

Aspergillus nidulans 가 生産하는 Naringinase 에 관한 研究

(제 1 보) 生産菌株의 選定 및 Naringinase 의 生産條件

柳 洲 鉉·文 順 玉·卞 裕 亮

延世大學校 工科大學 食品工學科

(1978년 5월 8일 수리)

Studies on the Naringinase Produced by *Aspergillus nidulans*

(Part I) Screening of Naringinase Produced by Fungi and Their Cultural Condition

Ju Hyun Yu · Soon Ok Moon and Yu Ryang Pyun

Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei University

(Received May 8, 1978)

Abstract

The Screening of fungi producing naringinase was done. A strain of *Aspergillus nidulans* showed the highest naringinase activity among 447 strains those were isolated from soil, spoiled citrus fruits and stock cultures.

The cultural conditions of *Asp. nidulans* for production of naringinase were studied. A strain of *Asp. nidulans* showed higher activity when it was cultivated at 30°C for 3 days on wheat bran media supplemented with 2.0% naringin, 0.2% (NH₄)₂SO₄ and 0.2% CaCO₃.

緒 論

밀감류의 苦味의 原因이 되는 물질은 naringin이라는 flavonoid 배당체이다.⁽¹⁻²⁾ Naringin含量이 높은 밀감加工品 및 주우스는 쓰므로, 이 苦味를 제거하는 實際的 方法으로 微生物이 生産하는 naringinase가 가장 주목되었다.⁽³⁻⁶⁾

1955년 岸登⁽⁷⁾에 의하여 처음으로 微生物을 이용한 naringinase 生産에 대한 연구가 報告된 이래 이에 대한 연구가 활발히 進行되었다. Naringinase를 生産하는 微生物로는 *Phomopsis citri*, *Rhizoc-*

tonia solani, *Ophiobolus miyabeanus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus usamii*, *Aspergillus niger*의 여러 菌株가 밝혀졌으며,⁽⁸⁻¹⁶⁾ 지금까지의 研究 結果 *Aspergillus niger*가 가장 유력한 微生物로 알려졌다. 이 菌을 이용한 naringinase의 研究가 많이 이루어 졌고,⁽¹⁸⁻²¹⁾ 우리 나라에서도 기(奇)등에 의하여 報告된 바 있다.^(8,7,21)

著者들은 토양, 썩은 굴 및 保存菌株들로 부터 아직 報告되지 않은 naringinase를 生産하는 優秀 菌株인 *Aspergillus nidulans*를 선별하였으며, naringinase 生産을 위한 배양조건을 연구하였다.

1. 菌株의 分離方法

토양 및 썩은 굴로부터 菌을 分離할 때는 koji extract agar 배지를 使用하여 平板分離法⁽²²⁾으로 分離하였다.

2. 粗酵素의 調製法

Arima 등의 方法⁽²³⁾에 따라 粗酵素液을 調製하였다. 즉 밀기울 5g과 수도물 5ml를 혼합한 배지에 분리한 菌株을 接種하고 30°C에서 3日間 培養한 後 20 ml의 증류수로 실온에서 3時間 추출하여 여지(Toyo filter No. 2)로 여과하여 粗酵素液으로 使用하였다.

3. 菌株의 選定法

Naringinase 活性의 높은 菌株을 選定하기 위하여 paper disc 法을 使用하였다.⁽²⁴⁾ 즉 naringin 0.1%, sodium azide 0.1%, 한천 1%를 含有한 평판한천배지위에 粗酵素液을 適當量 吸收시킨 paper disc(直徑 6 mm)를 놓아 37°C에서 20時間 反應시킨 後 diethylene glycol과 2N NaOH로 발색시켜 형성된 靨은 미색의 直경을 測定하여 菌株을 選定하였다.

4. Naringinase의 活性測定法

Naringinase의 活性은 Davis法⁽²⁵⁾의 中林 및 井上 등의 變法^(26, 27)에 의해 測定하였다. 0.02% naringin 溶液 5 ml(0.2 M McIlvaine buffer, pH 5.0)에 粗酵素液 0.5 ml를 加하여 40°C 항온조에서 한 時間 反應시킨 後 diethylene glycol 5 ml와 N NaOH 1 ml의 混合液으로 실온에서 30分間 발색후 Hitachi Model 101 Spectrophotometer를 利用하여 420 nm에서 吸光度를 測定하였다. 酵素의 單位는 反應液과 對照의 吸光度를 測定하여 이 差異가 對照의 吸光度의 10% 減少되는 酵素力을 1單位로 하고 다음 식으로 naringinase 活性을 換算하였다.

