

## 사상균의 Naringin 분해효소에 관한 연구(제 3 보)

*Aspergillus niger* S-1 의 naringin 용해효소의 특성과  
여름밀감의 脫苦味에 대하여

기 우 경

慶 尙 大 學

Studies on Naringinase of Mold. (Part 3)  
Naringin solubilizing enzyme of *Aspergillus niger* S-1 and  
removing of bitter taste from chinese citron.

Woo-Kyung Ki

Department of Agricultural Chemistry, Kyung Sang University, Jinjoo, Korea  
(Received May 25 1974)

### ABSTRACT

Studies were carried out on the practical use of Naringinase and some characteristics of Naringin solubilizing enzyme which might hydrolyze naringin to purunin.

Obtained results were as follows.

1. Selected strain for Naringinase producing was identified to be *Aspergillus niger* S-1 and its naringinase was applied to chinese citron processing to remove the bitter taste.
2. Of the naringinase, naringin solubilizing enzyme was purified on a DEAE-Sephadex A-50 column and crystalized from acetone and ammonium sulfate.
3. Hydrolyzed naringin which has higher solubility rather than naringin or naringenin were identified by thin layer chromatography.
4. Hydrolyzed naringin and naringin were separately determined by ethylacetate extraction and this result was compared with sensory test.

### 서 론

여름밀감<sup>1)2)</sup>은 온주밀감 보다 훨씬 생산비가 적게드나 강한 쓴맛 때문에 그대로는 가공하지 못한다. 특히 과즙율이 높은 수확 초기에는 가장 味苦가 강하기 때문에 여러가지 脫苦味法이 고안되었으나 苦味의 주성분인 naringin 을 분해하는 효소를 이용하는 것이 가장 합리적이며 외국의 경우 일부 실용화<sup>3)</sup> 되고 있다. 본보에서는 전보에 이어 분리선별한 *Aspergillus niger* S-1 균주가 생산한

naringin 분해 효소를 여름밀감의 과즙과 병조림의 脫苦味에 이용하였다. 이 naringin 분해효소<sup>4)</sup>는 편의상 naringin 을 purunin 까지 분해시키는 naringin 용해효소와 이 purunin 을 다시 naringenin 까지 분해시키는 효소로 나눌수있다. naringin 이 purunin<sup>5)</sup>으로 분해되면 용해도가 높아진 것은 물론 弱한 苦味를 가지게하여 오히려 밀감 특유의 맛을 주는 결과가 되기때문에 여름밀감 가공품의 품질을 향상시킨다. 그리고 이 물질이 다시 분해되면 無味이나 淸점이 생성 되는 결점이 있다한다. 그러므로 이러한 효소들을 포함하는 [naringin 분해

효소 중 naringin 을 분해하여 침전을 용해 시키고 脫苦味하는 효소인 <sup>6)</sup> naringin 용해화 효소를 정제하여 결정하였으며 정제에 따른 이 효소의 성질 등을 검토하고 purunin 으로 생각되는 이 효소 반응生成物을 표준 물질과 비교 檢討하였으며 이때 反應生成物中的 naringin 을 분리 정량하여 그 감소도를 알아보았으며 食味試驗과 비교하여 몇가지 결과를 얻었다.

## 실 험 방 법

### 1. naringinase 생산 균주의 동정

배양상의 특징과 형태적인 관찰을 하여 常法에 따라 동정하였다.

### 2. 분말효소의 조제

1. <sup>6)</sup>2. <sup>7)</sup>보에서와 동일하게 밀기울에 배양한 균의 효소를 침출하여 유안을 0.75포화시켜 불순물을 제거한 다음 이 액에 유안을 완전포화 시킨다음 탈염하고 냉각한 Aceton 을 가하여 분말효소로 만들어 밀감 가공이나 정제시 사용 하였다.

