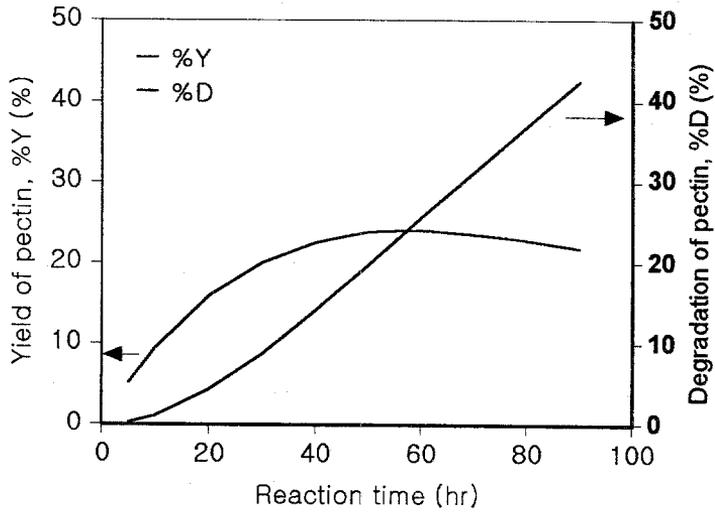


Fig. 7-7. Predicted yield and degradation of pectin.

제3절 펙틴의 제조공정 및 표준화

1. 제조 공정

추출, 분리 및 제품 표준화가 주요 단위조작인 펙틴의 제조 공정은 그림 7-8과 같으며, 각 단위조작에서 고려되어야 할 사항은 다음과 같다.

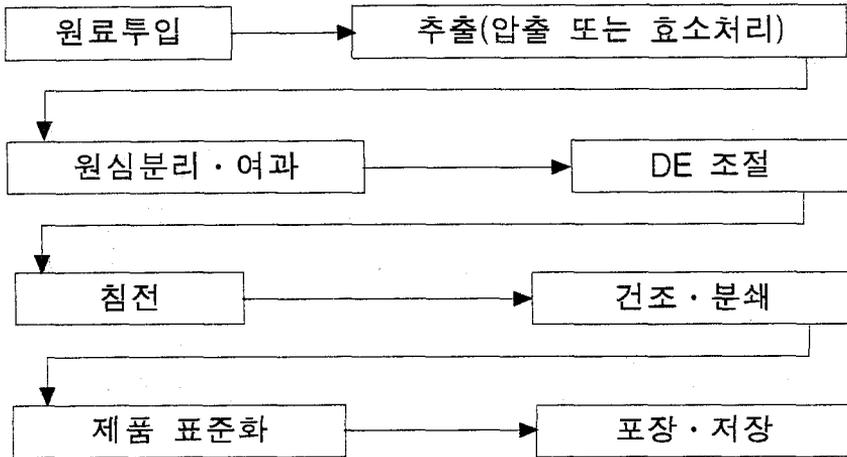


Fig. 7-8. 펙틴 제조 공정.

(1) 추출

압출 또는 효소처리에 의해 식물세포벽을 수용화할 수 있으며 운전조건은 앞에서 설명된 바와 같다. 압출에 의한 추출시 주요 공정변수는 원료의 수분함량, 원료의 공급률, 스크류 속도 등이다. 효소처리에 의한 추출시의 주요 공정변수는 완충용액의 pH, 반응온도, 반응시간 등이다.

(2) 분리

수용화된 추출액은 원심분리와 여과에 의해 불용성 물질을 제거한다. 분리, 여과된 여과액의 유색은 카본을 사용하여 제거할 수 있으며, 함유되어 있는 전분은 α -amylase를 처리하여 제거할 수 있다. 맑은 여과액은 저온하에서 감압농축한다.

(3) 에스테르화도 조절

농축된 펙틴의 제품 표준화를 위하여 에스테르화도(DE)를 조절한다. DE는 주로 산 또는 알칼리 처리에 의해, 또는 pectinesterase를 이용한 효소처리법에 의해 DE를 조절할 수 있다.

