

감(柿)과실의 연화중 효소활성, 펙틴 및 조직의 변화

신승렬[†] · 문광덕* · 이광희** · 김광수**

경산대학교 식품과학과

*한국식품개발연구원

**영남대학교 식품영양학과

Changes in the Enzyme Activities, Pectins and Structure of Persimmon Fruit during Softening

Seung-Ryeul Shin[†], Kwang-Duk Moon*, Kwang-Hee Lee** and Kwang-Soo Kim**

Dept. of Food Science, Gyungsan University, Gyungsan 712-240, Korea

*Korea Food Research Institute, Kyonggido 463-420, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate changes in the polygalacturonase and β -galactosidase activities, pectins, cell wall structure of persimmon fruit during ripening and softening. Polygalacturonase and β -galactosidase activities were not detected at turning stage. However polygalacturonase activities of mature and soft persimmon fruits were 55.01 and 206.70units/100g-fresh weight (fr. wt.), respectively. β -Galactosidase activities of mature and soft persimmon fruits were 21.79 and 380.23unit/100g-fr. wt. respectively. The contents of total and insoluble pectins increased during maturation but decreased during softening. The content of water-soluble pectin increased during maturation and softening. The intercellular space was enlarged during ripening, and middle lamella was degraded in mature persimmon fruit, and the cells of soft persimmon fruit were separated each other.

Key words : softening, polygalacturonase, β -galactosidase, pectin, persimmon

서 론

감과실은 비타민 A와 C의 함량이 많고 지혈작용과 설사를 멎게 하는 약리작용이 있어 예로부터 많이 식용되었으며 근년에 단감품종이 육종되어 생산과 소비가 증가되고 있다¹⁾. 그러나 감과실의 저장 및 유통과정 중에 일어나는 생리화학적 변화인 연화는 품질저하와 소비자의 기호성에 많은 영향을 줄 뿐만 아니라 변질과 부패를 유발하여 큰 경제적 손실을 초래한다²⁾.

연화현상은 생체내에 존재하는 세포벽분해효소의 작용에 의하여 세포벽 구성성분의 변화로 인한 물성변화를 초래함으로써 일어난다^{3,4)}. 즉, 과실의 성숙중에 세포벽분해효소인 polygalacturonase^{5,6)}, cellulase^{7,8)},

glycosidases⁹⁾, pectinmethylesterase¹⁰⁾ 등의 활성이 증가하고 이들 효소들이 세포벽을 분해함으로써 연화가 일어난다^{2,3)}. 특히 polygalacturonase는 성숙과 저장중에 활성이 증가하며 세포벽의 middle lamella의 주요 구성성분인 펙틴질을 분해하여 가용성 polyuronide를 유리시킴으로써 난용성 펙틴질이 감소한다¹¹⁾. 반면에 β -galactosidase는 펙틴의 축쇄결합을 하고 있는 galactan과 arabinogalactan을 분해하여 galactose를 유리시켜 연화를 촉진한다¹²⁾. 연화중에는 세포벽 성분인 펙틴질과 hemicellulose의 저분자화, 가용성 polyuronide 증가, galactose와 arabinose의 감소 등의 변화^{4,9)}와 세포벽 middle lamella의 붕괴¹⁰⁾가 일어남으로써 세포벽 구조의 변화를 초래하여 연화가 촉진된다.

과실에 관한 국내의 연구동향은 일반 성분, 가공 및 저장에 관한 많은 연구가 행해지고 있는 반면 연화에

[†]To whom all correspondence should be addressed

대한 연구는 매우 미진한 실정이다. 연화는 수확후의 과실의 품질과 저장성과 밀접한 관계가 있으므로 이에 대한 연구가 절실히 요구된다.

