



Optimization of enzyme treatment conditions for extraction of dietary fiber from *Opuntia humifusa* stem

Eun Jin Jang^{1†}, Ja Min Kim^{1†}, Kyung Young Yoon^{1*}, Seong-Ho Kim^{2*}

¹Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea

²Department of Food Engineering, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

반응표면분석법을 이용한 천년초 줄기로부터 식이섬유소 추출을 위한 효소처리 조건의 최적화

장은진^{1†} · 김자민^{1†} · 윤경영^{1*} · 김성호^{2*}

¹영남대학교 식품영양학과, ²대구대학교 식품공학과

Abstract

This study aimed to optimize the hydrolysis conditions required for extraction of dietary fiber from *Opuntia humifusa* stem using Viscozyme[®] (MilliporeSigma, St. Louis, MO, USA) with response surface methodology (RSM). A central composite design was applied to examine the effects of the independent variables, enzyme concentration (0.5-2.5%, X_1) and reaction time (1-5h, X_2). The hydrolysis conditions were optimized using total yield, total dietary fiber (TDF), water-soluble dietary fiber (SDF), and water-insoluble dietary fiber (IDF) contents of hydrolysates as dependent variables. The total yield was 39.9-53.2% and the coefficient (R^2) of the derived equation from the response surface regression for total yield was 0.9073. The TDF and SDF contents in all hydrolysates were 29.02-43.82% and 27.25-40.68%, respectively, which were within the 1% level. The IDF contents in all hydrolysates were 0.98-3.80% (R^2 0.8886) and with in 5% significance. The optimal hydrolysis conditions comprised 1.0-1.8% Viscozyme[®] and an incubation period of 1.0-1.8 h. Our results suggested that *O. humifusa* could be a source that might extend the application of dietary fiber in functional food industries.

Key words : *Opuntia humifusa*, response surface methodology, dietary fiber, enzymatic hydrolysis

서론

천년초(*Opuntia humifusa*)는 다년초 선인장과 식물로 줄기의 형태가 손바닥과 비슷하여 손바닥 선인장이라고도 불리며, 주로 전라남도 신안, 충청남도 아산, 경기도 일부 지역을 포함한 내륙지방에서 재배되고 있다. 천년초는 작은 솜털 가시를 가지고 있으며, 영하 20℃의 혹한에서도 자체의 수분을

절반으로 감소시켜 얼어 죽지 않고 생장하는 강한 생존력을 가지는 한국토종 식용 선인장이다(Shin 등, 2015; Kim 등, 2016). 천년초는 열매, 줄기, 뿌리 등 모든 부분이 식용가능하며, 특히 줄기는 연중 수확이 가능하고 열매보다 무기질 함량이 높다고 보고되고 있다(Kim 등, 2016). 또한 천년초는 폴리페놀 화합물, 식이섬유, 비타민, 칼슘, 무기질, 아미노산, 복합 다당류 등의 영양성분을 다량 함유하고 있으며, 그 중에서

*Corresponding author. E-mail : yoonky2441@ynu.ac.kr, Phone : +82-53-810-2878, Fax : +82-53-810-4666

E-mail : shkim64@daegu.ac.kr, Phone : +82-53-850-6536, Fax : +82-53-850-6539

†These authors contributed equally to this work.

Received 17 July 2020; Revised 18 September 2020; Accepted 24 September 2020.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

식이섬유 함량은 건조물 기준 줄기 및 열매에 각각 약 70% 및 45%로 다른 식물에 비해 식이섬유가 다량 함유되어 있다 (Shin 등, 2015).

식이섬유는 ‘인간의 소화효소에 의해 가수분해되지 않는 식물성 다당류와 리그닌(lignin)의 합’으로 정의되면 물리적·화학적 특징에 따라 수용성 식이섬유(soluble dietary fiber) 및 불용성 식이섬유(Insoluble dietary fiber)로 구분된다. 수용성 식이섬유는 대장 내 미생물에 의해 발효되는 식이섬유로 내당능 개선 효과와 혈청 콜레스테롤 조절 기능을 가진다. 반면, 불용성 식이섬유는 대장 내 미생물에 의해 대사되지 않는 섬유소로 분변량 증가, 분변의 장내 통과시간 촉진 및 대장암의 예방 등에 효과적인 것으로 보고된다(Ebihara와 Nakamoto, 1998; Im 등, 2016; Schneeman, 1987). 이런 특성 때문에 식이섬유를 다량 함유한 식물로부터 식이섬유 추출을 통해 기능성 소재로서 식품산업에 활용하려는 연구가 이루어지고 있다. 식물 속에 함유된 생리활성성분인 식이섬유의 추출 효율을 높이기 위한 방법으로는 용매추출법과 열수추출법 등이 있다. 용매추출은 분배에 의한 것으로 목적 성분과 용매와의 용해도 및 극성 등에 의하여 용매의 선택은 달라지며, 주로 유기용매가 추출에 사용되고 있으나 이들은 독성이 있어 잔류 용매의 안정성과 추출 후 유기용매의 환경오염에 대해 우려되는 부분이 있다(Oh 등, 2017; Shin과 Lee, 2011). 따라서 일반적으로 식물의 생리활성 물질을 추출하기 위해 열수추출법이 가장 많이 사용되고 있으나, 열수추출법 또한 에너지 소비가 많고 고온에 의한 유효성분의 파괴 등의 문제점이 있다. 이와 같은 각 추출 방법들이 가진 단점을 보완할 수 있는 다양한 추출 방법이 모색되고 있으며, 그 중에서도 효소를 이용한 추출 방법은 안정성이 높으며, 분해생성물 및 부산물이 적어 환경오염을 방지하고 비수용성의 기능성 성분을 수용성으로 전환시킴으로써 추출 효율을 증대시킬 수 있다는 장점을 가진다(Kim 등, 2007; Oh 등, 2015). 따라서 최근에는 식품으로부터 생리활성물질 추출을 위해 생물학적 방법인 효소가수분해가 주로 사용되고 있다.

