한국농화학회지 Vol. 13, No. 3, Dec. 1970
J. Korean Agricultural Chemical Society

사상균 Naringin 분해 효소에 관한 연구

[제1보] 우량 균주의 분리 선별과 선별균의 조효소 성질에 관하여

기 우 경·성 낙 계
(진주 농과대학)

Studies on the Naringinase of Mold

[part 1] Screening test of Molds on the Production of Naringinase and some properties of Crude Enzyme of Selected strain.

Woo Kyung Ki. Nack Kie Sung
(Jin Ju Agricultural College)

(Recieved Oct. 30, 1970)

Summary

Fifty strains of mold which isolated from the various sources were screened for the production of Naringinase (which hydrolyse naringin, the 7-rhamnoside-glucoside of 4′.5.7.- trihydroxyflavanonin, the main bitter principle of citrus fruits and grape fruits.

Of the 4 strains yielded naringinase with significant activity, S-1 strain was selected on the criterion of industrial application, and some properties of crude naringinase of this S-1 was investigated.

The results obtained were as follows.

1. Naringenase obtained from S-1 strain has optimum pH range from 3.0 to 5.0 for its activity.
2. Production of naringinase was increased on the addition of naringin to the medium.
3. Hydrolysis of naringin with approporiate concentration of naringinase was carried out linerly up to 80% on the 0.1% substrate solution.
4. The optimum temperature for its activity was 50°C, and this enzyme was inactivated 80% of its total activity at 70°C for 10 minutes, 40% at 60°C for 30 minutes.

   But signifiant decrease of activity were not occured by heat treatment at 50°C for 2 hours.
5. Crude enzyme of the naringinase obtained from S-1 strain was competitively inhibited by addition of glucose on the substrate, and inhibitor constant of the glucose on the this enzyme was 1.5 Mol, and inhibition rate were linearly increased accoding to the increase of sucrose concentration and 56% of its total activity was inhibited at 1 Mol sucrose solution.

1. 서 론

Naringin은 밀감류나 포도의 고미성분[1]의 주체로서 과량 존재 할 때는 좋지못한 맛의 원인이 된다. 그러므로 이런 쓴맛의 원인이 되는 Naringin을 제거하는 방법은 일찍부터 많은 연구가 되어왔다. 특히 E.M. Burdick[2] 등은 화학적 방법등을 연구 하였으나 최근에는 이러한 방법[2]에서는 불합리 한점이 너무나 많아 효소에 의한 방법이 많이 개발되었다. 즉 1938년 Hall[4] 등에 의한 식물성 효소의 연구에 뒤이어 보다 실용성이 있는 미생물원의 효소 연구가 Thomas[5] 神谷[6] 瀧口 洋[7,8] 등에 의해 이루어 졌으며 岡田 茂孝[9,10] 등에 의해 실용화 되고 있다. 우리나라에서도 남해 지방등의 유자류, 제주도의 밀감 등의 가공 등에는 이의 이용이 시급하다 하겠다. 그러므로 본인 등은 산업상 이용 가능성이 있는 pectinase를 가급적 생성하지 않고 Naringinase의 생산력이 많으며 내산성 고온성 효소생성균을 분리 선별하여 몇가지 조효소의 성질을 검토하여 실용화에 따르는 문제점 등을 검토하였다.

2. 실험 및 방법

〔1〕 곰팡이의 분리

균 분리용 배지로서는 Malt extract agar (pH. 5.0. Brix. 10°)로 하여 토양, 퇴비, 각종 Koji, 유자껍질 등을 균원으로 하여 Dilution pour plate method로 순수분리 하여 선별 시험용 균주로 하였다.

〔2〕 유용 균주의 1차 선별

1) 효소액의 조제

순수분리한 균을 Wheat bran과 Top water를 동일량(*w/v*) 가해 살균한 배지에 접종하고 30°C에서 5일간 배양후 상온에서 건조후 그 1g를 25m*l*의 Macllvaine Buffer에 1시간 추출후 여과하여 효소액으로 사용하였다.

2) Naringin 기질액의 조제

Macllvaine Buffer(pH 4.0)에 Naringin을 0.125% 가하고 60°C에서 10분간 가온 용해후 Naringinase 측정용 기질액으로 하였다.