### 3. naringin 용해와 효소의 특성

#### ① naringin 용해화 효소의 결정화<sup>8)</sup>

결정화에 사용한 효소의 정제는 [제 2 보<sup>7)</sup>]에서와 동일하게 DEAE-cellulose column 에서 정제하고 다시 sephadex G-200 으로 분자사별한 효소 담백으로 전기영동한 결과 단일담백으로 확인된것으로 반응생성물 검사결과 반응물의 침전감소, 반응생성물 확인에 의하면 naringin 이나 naringenin 이의 에 flavonoid 를 생성 하는것이 밝혀진 효소로서 polyethylen Glycol 로 적당하게 농축한후 cap 이 부착된 5ml 의 소형 시험관에 넣어 결정화 효소의 시료로 하였다.

aceton 에 의한 결정화는 -7°C 의 차운 aceton 을 上記 효소액에 소량씩 가하여 결정생성 유무를 현미경으로 검사 하였고 ammonium sulfate 의 결정의 경우 포화 ammonium sulfate 용액을 별도로 준비한 上記 효소액에 소량씩 가한후 몇일간 방치하여 침전생성 유무를 확인 하였다.

#### ② naringin 용해화 효소의 정제 및 특성

naringin 용해화 효소의 DEAE-cellulose column chromatography 의 경우 2보에서 위의 차이점은 사용한 효소가 실험방법 2의 분말효소란 점과 DEAE-cellulose column 에서 효소액을 용출시킬때 사용한 초산 원충액은 처음 1M 의 농도 pH 4.0 인 초산원충액 100ml 로 용출 시키고 동일 pH 이나 2

M농도인 초산 원충액 100ml 을 추가하였으며 그리고 이때 fraction 의 량도 1.6ml 로 하여 효소 이외의 담백질과 색소의 분별을 정밀히 검토한 점이있다. DEAE-sephadex A-50 에 의한 정제는 DEAE-sephadex A-50 분말 2g 를 증유수에 팽윤시키고 이를 1.7×30cm 의 column 에 채운후 1M acetate buffer pH 4.0 으로 충분히 평형시키고 DEAE-cellulose column chromatography 에서 fraction 한 fraction number 36, 37, 38, 번의 효소액 2ml 을 가하고 2M acetate buffer pH 4.0 을 5.0ml, 4M acetate buffer pH 4.8 을 50ml, 6M acetate buffer pH 5.6 을 50ml 씩 가하여 elution 시켜 naringinase 역가 측정, 담백질 정량, naringin 용해화의 관찰 등을 하였다.

#### 1) Naringinase 의 활성도 측정

전보에서와 같이 0.625% naringin (pH 4.0) 기질액 2ml 와 효소액 0.5ml 의 비율로 하여 cap 이 달린 시험관에 넣고 50°C 에서 30 분간 효소반응을 시키고 그중 0.2ml 을 취하여 Davis <sup>6)</sup>7) 법에 의해 측정하고 표준 흡광도와 비교하여 분해 %로 표시 하였다. 이 반응액을 다시 30분간 더 효소반응을 계속 시킨후 그 반응액중 1ml 을 취하여 ethylacetate <sup>9)</sup> 1ml 와 완전히 혼합하고 30분후 ethylacetate 층에서 0.2ml 을 취하여 naringin 감소를 상기 Davis method 로 측정하여 흡광도로 표시 하였다.

#### 2) 단백 정량

2보에서 동일하게 하였다.

### 4. Naringin 분해물질의 확인과 Naringin 과의 분리 정량

#### ① Naringin 분해 물질의 확정<sup>10)</sup>

DEAE sephadex A-50 column 에서 chromatography 로 얻은 fraction number 10, 11(실험방법 3의 효소 반응액)을 1시간 더 반응을 연장한 것을 시료로 하여 thin layer chromatography 에서 0.25mm 로 spreading 하여 thin layer 를 만들고 Butanol:Pyridine:Water 70:15:15 를 전개 solvent 로 하여 3시간 정도 상온에서 전개 시킨후 건조 후 6N-NaOH 를 spray 하여 황색의 spot 를 확인 하였다. 이때 표준물질로는 naringin 과 naringenin 을 사용하였다.

