

오이의 Pectinesterase 에 관한 연구

김 수 현* · 오 혜 숙 · 윤 선

연세대학교 가정대학 식생활학과

*연세대학교 교육대학원 가정교육 전공

Characteristics of Pectinesterase (PE) in Cucumbers

Kim Su Hyun*, Oh Hea Sook, Yoon Sun

Dept. of Food & Nutr., College of Home Economics Yonsei Univ.

**Dept. of Home Economics, The Graduate School of Education, Yonsei Univ.*

Abstract

This study was attempted to investigate the occurrence and the partial characteristics of pectinesterase(PE) in cucumbers. And the involvement of endogenous cucumber PE with the formation of insoluble pectic acid, in the presence of endogenous or added calcium ions, was also studied.

The results of this study are as follows:

- 1) PE activity was detected in whole cucumber homogenate.
- 2) The optimum pH and temperature of this enzyme were found to be 8.5 and 50°C, respectively.
- 3) When PE extract was added to 0.25% pectin solution, pectin gel was formed. The time required for the formation of pectin gel was reduced when the pectin solution was adjusted to the optimum conditions for PE activity(pH 8.5, 50°C) and CaCl₂ was added.
- 4) Cucumber juice which was heated to 100°C for 10 minutes failed to form any insoluble pectate precipitate. The formation of precipitate in cucumber juice was accelerated by preheating to 50°C, adjusting to pH 8.5 and addition of CaCl₂.
- 5) These results can be interpreted that endogenous PE in cucumber juice demethylates pectin, allowing interlinking of pectin molecules via divalent cation (Ca⁺⁺) and thus forming insoluble Ca-pectate. Therefore additional firming effects of cucumber can be expected to be obtained through activation of PE in conjunction with calcium ions.

서 론

서양의 오이 pickle은 칩채류의 일종으로 서구인 뿐만 아니라 한국인에게도 널리 애용되고 있는 식품으로 맛과 함께 독특한 질감이 중요한 특성으로 간주된다. 오이 pickle의 질감은 조리, 가공 과정에서 일어나는 pectin 물질의 변화와 밀접한 관계를 가지고 있다¹⁻³⁾. Pectin은 과채류의 세포막이나 세포들 사이에 존재하는 결합 물질로서 methylation되어 있는 정도에 따라 그 성상이 크게 달라진다. Fabian²⁾ 등은 연화된 오이 pickle을 현미경으로 관찰한 결과 상피 세포와 유연세포벽 사이에서 pectin질로 보이는 물질이 없어짐을 발견하고, 또한 연화과정 중 총 pectin의 함량에는 변화가 없으나 가용성 pectin량은 2배로 증가한 사실에 근거하여, 오이의 연화 원인은 pectin질의 변화에 의해 부분적으로 설명될 수 있다고 보고하였다. 이러한 연화 현상은 오이 pickle의 저장중 pectin 분해 효소를 생성하는 미생물, 특히 곰팡이류의 번식에 의해 촉진된다고 한다⁴⁾.

반면 고등 식물에 널리 존재하는 pectinesterase (PE)는 pectin의 methoxyl group을 가수분해하고, Ca⁺⁺등의 2가 양이온이 공존할 때 불용성 Ca-pectate gel을 형성함으로써 식물 조직의 질감을 단단하게 유지시킬 수 있다는 보고가 있었으며^{4,5)} 과채류의 가공시 질감이 물러지는 것을 억제시키기 위한 방법으로 예비 열처리가 효과적이라는 보고도 있었다⁶⁾. Fleming 등⁷⁾은 오이를 slice하고 77°C에서 고루 열처리를 하여 pickle을 제조하였을 때 3개월의 저장기간 후에도 질감이 단단하게 유지되었으나, 열처리를 하지 않은 오이는 심하게 연부 현상을 일으켰다고 하였다. 이는 오이에 있는 PE가 비교적 열에 안정하므로 PE를 활성화시키는 온도에서 열처리를 하면 저장기간 동안 pectin의 demethylation을 촉진하여 오이의 경도를 단단하게 유지할 수 있기 때문이라고 풀이하였다. 또한 박과 안⁸⁾등도 예비 열처리와 CaCl₂ 처리가 무우 조직의 경도에 미치는 영향을 조사한 연구에서 예비 열처리를 실시하였을 때 경도가 높아짐을 보고하였고, CaCl₂ 첨가 시에는 더욱 상승 효과를 나타냈다고 하였다.