3) 반응액의 조제와 효소작용

상기 0.125% Naringin 기질액 4m*l*를 test tube에 넣고 효소작용은 50°C에서 예온후 효소액 1m*l*을 가하고 1시간 반응 시킨후 Naringinase 활성 측정용 sample로 하였다.

4) Naringinase 활성도 측정

Naringin의 Naringenin으로의 분해는 두물질의 Diethylen glycol과 알카리에 의한 발색도의 차를 이용한 Davis[12] 법으로 반응액 0.2m*l*을 90% Diethylen glycol 10m*l*에 혼합후 6N—NaOH 0.2 m*l*을 가하여 정확히 10분만에 420mμ photoelectric colourimeter (Spectronic 20)로서 발석도를 측정하여 Standard Naringin과 Naringenin의 발색도를 합성하여 만든 결과와 대조하여 Naringin의 분해도를 측정하였다.

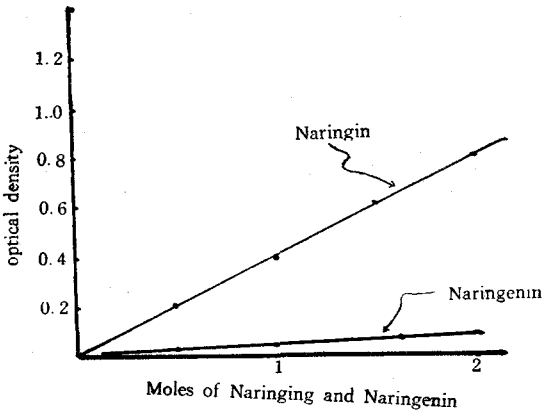

Fig. 1. Standard curves of Naringin and Naringenin

〔3〕 우량 균주의 최종선별

1) 배양 일수에 따른 Nariginase와 Pectinase 생성

A) 효소액의 조제

Wheat bran과 Top water를 동일량 혼합한 배지를 일정량씩 삼각후라스크에 넣고 살균한 후 포자현탁액을 일정량씩 각균주마다 이식 접종 한 후 30°C에서 배양, 처음 배지의 50배의 증유수로 추출 한 후 여과하여 Naringinase와 Pectinase 측정용 효소액으로 하였다.

B) Naringinase와 Pectinase 활성도 측정

Naringinase의 역가측정은 전기 방법으로 측정하여 0.1% 기질용액의 분해율을 환산하였으며 Pectinase의 역가측정은 Jansen[13] 법으로 1.25% Pectin solution (pH 4.2 Macllvaine Buffer) 4m*l*에 (A)의 효소액 1m*l*를 가하고 40°C에서 1시간 반응시킨 후 0.1N—I_2 5m*l*를 가하고 진탕후 20분간 방치하고 2M—H_2SO_4 2m*l*을 가하여 산성으로 하고 유리 I_2를 0.02N—$Na_2S_2O_3$로 적정하였으며 효소를 가온 실활시킨 Blank와의 차로서 활성도

를 나타내었다.

2) 최적 활성 pH에 의한 선별

효소액의 조제는 전술한 방법으로 5일간 배양후 증류수 추출액으로 동일농도의 여러가지 pH로 조절하고 0.125%의 각각의 pH를 가지는 Macllvaine Buffer의 기질액과 50°C에서 1시간 작용시킨 후 Naringinase의 활성도를 비교 하였다.

〔4〕 **S-1 균주 Naringinase의 효소학적 성질**

1) 효소농도 및 반응 시간에 따른 기질의 분해와 효소작용에 미치는 기질 농도의 영향

pH 2.8의 상기 완충액의 0.125% Naringin 용액에 효소액의 농도가 원액 2배 3배 되게 희석한다음 최종 기질농도가 0.1% 되게하고 50°C에서 반응시켜 시간에 따른 Naringin 분해를 검토하였으며 기질 농도가 효소작용에 미치는 경향에서는 pH 2.8의 각 기질 농도에서 50°C에서 1시간 동안 분해시키는 Naringin의 m Mole을 환산하여 기질농도가 효소작용에 미치는 영향을 Line weave polt로서 검토하였다.

2) 배지에 Naringin 첨가에 따른 Naringinase 생성에 미치는 영향

Wheat bran에 동일(w/v)의 여러가지 Naringin 첨가 용액을 가하여 배지로 하고 5일간 30°C에서 배양후 Naringinase 측정용 효소액으로 하여 상술한 방법으로 역가를 측정 효소생성에 미치는 영향을 조사 하였다.

