

## *Aspergillus niger* S-1이 생산하는 Hesperidin 분해효소에 관한 연구

기 우 경  
경상대학 식품가공학과

### Studies on the Hesperidinase of *Aspergillus niger* S-1

Woo Kyung Ki

Department of food processing

Kyung-Sang University

(Received October 6 1976)

#### Abstract

*Aspergillus niger* S-1 was proved to be a good hesperidinase producer which have been selected for naringinase utilization. Enzyme of this strain had good characteristics and purified relative high degree with good recovery by ammonium sulfate or acetone treatment. Results obtained were summarized as follows

- (1) The enzyme was most active at 60°C, when the reaction was performed in the pH 4.0 for 30min. Optimum pH for enzyme activity was 5.0 and activity was retained 78% at pH value 3.5.
- (2) Hesperidinase activity retained 95% of its full activity after treatment at 60°C for 30min at pH value 4.0., 70% at 70°C and 65% at 80°C. Most stable pH of this enzyme was showed 5.0 after treatment for 24hr at 4°C
- (3) Only Magnesium ion activated enzyme reaction, while other metallic ions, Cu<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Pb<sup>++</sup>, Mo<sup>++</sup>, Ag<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup> inhibited.
- (4) Eleven fold purification with 35% recovery was obtained in the case of 60% acetone treatment and 10-fold purification with 5.6% recovery was showed with 40% acetone comparing to the crude extract Enzyme.
- (5) Crude enzyme precipitated with 0.4—0.6 saturated ammonium sulfate contained 13% of the original enzyme activity with 48-fold increase in specific activity and enzyme has been purified 25 fold with a yield 19% by 0.6—0.8 saturation.
- (6) Hesperidinase formation was noticeably increased by addition of small amount of orange-peel extraction on the wheat bran medium.

#### 서 론

Hesperidin 분해효소의 밀감 가공에의 이용은 岡

田<sup>(1,2,3)</sup> 등에 의해 연구되어 실용화 되고 있다. 우리나라에서도 매년 밀감 생산량이 증가하여 1974년에는 3000% 이상이 생산<sup>(4)</sup> 되었고 더 증가될 추세이다. 그에 따라 많은 양이 수출되고 있으나 밀

감 가공에 백탁 물질인 Hesperidin을 제거 하는 효소제의 이용이나 개발은 하지 않았기 때문에 상품의 다양화와 국제 경쟁에서 손색이 없는 상품의 개발은 되지 못한다고 생각하여 이미 발표한 Narin-ginase<sup>(5,6,7)</sup> 생성 우수균인 *Aspergillus niger* S-1 이 동시에 Hesperidinase를 강하게 생산한다는 것이 확인되어 이 균의 Hesperidin 분해 효소의 효소학적 특성과 효소 단백질의 특성 등에 관하여 실험한 결과를 발표하고자한다.

### 실험 방법

1. 효소액의 조제 : 밀기울과 수도물을 동일 중량비(W/V)로 혼합하여 삼각 후라스크에 약 1/4량 넣고 고압 살균 후 *Aspergillus nigr* S-1 균의 포자를 접종하여 30°C에서 6일간 정온 배양한후 0.85% 식염수 4~5 배로써 1시간 정도 심온에서 추출한 후 착즙하여 8,000rpm에서 20분간 원심분리하여 이를 효소액으로 사용하였고 이 효소액을 유안으로 0.75 포화시킨 후 침전을 용해시켜 3일간 투석한 후 효소액으로 사용하였다.

2. 효소의 활성 특성 : 거질인 Hesperidin(東京化

成工業) 적량을 취하여 N-NaOH로 용해하고 N-HCl로 중화한 다음 McIlvaine's Buffer (pH 4.0를 최종 M/20되게 가한 기질 0.75% 용액 으로부터 4 ml과 효소액 1 ml를 60°C에서 30분간 반응시켜 효소 작용에 의해 생성된 환원당 전량을 Somogi 방법으로 측정하여 Glucose로 환산 1 mg을 생성한 경우 1 unit로 표시하였다.

3. 효소단백의 정량 : 표준 단백질을 Bovine serum albumin으로하여 Folin-ciocalteu method<sup>(8)</sup>로 발색시켜 750m $\mu$ 에서 HITACHI-MPS 5,000 spectro photometer로 흡광도를 측정하여 표준곡선을 만들고 같은 방법으로 효소 단백질의 함량을 발색 비교 정량 하였다.

