

## Aspergillus Saitoi가 生産하는 纖維素分解酵素에 關한 研究

(1 報) 온주밀감 통조림 製造時 內果皮 分解除去에 關한 研究

서울保健專門學校

李順愛 · 吳錫欣 · 尹政義 · 李盛鎭

(1971년 2월 27일 수리)

## Studies on Cellulolytic Enzymes produced by Aspergillus saitoi

(1) Studies on the endocarp remove canning process of mandarine orange syrup

by

Soon Ae Lee, Suk Hen Oh, Jung Eui, Youn, Sung Ho Lee

Seoul Health Junior College

(Received Feb. 27, 1971)

### Abstract

To research were procedure condition of cellulase and remove effect of endocarp of mandarine orange from the result obtained it could be summarize as follow.

1. Optimal conditions affecting the production of cellulolytic enzyme of *Aspergillus saitoi* are followings: optimal temperature 30°C and optimal culture period 3days.
2. When mandarine orange was soaked in 10 fold diluent of enzyme(diluent of enzyme: mandarine orange=2 : 1) and reacted under 40°C for 3.5—4hrs, it was most effective and available to the remove of endocarp, flavour, and lustre important to the canning process of mandarine orange syrup.

### 緒 言

著者は數種の糸狀菌 및 細菌이 生成하는 cellulase의 生成能을 研究 觀察하러 하는 바 그 일환으로 우선 *Aspergillus saitoi*의 cellulase activity를 관찰함과 아울러 cellulase가 밀감 內果皮 除去에 미치는 영향에 대하여 考察하는 바이다.

纖維素分解酵素에 대하여는 Siu, Gascoigne, J. and Gascoigne, M., 外山等의 總說이 있으며<sup>(1,2,3)</sup> Whitaker가 指摘한 바와 같이 cellulase는 纖維素 基質에 作用하는 enzyance이다. 本 酵素는 動植物 및 微生物에 存在함은 물론이거니와 1950年을 전후하여 食品工業과 醫藥品의 生産에 기여한 바 크다 하겠다. 또한 近年에

이르러서는 세포벽 분해와 下水道의 汚物除去 및 耐酸性酵素의 研究가 활발하다.

현재 우리나라의 통조림공장에서 사용되고 있는 mandarine orange syrup 통조림의 제조는 80~100°C에서 2~3分間 加熱하여 外皮를 除去한 後 다시 밀감의 內果皮를 除去하기 爲하여 2~3%의 HCl 溶液에서 2~3時間 浸漬後 水洗하고 다시 1% NaOH 溶液으로 15~20分정도 處理後 內皮를 中和와 함께 分解除去하는 方法을 채택하는데 이러한 方法의 결함으로는 果肉의 붕괴가 많고, 水洗過程이 完전하지 않으면 空罐의 주석이나 납과 作用해서 水素를 發生하여 오래두면 水素 gas에 의한 hydrogen swell 현상을 나타내며, 금속의 酸化物은 鹽酸과 作用해서 鹽化物로 되기 쉬우며, 또한

人體에서 口渴, 嘔吐, 설사, 胃痛 等の 증상을 나타내고 NaOH 는 咽頭, 食道, 胃의 진통, 嘔吐, 설사, 血性吐瀉, 下痢<sup>6)</sup> 등의 증상을 나타내는 등의 결점이 있으므로 筆者는 Asp. saitoi 를 數廻培養 하여 纖維素分解酵素에 의한 外果皮를 除去한 온주밀감에 處理한 바롱조림 製造用的 條件으로 우수한 效果를 얻었기에 이 에 報告하는 바이다.

**實 驗**

**A. 1. 供試菌株**

Aspergillus saitoi 를 供試菌株로 하였다.

**基本培地**

合成培地로 Czapeck medium 을 使用하였다.

**2. 基質液**

1% CMC—Na solution

**3. 麹의 培養法<sup>4)</sup>**

**補助培地**

test tube 에 7.0ml 의 Czapeck's solution 을 넣고 15 lbs 에서 30 分間 殺菌後 여기에 供試菌株를 無菌的으로 接種移植하여 30°C 의 Incubator 에서 48 時間 培養하였다.