반응표면분석법(response surface methodology, RSM)은 여러 개의 요인변수를 사용하여 최적조건을 찾고, 하나의 변수와 다른 변수들과의 상호작용으로 인한 반응변수를 측정하여 변수들의 최적값을 추론하는 방법이다. 일반적으로 반응표면분석은 여러 개의 종속변수와 상호작용을 평가하는 실험의 횟수를 줄이기 때문에 최소의 실험횟수로부터 최대의 정보를 얻을 수 있다는 이점이 있어 새로운 추출조건 또는 식품 개발 및 가공조건을 확립할 때 많이 이용되고 있다(Kim과 Kim, 2019; Park 등, 2017).

따라서 본 연구에서는 RSM을 이용하여 천년초 줄기로부터 생리활성물질인 식이섬유를 효율적으로 추출하기 위해 효

소를 이용하여 가수분해 조건을 최적화 하고자 하였다. 추출 조건으로 효소농도 및 반응시간을 요인변수로 선택하여 10개 추출 조건을 설정하였으며, 각 조건에 의해 추출된 추출물의 수율 및 식이섬유 함량을 측정 후 RSM을 통해 최적의 추출조건을 도출하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 천년초는 경상북도 의성지역에서 재배된 것으로 좋은 먹거리영농조합(Uiseong, Korea)을 통해 구입하였다. 천년초의 줄기를 분리한 후, 흐르는 물에 수세한 다음 물기를 제거하여 동결건조하였다. 동결건조된 시료는 믹서기(FM-681C, Hanil, Incheon, Korea)로 마쇄한 다음 100 mesh의 체로 체질하여 -20℃ 냉동고(MDF, Sanyo, Tokyo, Japan)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

일반성분 분석

천년초 줄기의 일반성분, 즉 수분은 자동측정기(FD-720, Kett, Tokyo, Japan)를, 조지방은 조지방 자동추출기(Soxtec 2050, Foss Hoganas, Sweden)를 이용하여 측정하였으며, 조회분은 직접회화법으로, 조단백질은 Kjeldahl법에 따라 micro-Kjeldahl 장치(Distillation Unit B-323, Buchi, Flawil, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 조섬유는 조섬유자동추출기(Fiber test F-6, Raypa, Barcelona, Spain)를 이용하여 측정하였으며, 탄수화물 함량은 시료 전체함량을 100%로 하고, 수분, 조단백질, 조지방, 조회분 함량(%)을 뺀 값으로 하였다.

효소분해조건 설정을 위한 실험계획

천년초 줄기의 효소분해 조건 최적화를 위해 세포빅 가수분해 효소인 Viscozyme L[®](Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)을 이용하였으며 중심합성계획법(central composite design)과 반응표면분석법(RSM)을 적용하여 실험 설계를 하였다. 동결건조된 천년초 줄기 5 g에 10배의 증류수를 첨가한 후, 최적조건(pH 4.8, 40℃)에서 효소농도(X_1)와 반응시간(X_2)을 독립변수(X_i)로 하여 효소농도(0.5-2.5%), 반응시간(1-5 h)을 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화한 후(Table 1), Table 2와 같이 13구간으로 설정하여 효소분해를 실시하였다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수(Y_n)는 총 수율(total yield, Y_1), 총식이섬유(total dietary fiber, Y_2), 수용성 식이섬유(water-soluble dietary fiber, Y_3) 및 불용성 식이섬유(water-insoluble dietary fiber, Y_4)로 설정하였고, 측정결과 값은 SAS software(SAS, version 9.4 SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 분석하였다.

Table 1. Levels of extraction conditions in experimental design

Variables	Symbols	Coded variables				
		-2	-1	0	1	2
Enzyme concentration (%)	X ₁	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Reaction time (h)	X ₂	1	2	3	4	5

Table 2. Experimental points of the central composite design and the experimental data of total yield, total dietary fiber (TDF), water-soluble dietary fiber (SDF) and water-insoluble dietary fiber (IDF) of *Opuntia hymifusa* stem under enzyme hydrolysis condition

Exp. No	Conditions		Total yield (%)	TDF content (%)	SDF content (%)	IDF content (%)
	Enzyme concentration (%)	Reaction time (h)				
1	2.0 (1) ¹⁾	4 (1)	46.88	32.01	31.02	0.98
2	2.0 (1)	2 (-1)	52.66	35.60	33.70	1.90
3	1.0 (-1)	4 (1)	40.23	29.02	27.25	1.77
4	1.0 (-1)	2 (-1)	45.38	42.69	40.68	2.01
5	1.5 (0)	3 (0)	44.57	33.86	32.70	1.16
6	1.5 (0)	3 (0)	44.80	33.74	32.40	1.34
7	1.5 (0)	3 (0)	44.52	33.79	32.49	1.30
8	1.5 (0)	3 (0)	44.63	33.77	32.40	1.37
9	1.5 (0)	3 (0)	44.90	33.63	32.32	1.31
10	2.5 (2)	3 (0)	53.24	30.20	28.77	1.43
11	0.5 (-2)	3 (0)	39.94	36.97	35.90	1.07
12	1.5 (0)	5 (2)	43.29	31.98	29.87	1.11
13	1.5 (0)	1 (-2)	45.38	43.82	40.02	3.80

¹⁾Coded value.