(4) 침전

펙틴 수용액으로부터 펙틴을 회수하기 위한 정제 과정으로서 알콜침전법 또는 금속침전법을 이용할 수 있다. 알콜침전법은 전단계에서 농축 과정을 거쳐 펙틴의 용액이 고농도(2~4%)일 때 효과적으로 사용될 수 있다. 알콜침전법에서 사용되는 용매로는 isopropanol, 에탄올, 메탄올 등이 있다. 펙틴 수용액이 저농도(0.3~0.5%)일 때는 금속침전법이 효과적이다. 금속침전법은 copper 또는 aluminum을 가할 경우 펙틴 분자내의 음이온에 의해 응집되어 침전물을 형성하는 원리를 이용하는 방법이다.

(5) 건조 및 마쇄

정제된 펙틴을 진공건조한 후 갈아서 분말의 펙틴을 얻을 수 있다.

2. 제품 표준화

펙틴의 표준화는 젤화 특성을 규정하는 방법으로 이루어진다. 메톡실 함량 7%를 기준으로 메톡실 함량이 7%보다 큰 펙틴을 고메톡실펙틴(high methoxyl pectin)으로, 7%보다 작은 펙틴을 저메톡실펙틴(low methoxyl

pectin)으로 분류된다.

고메톡실펙틴은 설탕과 산의 존재하에서 펙틴분자 사이의 결합을 통하여 3차원 구조의 그물구조를 형성함으로써 젤을 형성한다. 젤형성시 고형분함량, 산도, 펙틴의 메톡실함량에 의해 영향을 받는다.

저메톡실펙틴은 많은 자유카르복실기의 함유로 인하여 다가의 양이온과의 이온결합에 의하여 젤을 형성하기 때문에 산도나 고형분에 의해 영향을 크게 받지 않는다.

또한, 펙틴의 표준화를 위해 젤강도를 측정하는 방법을 사용할 수 있다. 표준 고메톡실펙틴의 젤강도는 150SAG이다. 펙틴의 젤 형성 능력은 1g의 펙틴이 pH 3.2에서 얼마만큼의 설탕과 결합하여 65%의 당 농도를 가진 일정한 경도의 젤리를 형성하느냐로 정해진다. 예를 들면, 1g의 펙틴이 위와 같은 조건을 충족시키는 젤리를 150g의 설탕과 함께 형성하였다면 이 펙틴의 등급은 150SAG이다. 일반적으로 펙틴의 등급이 높을수록 펙틴의 품질이 높다.

한편, 식품소재용으로 사용될 펙틴은 dextrose 또는 saccharose를 혼합하여 젤형성 능력을 조절할 수 있다.

제4절 요약 및 결론

압출에 의해 사과박으로부터 수용성 다당류를 추출하고자 할 때, 수율과 품질은 추출조건에 따라서 크게 달라지는 것으로 나타난 바, 공정 및 품질 관리를 위한 최적화를 효과적으로 수행하기 위하여 추출모형을 개발하였다. 비기계 에너지(SME)에 대한 수용성 다당류의 수율 및 평균분자량의 수학적 모형은 함수의 기울기가 각각 0.0958과 2140을 가지는 1차 함수형으로 표시할 수 있었으며, 이때 수율 모형의 결정계수는 0.921, 평균분자량 모형의 결정계수는 0.893으로 나타났다. 한편, 펙틴의 순도와 관련이 있는 무수갈락투론산 함량에 관한 수학적 모형은 -0.0637의 기울기를 가지는 1차 함수형으로 표시할 수 있

었으며, 모형의 결정계수는 0.865로 나타났다.