### 결과 및 고찰

1. 최적 pH : pH 2.2부터 7.0까지 여러 pH의 반응액을 40°C에서 30분간 효소반응을 시킨 결과 Fig.1과 같이 pH 5.0에서 최대활성을 보였으며 그리고 온주밀감중 pH 3.5<sup>(9)</sup> 정도인 낮은 경우에서도 78% 이상의 활성을 보일것으로 추측된다.

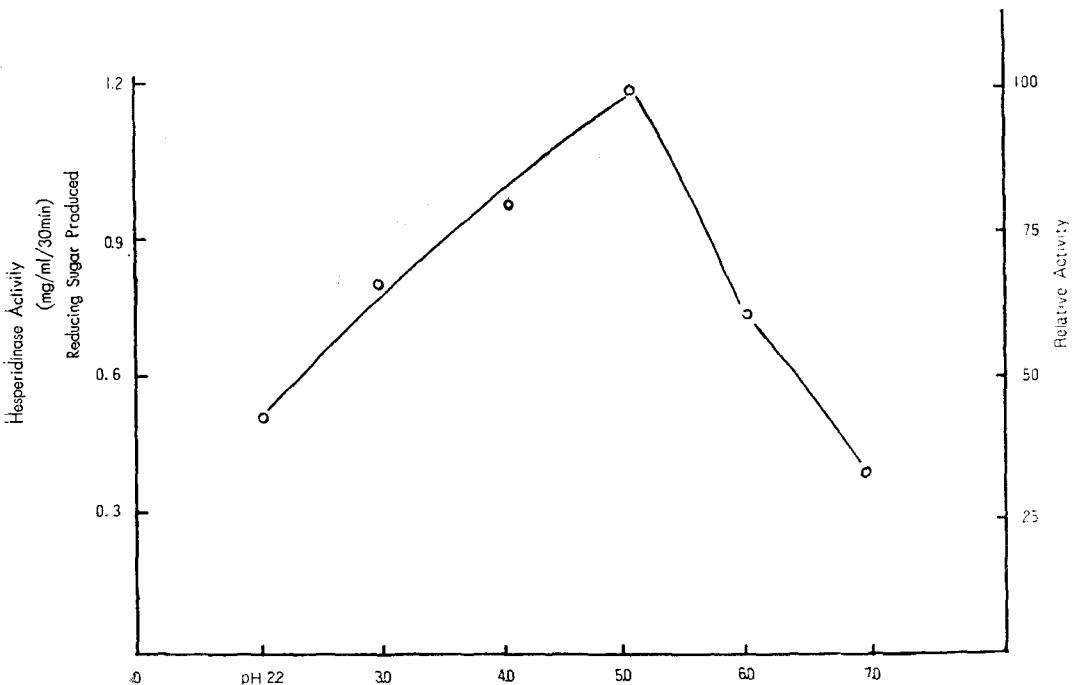


Fig. 1. Effect of pH on Hesperidinase Activity. Reaction conditions: 60°C, 30min.

## 2. 효소반응에 미치는 온도의 영향

반응액의 pH를 4.0으로 하고 각각의 온도에서 30분 반응 시킨후 효소반응 최적온도를 검토한 결과 Fig. 2에서와 같이 상당히 고온인 60°C에서 최

적활성을 가지는 효소이었다. 그러므로 이 효소는 과즙 시럽에 첨가하여 사용할 수 있는 산업상 이용<sup>(10)</sup>에 적당함을 알 수 있었다.