#### ② Naringin 과 분해물질의 분리정량<sup>9)</sup>

naringin 분해 물질은 上記 ①의 효소반응액을 여러가지 농도로 하고 naringin 표준 물질을 가온 용해시킨것과 동일하게 같은량의 ethyl acetate 를

가한후 상등액 0.2ml을 취하여 Davis 법에 따라 420m $\mu$ 에서 표준흡광도를 구하고 이표준직선에 따라 Naringin 과 이의 분해물질을 정량 하였다.

5. 여름밀감의 脫苦味에의 이용

여름밀감은 제주도 서귀포산으로 1973년 12월 초순 시장에서 구입한것으로 평균 중량 332g 의피울 30% 내과피 3.1% 중실 0.7% 순과육 66.2% 이었으며 착즙율은 총 중량에 대해 30.1ml/100g 이었다. 과실의 처리<sup>1)</sup>는 처음 박피하고 1%염산에 5시간 침적하여 내과피를 제거하고 12시간 동안 수세하여 물기를 뺀 다음 씨를 제거하고 과즙과 병조림의 원료로 사용 하였다. 苦味물질의 정량은 ethyl acetate 등탕에 추출한 액을 Davis 법으로 흡광도를 측정하여 실험방법 4. ②의 표준직선에 의해 naringin 의 량으로 나타내었다. 식미검사의 경우 paired comparison test 에 의해 검사하였으며 5% 이하의 위험율을 가진 것을 표시한다.

① 과즙 제조

착즙액의 1/3되는 물로서 다시 착즙하고 설탕을 전체 액즙의 30% W/V 가한후 3구분으로 하고 60°C에서 5분간 가열하여 naringin 을 용해시키고 50°C로 온도를 낮추어 효소를 첨가하지 않은 control 구와 순과즙에 대해 ml 당 1.3mg 가한구 2.6mg 가한구로 하여 처리하고 식미 검사와 ethylacetate 추출에 의한 naringin 정량을 하여 비교 하였다. 처리후 액즙의 pH는 2.2이었다.

② 병조림

순 과육에 각각 1.5배의 물을 가하고 설탕을 이 물에 대해 30% 가한후 60°C에서 가운하고 순과육 450g 를 가지는 3구분으로 하여 순과육에 대해 75mg/g, 65mg/g 효소 첨가구와 효소를 첨

가하지 않는 구로 하여 50°C에서 1시간 30분 효소 반응을 시키고 과육량은 여과하여 평량하고 액즙과 과육을 80°C에서 순간살균 하였다. 이때 액즙의 pH는 2.3이었으며 苦味검사는 과즙에서와 동일하게 하였다.

실험 결과

1. Naringinase 生産菌株의 동정

Photo. 1. 에서 보는 바와 같이

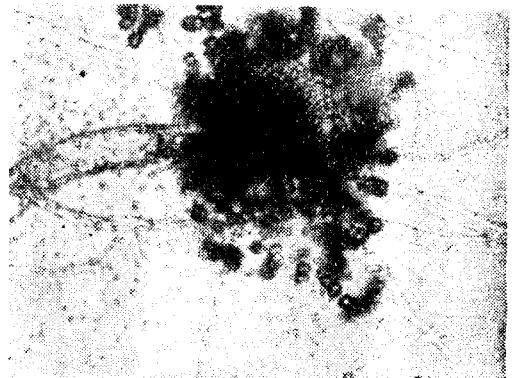
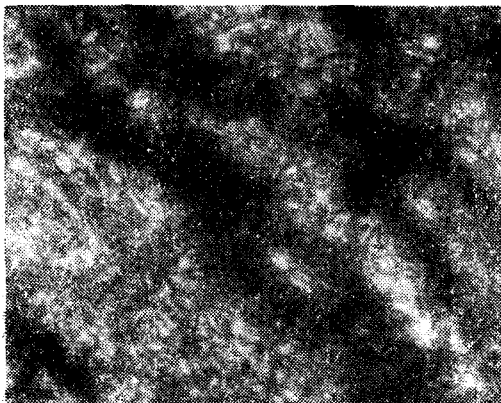


photo. 1. Microphotograph of *Aspergillus niger* S-1 (medium:malt extract agar)

