

微生物 Inulase에 의한 돼지감자 중의 Inulin 분해에 관한 연구

金 奇 哲

충북대학 농화학과

(1975년 6월 27일 수리)

Studies on the Hydrolysis of Inulin in Jerusalem Artichokes by Fungal Inulase

Ki-Choul Kim

Dept. of Agricultural Chemistry, Chung Buk National University

(Received, June 27, 1975)

Summary

The analysis of Jerusalem artichoke showed that it contains 12.09% of Inulin. The results obtained from the examination of the conditions for fructose production by cultivating *Penicillium sp 1* in the Jerusalem artichoke medium were as follows:

1. The optimum amount of water added to Jerusalem artichoke was 2.5 l of distilled water per kg of fresh Jerusalem artichoke. In this case, the concentration of Inulin was 4% (w/v).
2. The optimum temperature was 30°C, the initial optimum pH was 5.0 and the optimum cultural period was 72 hours.
3. Shaking culture with 50 ml of the medium and 120 oscills/min in 500 ml shaking flask was most effective as the culture method.
4. 0.1% of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ as a nitrogen source, 0.001% of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.001% of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ as metal salts were most effective.
5. Fructose production continued to increase for 72 hours under the optimum conditions for cultivation and the highest production rate of the Inulin was 95.25%.

緒 論

돼지감자(*Helianthus tuberosus* L. Jerusalem artichoke)는 菊科에 屬하는 多年生の 草木으로 栽培하기 쉽고 反當收穫量(10a當)도 1,100~2,300kg 나 되어 어느作物 보다는 其 收穫量이 많은 便이다. (13) (17) 돼지감자 중의 炭水化合物은 主로 Inulin

으로 되었다. 돼지감자중의 Inulin 成分量은 產地別 또는 收穫期別로 差異는 있으나 普通 還元糖으로 10~16% 程度가 含有되어있다. (2) (5) (7) (11) (17) (21) 그러나 돼지감자의 用度는 1940年代에 飼料로써 약간 利用되었을뿐이고 只今까지 계속 別로 利用度가 없고 따라서 栽培되고 있지도 않다. Inulin은 酸이나 Inulase에 依하여 加水分解되어 果

本 研究는 1974年度 産學協同財團 學術研究費의 支援에 依하여 이루어진 것이다.

糖으로 되어 이용될뿐이다. 故로 돼지감자는 加工處理하지 않고서는 利用的 價値가 적다. 果糖은 甘味科中甘味도가 果糖:蔗糖:葡萄糖=173:100:74의 比로써 가장 높고 營養的 價値가 높아서 食品으로써 가장 좋다. 故로 돼지감자의 利用에 對한 研究는 windisch,⁽²²⁾ R vadas,⁽²⁰⁾ 朝井,⁽²⁷⁾ prescott,⁽¹⁸⁾ victor⁽²¹⁾ 등이 *penicillium*, *Aspergillus* 등의 絲狀菌을 利用하여 돼지감자를 糖化시킨뒤에 酒精醱酵를 實施한 報文이 있으며 또한 Ruediger,⁽¹⁹⁾ 武田,⁽¹³⁾ 川山,⁽¹⁴⁾ 中村⁽¹⁵⁾ 등은 돼지감자를 加酸糖化後 中和하여 酒精醱酵를 實施하였다. 돼지감자를 黃酸으로 加水分解하여 果糖을 製造하는 方法이 있으나⁽¹¹⁾ 同法은 分解液에 含有 되어 있는 果糖을 石灰처럼 果糖石灰化合物로 만든 母液으로부터 分離하고 이것을 炭酸 또는 氫酸에 依하여 分解하고 果糖을 遊離시키어 淸澄의 狀態에서 濃縮後 果糖의 結晶을 調製하는 것이다. 이 方法은 酸加水分解法임으로 夾雜物이 많이 생기고 이것을 除去하기 위해서 여러가지 複雜한 操業이 必要하고 따라서 生成果糖의 損失이 많다. 또한 操作中에 使用되는 모든 機械나 容器가 耐酸性이 強해야 되는 등의 不利한 여러가지의 問題點이 많다. 따라서 製品의 收率도 떨어지고 製品價格도 높게 되어 食品으로써 一般의인 條件이 되지 못한다. 逸見⁽⁷⁾ 등은 絲狀菌을 돼지감자 抽出液培地에 培養後 菌絲의 移植으로 돼지감자를 糖化시키어 果糖甘味料를 調製한 報文이 있다. 最近 國內에서는 甘味資源이 極히 不足하기 때문에 全量을 原糖으로써 外國에서 輸入하고 있다. 甘味資源의 開發을 目的으로 著者⁽¹⁰⁾가 Inulin을 強力히 加水分解하는 力價 높은 絲狀菌 *penicillium sp1*을 分離하였다. 本稿에서는 *penicillium sp1*을 利用하여 돼지감자를 醱酵하여 果糖生産條件을 檢討한 結果를 報告하는 바이다.