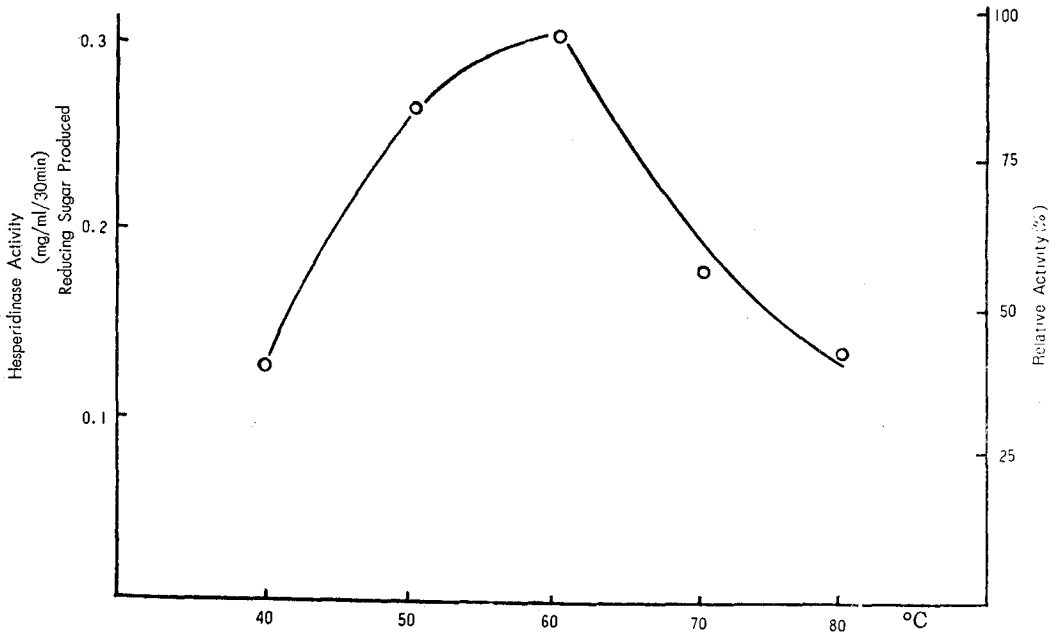


Fig. 2. Effect of Temperature on Hesperidinase Activity, Reaction conditions: pH 4.0, 30min.

3. pH에 대한 안정성: 효소액을 pH 3.0에서 7.0까지로 하고 4°C에서 24시간 처리한 다음 pH 안정성을 반응액의 pH를 4.0으로 하고 60°C에서 30분간 반응 시켜 안정성을 비교한 결과 pH 5.0에서 가장 안정하였으며 pH 4.0이나 6.0에서도 80% 이상의 활성을 가지고 있었다.

4. 열에 대한 안정성: pH 4.0의 효소액은 밀전된 시험관에서 여러 온도에서 30분간 열처리한 후 열처리를 하지 않은 효소와 활성을 비교한 결과 Fig 4와 같다. 그림에서 60°C까지는 95% 이상의 활성을 가지며 70°C에서 80%, 80°C에서는 65% 이상의 활성을 가지는 비교적 내열성 효소로서 이는 岡田 등의 경우보다 더 내열성이 강한 결과였다.

5. 각종 금속이온이 효소 반응에 미치는 영향: 효소 반응에 미치는 금속이온의 영향을 검토하기 위하여  $MnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $Pb(CH_3COO)_2$ ,  $Na_2MoO_4$ ,  $AgSO_4$ ,  $(C_6H_5CH_2COO)_2Hg$  등의 금속염을 반응액에 Table 1에서와 같은 농도로 첨가한 후 효소반응을 시켜 활성도를 비교한 결과  $Mg^{++}$ 은  $10^{-1}$  이

외의 저농도에서는 활성화한 반면 다른 금속이온은 농도에 관계없이 효소반응이 저하되었다.

6. Acetone에 의한 정제: 배양물로부터 추출하여 원심분리한 효소액 (pH 6.0)에  $-10^\circ C$ 로 냉각한 Acetone을 40%로부터 80%까지 가하고 이를 8,000rpm에서 20분간 원심분리하여 회수한 다음 Acetone을 제거하고 동일 효소용량이 되게 Mac-Irvine's Buffer (pH 4.0)에 용해시킨 다음 효소의 활성도와 단백질 함량을 측정하여 정제도와 회수율을 비교한 결과 Table 2와 같다. 즉 60% Acetone 침전의 경우 10.9배로 정제되었고 35%가 회수되었으며 그 다음 40% Acetone 처리의 경우 9.8배 순위로 정제되었으나 회수율은 5.6%로 너무 손실이 많으며 Acetone 70%나 80%일 경우 정제도는 점차 떨어지나 회수율은 Acetone의 농도 증가에 따라 각각 36%, 38%로 약간 증가하였다.

