

食品工業에 利用되는 酵素의 生産과 製品化에 關한 研究

—果汁의 淸澄에 使用하는 強力한 微生物珮틴分解酵素의 開發—

鄭 萬 在
忠北大學校 農科大學 農化學科
(1978년 4월 7일 수리)

Studies on the Manufacture and Production of Enzyme Utilizing for the Food Industry

Development of the powerful microbial pectic enzyme utilizing
for the clarification of fruit juice.

by

Man-Jae Chung

Dept. of Agricultural chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk National University.

(Received April 7, 1978)

Abstract:

Among the strains isolated from the various sources, the strain AC-12 producing a powerful pectinase was selected by the extensive screening test. The selected strain was indentified and its toxicity investigated. The conditions of the pectinase production, the characteristics of the purified enzyme and the clarification effect on the apple juice were studied.

1. The selected strain AC-12 was identified by the classification method of paper and fennel and named as *Aspergillus* sp. AC-12.
2. As a result of the breeding test of the white mouse, no toxicity was found from this enzyme.
3. The yield of pectinase in the medium of defatted rice bran was much better than that in the medium of wheat bran.
4. The optimum conditions for the culture of the strain in the medium of defatted rice bran were that the cultural time was 72hrs, the amount of water to be added about 80%, temperature 30~35°C and pH 3.0~5.0.
5. The yield of pectinase was slightly increased by the addition of pectin to the medium of defatted rice bran and by the addition of pectin, NaNO₃ and K₂HPO₄ to the medium of wheat bran, respectively.
6. The optimum conditions for the enzyme activity were pH 3.0~4.0 and temperature 40~50°C. The enzyme was stable below 40°C and pH 2.0~8.0, respectively. But above 50°C, this enzyme was abruptly inactivated. The activity was slightly increased by the addtion of MnSO₄ and CuSO₄.
7. It was regarded that the optimum temperature for the clarification of the apple juice was 40~50°C, the optimum pH 3.0 and the optimum concentration of the enzyme 0.1%, and the apple juice was almost clarified by the reaction at 45°C for 60 minutes.

* 本研究은 1977年度 産學協同財團學術研究費로 이루어졌으며 아울러 財團에 謝意를 表하는 바이다.

結 論

Pectin 分解酵素는 高等植物 및 微生物界에 널리 分布되어 있으며 食品工業과 밀접한 關係를 가지고 있는 酵素로서 果汁 및 果實酒 등의 澄清에 널리 利用되고 있다. Pectinase는 protopectinase, pectin esterase 및 polygalacturonase로 三大別하며 polygalacturonase는 다시 endopolygalacturonase, endopolymethylgalacturonase, exopolygalacturonase 및 exopolymethylgalacturonase로 細別하고 있다.

Pectinase의 生産菌株로는 *Erwinia aroidae*,^(1,2,8) *Erwinia carotovora*,^(1,2,8) *Bacillus mesentericus*,⁽⁴⁾ *Bacillus polymixa*,⁽⁶⁾ *Clostridium jelsineum*,⁽⁶⁾ *Clostridium lamigani*,⁽⁷⁾ *Pseudomonas prunicola*,⁽⁸⁾ *Pseudomonas maginalis*,⁽⁹⁾ *Saccharomyces fragilis*,⁽¹⁰⁾ *Candida utilis*,⁽¹¹⁾ *Hansenula anomala*,⁽¹¹⁾ *Aspergillus niger*,^(12,13) *Aspergillus foetidus*,⁽¹⁴⁾ *Aspergillus wentii*,⁽¹⁵⁾ *Aspergillus oryzae*,⁽¹⁵⁾ *Neurospora crassa*,⁽¹⁶⁾ *Fusarium moniliforme*,⁽¹⁷⁾ *Penicillium chrysogenum*,⁽¹⁸⁾ *Penicillium expansum*,⁽¹⁹⁾ *Sclerotinia libertiana*,⁽²⁰⁾ *Coniothrium diplodiella*,⁽²¹⁾ 등을 들 수 있다.

Pectinase의 生産 및 酵素的性質은 微生物의 種類 및 培養條件에 따라 크게 달라진다. 따라서 筆者는 各種 材料로 부터 酵素生産力이 强하며 毒性이 없고 耐酸性이 强한 優秀菌株를 選抜하였으며 培養條件, 酵素的 特性 및 酵素製品의 澄清化效果를 檢討하고 그 結果를 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 優秀菌株의 分離 및 同定

1) 菌株의 分離

(1) 1次選抜

濟州地方에서 수집한 土壤, 腐敗果實(사과, 복숭아, 포도, 감귤류) 및 腐敗菜蔬類를 分離試料로 하였다. 이 分離試料를 少量의 滅菌水에 懸濁시켜 이 懸濁液 數滴을 分離固體培地に 混合하고 平板法에 依하여 30°C에서 4日間 培養하여 發育이 旺盛한 취락만을 選抜하였다.