수율 측정

수율은 효소분해에 사용된 시료량에 대한 효소 가수분해 후 동결건조하여 얻은 추출물의 비를 백분율(%)로 나타내었다.

식이섬유 함량 측정

천년초 가수분해물의 식이섬유 함량 측정을 위해 10가지 중심합성계획의 효소분해 조건에서 가수분해한 가수분해물을 환류냉각장치를 이용하여 95℃에서 2시간 동안 추출한 후 추출액을 여과한 다음 얻은 여과액을 동결건조하여 분석 시료로 사용하였다. 식이섬유 함량 측정을 위해 시료 0.1 g에 증류수 50 mL를 첨가하고, 0.1 N NaOH로 pH를 6.0으로 조정 후 α-amylase 0.1 mL를 가하여 100℃에서 30분간 가열하였다. 가열 후 온도를 60℃로 낮춘 다음 0.1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.5로 조정 후 protease 5 µg를 가하여 60℃에

서 30분간 반응하였다. 다시 여기에 0.1 N HCl을 첨가하여 pH를 4.5로 조정 후 amyloglucosidase 0.1 mL를 첨가하여 60℃에서 30분간 반응한 후 방냉하여 식이섬유 함량 측정을 위한 효소반응액 시료로 사용하였다. 한편, 유리여과기에 celite 1 g을 첨가하여 105℃에서 하룻밤 건조시켜 항량을 구한 후 측정에 사용하였다.

총식이섬유함량을 측정하기 위해 효소 반응액에 60℃로 가열해 둔 95% 에탄올 200 mL를 가하여 실온에서 1시간 방치하여 침전물이 형성되도록 하였다. 그 후 항량을 구해놓은 유리여과기에 78% 에탄올을 첨가하여 가라앉힌 후 반응액을 여과시키고, 78% 에탄올, 95% 에탄올, 아세톤 순으로 각각 10 mL씩 2회 세척하였다. 침전물이 들어있는 유리여과기는 105℃에서 건조시키고 1시간 방냉하여 항량을 구하였다.

수용성 식이섬유의 함량을 측정하기 위해 유리여과기에

첨가된 celite를 78% 에탄올로 가라앉힌 후 반응액을 여과시키고 70℃로 가열해 둔 증류수 10 mL로 2회 세척한 후 여과액과 세척액에 증류수를 첨가하여 전체 부피를 100 mL로 맞추었다. 미리 60℃로 맞추어 둔 95% 에탄올 400 mL를 첨가한 다음 실온에서 1시간 방치하여 침전물이 형성되도록 하였다. 유리여과기의 celite를 78% 에탄올로 가라앉힌 후 검액을 여과시키고 78% 에탄올, 95% 에탄올 및 아세톤 순으로 각각 10 mL씩 2회 세척하였으며, 유리여과기는 105℃에서 미리 항량을 측정하여 총식이섬유(total dietary fiber, TDF), 수용성 식이섬유(water-soluble dietary fiber, SDF) 및 불용성 식이섬유(water-insoluble dietary fiber, IDF) 함량을 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{TDF}(\%) = [\text{Weight of residue (mg)} - \text{weight of protein in residue (mg)} - \text{weight of ash in residue (mg)} - \text{blank}] / \text{weight of sample (mg)} \times 100$$

$$\text{SDF}(\%) = [\text{Weight of residue (mg)} - \text{weight of protein in residue (mg)} - \text{weight of ash in residue (mg)} - \text{blank}] / \text{weight of sample (mg)} \times 100$$

$$\text{IDF}(\%) = \text{TDF}(\%) - \text{SDF}(\%)$$

최적 효소분해조건 예측

천년초 줄기 식이섬유의 최적의 효소분해조건 예측은 총 수율, 총식이섬유, 수용성 식이섬유, 불용성 식이섬유 함량의 반응표면을 superimposing하여 서로 중복되는 범위에서 최적 분해조건을 설정하였다. 또한, 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적조건으로 예측하고, 각 회귀식에 대입하여 예측 값을 설정하였다.