I. 實驗方法

1. 供試菌株 *Penicillium SP1*

2. 돼지감자 (*Helianthus tuberosus L.* Jerusalem artichoke)

本大學 實驗園場에서 秋季收穫한 것을 使用.

3. 成分分析

가) 一般成分分析

試料中의 水分 粗蛋白質 灰分 등은 常法에 準하여 各各 定量하였다.

나) Inulin의 定量^{(7) (8) (9)}

風乾돼지감자를 約 1mm 크기以下로 粉碎하고 이 중 2gr을 秤量하여 蒸溜水 50ml를 加하여 서서히 진탕하면서 12時間 放置한 뒤 여과한다. 殘渣를 蒸溜水로 여러번 洗滌하고 前 여액과 合해서 100ml가 되게 한다. 이中 10ml를 取하여 還元糖을 定量하였다. (遊離果糖)

또한 試料 0.5gr을 取하고 여기에 蒸溜水 50ml와 15% HCl 5ml를 加하여 沸騰되는 邊煎中에 1時間 完全히 加水分解시키고 여과한다. 여액을 中和後 증류수를 加하여 100ml로 稀釋한 다음 이 중에서 10ml 取하여 還元糖을 定量하고 全糖으로 하였다. 全糖으로 부터 遊離果糖(還元糖)을 減한 差에 0.9를 乘하여 Inulin量으로 算出했다.

다) 還元糖의 定量⁽⁴⁾

25ml의 標線이 있는 乾燥된 試驗管에 미리 3.5-Dinitrosalicylic acid(DNS)를 3.0ml 넣고 이곳에 試料 1ml를 加하여 잘 混和한 뒤 正確히 100°C에서 5分間 加熱하여 發色시킨 다음 冷水로 冷却하였다.

여기에 蒸溜水를 加하여 正確히 25ml로 稀釋하였다. Blank test는 DNS試藥 3.0ml에 蒸溜水 1ml를 加하여 上法과 같이 處理하였다. 糖標準液의 調製는 D-(—)-fructose를 使用하여 蒸溜水로 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1,000 μ g/ml의 三種으로 調製使用했다.

以上の 試料 Blank test 標準糖液을 波長 500 μ 에서 ATAGO 36形으로 測定하여 糖化率은 percentage로 換算하여 표시했다.

라) 試藥

4.5% NaOH溶液 300ml에 1% DNS溶液 880ml 및 Rochelle Salt 225g을 첨가한다. 別途로 10% NaOH溶液 22ml에 結晶 phenol 10g를 加하여 100ml가 될때까지 蒸溜水를 加한다.

이 phenol溶液 69ml에 NaHCO₃ 6.9g를 加하여 溶解시켜 이것의 全量을 上記 DNS溶液에 넣어 Rochelle Salt가 充分히 溶解할때까지 흔들어 주고 2日間 放置後 여과하여 着色병에 保存하여 使用했다.

4. 果糖生産條件

가) 原料處理

收穫後 一週間 外溫에 放置한 後에 물로 잘 捰고 물끼를 말린 다음 5mm 정도의 細片으로 切斷하고 신선돼지감자 1kg에 對하여 蒸溜水를 1.0l를 加하여 100°C로 1時間 加熱하고 冷却 되기 前에 더운 상태에서 麻布를 利用하여 여과 한다. 殘渣(粕)

는 미리 加熱해둔 蒸溜水 1.5L을 더 加하여 混濁시키고 再次여과하여 殘渣(粕)中の Inulin을 完全히 抽出한다. 이와같은 處理로 新鮮감자 1kg에 對하여 여액 3L을 얻었다.