본 연구는 세포벽분해효소, 펙틴질 및 조직의 변화가 감과실의 연화에 미치는 영향을 연구 검토하고자 성숙과 저장중에 세포벽분해효소인 polygalacturonase와 β -galactosidase의 활성, 펙틴질 및 조직의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 재료는 경남 창령군에서 재배한 부유종 단감(*Diospyros kaki* L.)으로서 녹숙감(개화 105~110일, GP), 변색기의 감(개화 130~135일, TG), 완숙감(개화 155~160일, MP)과 완숙감을 25°C에서 30일간 연화시킨 연시(SP)를 사용하였다.

효소추출

효소추출은 Pressey¹¹⁾가 행한 방법에 따라 과피를 제거한 과육 200g에 증류수 400ml를 가하여 10분간 균질화하고 균질액에 1M 농도가 되게 NaCl을 가하여 3시간 추출하여 여과하였다. 여액을 황산암모늄 85% 포화 열석한 다음 18,000g로 10분간 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수 10ml에 용해하여 투석막에 넣어 0.15M NaCl 용액에서 48시간 투석하였으며 다시 20,000g로 15분간 원심분리한 상등액을 효소액으로 하였다. 모든 효소의 추출조작은 4°C에서 행하였다.

효소활성 측정

Polygalacturonase의 활성 측정은 Gross¹²⁾의 방법에 준하였다. 즉, 1% polygalacturonic acid용액 100 μ l와 증류수 50 μ l를 잘 혼합한 용액에 효소액 50 μ l를 가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 100mM borate (pH 9.0) 1ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 다음에 1% 2-cyanoacetamide용액 200 μ l를 가하여 10분간 끓인 후 냉각하여 276nm에서 흡광도를 측정하여 분해된 galacturonic acid를 정량하였다. Polygalacturonase의 활성도는 30°C에서 30분 동안 1 μ mole의 galacturonic acid를 생성하는 효소량을 1unit로 하였다.

β -Galactosidase의 활성 측정은 *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside를 분해하는 정도를 측정하여 효소의 활성으로 나타내었다¹³⁾. 즉, 기질 *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside를 2mg/ml으로 녹인 10mM 초산나

트륨 완충액(pH 4.0) 50 μ l에 0.2% BSA (bovine serum albumin)액 300 μ l와 10mM 초산나트륨 완충액(pH 4.0) 100 μ l를 잘 혼합한 후에 효소액 100 μ l를 가하여 15분간 반응시킨 다음 200mM Na₂CO₃ 2ml를 가하여 반응을 정지시켜 410nm에서 흡광도를 측정하였다. β -Galactosidase의 활성도는 30°C에서 15분간 1mmole *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside를 분해하는 효소량을 1unit로 하였다.

펙틴의 분획 및 정량

펙틴의 분획은 Ben-Arie 등¹⁴⁾이 행한 방법에 따라 알콜 불용성 물질(AIS)에 증류수를 가하여 추출한 것을 수용성 펙틴으로 하였고, 잔사에 0.5% EDTA를 가하여 추출한 것을 EDTA 용해성 펙틴으로 하였으며, 불용성 펙틴은 잔사에 잔존하는 것으로 하였다.

펙틴의 정량은 carbazole 비색법¹⁴⁾에 따라 각 시료 용액 0.5ml와 진한 황산 3ml를 잘 혼합하여 20분간 중탕가열하고 냉각시킨 후에 carbazole 시약 100 μ l를 가하여 2시간 정색시킨 다음 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 펙틴의 함량은 galacturonic acid를 사용한 표준검량선에 의해 산출하였다.

조직의 전자현미경적 관찰

조직 검정용 시료는 감과실의 외피로부터 0.5~1.5cm사이의 조직을 적당한 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde와 1% OsO₄로 이중고정하여 ethanol과 propylene oxide로 단계적으로 탈수한 다음 Epon 812수지로 포매하였다¹⁵⁾. 투과형 전자현미경(TEM)용 시료는 LKB ultramicrotome으로 초박절편을 만든 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 Hitachi H-600 전자현미경(Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 주사형 전자현미경(SEM) 관찰은 이중고정한 시료와 연시를 각각 임계점 건조한 것을 백금증착하여 ISI-SS 130 전자현미경(Hitachi, Japan)으로 행하였다.