압출에 의한 추출모형은 선형함수로 나타났기 때문에 비기계에너지의 투입을 증가시킬수록 수율은 증가하나 수용성 다당류의 품질은 감소하는 것을 알 수 있다. 기존의 산처리에 의해 생산된 다당류와 동일한 분자량을 갖는 제품을 생산하기 위해서는 압출에 의한 추출시 124kWh/ton의 비기계에너지를 투입하여야 하며, 이때의 수율은 13.7%로 나타났다. 이와 같은 결과를 얻기 위한 공정변수의 값들은 공정최적화에 의해 다양한 조합으로 나타날 수 있는 바, 스크류 속도 250rpm, 원료의 공급량 40kg/hr, 원료의 수분함량 25%의 조건이 한 예가 되는 것으로 분석되었다.

exo-polygalacturonase에 의한 수용성 다당류의 추출시 최적반응조건은 pH 7, 반응온도 45°C, 효소대기질비 1/20의 조건으로 얻어졌으며, 이와 같은 조건 하에서 반응시간에 따른 추출반응의 수학적 모형은 지수함수형의 비선형모형으로 얻을 수 있었다. 효소에 의한 추출모형은 사과박의 경우 불용성의 프로토펙틴이 효소반응에 의해 수용성의 펙틴으로 추출되며, 또한 분자량이 큰 수용성의 펙틴은 다시 저분자 물질로 분해된다는 가정하에 개발되었다. 펙틴 생성을 나타내는 효소반응의 반응속도상수(k_1)는 0.0114hr^{-1} 로 나타났으며, 펙틴이 저분자 물질로 분해되는 반응의 반응속도상수(k_2)는 0.0243hr^{-1} 로 나타났다.

식물 세포벽으로부터 기능성 다당류를 생산함에 있어 기존의 산처리 방법을 대체할 수 있는 새로운 방법을 시도하였던 바, 본 연구에서는 압출에 의한 물리적 방법과 효소적 방법을 도입하여 그 효과를 분석하였다. 기존의 산처리 방법은 오래전부터 산업적으로 이용되어 온 방법으로서 경제성이 인정되는 방법임에도 불구하고 환경오염 문제로 인하여 대체 방법이 요구되고 있다. 더구나 생산설비의 규모와는 별개로 환경설비가 필수적으로 요구되고 있어 이에 대한 비용부담이 증가하는 추세에 있다.

특히, 자원의 규모가 세계규모에 비해 상대적으로 작은 우리나라의 농산물 및 농산부산물을 부가가치가 높은 자원으로 활용하기 위해서는 환경설비에 대한 부담이 거의 없는 새로운 다당류 생산방법이 모색되어야 한다.

여 백

제 8 장 종합 결론

본 연구는 저가의 생물자원으로부터 고품질의 다당류를 생산함에 있어 환경친화적인 생산기술의 개발이 요구되는 바, 사과박과 미역 세포벽의 선택적 수용화에 의한 고품질 및 고수율의 펙틴과 알긴산 생산기술을 개발하기 위하여 수행되었다.

(1) 물리적 추출법 설계

세포벽 모형에 근거하여 고온고압 조건하에서 기계적인 전단응력을 식물 세포벽에 가할 경우 수용성 다당류를 효과적으로 분리할 수 있다는 가설을 도입하였다. 압출성형기의 내부가 고온고압에 의한 반응조로서의 역할을 수행할 수 있도록 동방향완전맞물리형 이축압출성형기를 이용하여 압출성형기의 L/D(길이/직경)비가 20:1이 되도록 설치한 후, 공정변수로서 스크류 속도, 원료의 공급률 및 가수율을 제어하여 비기계에너지(specific mechanical energy)가 102~176kWh/ton인 조건하에서의 추출효과를 분석하였다.

(2) 압출에 의한 추출 수율

사과박으로부터 압출에 의해 수용성 다당류를 추출한 결과, 수율(수세척된 원료기준)은 11.9~19.8%(세척전 최초원료 기준의 수율은 5.6~9.4%)의 범위를 보였는데, 압출시의 비기계에너지가 증가할수록 수율은 향상되는 것으로 나타났다. 비기계에너지와 수율 사이의 상관관계는 0.960으로 나타났다. 압출에 의한 추출수율은 기존의 전형적인 산처리 조건(pH 1.8, 85°C)하에서의 수율 14.4%(최초원료 기준의 수율은 6.8%)에 비하면 크게 향상될 수 있는 것으로

나타났다.

미역의 경우, 압출에 의한 다당류 추출수율은 기존의 알칼리법에 의한 수율과 유사한 수준인 13.5~15.3%로 나타났다.