PE는 감귤류, 토마토 그리고 사과등의 고등 식물에 존재함이 밝혀졌고, 이들로부터 PE의 추출 및 정제가 시도되었다⁹⁻¹¹⁾. 그외에 미생물, 특히 곰팡이도 PE를 생성, 분비한다고 규명된 바 있다¹²⁾. 이들 두 isoenzyme의 성상은 출처에 따라 서로 달라 고등 식물내에

있는 PE isoenzyme의 최적 pH는 7~8로 나타난 반면^{23,14)}, 곰팡이의 PE는 pH 4~5의 범위에서 최대 활성을 보였다¹⁴⁾.

본 연구에서는 오이 pickle 제조시 연부현상을 억제하고 단단한 조직을 유지시킬 수 있는 방법을 모색하고자 하는 연구의 일환으로 오이에 존재하는 PE의 최적 pH와 온도에 대해 알아보고 PE 활성화와 CaCl₂ 첨가 여부가 pectate gel의 형성에 미치는 영향을 조사 연구하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

오이는 실험 당일 경동 시장에서 pickle용으로 적당한 짧고 굵은 것으로 구입하여 사용하였다.

HMP(high methoxyl pectin)는 The Copenhagen Genu Citrus Pectin Type B rapid set 150° USA-SAG을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) PE의 추출 및 활성 측정

오이의 무게를 재고 잘게 자른 후 그 중량의 2배 (W/V)되는 2.5% NaCl 용액을 기하고 Ultra-disperser(Yamato, Model LK-21)를 이용하여 25,000rpm에서 3분간 분쇄하였다. 4겹의 cheese cloth로 여과하여 여액을 5°C에서 15,000rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 효소 추출액으로 사용하였다.

효소 추출액 중의 PE의 활성은 Kertesz¹⁵⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 이 때 기질 용액은 0.1M NaCl의 염 농도를 가진 1% pectin 용액을 사용하였고 효소의 활성은 기질 용액 40 ml에 1 ml의 효소 추출액을 가하여 5분간 일정 pH를 유지하는데 소요되는 NaOH의 양으로서 나타내었다.

2) pH 변화에 따른 PE의 활성 측정

PE활성의 최적 pH를 알아보기 위하여 기질 용액의 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0으로 각각 조절한 후 20°C로 유지시키면서 효소 추출액 1ml을 넣고 각 pH에서 PE의 활성도를 측정하였다.

3) 온도 변화에 따른 PE의 활성 측정

① 기질용액의 온도변화에 따른 PE의 활성 측정
기질용액의 pH를 8.5로 조절하여 40 ml씩 취한 후 각각의 온도를 20, 30, 40, 45, 50, 53, 55, 60, 70°C로 맞추었다. 효소 추출액은 온도를 20°C에 맞추면서 30분간 유지시킨 다음 1 ml를 취하여 기질용액에 가하고 PE

Table 1. Pectate gel 형성에 관한 실험의 pH, PE와 CaCl₂ 첨가여부 및 열처리 조건

Sample No.	pH	PE	CaCl ₂	Heat(5 min at 50°C)
1	6.0	×	×	×
2	6.0	○	×	×
3	6.0	×	○	×
4	6.0	○	○	×
5	6.0	×	×	○
6	6.0	○	×	○
7	6.0	×	○	○
8	6.0	○	○	○
9	8.5	×	×	×
10	8.5	○	×	×
11	8.5	×	○	×
12	8.5	○	○	×

○, ×: PE, CaCl₂ 첨가 및 열처리 실시 여부를 나타냄.

의 활성을 측정하였다.

② 기질 및 효소 추출액의 온도를 변화시켰을 때의 PE의 활성 측정

기질용액의 온도를 각각 30°C와 50°C로 조절하고 효소추출액의 온도를 각각 4°C, 30°C, 50°C로 맞춘 후 30분간 같은 온도를 유지시킨 다음 1 ml를 취하여 30°C와 50°C로 조절한 기질용액에 첨가하고 PE 활성도의 변화를 측정하였다.