결과 및 고찰

영양성분

동결건조된 천년초 줄기의 일반성분을 분석하였으며, 그 결과는 Table 3과 같다. 천년초의 수분함량은 2.69%이었으며, 조단백질 함량은 18.80%, 조지방 함량은 0.66%, 조회분 함량은 8.19%, 탄수화물의 함량은 69.66%이었다. Kim 등(2016)은 수확시기별 천년초 줄기의 일반성분을 측정된 결과, 봄에 수확된 여주의 수분, 조단백질, 조회분, 조지방 및 탄수화물 함량이 각각 0.40%, 6.54%, 8.89%, 1.57% 및 82.64%로 보고하여, 본 연구결과에 비해 낮은 단백질 함량 및 높은 탄수화물 함량을 나타내었다. 또한, Yoon 등(2009)은 천년초 선인장 줄기의 일반성분을 분석한 결과, 수분이

Table 3. Proximate composition of *Opuntia humifusa* stem

Composition	<i>Opuntia humifusa</i> stem (% dry weight)
Moisture	2.69±0.14 ¹⁾
Crude protein	18.80±5.70
Crude fat	0.66±0.21
Crude ash	8.19±0.35
Carbohydrate	69.66±5.72
Dietary fiber	58.82±1.32

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

87.23%이었으며, 조회분, 조단백질, 조지방 및 조섬유의 함량이 각각 2.17%, 1.61%, 0.52% 및 1.02%로 수분을 제외한 조회분의 함량이 가장 높게 측정되어, 본 연구결과와 차이를 나타내었다. 이와 같이 천년초 줄기의 일반성분 함량 차이는 천년초의 품종 및 재배지의 차이에 기인한 것으로 판단된다. 본 연구에서 천년초 줄기의 식이섬유 함량은 58.82%로 탄수화물의 약 85%를 구성하는 것으로 나타났다. Hwang 등(1996)의 채소, 버섯, 과일 및 해조류 식품의 식이섬유 함량을 측정한 연구에서는 배추 26.28% dry weight, 양배추 21.40% dry weight, 알로에 41.56% dry weight, 표고버섯 48.78% dry weight, 사과 11% dry weight, 바나나 7.51% dry weight, 생미역 39.25% dry weight, 생다시마 56.74% dry weight로 보고하여, 본 연구에 사용된 천년초 줄기의 식이섬유 함량이 다소 높은 수준으로 확인되었다. 따라서 천년초 줄기의 높은 식이섬유 함량으로 기능성 탄수화물소재로 이용가치가 높을 것으로 판단된다.

효소분해조건이 수율에 미치는 영향

Viscozyme[®]은 cellulase, β-glucosidase, xylanase의 활성을 지니고 있어 식물 세포벽에 단단히 결합되어 있는 다당류인 cellulose, hemicellulose, β-1,4-glucan 등의 물질들을 가수분해함으로써 식이섬유를 비롯한 가용성 기능성 성분의 추출을 용이하게 한다(Oh 등, 2015). 따라서 천년초 줄기의 식이섬유 추출을 위한 최적의 효소분해조건 설정을 위하여 효소농도 및 반응 시간에 대한 중심합성계획을 실시하였다.

천년초 줄기를 중심합성계획에 의해 설계된 13구간의 효소분해조건에 따라 효소가수분해하여 얻은 시료의 수율을 측정하였으며, 결과는 Table 2와 같다. 효소농도 및 반응시간에 따라 39.94-53.24% 범위의 수율을 나타내었으며, 효소농도가 높아짐에 따라 수율도 증가하는 경향을 보였다. 이는 천년초 세포벽 성분이 Viscozyme[®]에 의해 가수분해되어 arabinose, glucose, galactose, xylose 등을 포함한 다당류, 다양한 올리

고당 및 가용성 다당류가 생성되어 수율이 증가한 것으로 판단된다(Yoon 등, 2006). 간장 제조 시 남은 부산물로부터 식이섬유소를 추출하고 수율을 측정된 결과, 최대 추출효율은 37.21%로, 본 연구의 추출 효율에 비해 낮게 나타나(Lin 등, 2014), 효소분해가 식이섬유소 추출방법임을 알 수 있었다. 효소적 분해와 압출 병행방법을 이용하여 쌀겨로부터 식이섬유소를 추출한 결과, 2%의 효소첨가 후 75℃에서 90분간 분해 후 얻은 식이섬유소의 추출율은 30.3%로 보고되었다(Wang 등, 2015). 또한, 메밀껍질로부터 효소분해에 의해 얻

은 수용성 식이섬유소의 추출율은 12.98%로 나타나(Im 등, 2016), 본 연구에서 얻은 식이섬유소의 추출 수율이 매우 높음을 확인하였다. 수율의 결과를 이용하여 반응표면회귀분석을 이용하여 반응표면 회귀식을 얻었으며(Table 4), 수율에 대한 회귀식의 R²은 0.9073이고 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 천년초 줄기의 분해조건에 따른 수율의 다항식을 바탕으로 3차원 반응표면그래프를 확인하였으며, 결과는 Fig. 1A와 같다. 효소농도 0.5%, 1.5% 및 2.5%일 때 수율은 각각 39.94%, 44.57-44.90% 및 53.24%로 효소농도

Table 4. Polynomial equations of *Opuntia humifusa* stem by enzyme hydrolysis condition

Response ¹⁾	The second order polynomial	R ²	Significance
Total yield	$Y = 39.544286 + 3.025357X_1 + 0.258512X_2 + 1.558214X_1^2 - 0.315000X_1X_2 - 0.174196X_2^2$	0.9073	0.0342
TDF content	$Y = 79.125714 - 17.270357X_1 - 16.466012X_2 - 0.263214X_1^2 + 5.040000X_1X_2 + 0.887946X_2^2$	0.9801	0.0017
SDF content	$Y = 78.492857 - 18.548095X_1 - 16.600714X_2 - 0.162857X_1^2 + 5.375000X_1X_2 + 0.861786X_2^2$	0.9751	0.0026
IDF content	$Y = 4.030000 + 1.087500X_1 - 1.793750X_2 - 0.032500X_1^2 - 0.340000X_1X_2 + 0.293125X_2^2$	0.8886	0.0483

X₁, enzyme concentration; X₂, reaction time.