나) 培養法

上記培地(여액)을 培養液量의 檢討以外는 500ml shaking flask에 50ml씩 分注後 15LBS에서 15分間 殺菌하여 Inulin(EP) 1.0%, corn steep liquor 1.0%, $NH_4H_2PO_4$ 1.0%, KCl 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% Initial pH 5.0의 agar 培養基에서 30°C 5日間 培養한 *Penicillin sp 1*을 1 白金耳接種하여 振動速度에 관한 檢討外는 120 oscills/min으로 振盪培養後 培養液을 10,000 rpm/min으로 遠心萬離하고 其上澄液을 分析試料로 使用했다.

II. 實驗結果 및 考察

(1) 돼지감자의 成分

本實驗에 使用한 돼지감자에 對한主要成分을 分析한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of Jerusalem artichoke used for experiment.

Jerusalem artichoke.	fresh Jerusalem artichoke	dry Jerusalem artichoke
Moisture	80.60(%)	16.73(%)
Total Sugar (fructose)	15.09	63.12
Reducing Sugar (fructose)	1.65	3.19
Inulin	12.09	53.93
Crude protein	1.89	10.33
Ash.	1.14	5.55

위에서 보는 것과 같이 돼지감자중의 炭水化合物은 大部分이 Inulin 成分으로 되어있다.

還元糖은 加水分解하기전에 돼지감자에 含有되어있는 直接還元糖을 말하고 全糖은 Inulin의 加水分解로 생긴 還元糖(果糖으로)과 直接還元糖(果糖

으로)의 合計를 말한다. Inulin 含量은 12.09%로 朝井⁽²⁾ 逸見⁽⁷⁾ 등의 分析值인 12.00~13.94%와 거의 비슷한 數值이다. 水分은 다른 球根類에 比하여 많은 便이다. 그러나 돼지감자는 收穫한 狀態로나 地下에서 自然狀態로 貯藏하는데 腐敗率이 적은 特性을 가지고 있다.

(II) 果糖生産條件

가) pH

pH에 依한 最適果糖生産條件을 알기 위하여 本培地의 pH를 磷酸緩衝溶液⁽¹²⁾과 非緩衝溶液으로써 1N-NaOH와 1N-HCl로 調節한 Initial pH로 각각 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0으로 하여 30°C 72時間 培養한 結果는 fig 1과 같다. 果糖生産 opt pH는 非緩衝溶液 pH 5.0와 磷酸緩衝溶液 pH 4.0으로 나타났다. 이때의 最高收率은 磷酸鹽緩衝溶液의 pH 4.0나 非緩衝溶液의 pH 5.0이 共히 91~93%경도로 別差異가 없으며 本實驗의 結果는 朝井⁽¹⁾의

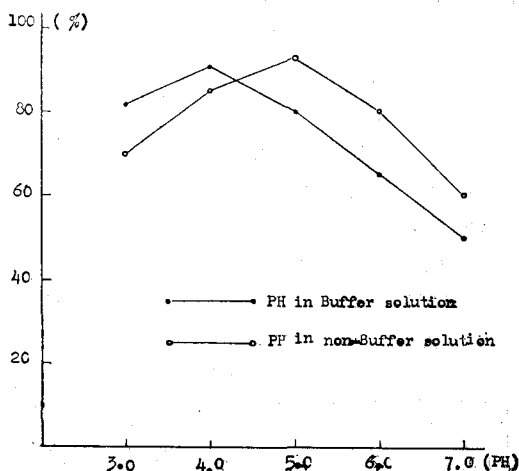


Fig. 1. Effect of cultural pH on the fructose production (after 72 hrs. at 30°)

Table 2. Effect of concentration of media on the fructose production

Concentration	media volume	Inulin	Cultural time (hrs)					
			0 (%)	24 (%)	48 (%)	72 (%)	96 (%)	122 (%)
1 : 1	1,700 ml	7.0	0.825	48.10	55.35	76.01	83.66	81.50
1 : 1.5	2,142 ml	5.7	0.660	45.02	54.23	78.09	85.05	83.20
1 : 2.0	2,570 ml	4.6	0.550	50.00	60.26	87.05	89.20	85.55
1 : 2.5	3,000 ml	4.0	0.471	52.23	65.34	92.01	82.30	75.32
1 : 3.0	3,428 ml	3.5	0.412	52.03	65.29	88.27	80.21	70.00
1 : 3.5	3,857 ml	3.0	0.366	53.55	70.30	85.03	76.25	68.26

絲狀菌 Inulase 最適 pH 4.4와 거의 같은 경향이고 逸見⁽⁷⁾의 最適 pH 4.1이나 H, Pringsheim⁽⁶⁾의 最適 pH 3.8보다는 약간 낮은 便이다 故로 본 實驗에 使用되는 培地의 pH는 非緩衝溶液의 Initial pH 5.0으로 調節하여 使用한다.