4) 오이의 PE에 의한 pectate gel 형성에 관한 실험

0.025M NaCl을 함유하는 0.25% pectin 용액을 12개의 시험관에 10 ml씩 취하고 각각의 pH, 온도 그리고 효소 추출액과 CaCl₂ 첨가 여부를 달리하였을 때 pectate gel 형성 여부 및 속도 그리고 형성양상에 대해 조사하였다. 이때 pectin 용액의 pH는 오이 용액 자체의 pH인 6.0과 pH 변화에 따른 PE의 활성 측정 실험 결과 최적 조건으로 밝혀진 8.5로 각각 조절하였으며, 온도 조건은 실온(20°C)과 최적 온도로 나타난 50°C로 맞추었다. 효소 추출액은 PE 활성에 대한 실험에서와 동일한 방법으로 조제하여 20°C와 50°C에서 5분간 유지시킨 후 사용하였다. CaCl₂의 사용량은 용액내 최종 농도가 20 mM이 되도록 하였다. 각각의 실험 조건은 Table 1에 나타내었다.

5) 오이의 PE에 의한 오이 즙액의 침전 형성에 관한 실험

Table 2. 오이 즙액의 침전 형성 실험의 pH, CaCl₂ 첨가 여부 및 열처리 조건

Sample No.	pH	CaCl ₂	Heat(5 min at 50°C)
1 or 1*	6.0	×	○
2 or 2*	6.0	○	×
3 or 3*	6.0	×	○
4 or 4*	6.0	○	○
5 or 5*	8.5	×	×
6 or 6*	8.5	○	×
7 or 7*	8.5	×	○
8 or 8*	8.5	○	○

* 오이즙액을 100°C에서 10분간 가열한 다음 같은 조건으로 처리한 시료임.

오이 즙액은 다음과 같이 만들었다. 낫오이와 PE를 불활성화시키기 위해 끓는 물에서 10분간 열처리한 오이를 잘게 썬다. 각각의 오이의 무게의 1/2에 해당하는 증류수를 가하고 blender(Osterizer)로 liquefying 속도에서 1분간 분쇄한 후 4겹의 cheese cloth로 여과하고 다시 그 여액을 Whatman No. 1 여과지로 여과하여 찌꺼기를 제거하고 즙액을 얻었다. 두 종류의 즙액의 pH, 온도, 그리고 CaCl₂ 첨가 여부등 조건을 달리하여 침전의 형성 상태를 조사하였다. 각각의 실험 조건은 Table 2에 표시하였으며 그 결과는 1시간후의 상태를 사진으로 제시하였고 아울러 30분과 24시간후의 결과도 비교 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. pH와 온도 변화에 따른 오이 PE의 활성

오이에서 추출한 PE의 pH에 따른 활성도는 Fig. 1에 나타내었다. 여러 고등식물에서 분리한 PE와 마찬가지로 오이내의 PE의 활성은 pH 8.5에서 최대였다.

Fig. 2는 효소 추출액의 온도는 변화시키지 않고(20°C), 기질 용액의 온도를 20, 30, 40, 45, 50, 53, 55, 60, 70°C로 유지시켰을 때의 효소의 활성을 나타낸 것이다. 그 결과 50°C에서 최적 활성을 보였으며 박⁸⁾등의 실험 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 박등은 무우에 존재하는 PE의 최적 온도가 50~55°C임을 밝혀내고 무우를 55°C에서 2시간동안 열처리하였을 때 무우 조직의 경도가 증가함을 보고한 바 있다.