¹⁾TDF, total dietary fiber; SDF, water-soluble dietary fiber; IDF, water-insoluble dietary fiber.

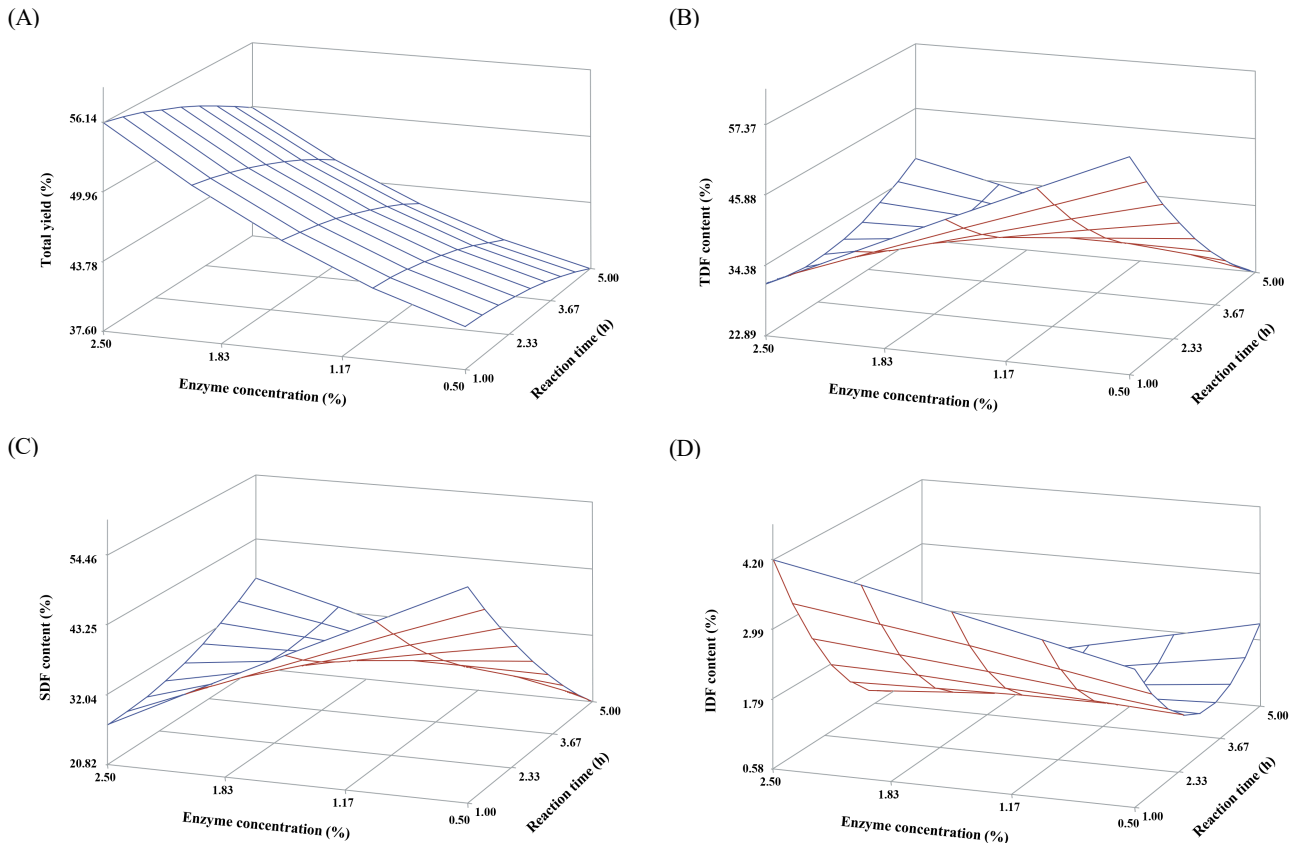


Fig. 1. Response surface for total yield (A), total dietary fiber (TDF) content (B), water-soluble dietary fiber (SDF) content (C) and water-insoluble dietary fiber IDF content (D) of *Opuntia humifusa* stem by enzyme concentration and reaction time.

가 높을수록 수율도 증가하였으며, 반응시간에 따른 수율의 함량 변화는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 천년초 줄기의 효소 분해물의 수율에 따른 예측된 정상점은 saddle point 형태로 나타났으며, 효소분해 조건을 고려하여 능선분석 결과에서 효소농도 2.46%, 반응시간 2.47시간일 때 최대값 54.12%로 예측되었으며(Table 5), 천년초 줄기 효소분해물 수율의 분해조건에 대한 영향은 반응시간보다 효소농도에 많은 영향을 받음을 확인하였다(Table 6).