결과 및 고찰

효소의 활성 변화

감과실의 성숙과 저장중에 연화와 밀접한 관계가 있는 세포벽분해효소인 polygalacturonase와 β -galactosidase의 활성변화를 조사한 결과는 Table 1과 같다. Polygalacturonase와 β -galactosidase의 활성은 변색기까지는 나타나지 않았으며 완숙기에 각각 55.01, 21.79unit/100g-fr. wt.이었고, 연시에서는 각각 206.70,

Table 1. Changes in the activities of polygalacturonase and β -galactosidase of persimmon fruits during ripening and storage

Stages ^a	Polygalacturonase ^b	β -Galactosidase ^c
GP	nd	nd
TP	nd	nd
MP	55.01	21.79
SP	206.70	380.23

^aGP ; green mature persimmon, TP ; turning persimmon, MP ; mature persimmon, SP ; soft persimmon

^bOne unit of polygalacturonase was defined as amount that released 1 μ mole of reducing sugar for 30min at 30 $^{\circ}$ C

^cOne unit of β -galactosidase was defined as amount that hydrolysed 1 mmole of *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside for 15 min at 30 $^{\circ}$ C

fr. wt. : fresh weight, nd : non-detected

Table 2. Changes in the contents of pectic substances in persimmon fruits during ripening and softening

Stages ^a	Pectic substances (mg/100g-fr.wt.) ^b			
	WSP	VSP	IPS	TPS
GP	171.03	61.05	242.91	474.57
TP	150.70	53.51	259.07	463.37
MP	153.45	54.90	247.91	456.26
SP	182.16	62.37	139.26	383.79

^aStage symbols are the same as in the Table 1

^bAbbreviations : WSP ; water-soluble pectin, VSP ; versene-soluble pectin, IPS ; insoluble pectic substances, TPS ; total pectic substance

380.23unit/100-fr. wt.로 완숙감에 비해 뚜렷이 증가하였다.

Huber²⁾와 Pressey 등¹⁶⁾은 과실의 성숙중에 polygalacturonase의 활성은 녹숙기까지는 나타나지 않고 익어감에 따라 증가한다고 하였으며, 또한 Hobson³⁾은 polygalacturonase의 활성 증가는 과실의 성숙중에 생합성됨과 더불어 생합성된 polygalacturonase가 세포벽 middle lamella를 분해함으로써 glycoprotein 형태로 세포벽에 결합되어 있는 비활성형 polygalacturonase가 활성형 polygalacturonase로 전환되기 때문이라고 보고하였다. Polygalacturonase는 세포벽의 middle lamella를 구성하는 펙틴질을 분해하여 저분자의 polyuronide를 유리함으로써 middle lamella를 붕괴시켜 연화를 촉진시킨다^{13,17)}.

Bartley^{18,19)}는 과실의 성숙과 저장중에 생합성되어 β -galactosidase의 활성이 증가하고 세포벽의 galactan과 arabinogalactan을 분해하여 연화를 촉진시키고, Knee²⁰⁾는 사과 성숙중에 펙틴질의 galactose와 arabi-

nose가 유리된다고 하였고, 신 등²¹⁾이 보고한 감과실의 성숙과 저장중에 galactose와 arabinose가 유리되는 것과 β -galactosidase와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

펙틴의 변화

Table 2는 감과실의 성숙과 연화중에 일어나는 펙틴의 용해성에 따라 분리 정량한 결과이다. 감과실의 총 펙틴의 함량은 신선한 감과실의 경우는 약 456~474 mg/100g-fr. wt.이었고 연시에서는 383.79mg/100g-fr. wt.으로 연화중에 현저히 감소하였다. 수용성 펙틴은 성숙중에 감소하였으나 연시에서는 182.16mg/100g-fr. wt.로 증가하였고, 불용성 펙틴은 성숙중에 약 243~259mg/100g-fr. wt.으로 뚜렷한 변화가 없었으나 연시에서는 139.26mg/100g-fr. wt.으로 현저히 감소하였다. 그리고 EDTA 용해성 펙틴은 성숙과 연화중에 뚜렷한 변화가 없었다.