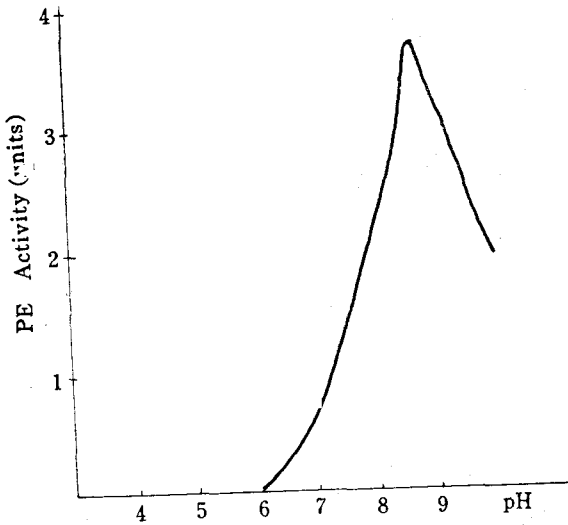


Fig. 1. pH 변화에 따른 PE의 활성도

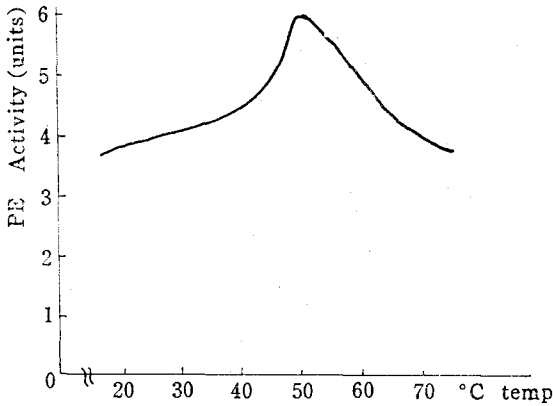


Fig. 2. 온도 변화에 따른 PE의 활성도

한편 기질 용액과 효소 추출액의 온도를 각기 달리 처리하였을 때 PE의 활성은 Table 3에 제시하였다. 그 결과 기질 용액과 효소 용액의 온도가 모두 50°C일 때 PE활성이 가장 높았으며 이는 효소 용액의 온도를 50°C로 유지시키는 동안 PE가 최대로 활성화되었기 때문으로 볼 수 있다.

2. 오이의 PE에 의한 pectate gel 형성

Pectin 용액을 pH, 온도, PE 첨가 여부 및 CaCl₂ 첨가 여부등의 조건을 달리하여 처리한 후 gel 형성 양상

Table 3. 기질 및 효소용액의 온도변화에 따른 PE의 활성도

기질 용액의 온도(°C)	효소 용액의 온도*(C°)	PE Activity (units)
30	4	5.7
30	30	6.2
30	50	6.5
50	4	6.6
50	50	8.2

※ 각 온도에서 30분간 유지시킴.

Table 4. Pectate gel의 형성 여부, gel의 형성 순서 및 외양

시료	gel 형성 여부	gel 형성 순서	의 양
1	×	×	Clear Solution
2	○	6	Semi opaque gel
3	×	×	Clear Solution
4	○	5	Opaque gel
5	×	×	Clear Solution
6	○	2	Semi opaque gel
7	×	×	Clear Solution
8	○	1	Opaque gel
9	×	×	Clear Solution
10	○	4	Semi opaque gel
11	×	×	Clear Solution
12	○	3	Opaque gel

결과를 Table 4에 요약하였다. 실험군 중 PE를 첨가하지 않은 모든 시료는 gel이 형성되지 않았고 PE를 첨가한 시료(2, 4, 6, 8, 10, 12)만이 gel을 형성하였다. 열처리의 효과를 보면 PE 존재시 실온 처리군에 비해 열처리를 해준 경우(2, 6)에 gel 형성 속도가 빨랐으며 이 현상은 열처리로써 PE의 활성이 촉진된 것이라 할 수 있다. 또한 pH를 8.5로 해준 것(10, 12)이 pH 6.0의 것(2, 4)보다 gel 형성 시간이 짧았으며 이는 PE의 최적 pH인 8.5에서 PE 작용이 왕성하기 때문으로 풀이된다. 한편 Ca⁺⁺의 효과는 gel의 형성 시간보다는 형성된 gel의 강도에 영향을 주었으며 그 결과 CaCl₂ 첨가군(4, 8, 12)이 가장 불투명한 색을 나타내어 단단한 gel이 형성됨을 알 수 있었다.