**本培養**

500ml 의 Erlenmyer flask 에 wheat bran과 rice bran 을 7 : 3 으로 混合한 것 20gm 에 물 12ml 를 加하여 잘 교반후 15lbs 에서 30 分間殺菌後 前記菌株를 接種移植하여 30°C 의 incubator 에서 3 日間 培養하였다. 그리고 固體培地를 40°C 의 incubator 內에서 乾燥시킨 後 粉碎하였다.

**B. 1. 酵素液의 調製**

乾燥粉碎한 麴 20gr. 에 물 200ml 를 가하여 室溫에서 5 時間 放置한 後 이것을 여과하여 酵素液으로 하였다.

**2. 酵素의 力價 測定法<sup>5)</sup>**

a) Carboxymethyl cellulose (CMC—Na 특급) 1% 液 5ml 에 pH 5.0 acetate buffer solution 4ml 를 加하여 40°C 의 恒溫槽에 40°C 가 될때까지 pre-heating 한다.

이 溶液에 酵素液 1ml 를 加하여 正確히 1 時間 作用시킨 後 反應液 1ml 를 取하여 3.5-dinitrosalicylic acid 를 利用해서 生成한 還元糖을 比色定量해서 glucose 量 (mg)을 算出하고 아래의 式으로 cellulase 力價를 表示하였다.

$$\text{cellulase 力價} = 10 \times f$$

f : 粗酵素液의 희석배수

b) 3.5-dinitrosalicylic acid method<sup>6),7)</sup>

本法은 3.5-dinitrosalicylic acid 가 alkali 性에서 糖

類還元基와 反應해서 黃褐色으로 反應되는 것을 利用한 것이다.

**<試藥>**

4.5% NaOH 溶液 300ml 에 1% dinitrosalicylic acid (DNS) 용액 880ml 및 Rochelle salt 255gm 을 添加한다. 달리 10% NaOH 溶液 22ml 에 結晶 phenol 10gm 을 加하여 100ml 가 될 때까지 물을 添加한다. 이 溶液 69ml 에 NaHCO<sub>3</sub> 6.9gm 을 加하여 溶解시켜 이것을 전부 위의 DNS 溶液에 넣어 Rochelle salt 가 充分히 溶解한 때까지 흔들어 준다. 2 日間 放置後 여과하여 착색병에 保存한다.

**<定量法>**

25ml 의 標線이 있는 乾燥된 Follin-Wu tube 에 反應液 1.0ml (glucose 로서 1,000~2,000μg)와 DNS 試藥 3.0ml 를 加하여 混合後 100°C 에서 5 分間 加熱한 後 冷水로 冷却하여 正確히 25ml 가 될때까지 물을 加한다.

**<blank test>**

DNS 試藥 3.0ml 에 葡萄糖을 加하여 全量을 2.5ml 로 하고 波長 530mμ 에서 Arther H. Thomas Co. Spectronic 20 으로 測定하였다.

**c) 糖標準液의 調製<sup>6)</sup>**

d-glucose 를 100°C 前後로 恒量이 될때까지 乾燥하여 그 1gm 을 mess flask 에 取하여 benzoic acid 를 0.25% 농도로 함유한 dist. water 에 溶解하여 全量을 1ml 로 한다.

上記原液를 1ml 를 取하여 같은 方法으로 benzoic acid 를 함유한 dist. water 에 溶解하여 100ml 로 한다. 10ml 의 mess flask 를 利用하여 위의 희석원액 1, 2, 3, 4, ml 를 取해서 각각 dist. water 를 加하여 10ml 로 하고 各各으로부터 그 2ml 씩 取해서 定量法에 따라 測定한다. (이것은 10, 20, 30, 40, 50 μg/ml 에 相當한다.)

**結果 및 考察**

Asp. saitoi 를 數廻培養하여 그것이 生成하는 纖維素分解酶의 實驗結果는 다음과 같다.

1. 培養時間에 따른 纖維素分解酵素 生成能과의 關係 고체배지에 strain 을 接種移植하여 30°C 의 incubator 에서 2 日, 3 日, 4 日, 5 日, 6 日間 培養한 結果 纖維素分解酵素 生成能은 Fig. 1 과 같다.

Fig. 1 에서 보는 바와 같이 24 時間부터 72 時間까지는 계속 生成이 急增하였으며 그 後 120 時間까지는 약간씩 상승되었으나 144 時間에서는 오히려 生成이 감소하였다.