나) 培地의 濃度

本培地의 最適培地濃度를 알기 위하여 新選돼지 감자 1kg에 對하여 加水量을 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5l의 比로 하여 抽出濾液을 만들어 培養한 結果는 table 2와 같다.

일반적으로 濃도가 높은 培地에서는 낮은 培地에서 보다 果糖生産速度는 느리었으나 最終生産量은 亦是 높았다. 果糖生産에 對한 最適加水量은 新選돼지감자 1kg에 對하여 2500ml區가 收率이가장 높았다.

다) 培養溫度

加水量을 2.5倍로 하고 Initial pH를 5.0으로 調節한 培地에 對한 果糖生産의 最適培養溫度를 알기 위해서 培養한 것은 fig. 2와 같다.

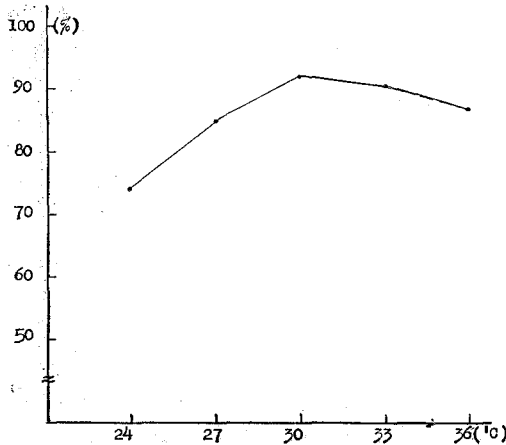


Fig. 2. Effect of culturing temperature on the fructose production (after 72hrs)

果糖生産最適溫度는 30~33°C 이고 底溫에서는 高溫 보다 生産率이 低下되었다.

본 結果는 中村⁽¹⁶⁾등이 報告한 penicillium 속의 Inulase 生産溫度인 30°C 와는 같은 경향이고 朝井⁽¹¹⁾의 絲狀菌 Inulase 의 生産適溫인 37°C 보다는 크게 差異가 있다.

라) 靜置培養과 振盪培養

培養方法에 對한 果糖의 最適生産條件을 알기

위해서 靜置培養과 振盪培養을 한 結果는 fig. 3과 같다. 靜置培養이 振盪培養보다 果糖生産收率도 떨어지고 培養期間도 2배나 所要된다.

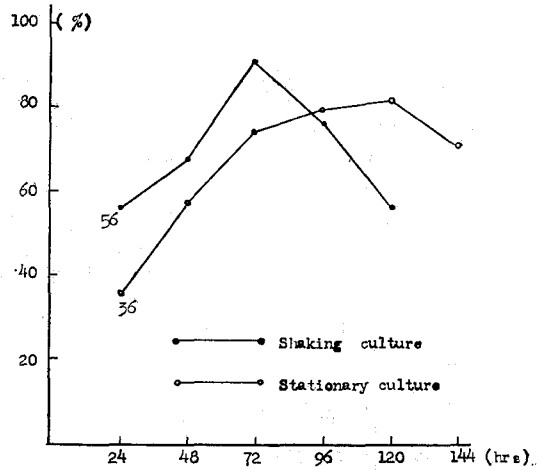


Fig. 3. Effect of stationary and Shaking culture on the fructose production,

마) 培養液量

通氣量과 培養液量에 對한 果糖生産의 最適條件을 알기 위하여 본 培地를 500ml Shaking flask 에 20, 50, 80, 110, 140ml씩 分注하고 培養한 結果는 fig 4와 같다. 最適培養液量의 範圍는 Shaking flask 500ml 용에 20~50ml 이고 80ml 까지도 약간 減少는 했지만 別로 大差는 없었다.