과실의 펙틴은 세포벽의 middle lamella의 주요 구성성분으로서 성숙과 연화중에 펙틴분해효소에 의해 분해되어 저분자인 polyuronide로 유리되어 불용성 펙틴은 감소하고 수용성 펙틴은 증가한다는 보고^{8,22)}가 있다. 그리고 과실의 성숙과 연화중에 polygalacturonase의 활성이 증가하고 펙틴의 함량이 감소한다고 보고^{3,13)}되었으며, 또한 과실조직에 polygalacturonase를 처리하였을 때 불용성 펙틴은 감소하는 반면에 수용성 펙틴은 증가함과 동시에 middle lamella의 붕괴 현상이 나타난다고 보고^{9,17)} 하였다.

이상과 같이 본 연구에서 연시에서 polygalacturonase의 활성이 증가하고 펙틴이 감소하는 것은 감과실의 연화중에 polygalacturonase에 의해 펙틴이 분해되어 저분자인 수용성 펙틴으로 전환된 결과로 생각된다.

조직의 변화

Fig. 1은 감과실의 성숙중에 세포간극의 변화를 투과형 전자현미경으로 관찰한 결과이다. 녹숙 감과실의 간극은 pectin질이 주요 성분인 middle lamella층으로 구성되어 있었으나, 성숙함에 따라 세포간극이 형성되고 완숙 감과실에서는 middle lamella의 용해현상이 관찰되었다.

세포간극은 과실의 성숙과 세포가 비대함에 따라 물리적, 생리적 작용에 의해서 형성되고, 또한 성숙과 연화시에는 세포벽의 middle lamella의 용해현상도 일어난다. 특히 Crookes와 Grierson¹⁷⁾은 토마토가 성숙함에 따라 middle lamella의 용해현상이 일어나고, *in vitro*