효소분해 조건이 총식이섬유 함량에 미치는 영향

중심합성계획에 의한 천년초 줄기의 효소분해 조건별 총식이섬유 함량은 Table 2와 같이 29.02-43.82% 범위의 값을 나타내었다. 효소농도 1%, 반응시간 4시간에서 29.02%로 가장 낮은 총식이섬유 함량을 나타내었고, 효소농도 1.5%, 반응시간 1시간에서 43.82%로 가장 높은 총식이섬유 함량을 나타내었다. 가수분해 조건에 있어 효소농도 및 반응시간에 따른 총식이섬유 함량 변화에 대한 반응표면 회귀식은 Table 4와 같으며, 총식이섬유 함량에 대한 회귀식의 R^2 은 0.9801로 높은 신뢰도를 보였으며, 1% 이내의 유의성을 보였다. 천년초 줄기 효소분해 조건에 따른 총식이섬유 함량에 대한 반응표면은 Fig. 1B와 같다. 효소농도 1.5%까지는 총식이섬유 함량이 증가하다가 그 이후에는 다시 감소하는 경향을 보였다. 또한 1시간 반응 후 총식이섬유 함량이 최고점을 보이다가 그 이후로는 감소하는 경향을 나타내었다. 천년초 줄기의 효소분해 결과에 대한 능선분석 결과는 Table 5에서와 같이 예측된 정상점은 saddle point로 나타났으며, 최대값은 효소농도 0.98%, 반응시간 1.29시간 일 때 48.54%로 예측되었다. 천년초 줄기의 효소분해 시 조건변수인 효소농도와 반응시간에 대한 총식이섬유 함량에 미치는 영향을 알아본 결과(Table 6), 효소농도보다 반응시간에 대해 더 많은 영향을 받음을 알

Table 6. Regression analysis of *Opuntia humifusa* stem by hydrolysis conditions

Response ¹⁾	F-Ratio	
	Enzyme concentration	Reaction time
Total yield	11.27 ^{*2)}	1.58
TDF content	15.12 [*]	56.53 ^{***}
SDF content	8.49 [*]	22.68 ^{**}
IDF content	0.23	9.72 [*]

¹⁾TDF, total dietary fiber; SDF, water-soluble dietary fiber; IDF, water-insoluble dietary fiber.

²⁾* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

수 있었다. Im 등(2016)은 메틸겉질로부터 Celluclast[®]와 Viscozyme[®]을 이용하여 생산된 식이섬유의 총 수율은 효소농도보다는 반응시간에 더 영향을 받았다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다.

효소분해 조건이 수용성 식이섬유 함량에 미치는 영향

천년초 줄기를 조건별로 효소분해하여 수용성 식이섬유 함량을 측정하였으며, 결과는 Table 2와 같다. 수용성 식이섬유 함량은 분해조건에 따른 차이를 보였고, 효소농도 1%, 반응시간 2시간에서 40.68%로 최고함량을 보였으며, 효소농도 1%, 반응시간 4시간에서 27.25%로 최소함량을 보였다. 천년초 줄기 효소분해 조건별 수용성 식이섬유 함량 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R^2 은 0.9751로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. 효소분해 조건에 따른 천년초 줄기의 수용성 식이섬유 함량 변화에 대한 반응표면은 총식이섬유 함량의 변화와 유사한 경향이 나타났다(Fig. 1C). 즉, 수용성 식이섬유 함량은 효소농도와 반응시간에 영향을 받으며, 효소농도 1.5%까

Table 5. Predicted levels of optimum hydrolysis condition for the maximum responses by ridge analysis total yield on total dietary fiber (TDF), water-soluble dietary fiber (SDF) and water-insoluble dietary fiber (IDF) content of *Opuntia humifusa* stem

Response	Response	Enzyme concentration (%)	Reaction time (h)	Result (%)	Morphology
Total yield	Max	2.46	2.47	54.12	Saddle point
	Min	0.69	4.18	39.51	
TDF content	Max	0.98	1.29	48.54	Saddle point
	Min	0.91	4.61	27.28	
SDF content	Max	0.96	1.32	46.97	Saddle point
	Min	0.90	4.59	25.79	
IDF content	Max	1.68	1.03	3.64	Saddle point
	Min	2.32	4.13	0.71	

지 증가하다가 그 이후 감소하였으며 반응시간 1시간에서 최고함량을 보이다가 이후로 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 국내산 주요 해조류(미역, 다시마, 툇, 파래 및 우뚝가사리)로부터 수용성 식이섬유소를 추출하기 위하여 Viscozyme®을 이용하여 효소분해한 결과, 효소농도가 증가할수록 수용성 식이섬유소의 추출 수율이 증가하였으며, 1% 첨가하여 1시간 추출 시 가장 높은 수율(3.11-13.81%)을 나타내었다(Do 등, 1997). 수용성 식이섬유 함량에 대해 효소분해 조건을 고려하여 능선분석을 통해 최대조건 및 최소조건과 그 값을 예측한 결과, Table 5와 같이 효소농도 0.96%, 반응시간 1.32시간일 때 최대값 46.97%를 나타내었다. 효소농도 및 반응시간에 대한 수용성 식이섬유의 F-ratio는 각각 8.49 및 22.68로 확인되어 효소농도보다 반응시간에 대해 더 높은 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 6). 효소 분해를 이용하여 배추부산물로부터 수용성 식이섬유소를 생산한 Park과 Yoon(2015)의 연구에 따르면 가수분해 시 분해시간이 증가할수록 수용성 식이섬유의 수율이 증가하였다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다. 이는 식물세포벽 복합분해효소인 Viscozyme®은 식물의 세포벽에 존재하는 불용성의 고분자물질들을 저분자화하여 수용성으로 가용화함으로써 효소분해물의 수용성 식이섬유 수율이 효소농도에 비례하여 증가하는 것으로 판단된다(Im 등, 2016; Lee 등, 2014).