(2) 2次選抜

100ml三角후라스크에 밀기울 5g와 수도물 5ml를 넣고 15lbs에서 40分間 加壓殺菌한 後 1次選抜한 各種 菌株를 接種하여 30°C에서 3日間 培養하고 pectinase活性을 測定하여 優秀菌株를 1株 選抜하였다.

Table 1. Medium for the selection of strain

Constituent	amount(g)
Citrus pectin	20.0
Sodium nitrate	5.0
Potassium phosphate, dibasic	2.0
Magnesium sulfate	0.5
Ferrous sulfate	0.5
Potassium chloride	1.0
Agar	20.0
Distilled water	1,000ml

2) 優秀菌株의 同定

2次選抜에서 選定된 優秀菌株는 Raper와 Fennel⁽²²⁾의 The Genus, Aspergillus分類方法에 依하여 同定하였다.

2. 毒性試驗

젓밀어진 흰귀(우) 5마리씩을 1群으로 하고 試驗區는 두 群으로서 標準飼料群과 10%培養物 添加飼料群(選抜菌株培養物 10%添加)으로 하였다. 微生物培養物은 脫脂米糠에 選定菌株를 3日間 培養하고 低溫에서 乾燥시켜 흰귀飼料에 10% 添加하였으며, 標準飼料는 흰귀飼料에 脫脂米糠을 10%添加하였다. 흰귀를 10週間 飼育하고 病理組織學的檢査를 實施하였다.

3. 培養條件

1) 基本培地

基本培地로는 밀기울培地와 脫脂米糠培地를 使用하였다.

밀기울培地 : 밀기울 5g, 수도물 4ml

탈지미강培地 : 脫脂米糠 5g, 수도물 4ml

2) 培養方法

Pfeffer agar medium 4日間 培養한 供試菌을 1白 金耳씩 上記 基本培地에 接種하여 30°C에서 培養하였다. 但 培養時間에 관한 實驗以外에는 3日間, 添水量에 관한 實驗以外에는 添水量을 80%, 培養溫度에 관한 實驗 以外에는 30°C로 하여 培養하였다.

3) 酵素液의 調製

供試菌株를 3日間 培養하고 그 培養物에 蒸溜水 50ml를 添加하여 homogenizer로 2分間 磨碎하고 1時間 靜置시킨後 10,000rpm으로 10分間 遠心分離하고 上澄液을 酵素液으로 하였다.

4) 酵素的 粗精製 및 製品化

脫脂米糠에 供試菌株를 接種하여 30°C에서 72時間 培養하고 그 培養物 1,000g에 5,000ml의 蒸溜水를 添加하여 pH를 4.0로 調節하고 6時間 振盪한 後 10,000rpm으로 遠心分離하였다. 上澄液에 3倍의 cold ethanol (98%)을 添加하여 5°C에서 1夜 放置한 後 10,000rpm

으로 遠心分離하여 沈澱酵素를 얻고 30°C에서 真空乾燥시켜 酵素製品으로 하였다.

5) 粘度降下法에 依한 pectinase(Endopolygalacturonase)의 活性測定⁽²³⁾

1% pectin溶液(0.05M 초산 완충액, pH 4.5) 10ml에 酵素液 1ml를 넣고 40°C의 恒溫槽에서 15分間 反應시킨後 沸騰水浴中에서 3分間 煮沸하여 酵素作用을 中止시키고 25°C에서 Ostwald粘度計를 使用하여 流下速度를 測定하고 粘度低下率을 다음과 같이 計算하였다.

$$\text{Reducing rate of viscosity}(\%) = \frac{V_o - V_t}{V_o - V_s} \times 100$$

V_o = flow time of substrate + inactivated enzyme (substrate blank)

V_t = flow time of the reaction solution of substrate + active enzyme

V_s = flow time of water + inactivated enzyme (water blank)

4. 果汁의 澄清化試驗

1) 供試品種 및 果汁의 調製

供試品種은 紅玉을 選擇하였으며 新鮮한 紅玉을 잘 洗滌하여 박피, 除芯하고 믹서로 破碎, 綿布로 濾過한後 5,500rpm으로 10分間 遠心分離하여 供試果汁으로 하였다.

2) 供試酵素劑

Aspergillus sp. AC-12酵素製品을 1%水溶液으로 만들어 使用하였다.