(3) 압출에 의한 추출물의 품질

압출에 의해 사과박으로부터 추출된 수용성 다당류의 무수갈락투론산 함량은 53.1~59.3%로 나타났으며, 비기계에너지와의 상관관계는 역상관을 보였다. 기존의 산처리에 의한 추출시 추출물의 무수갈락투론산의 함량은 50.4%로 나타났다.

수용성 다당류의 중성당 함량의 경우, 산처리의 38.3%에 비해 압출의 경우 19.1~30.7%의 범위로 나타났다. 압출시 비기계에너지의 증가에 따라서는 추출물의 중성당 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

고유점도 측정법에 의해 수용성 다당류의 분자량을 분석한 결과, 압출에 의한 추출물의 분자량은 $4.97 \times 10^4 \sim 2.41 \times 10^5$ 의 분포를 보였으며, 비기계에너지의 증가에 따라 분자량은 감소하는 것으로 나타났다. 산처리에 의한 추출물의 분자량은 1.81×10^5 로 나타났다.

이온교환크로마토그래피를 통해 압출에 의한 추출물의 분포를 분석한 결과, 압출시 비기계에너지가 증가할수록 추출물의 순도와 분자량이 감소하는 것으로 나타났다.

한편, 압출에 의해 미역으로부터 추출한 수용성 다당류의 분자량은 알칼리법에 의한 경우와 비슷한 158,000~165,500으로 나타났다.

(4) 효율적 추출법 설계

식물 세포벽은 여러 가지 세포벽 분해효소에 의해 저분자 물질로 분해된다. 는 현상을 이용하여 분해속도를 제어할 경우 유용한 고분자 물질을 추출할 수 있다는 가설을 도입하였다. 2종의 cellulase, 2종의 hemicellulase, 1종의 glucosidase, 1종의 exo-polygalacturonase를 사용하여 온도, pH, 반응시간, 원료와 효소의 농도비에 따른 수용화 효과를 분석하였다.

(5) 효소적 방법에 의한 추출 수율

cellulose 분자를 무작위적으로 가수분해하는 효소로 알려져 있는 cellulase를 이용하여 사과박의 수용성 다당류의 분획 효과를 분석한 결과, pH 5.0, 40℃의 조건하에서 기질농도(완충용액대비) 1~5%, 효소농도(기질대비) 0.03~5%, 반응시간 12~24hr의 범위에서 추출물의 수율(세척전 최초 원료기준)은 1.5~10.8%로 나타나 추출조건에 따라서 큰 차이를 보였다. cellulase에 의한 최대수율은 5%농도의 기질에 기질대비 4%의 효소를 혼합하여 24시간 추출하였을 때 나타났다.

cellulase에 의한 미역의 수용화 효과는 사과박의 경우와 유사한 추출조건하에서 1.4~3.3%의 수율을 보였다.

hemicellulase를 이용한 수용성 다당류의 추출수율을 분석한 결과, cellulase에 의한 추출효과 분석시 사용한 반응조건과 유사한 조건하에서 사과박의 경우 수율은 2.3~6.6%, 미역의 경우 0.9~3.1%로 나타났다.

glucosidase를 pH 5.5, 40℃의 조건하에서 사과박과 효소를 10:1의 비율로 혼합하여 0.5%의 용액으로 12~72hr 반응시킨 결과, 최대수율은 36시간 경과 후 8.3%로 나타났다.

폴리갈락투론산을 말단에서 순차적으로 하나씩 가수분해하는 것으로 알려진 exo-polygalacturonase(exo-PG)의 수용화 효과를 pH 3~pH 9, 반응온도 30~67℃, 반응시간 12~72hr, 효소대기질비 1/100~1/5의 조건하에서 분석한 결과,

사과박의 경우 최대수율은 pH 7, 반응온도 45℃, 반응시간 60hr, 효소대기질비 1/20의 조건에서 9.3%로 나타났다. 미역의 경우 최대수율은 pH 7, 30℃, 반응시간 24hr의 조건에서 10.6%로 나타났다.