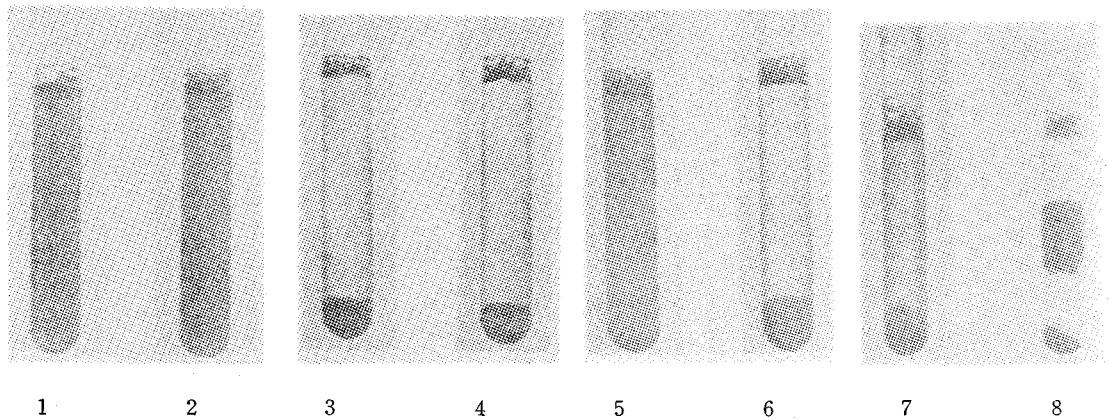


Fig. 3. pH 6.0, no-heating 및 CaCl₂ 첨가여부에 따른 오이즙액의 상태
Fig. 4. pH 6.0, heating 및 CaCl₂ 첨가여부에 따른 오이즙액의 상태
Fig. 5. pH 8.5, no-heating 및 CaCl₂ 첨가여부에 따른 오이즙액의 상태
Fig. 6. pH 8.5, heating 및 CaCl₂ 첨가여부에 따른 오이즙액의 상태

1. pH 6.0, no-heating, CaCl₂ ×
 2. pH 6.0, heating, CaCl₂ ×
 3. pH 6.0, no-heating, CaCl₂ 첨가
 4. pH 6.0, heating, CaCl₂ 첨가
 5. pH 8.5, no-heating, CaCl₂ ×
 6. pH 8.5, no-heating, CaCl₂ 첨가
 7. pH 8.5, heating, CaCl₂ ×
 8. pH 8.5, heating, CaCl₂ 첨가
 (각각 1시간 후 상태의 사진)