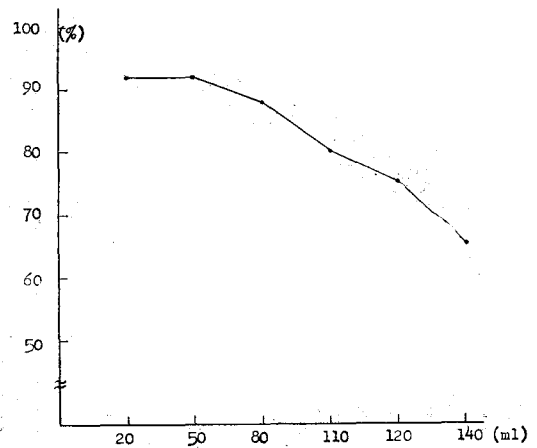


Fig. 4. Effect of cultural Solution volume on the fructose production (after 72hrs at 30°C)

마) 振盪速度

본 培地를 使用하여 振盪速度가 果糖生産에 미치는 影響을 實驗한 結果는 fig 5와 같다. 前記라 項에서도 나타난 바와 같이 靜置培養과 振盪培養과는 果糖生産에 미치는 影響은 상당히 크다. 最適振盪速度는 120oscills/min 內外이다.

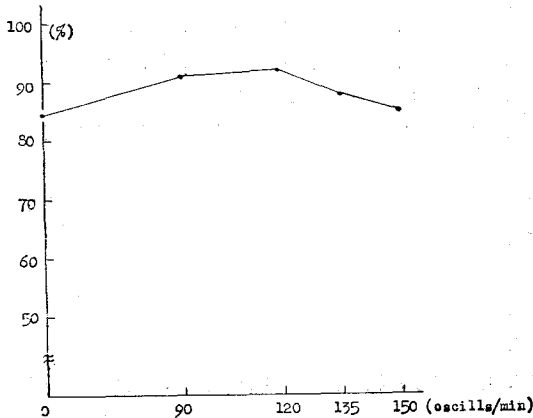


Fig 5. Effect of velocyaty of oscillation on the fruetose production(after 72hrs at 30°C)

사) 窒素源의 添加

본 培地의 果糖生産에 對한 窒素源의 影響을 檢討하기 위하여 各種 窒素의 濃度를 달리하여본 培地에 添加後 培養한 結果는 Tabel 3와 같다. 無機 窒素源은 $NH_4H_2PO_4$ 以外에는 果糖生産을 增加시키지 못했고 오히려 농도가 增加함에 따라 減少의 傾向이었다. 有機窒素源은 一般的으로 果糖生産에 좋은 影響으로 나타났으나 뚜렷한 큰 効果는 얻지 못했다.

Table 3. Effect of nitrogen source on the fructose production. (after 72 hrs. at 30°C)

Concentration	Amount of fructose (%)			
	0.001 (%)	0.010 (%)	0.100 (%)	0.500 (%)
N-Sources				
NH_4Cl	89.72	86.35	85.40	80.23
$(NH_4)_2SO_4$	87.28	89.26	85.00	82.00
$NH_4H_2PO_4$	90.06	90.01	93.28	87.26
$(NH_2)_2CO$	87.31	85.31	83.23	78.21
$NaNO_3$	86.24	87.37	82.51	79.23
Yeast extract	89.23	90.11	90.21	88.00
C.S.L.	88.71	90.29	91.01	89.91
Peptone	89.71	91.23	90.11	89.28

아) 金屬鹽 添加

果糖生産에 對한 金屬鹽을 檢討하기 위하여 본 培地에 各種 金屬鹽의 濃度를 달리 添加하여 培養한 結果는 Table 4와 같다. 金屬鹽類의 添加도 果糖生産에 큰 影響은 나타나지 않았으나 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 나 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 0.001% 添加區만이 無添加區보다 다소 增加를 보았다. 其他의 金屬鹽類는 添加濃度가 增加함에 따라 無添加區보다 오히려 減少되었다.

Table 4. Effect of additional metal salts on the fructose production(after 72 hrs, at 30°C)

Metal Salts	Amount of fructose (%)			
	0 (%)	0.001 (%)	0.01 (%)	0.1 (%)
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	92.26	90.21	86.00	80.31
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	"	92.23	87.12	79.26
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	"	94.00	90.21	82.03
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	"	89.23	85.21	79.01
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	"	86.59	81.23	75.23
NaCl	"	89.75	90.01	80.13

자) 最適培地와 培養日數

供試菌株를 JeruSalem artichoke water extract (4% W/V extraction at 100°C for 1hrs) 1l, $NH_4H_2PO_4$ 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, Initial pH 5.0와 같은 最適培地에 接種하여 30°C 120oscills/min 의 Shaking cultuze 로