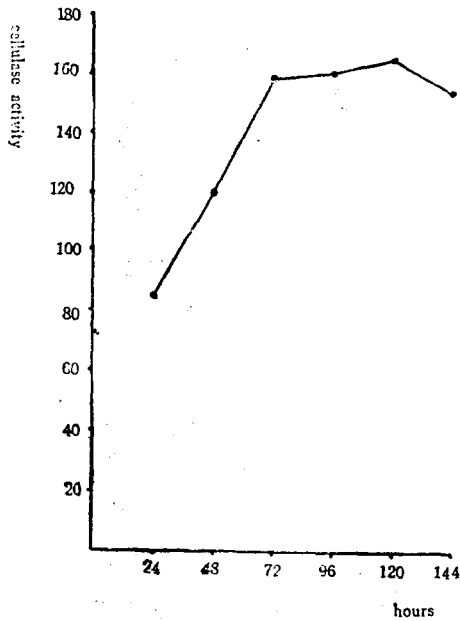


Fig. 1. Relation of cultivation time and cellulolytic enzyme activity.

2. 酵素稀釋倍數와 作用時間에 따른 밀감 內果皮 分解와의 關係

粉麴 50gm을 dist. water 500ml에 浸漬하여 室溫에서 5時間 放置後 여과하여 그 여액에 外皮를 벗긴 mandarine orange 200gm을 넣어 40°C의 恒溫槽에 作用시켰을 때 밀감 內果皮의 變化는 Table 1 과 같다.

Table 1. Detect effect with mandarine orange the endocarp of cellulase.

희석배수 \ 작용시간(hr)	5	10	15	20	대조구
1	+	+	⊕	○	○
2	≡	≡	+	+	○
3	≡	≡	≡	+	○
4	≡	≡	≡	+	○

○ : 變化없음                    ⊕ : 10% 脫皮  
 + : 20~30% 脫皮                ≡ : 30~50% 脫皮  
 ≡ : 60~80% 脫皮                ≡ : 80~100% 脫皮  
 (≡) : decay

Table 1에서 보는 바와 같이 5倍 희석액의 3時間에서 거의 완전히 內果皮가 分解除去되고, 4時間에서는 果肉의 주위가 붕괴되어 形態가 不良하여 10倍에서는 4시간에 거의 脫皮, 3時間에서는 內果皮가 약간

붙어있으나 水洗過程에서 거의 脫皮되며, 果肉의 狀態, 風味가 4가지중 가장 우수한 效果를 나타내었고 15倍, 20倍는 反應速度가 느리므로 너무 장시간 處理하면 果肉의 風味, 營養價가 損失되는 結果가 되므로 5倍에서 3~4시간 處理하는 것이 통조림製造에서 가장 效果가 좋다고 思料되며, 밀감果肉을 물에 處理한 對照區는 內果皮에 變化가 없었다.

Table.1의 5倍, 10倍 稀釋液에서 3時間, 4時間 處理한 것은 Fig.2와 같다.

끝으로 이 실험을 爲하여 助言과 도움을 주신 建國大學校 鄭東孝 博士, 丁聖九 先生께 衷心으로 감사를 드리며 끝까지 실험을 보조하여준 송병호, 박옥기, 박상철군에게 감사의 말씀을 드리는 바이다.

要 約

Aspergillus saitoi가 生産하는 纖維素分解酵素의 生産條件과 밀감內果皮의 脫皮效果를 검토한 結果는 다음과 같다.

1. Asp. saitoi의 培養最適 溫度는 30°C, 時間은 72時間에서 纖維素 生成能이 가장 좋았다.
2. 本酵素를 10倍 농도로 희석하여 (희석효소액 : 밀감 2 : 1) 40°C의 恒溫槽에서 3.5~4時間 作用시킨 것이 脫皮程度, 風味, 光澤이 우수하여 밀감 syrup 통조림 제조조건으로 最適이었다.