3) 果汁의 澄清化度 測定⁽²⁴⁾

供試果汁 10ml에 酵素液 1ml를 添加하여 45°C에서 一定時間 反應시킨다음 沸騰水中에서 5分間 加熱하여

Table 2. Screened strain and their pectinase producing ability

Reducing rate of viscosity(%)	10>	10.1-20.0	20.1-30.0	30.1-40.0	40.1<
Number of strain	102	35	22	11	2

反應을 中止시키고 濾過하여 660nm에서 透過率(T%)을 測定하였다(但, 澄清化度는 透過率로 表示하였다).

實驗結果 및 考察

1. 菌株의 分離와 優秀菌株의 同定

前記한 方法에 依하여 pectinase 生産能이 있는 菌株 172株를 分離하고 이들의 pectinase 生産能을 調査한 結果는 Table 2와 같다.

選拔한 菌株의 pectinase 生産能을 調査한 結果 粘度低下率이 440.1%以上인 菌株는 2株뿐이며 그 中 腐敗사과에서 分離한 AC-12가 pectinase 生産能이 가장 優秀하였으므로 이 菌株를 優秀菌株로 선정하여 形態의 特性을 檢討한 結果는 Table 3과 같다.

以上の 形態學의 特徵으로 보아 AC-12는 *Aspergillus* sp.에 屬하는 菌株로 同定하였으며 *Aspergillus* sp. AC-12로 이름 붙였다.

2. 毒性實驗

원료를 10週間 飼育하고 病理組織學的 檢査를 實施한 結果는 Table 4와 같이 標準飼料群과 마찬가지로 10%培養物添加飼料群에서 全然 異常이 나타나지 않았다. 따라서 本酵素製品은 毒性이 없는것으로 食品加工

Table 3. Morphological characteristics of screened strain(Czapecks agar)

Colony	Carbonaceous black or brownish black, reverse usually colorless, slowly growing.
Vesicle	globose, 35~85 μ in diameter
Conidiophore	brown, 1.3~3.6mm \times 15~19 μ , wall smooth, comparatively thick (2.3~2.6 μ)
Sterigmata	
primary	dark brown, 15~28 \times 3.5~8 μ
secondary	pale dark brown, 5~7 \times 2.5~3.0 μ
Conidia	dark, brown, globose, 3.0~4.5 μ in diameter, irregularly roughened with conspicuous ridges.
Conidial head	globose, 70~80 μ in diameter, black,

Table 4. Physiological and histological state

Group	Brain	Heart	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Pancreas	Adrenal	Stomach	Intestine	Thyroid
Standard	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treatment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +; normal -; abnormal

에 使用할수 있다고 思料된다.

3. 酵素의 生産條件檢討

1) 培養時間

밀기울培地와 脫脂米糠培地를 使用하여 一定時間 培養한 結果는 Fig.1과 같이 脫脂米糠에서는 72時間, 밀기울培地에서는 48~72時間 培養時에 最高의 酵素活性을 나타냈으며 그 以後에는 다 같이 減少現象을 보였다. 培養時間에 따른 pectinase 活性은 微生物의 種類 및 培地組成에 따라 다른데 *Asp. japonicus*⁽²⁵⁾는 65時間, *Pen. chrysogenum* Q 176⁽¹⁸⁾은 192時間, *Clostridium felsineum* var. *sikokianum*⁽⁶⁾을 24時間, *Asp. saitoi*,⁽²⁶⁾ *Pen. islandicum*⁽²⁸⁾은 72~96時間 *Coniothyrium diplodiella*와 *Sclerotinia libertiana*⁽²⁴⁾는 48~96時間, *Asp. saitoi* IAM⁽²⁷⁾은 72~96時間, *Asp. niger*⁽²⁸⁾는 120時間 培養時에 最高의 pectinase活性을 나타내었다고 報告하였다. 이와같이 菌株에 따라 培養時間에 差異가 큼을 알수 있다.

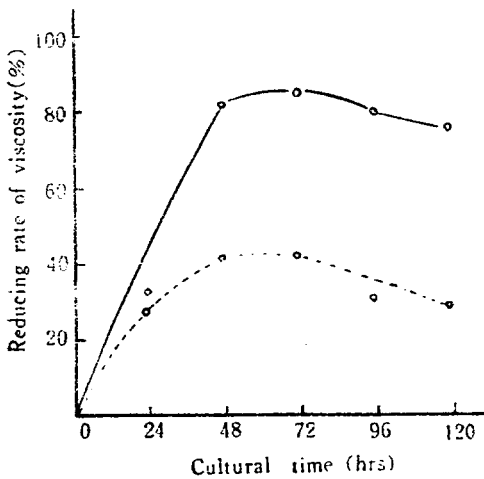


Fig. 1. Effect of cultural time on the pectinase production

* ○—○ defatted rice bran medium
○---○ wheat bran medium

2) 添水量

밀기울培地와 脫脂米糠培地에 수도물을 여러가지 比率로 添加하여 培養한 結果는 Fig. 2에서 보는바와 같이 밀기울培地에서는 60~100%, 脫脂米糠培地에서는 80%內外이었다.