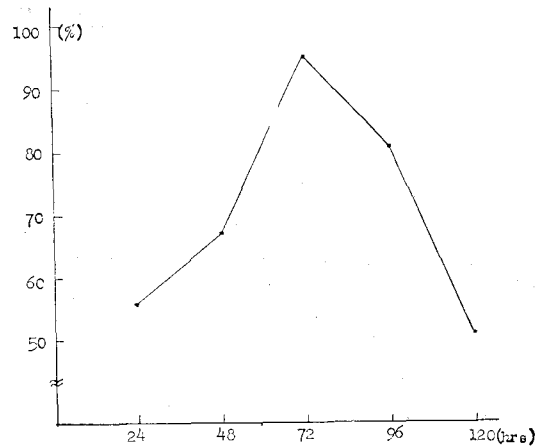


Fig. 6. Effect of culturalperiod on the fructose production

24—120hrs 까지 培養한 結果는 fig. 6과 같다. 果糖生産量은 72 hrs까지는 계속 增加하여 92.25%까지 達했다가 점점 減少하여졌다. 이러한 實驗結果는 中村⁽¹⁶⁾가 報告한 絲狀菌 Inulase 最適培養日數 6—7日과 朝井⁽¹⁾가 報告한 penicillium 속을 37°C에서 6日間 培養한 것보다는 短縮되었고 逸見⁽⁷⁾이 報告한 72 hrs 結果와는 거의 一致하였다.

摘 要

돼지감자를 分析하여 炭水化合物으로써 存在하고 있는 Inulin 성분량이 12.09% 含有하고 있음을 確認하였다. *penicillium sp 1*을 돼지감자培地에 培養하여 果糖生産條件을 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. 돼지감자에 對한 最適加水量은 신선돼지감자 1kg에 對하여 蒸溜水 2.5l이다. 이때의 Inulin 濃度는 4%(W/V)이었다.

2. opt. temp는 30°C, opt pH는 Initial pH로 5.0, opt cultoral period는 72 hrs 이었다.

3. 培養方法은 500ml shaking flask에 培地量을 50ml로 하고 120oseills/min으로 shaking culture가 가장 効果的이었다.

4. 窒素源으로써는 $NH_4H_2PO_4$ 0.1%, 金屬鹽으로써는 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%가 가장 効果的이었다.

5. 最適培養條件下에서 果糖生成은 72 hrs까지 계속增加되었고 最高의 生産量은 95.25%이었다.

參 考 文 獻

1. 朝井勇宣：日釀協誌 15, 771-750 (1937)

2. 朝井勇宣：日釀協誌 15, 849-853 (1937)
 3. 武田, 四屋：日工業化學雜誌 343, 501 (1937)
 4. 福井作藏：化學と 生物, 3(9) 37 (1965)
 5. Hamilton, P. Traus & Others; Journ. Agric. Res 39, 551(1929)
 6. H. Pringschcim; Ber. 55, 1414(1922)
 Zeit. f. Physial. Chem., 133 80; 65, 1242-48(1931) 64, 143 (1931)
 7. 逸見文雄, 富田寬武：日農化誌, 19, 816(1943)
 8. 逸見文雄, 富田寬武：日農化誌, 20, 221(1943)
 9. 逸見文雄, 友枝乾夫：日農化誌, 19, 383(1943)
 10. 金奇哲：韓農化, 18, 42-51 (1975)
 11. 京都大學農學部·農藝化學教室編 新改版 農藝化學實驗書, 3, 1300(1960)
 12. Macll voine: J. Boil, Chem., 19, 183 (1921)
 13. 松田透雄：食用作物, 産業圖書株式會社, 346 (1948)
 14. 川山：日釀協誌, 15, 635, 892(1937)
 15. 中村松雄：日化學工業資料 10, 1, 33, (1937)
 16. 中村豐彦, 帆足信一郎：日農化誌, 43, 599-605 (1969)
 17. 西川五郎：工藝作物學, 448(1963)
 18. Prescott and Dum; Industrial microhiology Second Edition 135(1945)
 19. Ruediger: Zeit. f. Spiritusindust 43, 203 (1920)
 20. R.Vadas: Chemik zeit, 249 (1934)
 21. Victor R. Boswell & Others: U.S. Dep. of Agric. Washington, Tech, Bull. 514, 12(1936)
 22. Windisch; Zeit, f. Spiritusindust 43, 292(1920)