7. 효소의 유안에 의한 정제: 배양물로부터 얻은 조효소액 (pH 6.0)을 유안으로 분획 침전시켜 각각을 증류수와 Buffer (pH 5.0)에 3일간 투

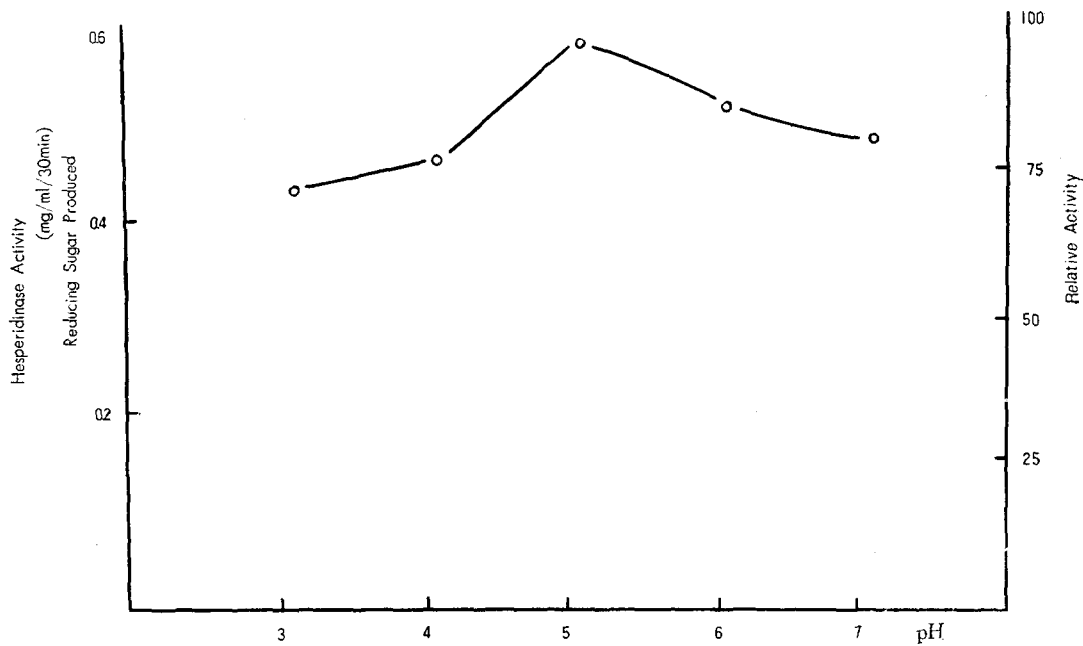


Fig. 3. Effect of pH on Stability of Hesperidinase. Reaction conditions: 60°C, pH 4.0, 30min