*Aspergillus*屬菌株에 對한 添水量을 보면 *Asp. japonicus*⁽⁵⁾는 85%, *Asp. saitoi*⁽²⁶⁾는 約 117%이었는데 本 選定菌株에 있어서도 이들 結果와 大略 비슷하였다.

3) 培養溫度

2種의 基本培地에 供試菌株를 接種하고 所定溫度에

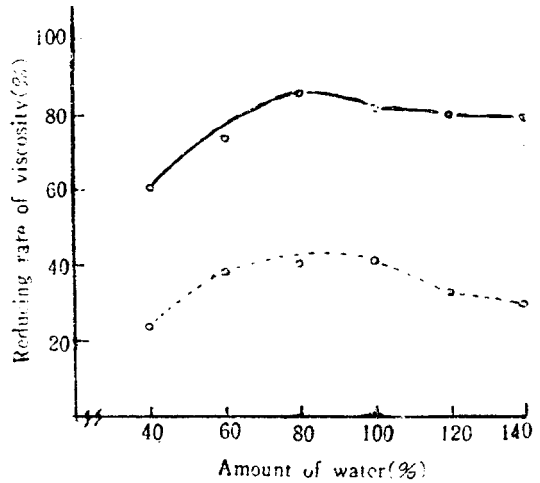


Fig. 2. Effect of the amount of water on the pectinase production

○—○ defatted rice bran medium
○---○ wheat bran medium

서 培養한 後 pectinase의 活性을 測定한 結果는 Fig. 3과 같이 두가지 基本培地에서의 適溫은 다 같이 30~35°C였다.

各種菌株의 最適培養溫度는 *Asp. japonicus*⁽²⁵⁾는 25°C, *Pen. chrysogenum* Q 176,⁽¹⁸⁾ *Asp. saitoi*,⁽²⁶⁾ *Pen. islandicum*,⁽²⁶⁾ *Coniothyrium diplodiella*,⁽²⁴⁾ *Asp. saitoi* IAM,⁽²⁷⁾ *Asp. niger*,⁽²⁸⁾는 다 같이 30°C라고 報告하였는데 本菌株에 있어서도 이들 菌株와 酵素生産適溫이

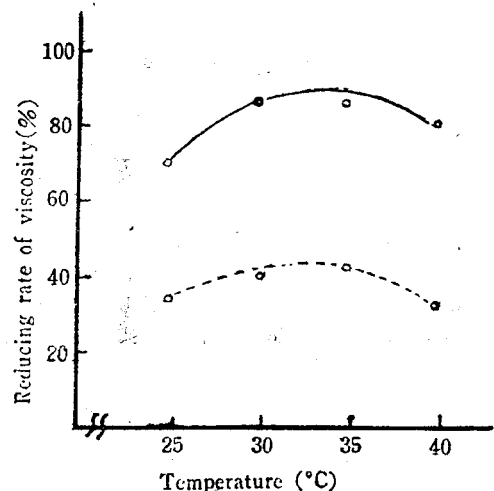


Fig. 3. Effect of cultural temperature on the pectinase production

○—○ defatted rice bran medium
○---○ wheat bran medium

거의 一致하고 있다.

4) 添水의 pH

基本培地에 수도물代身에 所定 pH의 McIlvaine 緩衝液을 添加하여 供試菌株을 培養하고 pectinase 活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

脫脂米糠培地와 밀기울培地는 다 같이 pH 3~5에서 最適 pH를 나타내고 있다.

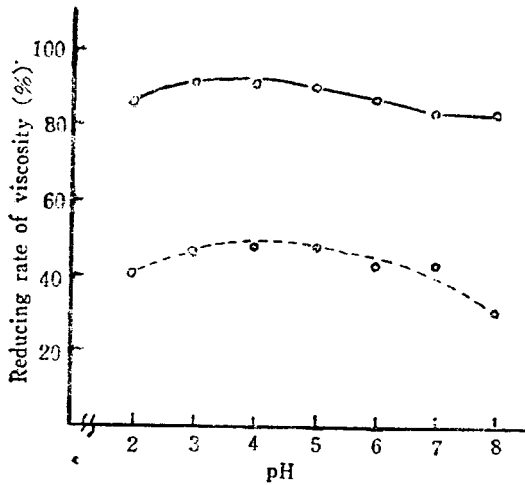


Fig. 4. Effect of pH of water on the pectinase production

○—○ defatted rice bran medium
○---○ wheat bran medium

5) Carbon sources 添加試驗

基本培地에 各種 炭素源을 2%씩 添加하고 pectinase 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 5와 같이 두가지 基本培地에서 다 같이 pectin의 添加가 약간의