선별된 *Aspergillus* 속의 S-1 strain 은 2 단경자를 가지며 first sterigmata 는 7.5 $\mu$  이며 second sterigmata 는 3 $\mu$ , vesicle 의 크기는 25 $\mu$ ~32.5 $\mu$  이었다. conidiospore 는 粗粒狀 혹은 소돌기를 가지



① Aceton treating



② Ammonium sulfate treating

photo. 2. Microphotograph of Crystal of the Naringin solubilizing Enzyme.

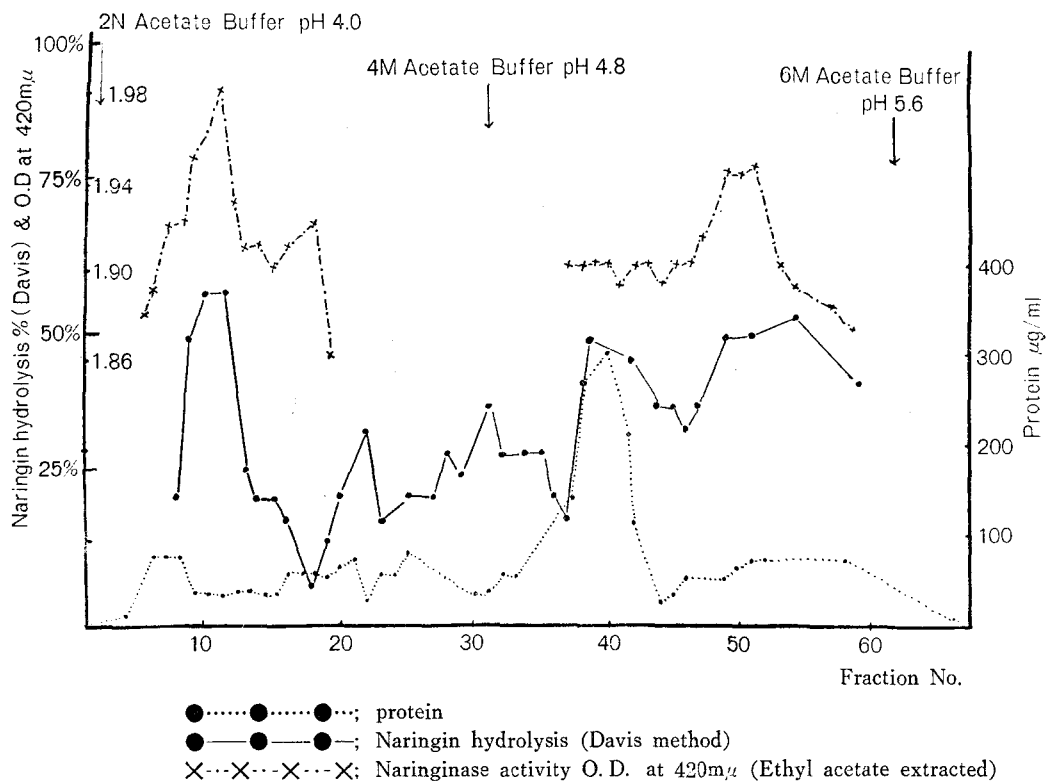


Fig. 1. Purification of the Naringinase *Asp. niger* S-1 on a DEAE cellulose column.