引 用 文 獻

1. Gascoigne, J.A., Gascoigne M.M.: "Biological Degradation of Cellulase" p 53 Butterworths (1960)
2. Whitaker, D.R.: Arch Biochem. Bio. phys., 43, 253, (1953)
3. 外山信男: 食品工業(日本) 9, 14, (1966)
4. 朴啓仁, 尹政義: The Korean J. of Microbiol, 6, 3, (1968)
5. 外山信男: 日本特許公報 昭 39-2957 (1965)
6. Sumner, J.B.: J. Biol chem, 47, 5, (1921)
7. Sumner, J.B.: J. Biol chem 65, 393, (1925)
8. 化學の領域編輯委員, 化學の領域增刊 34 (南江堂, 日本)
9. 日本藥局方編輯委員, 日本藥局方 C-234, C-815, (廣川書店, 日本)
10. 松材親, 前島一孝, セルラゼ研究會 第五回 シンポジウム記錄 (1965)
11. 森昭, 飯森正秀: 食品工業 (日本) 12, 8, (1969)

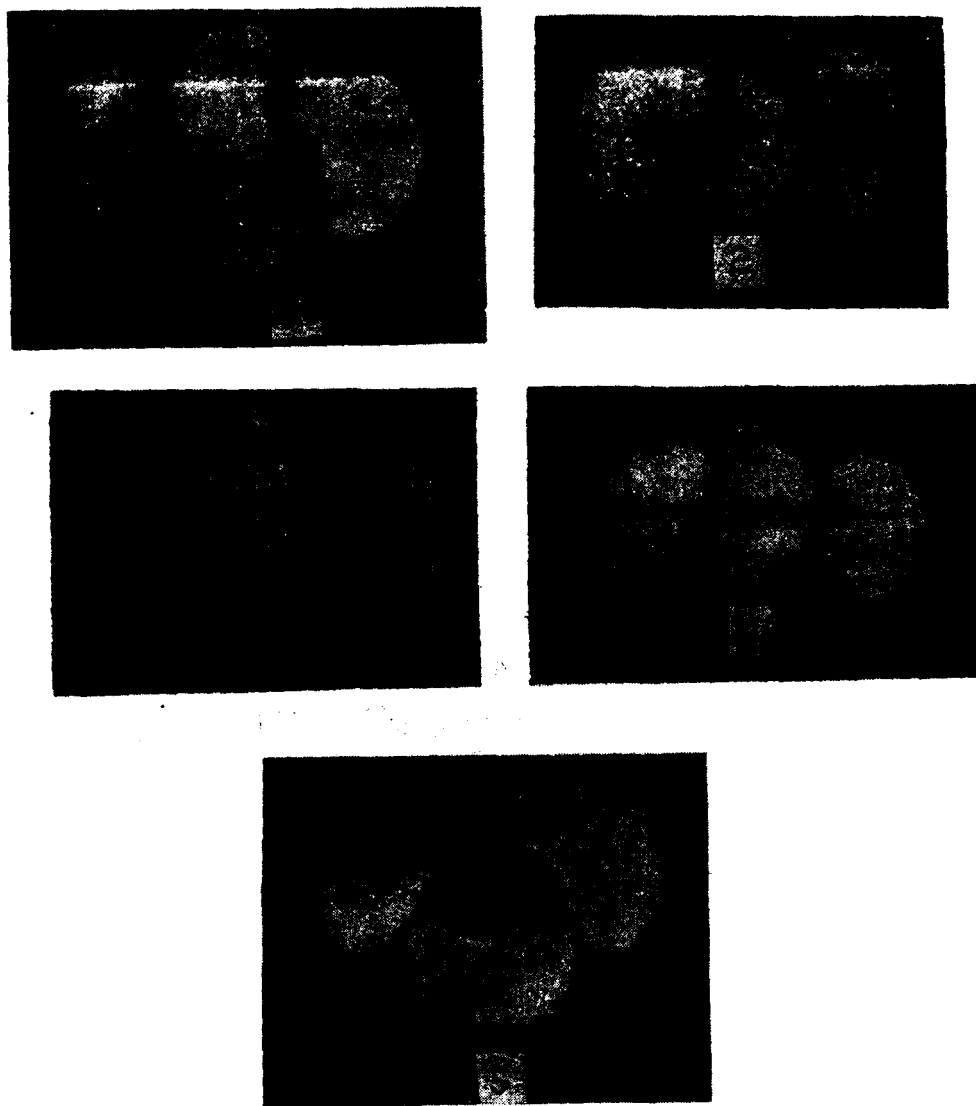


Fig 2. The state of remove at mandarine orange endocarp  
be attended with enzyme treatment.

- |                    |                   |                    |
|--------------------|-------------------|--------------------|
| 1 : 10 倍 희석 4 時間處理 | 2 : 5 倍 희석 3 時間處理 | 3 : 10 倍 희석 3 時間處理 |
| 4 : 5 倍 희석 4 時間處理  | 5 : 對照區           |                    |