Table 5. Effect of carbon sources on the pectinase production

Carbon sources	Reducing rate of viscosity(%)	
	Defatted rice bran medium	wheat bran medium
Glucose	82.7	37.0
Galactose	84.0	37.6
Sucrose	86.6	31.1
Maltose	88.7	42.2
Lactose	79.8	32.0
Soluble starch	81.3	24.7
Mannitol	82.5	37.6
Myoinositol	83.9	42.2
Pectin	91.8	46.2
Control	84.7	40.7

효과를 나타내었다. Yamasaki등⁽²⁶⁾은 *Asp. saitoi*의 培養時 sucrose 4%와 pepsin 2%를 添加할때 Endopolygalacturonase의 activity가 크게 增加되었다고 報告하였는데 本菌株에 있어서는 pectin 2% 添加時活性이 脫脂米糠培地에서 約 7% 增加되었다.

6) nitrogen sources의 添加試驗

基本培地에 各種 無機窒素源을 各各 0.2%씩, 各種 有機窒素源을 各各 2%씩 添加하고 pectinase의 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 6와 같다.

Table 6. Effect of nitrogen sources on the pectinase production

Nitrogen sources	Reducing rate of Viscosity(%)	
	Defatted rice bran medium	Wheat bran medium
(NH ₄) ₂ SO ₄	84.5	37.7
(NH ₂) ₂ CO	81.8	43.2
KNO ₃	85.0	40.1
NH ₄ NO ₃	85.8	43.0
NH ₄ Cl	85.4	42.6
NaNO ₃	83.7	45.4
Peptone	83.8	42.5
Albumin	80.3	39.9
Yeast	84.1	22.6
Control	84.7	40.7

Table 6에서 보는바와 같이 밀기울培地에 NaNO₃를 添加할때 酵素活性이 약간 增加되었을뿐 다른 窒素源의 添加는 別效果를 認定할수 없었다.

7) K鹽 및 Mg鹽 添加試驗

基本培地에 各種 鹽類를 0.2%씩 添加하고 pectinase 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 7과 같이 밀기울培地에 K₂HPO₄를 첨가하였을때 약간의 效果가 있을뿐 다른 鹽類의 添加는 別效果가 없었다.

Table 7. Effect of potassium and magnesium salt on the pectinase production

Kinds	Reducing rate of viscosity(%)	
	Defatted rice bran medium	Wheat bran medium
KH ₂ PO ₄	82.3	34.5
K ₂ SO ₄	84.1	38.9
K ₂ HPO ₄	82.3	44.3
KCl	82.1	37.2
MgSO ₄	83.7	39.0
MgCO ₃	83.4	37.0
MgCl ₂	83.2	33.2
Control	84.7	40.7

4. 粗精製酵素(酵素製品)의 收率

· 脫脂米糖培地에 供試菌株들을 接種하여 30°C에서 72 時間 培養하고 그 培養物 1,000g로부터 粗精製酵素製品 (dry matter) 27.96g를 얻었다.

5. 酵素의 特性檢討

1) 作用最適 pH와 最適溫度

作用最適 pH는 McIlvaine緩衝液을 使用하여 基質溶液 (1% pectin 溶液)의 pH를 所定pH로 調節하고 40°C에서 酵素活性을 測定하였고, 最適溫度는 pectin溶液의 pH를 4.0로 調節하고 20~70°C에서 酵素活性을 測定 하였으며 그 結果는 Table 8과 같이 最適 pH는 3.0~ 4.0, 最適溫度는 40~50°C이었다.

最適pH와 最適溫度에 關한 研究를 보면 *Asp. japonicus*의 Endopolygalacturonase⁽²⁵⁾는 最適 pH는 4.5, *Pen. chrysogenum* Q 176의 pectinase⁽¹⁸⁾는 最適 pH가 4.0~6.0, 最適溫度가 40°C, *Clostridium felsineum* var. *sikokianum*의 polygalacturonase⁽⁶⁾는 最適 pH가 5.0~5.6, 最適溫度가 45°C, *Asp. sp*의 Endopolygalacturonase⁽²⁹⁾는 最適 pH가 4.5, 最適溫度가 40°C, *Asp. niger*의 Endopolygalacturonase⁽³⁰⁾는 最適 pH가 6內外 라고 하였는데 本菌株의 pectinase는 最適 pH가 다른 菌株에 比하여 약간 낮은 便에 屬한다.