3) 최적 작용 온도

기질의 pH가 2.8과 4.0의 두가지로 하여 각각의 온도에서 1시간 반응 시킨후 그반응액을 0.2m*l*를 취하여 0.1% 기질액의 분해 %를 구하여 최적 작용 온도를 알았다.

4) 온도와 pH에 대한 안정성

pH에 대한 본선별균 효소의 안정성은 동일농도의 효소액이 각각의 pH가 되게 0.1N—HCl이나 0.1N—NaOH로 조절한 다음 각 pH의 완충액을 각 pH로 조절한 효소액에 1/3량 가하고 역가를 측정하여 Control로 하고 0°C에서 24시간 보존후 역가를 측정하여 비역가로서 나타내었다. 이때 효소액의 pH는 측정전에 기질액의 pH와 동일하게 2.8로 조정한 동일농도의 효소액이 되게 하였다.

온도에 대한 안정성은 pH 4의 효소액을 각 온도에서 일정시간 열처리하고 50°C에서 1시간 반응시킨후 열처리 하지 않은 효소의 역가를 100으로 하여 각각의 비역가를 구하였다.

5) 효소 작용에 미치는 Glucose와 Sucrose의 영향

선별균주 S-1이 생성하는 Naringinase의 작용에 미치는 Glucose의 영향을 알아보기 위하여 2개의 상이한 기질농도 0.075%와 2.1%의 최종반응액의 기질농도가 되게한 반응액에 각 Mole 농도의 Glucose를 첨가시켜 30분간 효소작용을 시킨후 분해하는 Naringin의 m Mole를 역수로 하여 두기질 농도에게 저해 되는 직선을 얻어 저해 형식과 저해정수를 알아보았다.

Sucrose에서는 0.1%기질 액에서의 각 농도의 Sucrose가 효소 작용에 미치는 영향은 기질의 분해도로서 나타내었다. 이때 기질의 pH는 2.8이었으며 반응 온도는 50°C이었다.

3. 결과 및 고찰

〔1〕 **1차선별**

1차선별 결과 Naringinase의 활성도는 상술한 선별 조건에서는 Table 1과 같이 *Aspergillus* 속에서는 Naringinas의 활성도가 높았으며 *Penicillium* 속에서는 거의 역가가 나타나지 않았다.

Table 1 Result of first Screening test.

Hydrolysis% / Genus	0~5°	5~25	25~50	50~	Total strains
Aspergillus	4	12	11	4	31
Penicillium	11	2	0	0	13
Others	2	1	1	0	4

〔2〕 **우량 균주의 최종선별**

1) 배양 일수에 따른 Naringinase와 Pectinase 생성

1차 선별에서 Naringinase의 생산력이 좋은 S-1 S-23 S-60 S-62에 대하여 배양 일수에 따른 Naringinase와 Pectinase 생성을 검토해 본 결과, Fig 2, Table 2와 같았는데 Pectinase의 생성은 Naringinase 처리시 과육의 연화 등의 부작용을 일으키기 쉬우므로 Pectinase의 생성이 적고 Naringinase의 생산이 많은 S-1이 가장 이상적인 것 같았다.

Table 2 Production of Pectinase on the Cultured days

Cultured days / Strain no.	2	3	5	7	9
1	0.46	0.35	0.30	0.32	—
23	0.10	0.20	0.50	0.45	0.44
60	0.30	0.25	0.35	0.64	0.66
62	0.05	0.25	0.20	0.44	0.40

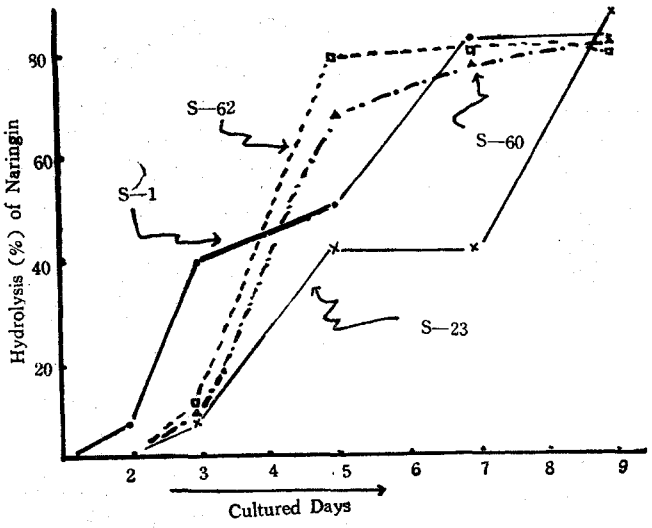

Fig. 2 Production of Naringinase on the Cultured days.