(6) 효소적 방법에 의한 추출물의 품질

exo-PG를 이용하여 사과박으로부터 수용성 다당류를 추출하였을 때 최대수율을 얻을 수 있는 추출조건하에서 펙틴의 순도는 80.1%, 메톡실 함량은 6.36%, 평균분자량은 1.50×10^4 로 나타났다. 반면에 산처리에 의해 추출된 수용성 다당류의 펙틴의 순도는 75.7%, 메톡실 함량은 2.44%, 평균분자량은 7.66×10^4 로 나타났다.

cellulase를 이용하여 수용성 다당류를 추출하였을 때 평균분자량은 추출조건에 따라서 $0.70 \times 10^4 \sim 9.96 \times 10^4$ 의 범위를 보였으며, 최대수율을 얻을 수 있는 조건하에서 평균분자량이 3.1×10^4 로 나타났다.

한편, exo-PG를 이용하여 미역으로부터 알긴산을 추출하였을 때 순도는 20.9%로 매우 낮았다.

(7) 압출에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화

압출에 의해 사과박으로부터 수용성 다당류를 추출하고자 할 때, 수율과 품질은 추출조건에 따라서 크게 달라지는 것으로 나타난 바, 공정 및 품질 관리를 위한 최적화를 효과적으로 수행하기 위하여 추출모형을 개발하였다. 비기계 에너지(SME)에 대한 수용성 다당류의 수율 및 평균분자량의 수학적 모형은 함수의 기울기가 각각 0.0958과 2140을 가지는 1차 함수형으로 표시할 수 있었으며, 이때 수율 모형의 결정계수는 0.921, 평균분자량 모형의 결정계수는

0.893으로 나타났다. 한편, 펙틴의 순도와 관련이 있는 무수갈락투론산 함량에 관한 수학적 모형은 -0.0637 의 기울기를 가지는 1차 함수형으로 표시할 수 있었으며, 모형의 결정계수는 0.865 로 나타났다.

압출에 의한 추출모형은 선형함수로 나타났기 때문에 비기계에너지의 투입을 증가시킬수록 수율은 증가하나 수용성 다당류의 품질은 감소하는 것을 알 수 있다. 기존의 산처리에 의해 생산된 다당류와 동일한 분자량을 갖는 제품을 생산하기 위해서는 압출에 의한 추출시 124kWh/ton 의 비기계에너지를 투입하여야 하며, 이때의 수율은 13.7% 로 나타났다. 이와 같은 결과를 얻기 위한 공정변수의 값들은 공정최적화에 의해 다양한 조합으로 나타날 수 있는 바, 스크류 속도 250rpm , 원료의 공급량 40kg/hr , 원료의 수분함량 25% 의 조건이 한 예가 되는 것으로 분석되었다.

(8) 효소적 방법에 의한 추출모형 개발 및 공정 최적화

exo-polygalacturonase에 의한 수용성 다당류의 추출시 최적반응조건은 pH 7, 반응온도 45°C , 효소대기질비 $1/20$ 의 조건으로 얻어졌으며, 이와 같은 조건 하에서 반응시간에 따른 추출반응의 수학적 모형은 지수함수형의 비선형모형으로 얻을 수 있었다. 효소에 의한 추출모형은 사과박의 경우 불용성의 프로토펙틴이 효소반응에 의해 수용성의 펙틴으로 추출되며, 또한 분자량이 큰 수용성의 펙틴은 다시 저분자 물질로 분해된다는 가정하에 개발되었다. 펙틴 생성을 나타내는 효소반응의 반응속도상수(k_1)는 0.0114hr^{-1} 로 나타났으며, 펙틴이 저분자 물질로 분해되는 반응의 반응속도상수(k_2)는 0.0243hr^{-1} 로 나타났다.

(9) 공정의 종합적 평가

식물 세포벽으로부터 기능성 다당류를 생산함에 있어 기존의 산처리 방법을

대체할 수 있는 새로운 방법을 시도하였던 바, 본 연구에서는 압출에 의한 물리적 방법과 효소적 방법을 도입하여 그 효과를 분석하였다. 기존의 산처리 방법은 오래전부터 산업적으로 이용되어 온 방법으로서 경제성이 인정되는 방법임에도 불구하고 환경오염 문제로 인하여 대체 방법이 요구되고 있다. 더구나 생산설비의 규모와는 별개로 환경설비가 필수적으로 요구되고 있어 이에 대한 비용부담이 증가하는 추세에 있다.