Table 8. Effects of pH and temperature on the pectinase activity

pH	Relative activity (%)	Temp. (°C)	Relative activity (%)
2.0	94.7	20	70.9
3.0	100.0	30	87.2
4.0	99.6	40	100.0
5.0	77.3	40	100.0
6.0	53.6	50	98.6
7.0	42.4	60	87.3
8.0	12.8	70	46.9

2) 酵素의 pH安定性 및 熱安定性

pH安定性은 酵素液에 同量의 McIlvaine緩衝液과 NH₄OH-NH₄Cl緩衝液을 加하여 所定pH로 調節하고 50°C에서 24時間 維持한 後 McIlvaine緩衝液으로 pH 4.0로 調節하고 酵素活性을 測定하였으며, 熱安定性은 酵素液을 30~70°C에서 20分間 維持한 後 酵素活性을 測定하였으며 그 結果는 Table 9와 같다. pH安定範圍는 2.0~8.0이며 熱安定性을 보면 40°C以下에서는 大體로 酵素의 活性이 維持되나 50°C以上에서는 急激하게 失活되었다.

pH安定性과 熱安定性에 關한 研究를 보면 *Asp. sp.*의 Endopolygalacturonase⁽²⁹⁾는 0~4°C에서 16日間 放

Table 9. Effect of pH and temperature on the pectinase stability

pH	Relative activity (%)	Temperature(°C)	Relative activity (%)
2.0	100.0		
3.0	97.8	30	100.0
4.0	96.4		
5.0	96.0	40	95.6
6.0	95.6		
7.0	95.9	50	11.6
8.0	95.0		
9.0	85.6	60	2.8
10.0	56.1		
11.0	55.2	70	0

置하였을때 安定 pH는 3.5 20°C에서 20時間 放置하였을때의 安定pH는 4.5이고, 20~30°C에서 1時間 放置하였을때 大體로 酵素活性이 維持되었으며 *Asp. japonicus*의 Endopolygalacturonase⁽²⁵⁾는 4°C에서 20時間 放置하였을때 安定 pH範圍는 2~7이고, 30~50°C에서 10分間 維持시킬때 安定하였으며 *Clostridium felsineum* var. *sikokianum*의 polygalacturonase⁽⁶⁾는 40°C에서 20分間 維持하였을때 安定하다고 하였다. 이와같이 安定 및 安定溫度는 菌株 및 加熱時間에 따라 다른데 本菌株가 生産하는 Pectinase의 熱安定性은 大體로 이들과 비슷하나 pH安定性은 酸性에서 弱 alkali性에 걸쳐 安定한 것이 特異하다.

3) 金屬이온의 영향

1% pectin 溶液 10ml에 各種 金屬鹽類의 0.1M 溶液을 1ml씩 添加하고 酵素活性을 測定한 結果는 Table 10과 같이 MnSO₄와 CaSO₄의 添加는 pectinase의 活性을 약간 增加시켰으며 Ag₂SO₄는 pectinase의 活性을 크게 減少시켰다. 이때 酵素液은 透析酵素液을 使用하였다.

Table 10. Effect of metal salt on the pectinase activity

Kinds of metal salt	Relative activity(%)
Na ₂ SO ₄	72.4
MgSO ₄	112.2
MnSO ₄	127.3
K ₂ SO ₄	82.0
CaSO ₄	129.8
Ag ₂ SO ₄	57.6
HgCl ₂	82.2
Control	100.0

6. 果汁의 消滯化試驗

1) 淸澄化度에 미치는 溫度의 影響

20~70°C에서 20分間 反應시킨 後 淸澄化度를 測定한 結果는 Fig. 5와 같이 40~50°C에서 最高의 淸澄化度를 나타내었다.

果汁의 淸澄化도와 反應溫度에 對한 研究를 보면 *Asp. niger* 製劑⁽³⁰⁾는 30~60°C에서, *Coniothyrium diploidiella* 製劑는 50°C內外에서 最高의 淸澄化度를 나타내었다고 한다.

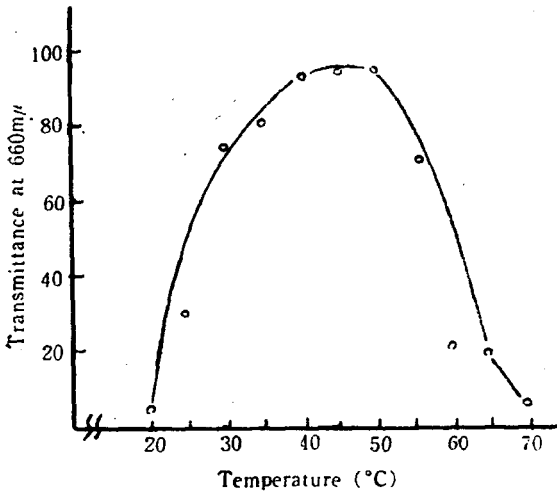


Fig. 5. Effect of temperature on the clarification of apple juice

2) 淸澄化度에 미치는 pH의 影響

사과과즙의 pH를 citric acid와 sodium carbonate로 2~7로 調節하고 45°C에서 20分間 反應시킨 結果는 Fig. 6과 같이 pH 3에서 最高의 淸澄化度를 나타내었다. 사과과즙(國光)에 各種 酵素劑의 淸澄化도에 미치