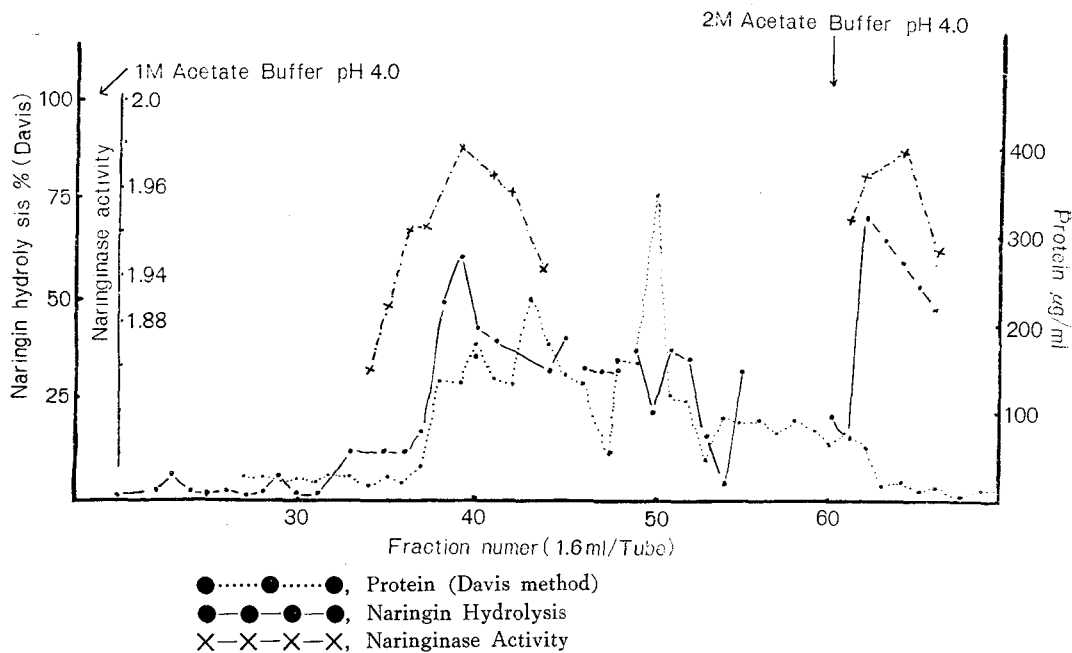


Fig. 2. Chromatographic Separation of the Naringin Solubilizing Enzyme on a DEAE-sephadex A-50 Column, O. D. at 420m $\mu$  (ethyl acetate extracted)

크기는  $4\mu\sim 5\mu$  이었으며 사면배양 또는 평판배양에서의 colony 의 색깔은 흑갈색이었다. 이균은 이로서 *Aspergillus niger* 에 속함을 알수 있었으며 *Aspergillus niger* S-1 이라 하였다.

## 2. Naringin 용해와 효소의 특성

### ① Naringin 용해화 효소의 결정화

Ammonium sulfate 에 의한 결정은 photo 2-②와 같고 Aceton 에 의한 결정은 photo 2-①과 같다.

### ② Naringin 용해화 효소의 정제 및 특성

분말효소 100mg을 DEAE-cellulose column chromatography 한 결과는 Fig 1. 과 같이 2 보에서 보다 fraction 량이 1.6/4ml 로 적으며 naringinase 역가 측정에 의한 효소의 용출부위는 단백질이 많이 용출되는 부위 바로 앞에 1 차로 나타났다. 그러나 갈색물질의 용출부위는 단백질이 많이 용출되는 부위 뒤에 나타난 것으로 분리가 완전히 가능하였다. 그리고 또 하나의 효소단백 peak 가 용출액의 농도를 2 배로 높힌 부위 뒤인 fraction number 62~64에서도 나타났다. 이 두 효소의 peak 차이점은 장시간 반응 시킨 결과 36~39번의 fraction number 에서는 침전이 많이 생겼으나 F. N 62~65 까지의 경우 침전생성이 오히려 적었다.

그러나 36~39번의 효소의 경우 ethylacetate 추출에 의한 발색도도 62~65번과 같이 상당히 낮았음으로 이는 naringenin 으로의 2 차 분해에 의한 것인지를 검사하기 위하여 DEAE-sephadex column chromatography 하였으며 결과는 Fig2. 와 같다.