특히, 자원의 규모가 세계규모에 비해 상대적으로 작은 우리나라의 농산물 및 농산부산물을 부가가치가 높은 자원으로 활용하기 위해서는 환경설비에 대한 부담이 거의 없는 새로운 다당류 생산방법이 모색되어야 한다.

참 고 문 헌

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.:
Molecular Biology of the Cell, Garland Pub., Inc., New York p. 225
(1983)
2. Kloareg, B., Demarty, M. and Mabeau, S.: Polyanionic characteristics of
purified sulfated homofucans from brown algae. *Int. J. Biol.*
Macromol., **8**, 380 (1986)
3. May, C.D.: Industrial pectins: sources, production and applications.
Carbohydr. Polym., **12**, 79-84 (1990)
4. Gacesa, P.: Alginates. *Carbohydr. Polym.*, **8**, 161-182 (1988)
5. 황재관, 김종태, 홍석인, 김철진: 압출성형에 의한 식물 세포벽의 수용화.
한국영양식량학회지. **23**, 358-370 (1994)
6. Fulger, C.V. and Bradbury, A.G.: Modification of bran by extrusion.
U.S. Patent 4,500,558 (1985)
7. Thibault, J.F., Valle, G.D. and Ralet, M.C.: Process for treatment of
products rich in plant cell walls, especially rich in pectins, these
pectins, the extraction residues, their utilization, and products
containing them. French Patent Application, FR 2,638,331 A1 (1990)
8. Ralet, M. C., Thibault, J. F. and Della Valle, G. : Solubilization of

- sugar-beet pulp cell wall polysaccharides by extrusion-cooking. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **24**, 107 (1991)
9. Ralet, M.C. and Thibault, J.L.: Extraction and characterization of very highly methylated pectins from lemon cell walls. *Carbohydr. Res.*, **260**, 283-296 (1994)
 10. Guillon, F, Barry, J.L. and Thibault, J.F.: Effect of autoclaving sugar-beet fibre on its physicochemical properties and its in-vitro degradation by human fecal bacteria. *J. Soc. Food Agric.*, **60**, 69-79 (1992)
 11. Panchev I., Kirchev, N. and Kratchavnov, C.: Improving pectin technology. II. Extraction using ultrasonic treatment. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 337-341 (1988)
 12. Kratchavnov, C., Panchev, I., Pavlova, E. and Shtereva, L.: Extraction of pectin from fruit materials pretreated in an electromagnetic field of super-high frequency. *Carbohydr. Polym.*, **25**, 141-144 (1994)
 13. Renard, C.M.G.C., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F. and Pilnik, W.: Comparison between enzymatically and chemically extracted pectins from apple cell walls. *Animal Feed Sci. Technol.*, **32**, 69-75 (1991)
 14. Renard, C.M.G.C., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F. and Pilnik, W.: Studies on apple protopectin. I. Extraction of insoluble pectin by chemical means. *Carbohydr. Polym.*, **15**, 9-25 (1991)

15. Renard, C.M.G.C., Searle van Leeuwen, M.J.F., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F. and Pilnik, W.: Studies on apple protopectin. II. Apple cell wall degradation by pure polysaccharides and their combinations. *Carbohydr. Polym.*, **14**, 295-314 (1991)
16. Renard, C.M.G.C., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F. and Pilnik, W.: Studies on apple protopectin. III. Characterization of the material extracted by pure polysaccharidases from apple cell walls. *Carbohydr. Polym.*, **15**, 13-32 (1991)
17. Renard, C.M.G.C., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F. and Pilnik, W.: Studies on apple protopectin. IV. Apple xyloglucans and influence of pectin extraction treatments on their solubility. *Carbohydr. Polym.*, **15**, 387-403 (1991)
18. Renard, C.M.G.C., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F. and Pilnik, W.: Studies on apple protopectin. V. Structural studies on enzymatically extracted pectins. *Carbohydr. Polym.*, **16**, 137-154 (1991)
19. Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Voragen, A.G.J., van den Broek and Pilnik, W.: Studies on apple protopectin. I. Extraction of pectins from cell walls with rhamnogalacturonase. *Carbohydr. Polym.*, **22**, 203-210 (1993)
20. 김철진, 김종태, 황재관, 홍석인, 조성자: 압출성형에 의한 저이용 식량자원의 가공공정개발. 한국식품개발연구원 보고서 E1293-0532 (1994)