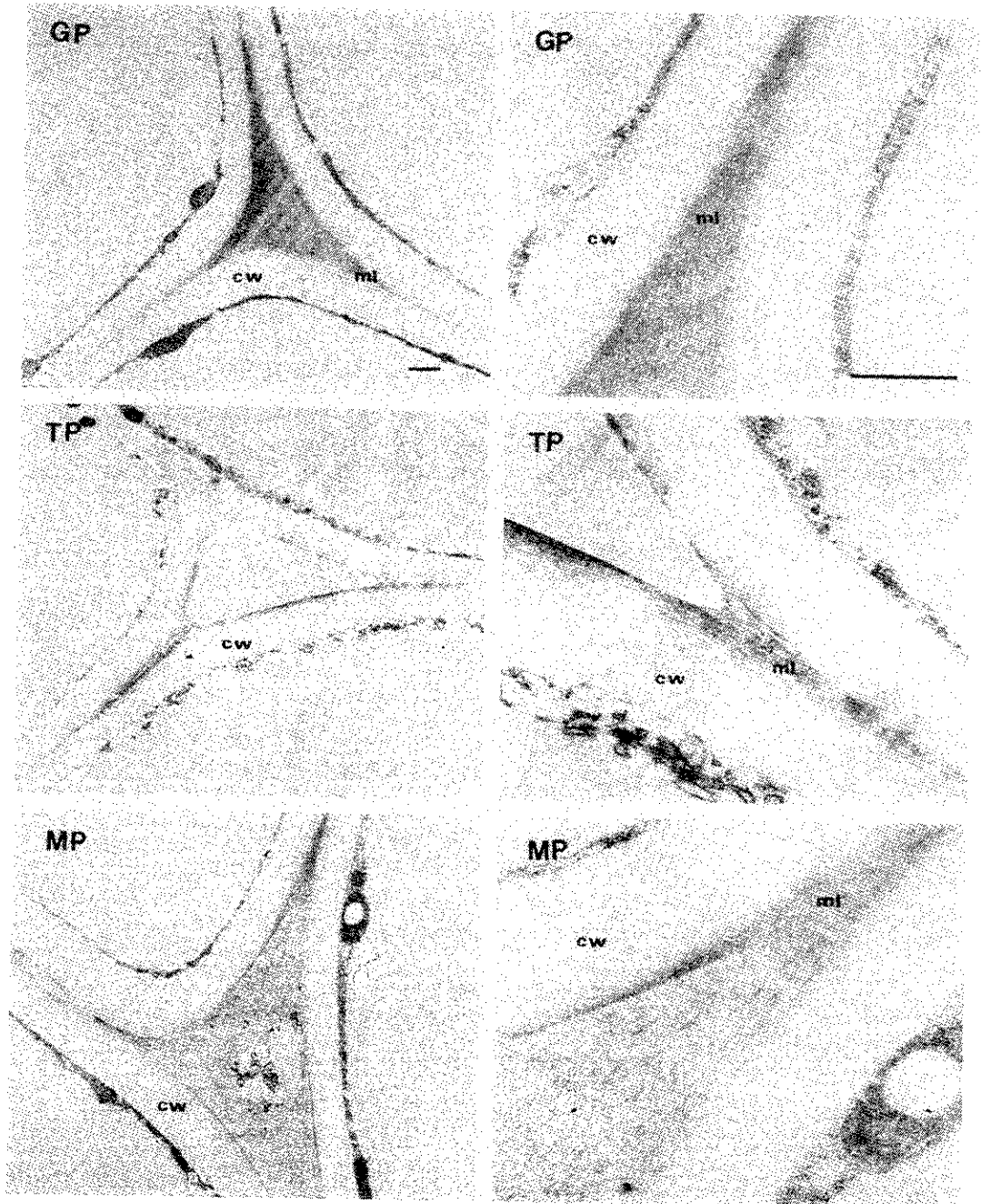


Fig. 1. Changes in the intercellular space of persimmon fruits during ripening (left; $\times 6,000$, right; $\times 20,000$).
Abbreviation : cw ; cell wall, ml ; middle lamella. bar = $1\mu\text{m}$. Stage symbols are the same as in Table 1.

에서 토마토 조직에 polygalacturonase를 처리하였을 때 middle lamella의 용해현상이 일어난다고 보고하였다.

Fig. 2는 감과실의 성숙과 연화시에 세포를 주사형

전자현미경으로 관찰한 것이다. 감과실의 성숙중에는 세포의 비대성장이 일어나고 세포간극이 발달한 것을 관찰할 수 있었고, 연시에서는 세포가 둥근형태의 세포가 분리되어 있었고 세포벽에 pectin질과 같은 점액