$$\text{Naringinase 酵素活性 (u/ml)} = \frac{A-B}{A} \times \frac{1}{10} \times 100 \times D$$

- A : 對照의 흡광도
- B : 反應液의 흡광도
- D : 酵素液의 희석배수

1. Naringinase 生産菌株의 選定

토양에서 分離한 곰팡이 361 菌株, 부패된 굴에서 分離한 곰팡이 27 菌株와 保存菌株 59 菌株, 計 447 菌株의 곰팡이를 밀기울에 培養하여 추출한 粗酵素液을 paper disc 法으로 naringinase의 活性을 測定한 結果 98 菌株가 活性을 나타내었으며 이들의 酵素活性을 測定한 結果 活性이 제일 높은 菌株는 保存菌 *Aspergillus nidulans* 菌株였다.

2. *Aspergillus nidulans*에 의한 naringinase의 生産條件의 檢討

(1) 培養日數의 影響

밀기울 배지에 *Aspergillus nidulans*를 接種하여 30°C에서 培養하여 naringinase 生産에 미치는 培養日數의 影響을 檢討한 結果, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 培養日로부터 3日 經過後 naringinase 活性이 最高值에 達하였으며 그 以後에는 變動이 없었다.

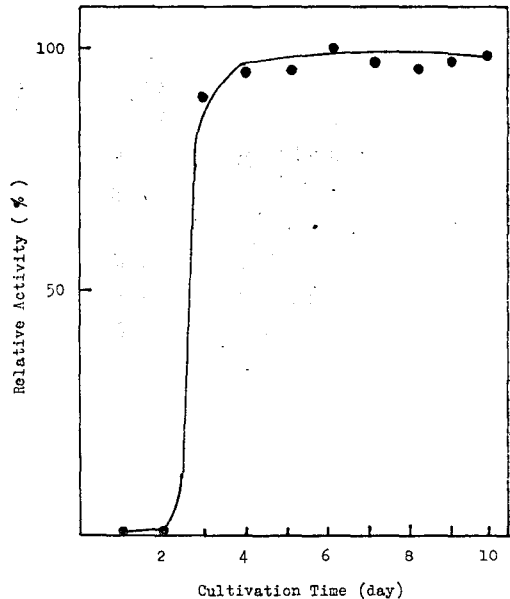


Fig. 1. Time Course of Naringinase Production by *Aspergillus nidulans*.

(2) 水分의 影響

밀기울에 물을 섞어 酵素生産에 미치는 水分含量의 影響을 檢討하였다. Naringinase 生産은 물을

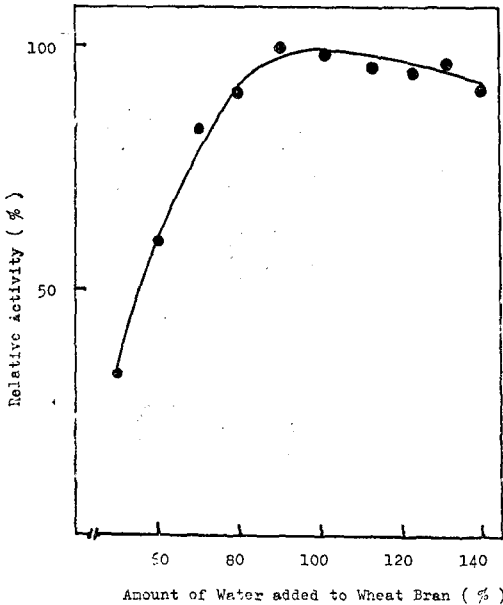


Fig. 2. Effect of Amount of Water Added to Wheat Bran on Naringinase Production by *Aspergillus nidulans*.

밀기울량을 90% 섞었을 때 최고치에 달하였고 (Fig. 2) 그 이상의 水分添加時는 감소하는 傾向이 있었다. 이것은 밀기울의 점착성이 높아져 공기 유통이 不充分하기 때문인 것으로 생각되어진다.

(3) 培養溫度의 影響

25°C, 30°C, 35°C에서 각각 3日間 배양 후 酵素生産을 檢討한 結果 30°C에서 가장 높은 生産性을 나타내었으며, 35°C에서는 약간 감소하였다. (Fig. 3). 그리고 25°C에서는 30°C에 비하여 1/4程度밖에 生産되지 않아 酵素生産의 最適溫度는 30°C라고 생각되었다.