21. Hwang, J.K. and Kokini, J.L.: Changes in solution properties of pectins by enzymatic hydrolysis of sidechains. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 389-395 (1995)
22. 신해현, 변유량: β -(1,4)-D-arabinogalactanse 생산균주의 분리 및 정제. 한국산업미생물학회지, (1995)
23. 신해현, 변유량: 호알카리성 *Bacillus* species HJ-12 유래 β -(1,4)-D-arabinogalactanse의 특성. 한국산업미생물학회지, (1995)
24. 박재복, 황재관, 김승호, 김종태, 조용진, 김대현, 김이식: 펙틴 제조공정 설계. 한국식품개발연구원 연구보고서. I1109-0402 (1993)
25. 황재관: 펙틴의 정제와 분석. 한국식품영양학회지. **22**, 500-509 (1993)
26. Dey, P.M. and Brinson, K.: Plant cell walls. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **42**, 265 (1986)
27. Jackman, R.L. and Stanley, D.W.: Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Tren. Food Sci. Technol.*, **6**, 187 (1995)
28. John, M.A. and Dey, P.M.: Postharvest changes in fruit cell wall. *Adv. Food Res.*, **30**, 139 (1986)
29. May, C.D.: Pectins. In *Thickening and Gelling Agents for Food*, Imeson, A.(ed.), Blackie Academic & Professional, New York, p.124-152 (1992)

30. Pszczola, D.E.: Pectin's functionality finds use in fat-replacer market. *Food Technol.*, **45**, 116 (1991)
31. Renad, C.M.G.C., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F. and Pilnik, W.: Extraction of insoluble pectin by chemical means. *Carbohydr. Polym.*, **40**, 169 (1990)
32. 최동원 : 효소에 의한 사과 세포벽 펙틴 추출. 한국식품영양학회지, **9**(4), 413 (1996)
33. 이승철, 육현균, 황용일 : 유기용매의 처리에 따른 *Bacillus subtilis* IFO 12113 유래 protopectinase의 회수. 한국농화학회지, **40**(2), 107 (1997)
34. 이승철, 고보성, 김향미, 김기운, 황용일 : Protopectinase 생산균주, *Rhizopus* sp. R2의 분리 및 감자조직의 단세포화를 위한 최적조건. 한국미생물학회지, **33**(2), 131 (1997)
35. Sakai, T. and Okushima, M.: Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 667 (1982)
36. Sakai, T. and Yoshitaka, S.: Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reessii* strain L. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1941 (1984)
37. Sakai, T., Okushima, M. and Yoshitaka, S.: Purification, crystallization

- and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1951 (1984)
38. Sakai, T., Hours, R. and Nakamura, T.: Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J. Food Sci.*, **60**, 468 (1995)
39. 이승철, 고보성, 이대회, 황용일 : Protopectinase를 이용한 식물조직의 단세포화. *한국식품영양과학회지*, **26**(3), 430 (1997)
40. Mitsui, T., Hashimoto, N., Deguchi, K., Hirano, M. and Igaue, L.: Isolation of plant mesophyll protoplasts with an endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum*. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **7**, 14 (1990)
41. Suzuki, H., Abe, T., Urade, M., Nisizawa, K. and Kuroda, A.: Nature of the macerating enzymes from *Rhizopus sp.* *J. Ferment. Technol.*, **45**, 73 (1967)
42. Sakai, T.: Protopectinase from yeast and a yeastlike fungus. *Methods in Enzymology*, **16**, 336 (1988)
43. Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G.: New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.*, **54**, 484 (1973)
44. Klavons, J. A. and Bennett, R. D.: Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 597 (1986)