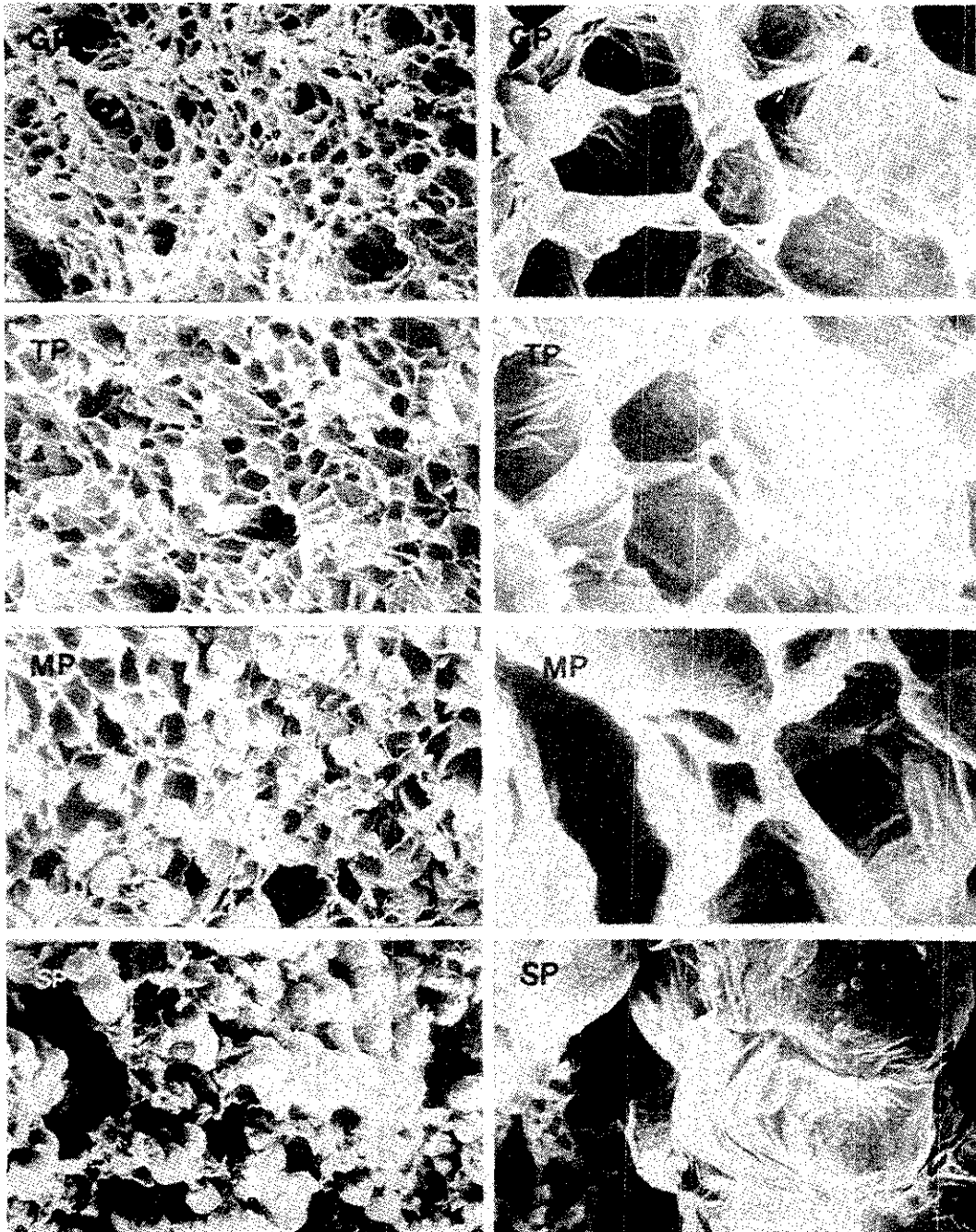


Fig. 2. Changes in the cell structure of persimmon fruits during ripening and softening(left ; $\times 50$, right ; $\times 300$). Stage symbols are the same as in Table 1.

성분이 집적되어 있었다. 이는 세포벽분해효소의 작용에 의해서 세포벽성분, 특히 pectin질이 분해되어 middle lamella의 용해현상으로 일어나는 것으로 생각된다.

과실의 성숙과 연화중에 세포벽의 성분인 펙틴질은 펙틴분해효소의 작용에 의해서 분해되어 저분자화되어 수용성 polyuronide로 유리됨으로 middle lamella의 붕괴현상이 일어난다는 보고^(10,17)가 있다. 그리고 본