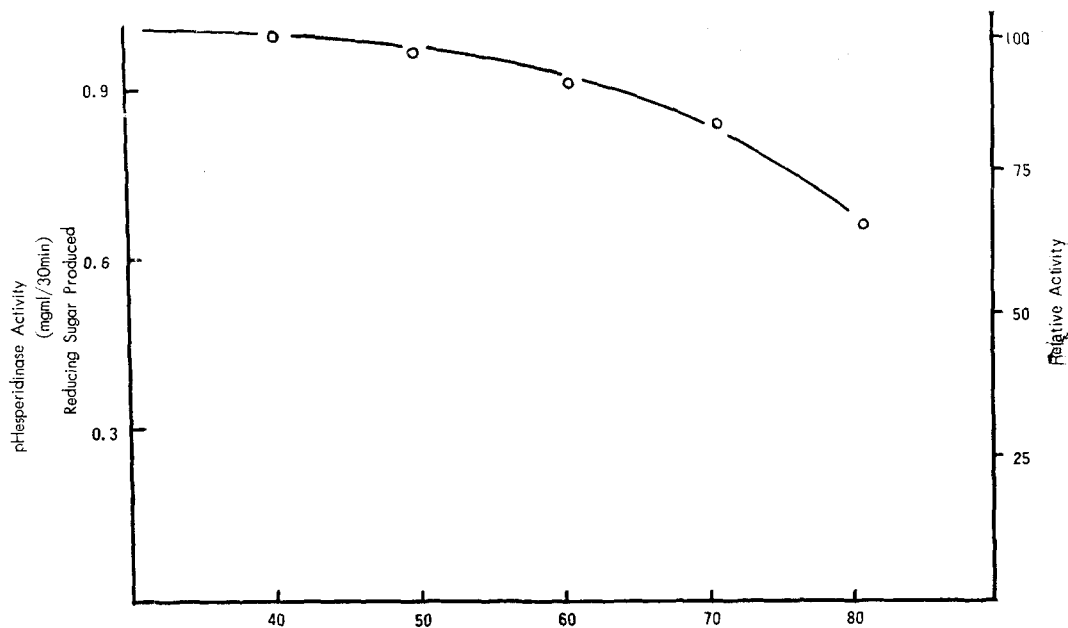


Fig. 4. Effect of Temperature on Stability of Hesperidinase. The enzyme was treated under various temperatures for 30 minutes before its activity was measured. Reaction conditions: 60°C, pH 4.0, 30min.

**Table 1.** Effects of metallic ions on crude Hesperidinase reaction.

Metallic Ions	Ionic concentration (Moles/Reaction mixture) and Activity			
	$1 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$
MgSO <sub>4</sub>	0.53	0.08	1.08	0.99
CuSO <sub>4</sub>	0.14	0.73	0.83	0.88
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0.16	0.87	0.85	0.87
Na <sub>2</sub> MoM <sub>4</sub>	0.57	0.78	0.75	0.78
MnSO <sub>4</sub>	0.78	0.80	0.77	—
none		0.98		

Dilution degree of each Saturated solution				
Dilution Metallic Ion	$4 \times 10^{-1}$	$4 \times 10^{-2}$	$4 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-4}$
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.69	0.72	0.84	0.78
(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> COO) <sub>2</sub> Hg	0.42	0.57	0.69	0.97

※Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub>Hg were slightly dissolved in water.

**Table 2.** Aceton Precipitation of Hesperidinase. The pH of initial extract was 6.0 and the enzyme was centrifuged at 8000rpm for 20 min, after cold aceton treatment. The precipitate was dissolved with MacIlvaine's buffer (pH 5.0) and then activity was assayed.

Procedure	Enyme-concentration (unit 1 ml)	Protein (mg/ml)	Total unit	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification
Initial extract	1.6	10.4	16	0.153	100	1
Aceton 40%	0.09	0.06	0.9	1.5	5.6	9.8
Aceton 60%	0.563	0.34	5.63	1.661	35.3	10.9
Aceton 70%	0.575	0.44	5.75	1.3	35.9	8.5
Aceton 80%	0.61	0.575	6.1	0.942	38.1	6.1

석하여 정제도와 회수율을 비교한 결과 Table 3과 같이 0.4~0.6 포화 분획에서 조효소일 경우 보다 48.4배 정제되었으며 13.4%가 회수되었다. 0.6~0.8 포화의 경우 23.7배로 19%가 회수되었다. 이는 이 균이 생성하는 Naringinase의 경우 0.75~1 포화의 경우 가장 정제도가 우수하며 Total activity도 0.25~0.75 포화 보다 크게 차이가 없는 경우라는 차이가 많은 결과이었다.

그리고 이 효소액을 유산으로 0.75포화시킬 경우 용액의 pH에 따라 회수되는 효소의 활성도를 비교하기 위하여 각 pH별로 동일량의 효소액을 침전시키고 침전을 용해하여 투석시킨다음 동일 효소 용량으로 하여 회수되는 상태를 비교한 결과 Fig. 5에서와 같이 pH 4.0~5.0에서 가장 많이 회수되었다. 그러므로 이효소의 등전점은 pH 4.0~5.0에 분포하리라 생각된다.

8. 밀감 과피 추출물이 효소생산에 미치는 효과  
수분 함량이 54%인 온주밀감 과피에 대해 2배

**Table 3.** Fractional Purification of Cultured Extract. Enzyme by Ammonium Sulfate. Salted enzyme was dialyzed 3 day against water and buffer (pH 4.0)

	Enzyme Concentration	protein (mg/ml)	Total unit	Specific activity	Yield
Initial extract	1.6	0.502	400	0.153	100
0~0.4	—	0.05	—	—	—
0.4~0.6	0.89	0.12	53.4	7.41	13.35
0.6~0.8	1.27	0.35	76.2	3.63	19.05
0.8~1	0.36	0.2	21.6	1.8	5.4