양 효소이 생성은 Takiguchi의 Scalase와 비교 해 볼 때 Pectinase의 생성은 상당한 차이가 있으나 Naringirase 생성은 대개 비슷한 배양 일수에서 최고치에 달한 것을 알 수 있었다.

2) 최적 활성 pH에 의한 선별

Pectinase는 urea 등에 의한 분별 실활 등의 방법으로 제거 할 수 있고 또 최적 작용 pH[14]가 Naringinase의 이상적인 pH와는 상이 할 수 있으므로 Naringinase의 생산성이 좋은 두 균주 S-1과 S-23에 대하여 최적 작용 pH를 조사해본 결과 Fig. 3과 같이 4.0 이었으나 S-1은 瀧口 洋[9] 등이 검토한 ***Aspergillus usamii mut, shiro usamii*** 와 비슷하였는데 차이점은 pH 5에서도 상당히 잘 작용할 수 있다는 것이었으며 S-23은 ***Aspergillus niger*** 와 비슷하였다. 이로서 S-1이 최적작용 pH의 면으로서 볼때 가장 이상적이라 할 수 있다.

〔3〕 S-1 균주 Naringinase의 몇가지 효소학적 성질

1) 효소 농도 및 반응 시간에 따른 기질 분해와 효소 작용이 미치는 기질 농도의 영향

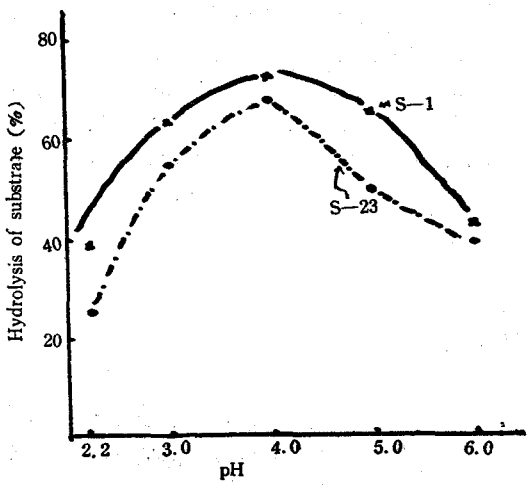

Fig. 3. Optimum pH for Naringinase Activity

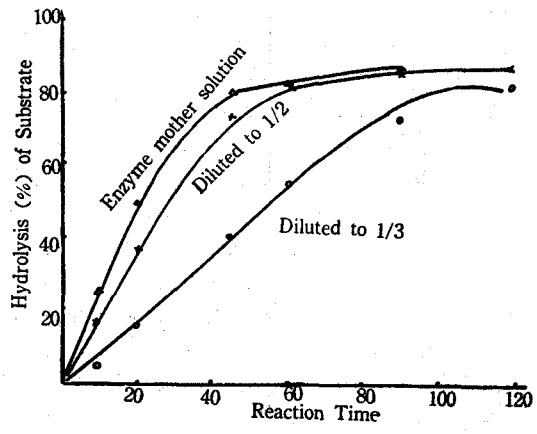

Fig. 4. Hydrolysis of the Substrate solution with Various Concentration of Nariginase Obtained from S-1 strain

시간에 따른 기질의 분해는 Y. Takiguchi[9] Thomas[5]의 경우와 비슷하게 80% 정도 까지는 직선적인 결과를 보여주었으며 기질농도의 영향에 대하여 조사 해본 결과 고농도의 기질 농도에서는 활성도가 낮았는데 이는 Naringin의 침전 생성 등에 의한 효소작용의 불충분 등이 원인인것 같았으며 이로서 밀감 과즙이나 통조림의 가온처리는 과육 등에서 Naringin 추출에도 의의가 있을 뿐 아니라 완전한 효소 작용에 필요한 불용성 Naringin의 용해에도 상당히 의의가 있는 것 같았다.