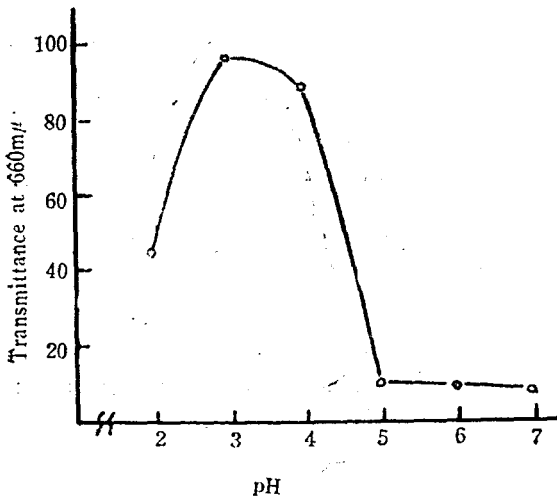


Fig. 6. Effect of pH on the clarification of apple juice

는 pH의 影響에 關한 研究를 보면 *Asp. niger* 製劑⁽³⁰⁾는 pH 3.0, *Coniothyrium diploidiella* 製劑⁽³⁰⁾는 4.0에서 最高의 淸澄化度를 나타내었다고 하였는데 本酵素製品도 이들 結果와 大體로 비슷한 結果를 보이고 있다.

3) 淸澄化도와 酵素의 濃度

果汁에 對하여 粗精製酵素製品의 濃度를 0.02~0.12%로 하고 45°C에서 20分間 反應시킨 後 淸澄化度를 測定한 結果는 Fig. 7과 같이 0.04%까지는 거의 添加한 酵素量에 比例하여 淸澄化도가 增加되었으나 그 以上の 濃度에서는 극히 완만하게 增加되었다.

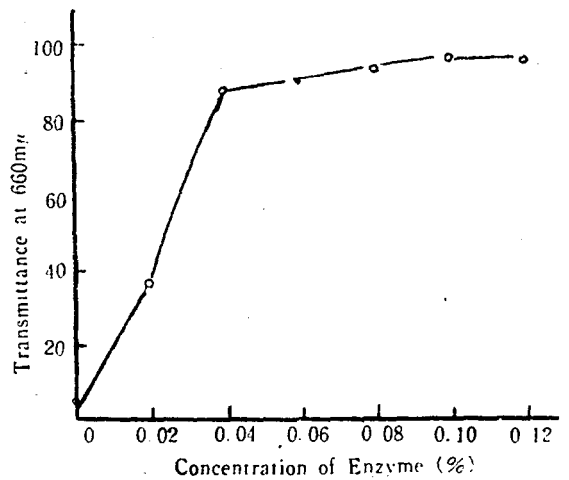


Fig. 7. Effect of enzyme concentration on the clarification of apple juice

4) 淸澄化도와 反應시간

果汁에 對하여 粗精製酵素製品의 濃度를 0.1%로 하고 45°C에서 反應時間을 달리하여 淸澄化도를 測定한

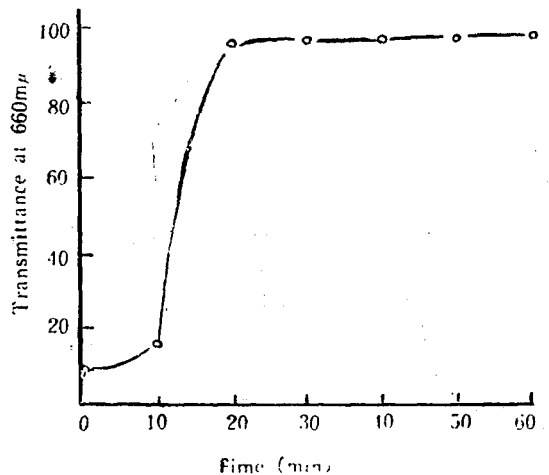


Fig. 8. Effect of reaction time on the clarification of apple juice

結果는 Fig. 8과 같이. 60分間 反應시켰을때 淸澄化度는 98.6%를 나타내었다.