량의 수도물을 넣고 끓여 추출한 액을 원심분리하고 pH를 조정하여 이 추출물을 여러 비율로 수도물 대신 첨가하여 배양기를 만들고 효소를 생성시킨 다음 3배량의 생리식염수로 추출하여 효소생성

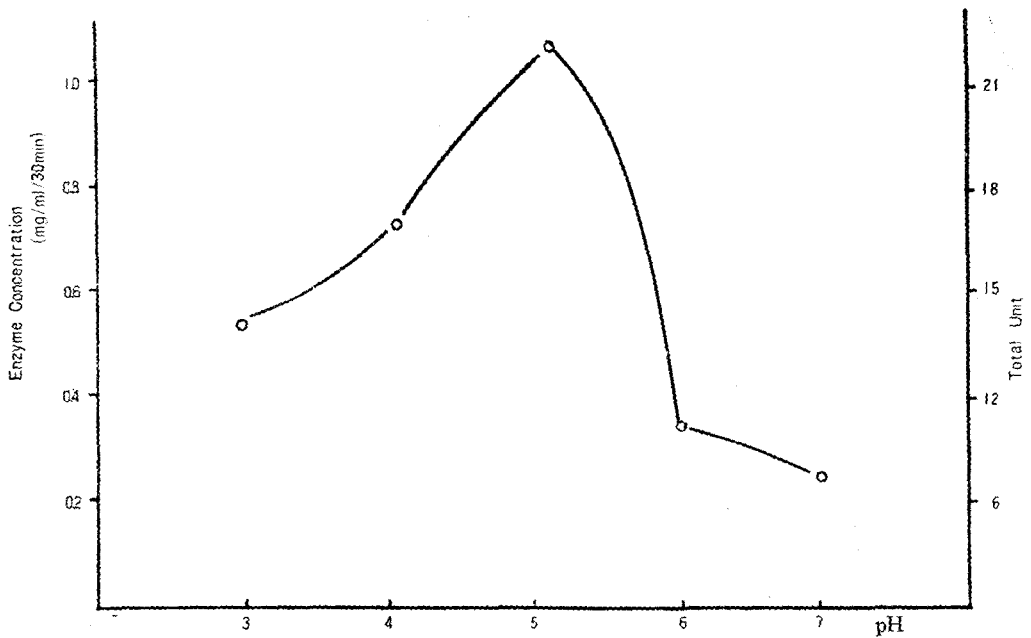


Fig. 5. Ammonium sulfate precipitation by change of pH. Enzymes were precipitated with 75% Ammonium sulfate at various pH and dialyzed against water or Buffer (pH 5.0) for 3 days at 0°C