연구에서도 polygalacturonase의 활성이 증가하고 난용성 펙틴질은 감소하고 수용성 펙틴질은 증가하는 것과 middle lamella의 용해현상과 세포의 분리현상이 관찰 되었다. 감과실의 연화는 polygalacturonase와 β -galactosidase 등의 세포벽분해효소의 작용에 의해서 middle lamella를 구성하는 펙틴질이 분해되어 middle lamella가 용해됨으로써 일어나는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 감과실의 성숙과 연화중에 일어나는 세포벽분해효소의 활성, 펙틴 및 조직의 변화를 조사하였다. Polygalacturonase와 β -galactosidase의 활성은 미숙과실에 없었으나 완숙 감과실에서 각각 55.1, 21.79unit/100g-fr. wt.이었고 연시에서는 각각 206.70, 380.23unit/100g-fr. wt.으로 증가하였다. 펙틴질의 변화는 총 펙틴과 불용성 펙틴은 성숙중에 증가하였으나 연시에서는 현저히 감소하였으며, 반면에 수용성 펙틴은 성숙과 연화중에 증가하였다. 감과실의 성숙중에 간극의 발달과 더불어 middle lamella의 용해현상이 일어났으며 연시에서는 세포가 분리되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단연구비(891-1508-062-2)지원에 의하여 수행된 연구의 일부이며, 한국과학재단에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- 유태종 : 식품카르테. 박명사, p.12(1976)
- Huber, D. J. : The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Reviews*, **5**, 169(1983)
- Hobson, G. E. : Enzymes and texture changes during ripening. In "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables" Friend, J. and Rhodes, M. J. C. (eds.), Academic Press, London, p.473(1980)
- Tucker, G. A. and Grierson, D. : Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening. *Planta*, **155**, 64(1982)
- Hobson, G. E. : Cellulase activity during maturation and ripening of tomato fruit. *J. Food Sci.*, **33**, 588(1978)
- Pess, G. E., Fuchs, Y. and Zauberan, G. : Cellulase activity and fruit softening in avocado. *Plant Physiol.*, **61**, 416(1978)
- Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D. : Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzymes. *J. Sci. Food Agr.*, **33**, 396(1982)
- Knee, M. and Bartely, I. M. : Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. In "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables" Friend, J. and Rhodes, M. J. C. (eds.), Academic Press, London, p.149(1980)
- Gross, K. C. and Sams, C. E. : Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening. *Phytochemistry*, **23**(11), 2257(1984)
- Ben-Arie, R., Kislev, N. and Frenkel, C. : Ultrastructural changes in the cell wall of ripening apple and pear fruits. *Plant Physiol.*, **64**, 197(1979)
- Pressey, R. : β -Galactosidase in ripening tomatoes. *Plant Physiol.*, **71**, 132(1983)
- Gross, K. C. : A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *J. Food Biochem.*, **8**, 39(1984)
- Ben-Arie, R., Sonogo, L. and Frenkel, C. : Metabolism of the pectic substances in ripening pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **104**(4), 500(1979)
- Bitter, T. and Muir, H. M. : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **1**, 361(1977)
- Luft, J. H. : Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem.*, **62**, 465(1971)
- Pressey, R., Histon, D. M. and Avants, J. K. : Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *J. Food Sci.*, **36**, 1070(1971)
- Crookes, P. R. and Grierson, D. : Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol.*, **142**, 366(1980)
- Bartley, I. M. : β -Galactosidase activity in ripening apple. *Phytochemistry*, **13**, 2107(1974)
- Bartley, I. M. : A further study of β -galactosidase activity in apple ripening in storage. *J. Exper. Bot.*, **28**, 943(1977)
- Knee, M. : Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples. *Phytochemistry*, **12**, 1543(1973)
- 신승련, 김순동, 송준희, 김광수 : 감과실의 성숙과 추숙중의 세포벽 다당류의 비섬유성 다당류의 변화. *한국식품과학회지*, **22**(7), 743(1990)
- Shewfelt, A. L., Payter, V. A. and Jen, J. J. : Textural changes and molecular characteristics of pectin constituent in ripening peaches. *J. Food Sci.*, **36**, 573(1971)

(1993년 4월 20일 접수)