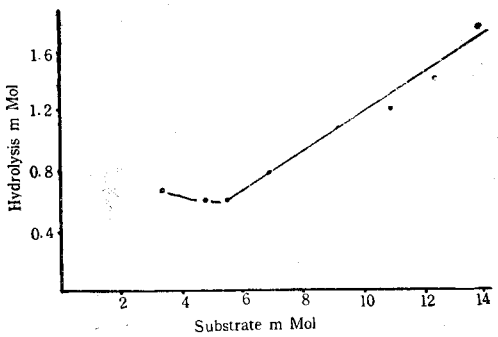

Fig. 5. Effect of Substrate Concentration on the Naringinase Activity.

2) 배지에 Naringin 첨가가 효소 생성에 미치는 영향

Rhamnose에 의해서 Naringinase의 생산이 증가 한다는 것은 일반적으로 알려진 사실이나[15], Wheat bran 배지에서 Naringin 첨가에 따른 효소 생성을 실험 해본 결과 Table 3와 같이 1% 정도의 Naringin 첨가에 의하여 2배 가까운 효소 생성의 증가를 가져왔다.

Table 3. Increase in the Naringinase producing activity by Naringin

Medium: Wheat Bran 1: each % of Naringin soln. 1

Naringin %	0	0.001	0.01	0.1	1	2
Hydrolysis %	49.0	49.0	61.0	62.5	77.0	83.0

3) 최적 작용 온도

최적 작용 온도는 Fig. 6과 같이 50°C 부근이 있으며 그 이상에서는 역가의 급격한 감소가 일어났다. 최적 작용 온도에서 볼때 *Aspergillus niger* 와 비슷하나 Y. Takiguchi[7] 등의 Scalase 보다는 낮았다.

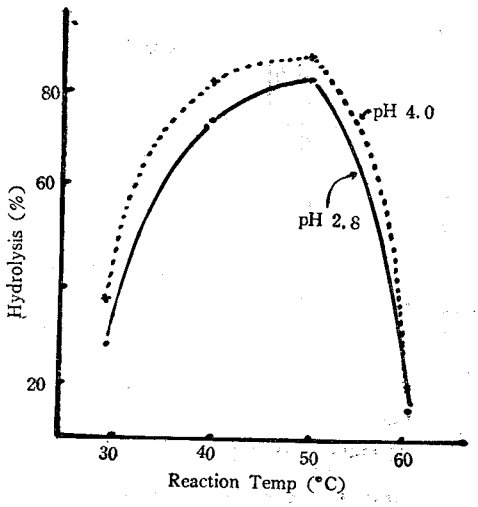

Fig. 6. Optimum Temperature for Naringinase Activity

4) pH와 열에 대한 안정성

Table 4. pH Stability of Naringinase

Treating pH	2.2	2.8	5.0	6.0	8.0
Relative activity	95	100	100	96	81

pH에 대한 안정성은 Table 4에서와 같이 0°C에서 24시간 처리한 결과 pH 2.8~5.0까지는 역가의 손실이 없었으나 pH 5 이상에서는 역가의 감소가 나타났다. 그러므로 본효소는 내산성 효소인것을 알았으며 온도에 대한 안정성은 50°C에서는 2시간 동안 처리로 상당히 안정 하였으나 60°C 이상에서는 급격한 실활하는것을 알수 있었다.