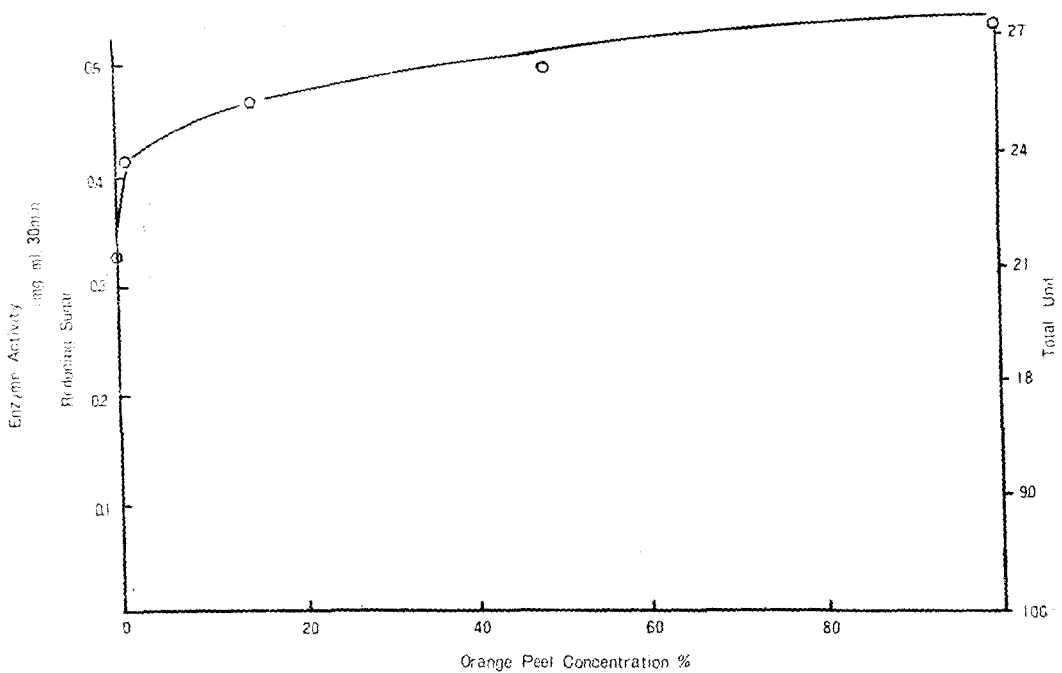


Fig. 6. Effect of Orange peel added to the Culture Medium on the Formation of Hesperidinase.

을 비교한 결과는 Fig. 6 과 같이 수도물 대신 과피 추출물 0.05% 첨가한 경우 현저한 효과가 있었으며 15%까지는 그효과가 계속 상승하나 그이상의 첨가일 경우 증가량은 크지 못하였다. 이러한 효소 생산의 증가는 배양기 조제에서 좀더 검토가 있으면 더 많은 증가를 가져오리라 고려된다.

## 요 약

산업상 이용에 적합한 분리 선정된 Naringinase 생산 균주인 *Aspergillus niger* S-1은 동시에 Hesperidinase를 강력히 생산함이 확인 되었으며 이 균주가 생산하는 Hesperidinase의 효소학적 성질을 요약하던 다음과 같다.

1. pH 4.0에서 30분간 반응 시켰을때 최적 온도는 60°C 이었으며 최적 작용 pH는 5.0이었으나 pH 3.0에서는 70% 활성을 보였다.

2. pH 4.0에서 30분간 열처리 하였을 경우 60°C로 열처리한 결과 90%, 70°C일 경우 70%, 80°C일 경우 65%의 활성을 가지는 비교적 내열성 효소이었다. 그리고 pH에 대한 안정성은 4°C에서 24시간 보존한 결과 pH 5.0일 경우 가장 안정 하였다.

3.  $Mg^{++}$  이온은  $1 \times 10^{-2}M$ 이하부터는 활성화하였으나  $Cu^{++}$   $Mn^{++}$   $Pb^{++}$   $Mo^{++}$   $Ag^{++}$   $Hg^{++}$  등은 저해 하였다.

4. 효소를 Aceton 처리할 경우 60% Aceton 처리에서 배양 추출물의 경우 보다 11배 정제되었으

며 35%가 회수 되었으며 40%의 Aceton 처리일 경우 10배 정제되었으며 5.6%가 회수 되었다.

5. 배양 추출 효소를 유안으로 염색할 경우 0.4~0.6 분획 침전 시킬 경우 48배 정제되었으며 처음 효소의 13%가 회수되었고 0.6~0.8포화 분획에서도 19%가 회수되었고 25배 정제되었다.

6. Hesperidinase 생성은 약간량의 밀감 과피 추출물의 첨가로 현저히 증가 하였다.

- (1) 岡田 茂孝, 岸 清, 東原 昌孝, 福本 壽一郎 : 日本 農化會誌, 37 (2) 84 (1963)
- (2) 岡田 茂孝, 岸 清, 東原 昌孝, 福本 壽一郎 : 日本 農化會誌, 37 (3) 142 (1963)
- (3) 岡田 茂孝, 岸 清, 東原 昌孝, 福本 壽一郎 : 日本 農化會誌, 37 (3) 146 (1963)
- (4) 농업 협동조합 중앙회 : 농업 년감 46 (1975)
- (5) 기우경, 성낙계 : 한국농화학회지, 13 (3) 237 (1970)
- (6) 기우경, 김종규, 김명찬 : 한국식품과학회지, 5 (2) 78 (1973)
- (7) 기우경 : 한국산업미생물회지, 2(2) 111(1974)
- (8) 安藤銳郎, 寺山安, 面澤一俊 : 生化學 研究法 II, 朝倉書店, 東京, 442 (1968)
- (9) 박노풍, 변광의, 백자훈 : 한국식품과학회지, 4 (4) 285 (1972)
- (10) 富田 治男 : 食品工業, 62 12 (1970)