Fig2. 에 의하면 fraction number 8~13 의 경우 Davis 법에 의한 naringinase 활성도는 크게 높지 않으나 완전 효소반응을 시킨후는 침전생성이 없었으며 ethylacetate 추출후 Davis 법에 의한 측정 결과는 아주 높은 활성도를 나타내었다.

## 3. Naringin 의 효소반응 중간생성물의 확인과 맛물질의 분리정량

DEAE sephadex chromatography 하여 얻은 fraction number 10, 11번 효소의 반응 생성물과 표준 naringin, naringenin 의 thin layer chromatography 한 결과는 Fig. 3과 같다. naringin 이 효소반응한 후 용해화된 시료의 Rf 치는 naringin 과 naringenin 의 중앙에 위치한 것으로 purunin 인 것으로 추정된다.

그리고 상기 효소반응액과 naringin 의 ethylacetate 용출액을 Davis 법에 의한 발색후 흡광도 직선은 Fig. 4와 같다.

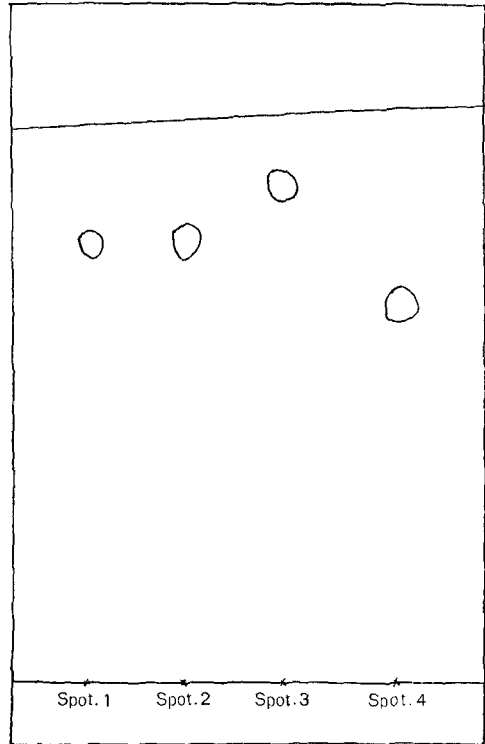


Fig. 3. Thin Layer Chromatogram of Naringin Hydrolyzed, Naringin and Naringenin  
Spot 1. Spot 2: Naringin Hydrolyzed (F. N. 11-12)

Spot 3. :Naringenin Spot 4. :Naringin  
Solvent, Butanol, : Pyridine: Water. 70:15:15.

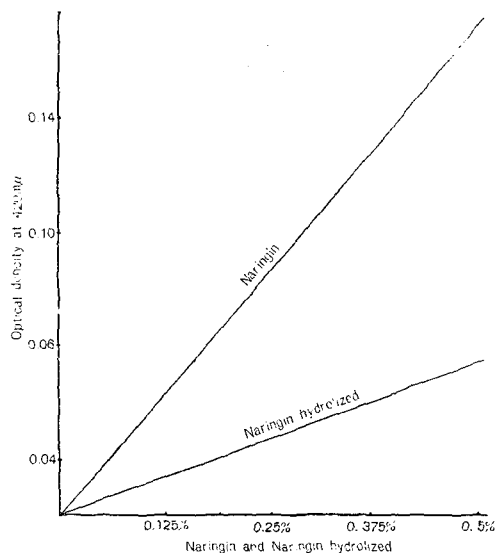


Fig. 4. Standard Curves of Naringin and Naringin Hydrolyzed after Ethylacetate Extraction

#### 4. 여름밀감의 脫苦味에의 이용

여름밀감 과즙의 脫苦味의 경우 Table 1과 같으며 병조림에서는 Table 2와 같다. 병조림의 경우 과육에 효소 처리가 된 경우 과육량이 감소했는데 이는 pectinase에 의한 분해로 생각된다.