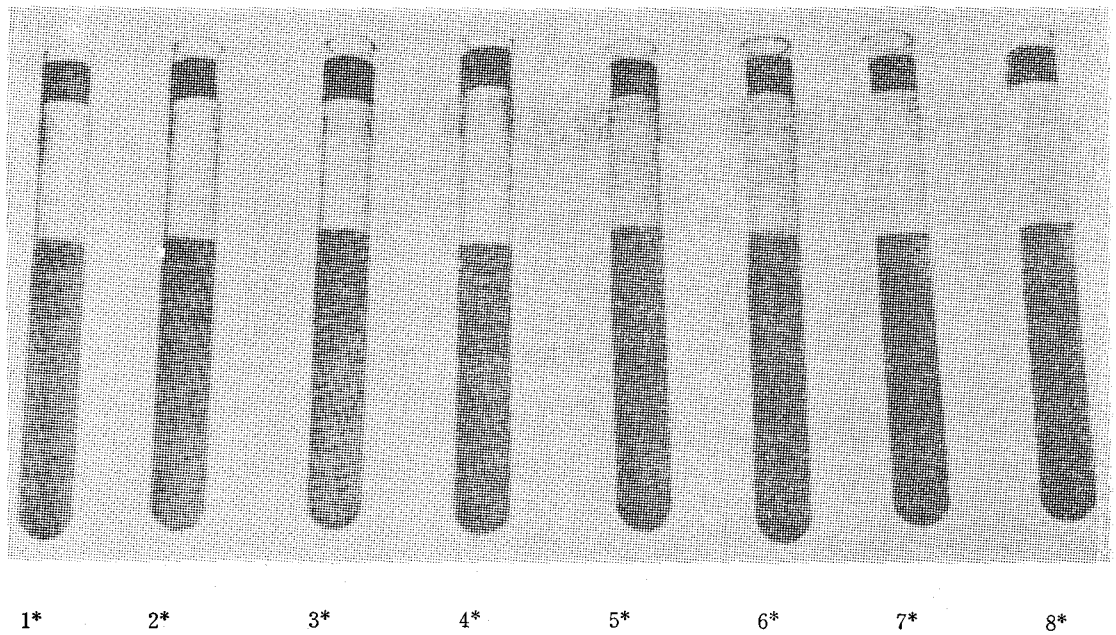


Fig. 7. 오이를 열처리(100°C, 10분)하여 PE를 불활성화시킨 후 얻은 즙액의 pH, 온도 및 CaCl₂ 첨가 여부에 따른 1시간 후의 상태. (1*~8*의 조건은 Fig. 3~6까지의 1~8과 각각 동일함)

3. 오이의 PE에 의한 오이 즙액의 침전 형성

상술한 방법으로 처리한 오이 즙액의 1시간 후의 상태를 사진으로 제시하였다. 그림 3은 PE는 존재하나 활성화시키지 않은 상태에서 Ca^{++} 의 첨가효과를 나타낸 것으로 1,2의 시료 모두 30분과 1시간 후에 침전이 생기지 않았으나 Ca^{++} 이 첨가된 2의 경우에는 24시간 경과 후에 소량의 침전이 형성되었다. Fig. 4에는 오이 즙액을 50°C로 5분간 열처리 하였을 때 PE의 활성화에 따른 침전 형성 결과를 나타낸 것이다. 즉 오이 속의 PE가 활성화되면 오이 즙액 자체내의 Ca^{++} 농도 만으로도 침전이 형성됨을 보여 주었다. 이상의 결과는 무우 김치의 연화 방지를 위해 55°C에서 2시간 예비 열처리를 실시한 박⁹⁾등의 연구 결과와 일치하는 것으로 오이 pickle이나 기타 과채류의 가공시 우선 PE를 활성화할 수 있는 조건으로 열처리를 함으로써 질감을 향상시킬 수 있으리라는 본 연구의 의도를 뒷받침해 주는 것이다. Fig. 5은 pH에 의해 PE를 활성화한 실험 결과이다. $CaCl_2$ 첨가 여부에 따라 각기 열처리의 경우보다는 서서히 작용하여 침전을 형성시켰다. $CaCl_2$ 를 가하지 않은 경우에는 열처리 경우와는 달리 1시간 경과 후까지는 침전이 생기지 않았고 훨씬 후에 형성되었다. Fig. 6은 PE를 최대로 활성화시킨 조건에서 $CaCl_2$ 첨가 효과를 본 것으로 $CaCl_2$ 첨가시 침전 형성의 속도와 양이 월등히 우수했으나, PE가 활성화된 조건에서는 따로 $CaCl_2$ 를 첨가하지 않아도 오이 즙액내의 Ca^{++} 의 농도로 빠른 시간에 충분히 침전을 생성하였다. Fig. 7에서는 끓는 물에서 10분간 처리하여 PE를 불활성화시켰을 때는 pH 및 온도, $CaCl_2$ 첨가 여부와 무관하게 30분, 1시간, 24시간 후 모두 침전이 형성되지 않았다.

이상의 결과로써 오렌지 주스나 토마토 주스등과 같은 천연 과즙 제조시에는 PE를 불활성화시켜 과즙의 혼탁도를 유지하는 것이 바람직하다⁹⁾. 그러나 과채류의 가공시 일어나는 질감의 연부 현상을 억제하기 위해서는 PE를 활성화시키기 위한 예비 열처리가 효과적임을 시사해 주고 있다. 또한 $CaCl_2$ 등 2가 양이온 존재시 불용성 pectate 형성이 더욱 촉진됨을 고려할 때 과채류에 Ca^{++} 을 침투시키는 것 또한 과채류들의 질감을 단단하게 유지시키는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

요약 및 제언

본 연구는 오이에서의 PE 존재 유무를 확인하고 PE

활성의 최적 조건인 pH와 온도를 밝혔다. 동시에 1% pectin 용액과 오이 즙액을 하나의 model system으로 보고 여기에 PE의 최적 조건을 적용하여 pectate gel의 형성 여부 및 침전 형성 여부를 조사하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 오이 PE의 최적 pH는 8.5로 나타났으며, 온도 변화에 따른 PE의 활성은 20°C~70°C에서 모두 나타났으나 50°C에서 최대치를 보였다. 또한 기질과 효소 용액의 온도가 모두 50°C일 경우에 PE의 활성이 가장 높았다.