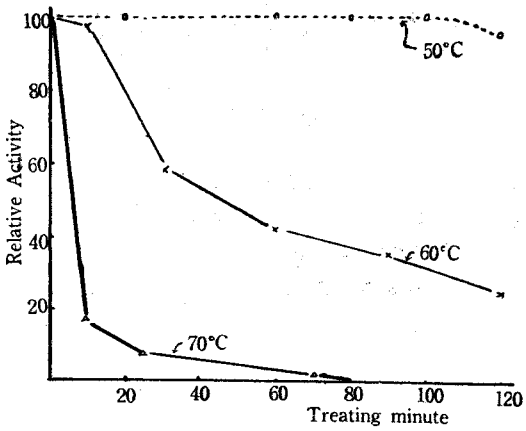

Fig. 7. Stability of Crude Naringinase against Various Temperature

5) 효소 작용에 미치는 Glucose와 Sucrose의 영향

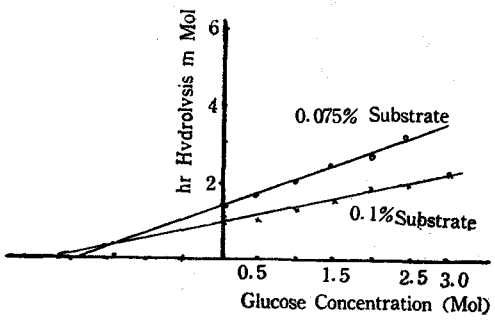

Fig. 8. Effect of Glucose Concentration on the Naringinase Activity.

Naringinase의 작용에 Glucose나 Sucrose가 저해하면 실용화를 위해서는 많은 애로가 있다는 것은 알려진 사실이나[11] 본효소의 작용에 미치는 Glucose의 영향을 검토 해본 결과 Tomson[5] 등이 검토한 Naringinase와는 많은 차이가 있었으며 저해형식은 경쟁적으로 저해하여 저해 정수는 1.5Mol 정도이었다. 그러므로 본효소는 상당히 Glucose에 대하여 내당성 효소 인것을 알수 있으며 Sucrose에 대한 저해도 Table 5에 보는 바와 같이 1 Mol 농도에서 45% 정도의 활성을 나타 내므로 지금까지 실용화[12] 되고 있는 어떠한 효소 보다 당에 대하여 저해를 받지 않는 효소라는 것을 알수 있었다.

Table 5. Effect of Sucrose Concentration on the Naringinase Activity.

Sucrose Mol. / Naringnase Activity	0	0.1	0.25	0.50	0.88	1
m mol. / hr.	0.70	0.71	0.55	0.52	0.31	0.32

4. 적 요

밀감류 등의 고미 성분의 일종인 Naringin을 분해하는 효소를 생성하는 사상균을 분리 선별하여 실용화에 알맞는 S-1 균주 효소 Naringinase의 몇가지 효소학적 성질을 검토한 결과는 다음과 같다

1. Naringinase S-1은 Pectinase의 생성이 비교적 약하였으며 최적 활성 pH의 범위는 pH 3.0~5.0 사이었다.

2. Naringinase의 생성은 배지에 Naringin 첨가에 의하여 많이 증가되었다.

3. 적당한 효소농도 이상에서는 Naringin의 분해는 0.1% 기질 농도에서는 80% 까지는 거의 직선적이있으며 고농도의 기질농도에서는 활성도가 낮았다.

4. 최적 활성 pH는 50°C이었으며 열안정성은 50°C에서 2시간 열처리에 의하여서는 별 역가의 감소가 없었으나 60.C에서 30분에 40% 70°C에서 10분만에 70%의 불활성화를 나타내었다.

5. Glucose는 효소작용에 있어 경쟁적으로 저해하였으며 저해정수는 1.5 Mol이었고 Sucrose에 의한 저해는 1 Mol 농도에서 56%의 저해를 가져왔다.

참 고 문 헌

1. 中林敏郎; 食品の變色とその化學 20(1968)
2. E.M. Burdick R.H. Maurer: US 2,5,10,797
3. 緖方邦安; 園藝食品の加工と利用 85(1968)
4. Hall, D.H: Chemistry and Industry, 57, 473(1938)
5. D.W. Thomas, C.V. Smythe, et al. Food Research 23, 591(1959)
6. 神谷 昭和 35年度日本農化講演要旨 p.25(1960)
7. 瀧口洋; 高峯研究年報 Vol. 14, 101(1962)
8. 瀧口洋; 日農化會誌 39, 5. 194—198(1965)
9. 岡田茂孝. 福本壽一郎; 日農化 37, 146—150 (1963)
10. 岡田茂孝. 福本壽一郎; 科學と工業 39, 96 (1965)
11. 富田次男; Food Industry 13, 6. 120(1970)
12. 櫻井芳人; 果實蔬菜の加工貯藏 ハンドブック 104—105(1969)
13. W.B. Davis; Anal. Chem, 19, 476—478 (1947)
14. 赤堀四郎; 酵素研究法 2, 167(1968)
15. 赤堀四郎; 酵素ハンドブック 468(1967)