효소분해 조건이 불용성 식이섬유 함량에 미치는 영향

일반적으로 불용성 식이섬유에는 cellulose, lignin 및 hemicellulose 등이 포함되며, 이들은 장의 연동 운동을 촉진시키며, 분변의 부피를 증가시킨다. 뿐만 아니라 소화 과정에서 중금속 및 기타 독성 물질의 흡착을 빠르게 제거하는 등 소화과정에서 중요한 작용을 한다(Hua 등, 2019; Makki 등, 2018). 중심합성계획에 의한 천연초 줄기 효소분해 조건별 불용성 식이섬유 함량을 분석하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 효소농도 및 반응시간에 따라 0.98-3.80% 범위의 불용성 식이섬유 함량으로 나타났고, 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 6과 같다. 불용성 식이섬유 함량에 대한 회귀식의 R^2 값은 0.886으로 5% 이내의 유의성이 인정되었다. 천연초 줄기의 불용성 식이섬유 함량에 대한 분해조건별 반응표면의 변화는 Fig. 1D에 나타내었으며, 그 결과 효소농도 및 반응시간에 따른 불용성 식이섬유 함량은 큰 차이가 없었다. 효소농도 및 반응시간에 따른 불용성 식이섬유 함량 결과에 대한 예측된 정상점은 saddle point로 확인되었으며, 최대값은 효소농도 1.68%, 반응시간 1.03시간에서 불용성 식이섬유 함량은 3.64%로 예측되었으며(Table 5), 효소농도보다 반응시간에 많은 영향을 받음을 확인할 수 있었다(Table 6).

최적 효소분해조건 예측

Viscozyme®을 이용한 천연초 줄기의 효소분해에서 수율, 총식이섬유, 수용성 식이섬유 및 불용성 식이섬유가 높은 효소분해조건을 설정하기 위하여 각 항목의 반응표면을 superimposing하여 Fig. 2에 제시하였다. 각 항목의 최적 분해조건으로 도출된 최대 또는 최적값의 반응표면을 한 도면에 합한 결과, 수율, 총식이섬유 함량, 수용성 식이섬유 함량 및 불용성 식이섬유 함량 4항목의 최대값을 나타내는 반응표면의 그림이 완전 또는 부분적으로 적합하였고, 그 일치하는 부분을 각 독립변수의 범위를 읽어 최적 분해조건 범위로 설정하였다. 이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 효소분해의 최적 조건 범위는 Fig. 2의 짙은 부분으로 효소농도 1-1.8% 및 반응시간 1-1.8시간으로 예측되었다(Table 7).

요 약

본 연구에서는 천연초 줄기를 Viscozyme®을 이용하여 효소분해하여 분해물의 수율과 식이섬유 함량 등을 측정하여 반응표면분석법으로 천연초 줄기의 최적 효소분해 조건을 설정하였다. 실험계획은 중심합성계획법으로 실시하여 2가지

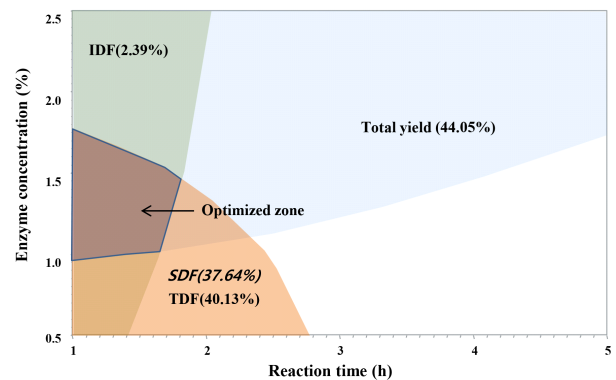


Fig. 2. Superimposing contour map for optimized hydrolysis conditions of total yield, total dietary fiber (TDF) content, water-soluble dietary fiber (SDF) content and water-insoluble dietary fiber (IDF) content from *Opuntia humifusa* stem by enzyme concentration and reaction time.

Table 7. The range of predicted optimum hydrolysis condition of *Opuntia humifusa* stem by superimposed response surface

Treatment condition	Range of predicted condition (optimal value)
Enzyme concentration (%)	1-1.8 (1.75)
Reaction time (h)	1-1.8 (1.50)