**Table 1.** Naringinase Treatment on Chinese Citron Juice.

| Test<br>Treating hour<br>Juice | Naringin content and bitter taste* (mg/100ml) |         |          |
|--------------------------------|---|---------|----------|
|                                | 30 min  | 60 min  | 90 min   |
| Control                        | —   | —       | 25mg(##) |
| Enzyme 1.3mg/ml                | 243mg(##)                                     | 148(##) | 40(-)    |
| Enzyme 2.6mg/ml                | 155mg(##)                                     | 78(±)   | 0(-)     |

※ # strong bitter taste

**Table 2.** Naringinase Treatment on Chinese Citron Glass Packing.

| Treatment        | Naringin content | Sensory test | Flesh weight (g) |
|------------------|------------------|--------------|------------------|
| Control          | 145mg/ml         | ##           | 300              |
| Enzyme 0.75m g/g | 79.8mg/ml        | ±            | 260              |
| Enzyme 1.5mg/g   | 14.5mg/ml        | -            | 205              |

## 고 찰

### 1. 균주의 동정

Naringinase 생산균은 瀧口洋<sup>12)</sup>에 의하면 일부 식물 병원균에도 강력한 균주가 있다는 보고가 있고 그의 여러 연구자들에 의해 많은 연구가 있지만 대부분이 *Aspergillus* 속에 포함되어 있으며 *Aspergillus* 속 중에서는 *Aspergillus usami*, *Asp. usami mut.*, *Shiro-usami*, *Asp. tamari*, *Aspergillus*<sup>13) 14)</sup> *oryzae* 등이 있으나 岡田<sup>15)</sup> 茂孝, 岸清, Thomas<sup>15)</sup> 등에 의해 실용화 되고있는 菌株는 *Aspergillus niger*이다. 본인이 검토한 47株의 균중에서도 *Penicillium* 속 균은 일반적으로 효소 생성력이 *Asp.* 속 보다 약하였으며 *Aspergillus* 속 중 가장 실용성<sup>7)</sup>이 있는 균주는 *Aspergillus niger* S-1이었다.

### 2. Naringin 용해화 효소의 특성

#### ① Naringin 용해화 효소의 결정

岡田 茂孝<sup>15)</sup> 등에 의한 결정화 결과는 acetone의 경우 비슷한 결정형태를 나타내었다. 그러나, 정제방법이나 효소학적 성질의 경우 상당한 차이가 있었다는 것은 실험방법에서 밝힌 바와 같다.

#### ② Naringin 용해화 효소의 정제와 특성

DEAE-cellulose column chromatography의 경우 2보에서 보다 용출액의 량과 농도를 조절하고 fraction의 량을 소량씩한 결과 fraction number 36~39번까지는 침전 생성은 많은 반면 Davis법에 의한 naringinase 활성도는 그다지 높지 않으나 반응물의 ethylacetate 추출에 의한 활성은 높았다. 많은 단백질이 용출되는 부위는 2보에서와 같이 fraction number 50번 부위에 용출되었으며 갈색물질의 용출은 53~58번까지였다. 그리고 용출액인 acetate buffer의 농도를 높힌 부위인 62~64번 까지에 또 하나의 효소 peak가 있음을 Davis法과 ethylacetate 추출에 의한 flavonoid 정량 결과 나타났으며 반응액의 침전이 소량인점으로 naringin이 naringin 용해화 효소에 의한 용해화 된것으로 추정된다. fraction number 36~39까지의 경우 침전 생성이 많았는데 이원인은 naringin이 naringin 용해화 효소에 의해 용해되는 물질로 변화되고 이 물질이 다시 분해되어 naringenin 등이 생성된 때문인것 같다.