2. Pectin 용액에 PE를 첨가하였을 때 모두 pectate gel을 형성하였으며 이 때 pH와 온도를 조절하여 PE의 최적 활성 조건으로 한 경우는 조절하지 않은 경우보다 gel 형성 속도가 빨랐다. $CaCl_2$ 첨가 효과는 gel 형성 속도보다 형성된 gel의 강도에 영향을 미치는 것으로 나타났다. Pectin 용액에 PE를 첨가하지 않았을 때는 실험 조건에 관계없이 모두 gel을 형성하지 않았다.

3. 오이 즙액을 조제하고 온도와 pH, $CaCl_2$ 첨가에 따른 침전 물질을 비교한 결과 열처리와 pH 조절시 침전 생성 속도가 빨랐으며 열처리 효과가 pH 조절 효과보다 더 컸다. 이들 실험군에 $CaCl_2$ 를 첨가할 경우 오이 즙액 자체내의 Ca^{++} 을 이용한 경우보다 침전 속도를 촉진시켰을 뿐 아니라 침전의 양도 많았다. 반면 이를 100°C에서 10분간 열처리하여 PE를 실패시켰을 때는 pH, 온도 및 Ca^{++} 의 첨가 여부에 관계없이 침전을 생성시키지 않았다.

4. 따라서 오이 pickle 제조시에 PE를 활성화시키고 Ca^{++} 을 침투시킴으로써 연화 현상을 방지할 수 있을 것으로 사료되며 이 방법을 실제로 이용할 수 있는 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 유태종 외 : 식품화학, 수학사, p.86~98, 1975.
2. Fabian, F.W., Byran, C.S. and Etchells, J.L.: Tech. Bull. Mich. State Coll. Agr. Expt. Sta., p.126, 1932.
3. R.F. McFeeters, H.P. Fleming and R.L. Thompson: Pectinesterase activity, Pectin methylation, and Teture changes during storage of blanched cucumber slices, J. Food. Sci., 50:201, 1985.
4. R.W. Buescher: J. Food Biochem, 6, 147, 1982.

5. J.L. Collins and R.C. Wiley: J. Food Sci., **32**:185, 1967.
6. O.R. Fennema: Food Chemistry 2nd ed., Marcel Dekker Inc., p.661, 1985.
7. Fleming, H.P., Thompson, R.L., Bell, T.A. and Hontz, L.H.: Controlled fermentation of sliced cucumbers, J. Food Sci., **48**:888, 1978.
8. 박관화, 안승요 외 : 예비 열처리에 의한 무우김치의 연화방지, Korean J. Food Sci. Technol., **17**:6, 1985.
9. Bella Körmer, Gideon Zimmermann and Zeki Berk: Orange Pectinesterase purification, properties and effect on cloud stability, J. Food Sci., **45**:1203, 1980.
10. Hiroki Nakaguwa, Yoshinobu Yanagawa and Hidetaro Takehana: Studies on the pectolytic enzyme part IV. Purification of tomato fruit pectinesterase, Agr. Biol. Chem., **34**:7, 991, 1970.
11. Masatoshi Manabe: Purification and properties of citrus natsudaikai pectinesterase, Agr. Biol. Chem., **37**(6):1487, 1973.
12. S. Ishii, K. Kiho et al: Low methoxyl pectin prepared by pectinesterase from *ASP. japonicus*, J. Food Sci., **44**(2):611, 1979.
13. 윤경희 : 감귤류 과피내의 PE 작용에 의한 LMP 조절 및 특성에 관한 연구, 연세대학교 대학원 석사학위 논문, 1982.
14. General Reed: Enzymes in Food Processing, Academic Press, pp.107~122, 1975.
15. Kertesz, Z.L.: Pectic enzymes, Interscience Publishes, New York, 1951.