독립변수로서 효소농도(0.5-2.5%) 및 반응시간(1-5시간)을 설정하고, 종속변수로는 가수분해물의 수율, 총식이섬유 함량, 수용성 식이섬유 함량 및 불용성 식이섬유 함량을 측정하여 효소분해조건을 최적화하였다. 천년초 줄기의 일반성분을 측정된 결과, 탄수화물이 69.66%, 식이섬유 58.82%로 식이섬유가 탄수화물의 대부분을 차지하였다. 중심합성계획법에 의해 설정된 13개의 효소분해조건에서 천년초 줄기를 분해하여 모니터링한 후 최적 분해조건을 예측한 결과, 종속변수에 따른 회귀식은 모두 5% 이내 수준에서 유의성이 인정되었다. 수율에 대한 예측된 최적조건은 효소농도 2.46%, 반응시간 2.47시간이었고, 총식이섬유 함량은 효소농도 0.98%, 반응시간 1.29시간이었으며, 수용성 식이섬유 함량은 효소농도 0.96%, 반응시간 1.32시간이었고, 불용성 식이섬유 함량은 효소농도 1.68%, 반응시간 1.03시간으로, 이때 각 종속변수의 최대값은 수율 54.12%, 총식이섬유 함량 48.54%, 수용성 식이섬유 함량 46.97%, 불용성 식이섬유 함량 3.64%로 나타났다. 천년초 줄기 분해물의 수율, 총식이섬유 함량, 수용성 식이섬유 함량 및 불용성 식이섬유 함량에 대한 최적 분해조건을 superimposing 한 결과, 효소농도 1-1.8%, 반응시간 1-1.8시간으로 예측되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Eun Jin Jang <https://orcid.org/0000-0001-6420-780X>
 Ja Min Kim <https://orcid.org/0000-0002-2565-6087>
 Kyung Young Yoon <https://orcid.org/0000-0003-0626-5563>
 Seong-Ho Kim <https://orcid.org/0000-0002-5787-7650>

References

- Do JR, Kim EM, Koo JG, Jo KS. Dietary fiber contents of marine algae and extraction condition of the fiber. *J Korean Fish Soc*, 30, 297-296 (1997)
- Ebihara K, Nakamoto Y. Comparative effect of water-soluble and -insoluble dietary fiber on bowel function in rats fed a liquid elemental diet. *Nutr Res*, 18, 883-891 (1998)
- Hua M, Lu J, Qu D, Liu C, Zhang L, Li S, Chen J, Sun Y. Structure, physicochemical properties and adsorption function of insoluble dietary fiber from ginseng residue: A potential functional ingredient. *Food Chem*, 286, 522-529 (2019)
- Hwang SH, Kim JI, Sung CJ. Analysis of dietary fiber content of some vegetables, mushrooms, fruits and seaweeds. *J Nutr Health*, 29, 89-96 (1996)
- Im HJ, Park BY, Yoon KY. Production of soluble dietary fiber of buckwheat hulls by enzymatic depolymerization and its characteristics. *Korean J Food Sci Technol*, 48, 97-103 (2016)
- Kim HJ, Kim MH, Jang M, Lim TG, Hong HD, Rhee YK, Kim KT, Cho CW. The seasonal appearance and chemical composition characteristics of cladode of *Opuntia humifusa*. *Korean J Food Preserv*, 23, 502-509 (2016)
- Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM, Rho JH. Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 36, 1482-1485 (2007)
- Kim YS, Kim SH. Optimization of Deodeok (*Codonopsis lanceolata*) extraction condition using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 48, 447-455 (2019)
- Lee PH, Park SY, Jang TH, Yim SH, Nam SH, In MK, Kim DC, Chae HJ. Effects of complex carbohydrase treatment on physiological activities of pear peel and core. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 43, 404-410 (2014)
- Lin L, Li X, Xu Z, Li B. Dietary fiber extraction from soy sauce residue. 2014 International Conference on Nutrition and Food Sciences, IACSIT Press, Singapore, IPCBEE, 71, p 82-86 (2014)
- Makki K, Deehan EC, Walter J, Backhed F. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host Microbe*, 23, 705-715 (2018)
- Oh MH, Hwang YJ, Yoon KY. Biological activity of water-soluble polysaccharides from *Cedrela sinensis* according to extraction methods. *Korean J Food Sci Technol*, 49, 215-221 (2017)
- Oh MH, Jang HL, Lim YJ, Yoon KY. Antioxidant activities of *Cedrela sinensis* hydrolysates prepared using various enzymes. *Korean J Food Sci Technol*, 47, 413-418 (2015)
- Park MJ, Kim SB, Kim SJ, Kim KM, Choi SY, Chang M, Kim GC. Optimization of spray drying conditions of soft persimmon and milk mixture using response surface methodology. *Korean J Food Preserv*, 24, 957-964

- (2017)
- Park SY, Yoon KY. Production of enzymatic hydrolysate including water-soluble fiber from hemicellulose fraction of Chinese cabbage waste. *Korean J Food Sci Technol*, 47, 6-12 (2015)
- Schneeman BO. Soluble vs insoluble fiber: Different physiological responses. *Food Technol*, 41, 81-82 (1987)
- Shin DS, Han GJ, Oh SG, Park HY. Functional component analysis and physical property of Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) powder. *Korean J Food Preserv*, 22, 838-844 (2015)
- Shin SL, Lee CH. Antioxidant activities of Ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J Life Sci*, 21, 56-61 (2011)
- Wang X, Xu Y, Liang D, Yan X, Shi H, Sun Y. Extrusion-assisted enzymatic hydrolysis extraction process of rice bran dietary fiber. In *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2015*, New Orleans, LA, USA, 26-29 July, p 1337-1345 (2015)
- Yoon JA, Hahm SW, Son YS. Nutrients content in different parts of pickly pear (*Opuntia humifusa*) and possible anti-breast cancer effect. *Korean J Food Nutr*, 22, 485-491 (2009)
- Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. *LWT-Food Sci Technol*, 39, 388-392 (2006)