### 3. Naringin 용해화효소 반응 생성물의 확인과 정량

Naringin의 효소분해 생성물은 purinin과 naringin이 알려져 있다. purinin은 효소분해에 의해서만 얻을수 있으므로 DEAE-sephadex A-50에 의해 정제된 fraction number 9~11번의 반응액과 표준 naringin과 naringin을 thin layer chromatography한 결과 반응생성물은 Rf치가 Naringin과 naringenin의 사이에 있는 flavonoid인점 naringin보다 용해도가 높은점 등으로 purinin인것으로 추정되나 발색도에 있어서는 岡田<sup>9)</sup> 등의 결과보다 약간 강한 것 같았다. 그러나 naringin 정량에 있어서는 크게 문제시 되지 않을 정도였다. 이런점은 차후 중간 생성물을 다량 정제하여 비교해보아야 될것같다.

### 4. 여름밀감의 과즙과 병조림의 脫苦味

과즙의 경우 과즙 ml 당 1.3mg 효소 첨가의 경우 90분 효소처리로 苦味가 나타나지 않았다. 그러나 naringin과 purinin 분리 정량에 의한 岡田 茂孝<sup>9)</sup>의 결과와 일치 하는지 여부는 더 검토되어야 할것같다. 그리고 병조림 등에 문제시 되는 과육 연화에 관계하는 pectinase의 분비가 적은 균을 선별하였음에도 과육의 감소가 현저한 점으로 pectinase에 대한 연구가 필요한 것으로 사료되며 粗酵素에 함유되어있는 갈색 물질 등을 간편하게

제거하는 방법등이 실용화에 문제시 되는 점이라 할수 있겠다.

## 요 약

① 분리선별한 Naringinase 생산균인 S-1 SP, 은 *Aspergillus niger* 이었다.

② Naringinase 중 정제된 naringin 용해화 효소를 acetone 과 ammonium sulfate 에 의해 결정화 하였다.

③ Naringin 용해화 효소와 naringenin 생성 효소가 DEAE-sephadex A-50 column chromatography 에 의해 분리 되었다.

④ Naringin 용해화 효소에 의해 분해된 물질이 Thin layer chromatography 에 의해 확인되었으며 이물질은 ethylacetate 추출법에 의해 naringin 분리 정량이 가능하였다.

⑤ Crude naringinase 를 여름밀감 과즙과 병조립 달고미에 이용하여 ethylacetate 추출법에 의해 naringin 을 정량하고 食味시험 결과와 비교하였다.

본 연구에 많은 조언을 해주신 경북대학교 농화학과 서정훈 박사님께 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1) 緒方邦安著：園藝食品의 加工과 利用 (養賢堂

日本) 87 (1966)

2) 果汁技術研究会編：果汁ハンドブック (高陽書院, 日本) 上卷56, 292~312, (1960)

3) 富田 次男：食品 工業, 62 12 (1970)

4) 岡田茂孝, 矢野 真弓, 福本寿水郎：日本農學會誌, 38 (5), 242 (1964)

5) 中林敏郎：食品工學會誌, 9, 28, (1962)

6) 기우경, 성낙계：한국농화학회지 13 (3), 237 (1970)

7) 기우경, 김중규, 김명찬：한국식품과학회지 5 (2) 78 (1973)

8) 赤堀四郎編：酵素研究法 (朝倉書店, 日本東京) 第一卷 170~178 (1965)

9) 岡田茂孝, 矢野真弓福本寿一郎：科学と工業 39, 42 (1965)

10) 福井作藏：還元糖の 定量法 (東京大学 出版会：日本) 159 (1971)

11) 緒方邦安著：緒方邦安著：園藝食品의 加工と 利用 (養賢堂, 日本) 313 (1966)

12) 滝 口洋：日本農化学會誌 39, (5) 194 (1965)

13) 岡田 茂孝, 岸清 東原昌孝, 福本寿一郎：日本農化学會誌 37, (2) 84 (1963)

14) 岸 清：科学と 工業 29, 140 (1955)

15) D. W. Thomas, C. V. Smythe, M. D Labbe: Food Research, 23, 591 (1959)