要 約

여러가지 材料로 부터 pectinase 生産能이 강한 菌株를 檢索하고 優秀菌株 AC-12를 1株選拔하여 同定하고 毒性試驗 및 pectinase 生産條件, 酵素의 特性 및 사과果汁의 淸澄化實驗을 實施하고 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 選拔優秀菌株는 Raper와 Fennel의 分類方法에 따라 同定하였으며 *Aspergillus* sp. AC-12로 이름붙였다.
2. 本酵素製品은 白鼠의 飼育試驗에서 全然 毒性을 나타내지 않았다.
3. 脫脂米糠培地가 밀기울 培地에 比하여 pectinase의 生産量이 현저하게 많았다.
4. 脫脂米糠培地에서의 最適 培養時間은 72時間, 最適 添水量은 80%內外, 最適 培養溫度는 30~35°C, 最適 添水の pH는 3.0~5.0이었다.
5. 脫脂米糠培地에 pectin, 밀기울培地에 pectin, NaNO₃ 및 K₂HPO₄의 添加는 pectinase의 生産을 약간 增加시켰다.
6. 本酵素의 作用最適 pH는 3.0~4.0, 最適溫度는 40~50°C, 安定 pH範圍는 2.0~8.0이고 40°C 以下에서는 安全하나 50°C 以上에서는 急激하게 不活性化되었고, MnSO₄와 CaSO₄의 添加는 pectinase의 活性을 약간 增加시켰다.
7. 사과과즙의 淸澄化에 對한 最適溫度는 40~50°C, 最適 pH는 3.0이었고, 사과과즙에 對한 酵素製品의 最適添加濃度는 0.1%이며 45°C에서 60分間 反應시켰을때 果汁은 거의 淸澄化되었다.

參 考 文 獻

1. Wood, R.K.S.: *Nature*, 167, 771(1951).
2. Kraght, A. J. and M. P. Starr; *Arch. Biochem. Biophys.*, 42, 271(1953).
3. 藤井義紹: *日農化*, 30, 363(1956).
4. 小澤潤二郎, 岡本賢一: *大原農研報告*, 10, 215 (1955).
5. Nagel, C. W. and R. H. Vaughn: *Arch. Biochem.*

- Biophys.*, 93, 344(1961).
6. 木尾明: *日農化*, 27, 699(1953).
7. Ranigan, G. W.: *J. Bacteriol.*, 77, 1(1959).
8. Mills, G. B.: *Biochem. J.*, 44, 302(1949).
9. Ceponis, M. J. and B. A. Friedman: *Phytopathology*, 49, 141(1959).
10. Phaff, H. J. and B. S. Luh: *Arch. Biochem. Biophys.*, 36, 23(1952).
11. Bell, T.A. and J. L. Etchells: *Appl. Microbiol.*, 4, 196(1956).
12. 齊藤日向: *日農化*, 28, 810(1954).
13. Tuttobello, R. and P. J. Mill: *Biochem. J.*, 79, 51(1961).
14. Brooks, J. and W.W. Reid: *Chem. Industries*, £25 (1955).
15. Smythe, C. V. and J. A. Miller: *U.S. Patent*, 2, 599(1952).
16. Roboz, E. R., W. Barrat and E. L. Tatum: *J. Biol.*, 195, 459(1952)
17. Singh, R.K. and R. K. S. Wood: *Ann. Bot. N. S.*, 20, 89(1956).
18. 綾野雄幸, 井上憲政: *日釀工誌*, 36, 410(1958).
19. 小澤潤二郎, 岡本賢一: *日農學研究*, 41, 79(1953).
20. 里村幸男: *日農化*, 26, 486(1952).
21. 遠藤章: *Agr. Biol. Chem.*, 25, 382(1961).
22. Raper, K. B. and Fennel, D. I. *The Genus Aspergillus*. The williams and wilkins Co. (1965)
23. Roboz, E., R. W. Barrat and E. L. Tatum: *J. Biol. Chem.*, 195, 495(1952).
24. Endo, A: *Agr. Biol. Chem.*, 78, 234(1964).
25. Ishii, S. and Yokotsuka, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1885(1972).
26. Arima, K., Yamasaki, M. and Yasui, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 28, 248(1964).
27. Yamasaki, M., Yasui, T. and Arima, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 30, 1119(1966).
28. Tuttobello, R. and Mill, P. J.: *Biochem. J.* 79, (1961).
29. 李逢起, 柳洲鉉, 梁逢, 趙世勳, 柳駿: *韓國産業微生物學會誌*, 4, 63(1976).
30. 三澤豐, 松原良, 羽田野誠, 原稔, 犬塚猛雄: *日本食品工業學會誌*, 15, 83(1968).