(4) 營養源의 影響

1) 窒素源의 影響: 기본 밀기울 배지에 유기 질소원과 무기질소원을 각각 2%, 0.2% 添加하여 30°C에서 3日間 培養하여 naringinase의 生産에 미치는 窒素源의 影響을 檢討한 結果 Table 1에 표시한 바와 같이 酵素生産은 어떠한 有機窒素源을 使用한 境遇도 別로 效果가 없었으며, 尿素는 오히려 菌株 生産을 抑制하였다. 無機窒素源은 Table 2에 표시한 것과 같이 $(NH_4)_2SO_4$ 가 가장 效果의이었다. 岡田等⁽¹¹⁾의 研究에서도 밀기울 배지에 $(NH_4)_2SO_4$ 를 添加한 바 있었다.

2) 炭素源의 影響: 기본 밀기울 배지에 각종

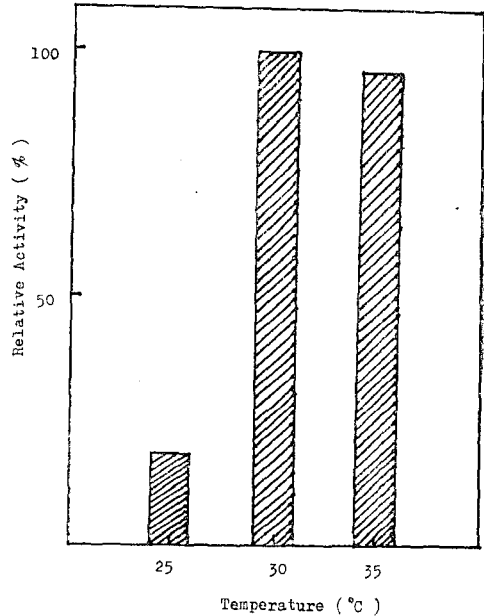


Fig. 3. The Effect of Temperature on Naringinase Production by *Aspergillus nidulans*.

Table 1. Effect of Organic Nitrogen Sources on Naringinase Production by *Aspergillus nidulans*.

Organic nitrogen source (2%)	Naringinase activity (unit)	Relative activity (%)
C. S. L.	37	90
Y. E.	42	102
S. B. M.	39	96
Casein	37	90
Urea	25	61
Peptone	33	80
Casamino acid	36	88
None	41	100

Table 2. Effect of Inorganic Nitrogen Sources on Naringinase Production by *Aspergillus nidulans*.

Inorganic nitrogen source (0.2%)	Naringinase activity (unit)	Relative activity (%)
$NaNO_3$	45	110
KNO_3	31	76
$(NH_4)_2SO_4$	48	117
None	41	100

Table 3. Effect of Carbon Sources on Naringinase Production by *Aspergillus nidulans*.

Carbon source (2%)	Naringinase activity (unit)	Relative activity (%)
Naringin	45	115
Glucose	44	113
Maltose	43	110
Rhamnose	41	105
Galactose	40	103
Soluble starch	39	100
Lactose	40	103
None	39	100

炭素源을 2%씩 添加하고 30°C에서 3日間 培養하여 各炭素源의 影響을 본 結果는 Table 3과 같았다. Naringin을 添加한 것이 效果가 좋았으며 이는 이미 다른 研究에서도 밝혀진 바와 같다. (10,11)

3) 無機鹽類의 影響: 基本 밀기울 배지에 各 種 無機鹽類를 0.2%씩 添加하고 30°C에서 3日間 培養하여 各 無機鹽類의 影響을 본 結果와 Table 4와 같은 結果를 얻었다. Naringinase 生産에는 CaCO₃가 가장 效果의이었으며 이는 Bram 등의 實驗에서도 밝혀진 바 있다. (10)

要 約

트양에서 分離한 곰팡이 361 菌株, 부패된 귤에서 分離한 곰팡이 27 菌株와 保存菌株 59 菌株 計 447 菌株中 naringinase 를 生産하는 菌株 98 菌株를 分離하고 그 중 活性이 높은 *Aspergillus nidulans* 를 選定하여 이의 酵素 生産時 培養條件에 대하여 研究한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

즉 밀기울과 물을 10:9의 比率로 섞은 밀기울 배지에 菌을 接種한 後 30°C에서 3일이상 培養하였을 때 높은 活性을 나타내었으며, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, naringin 2%, CaCO₃ 0.2%를 배지에 첨가하였을 때 naringinase 의 活性은 增加하였다.

參考文獻

- 1) Devry: *Jahresber. Pharmacol.*, **1**, 132(1866).
- 2) Chandler B.V. and K.J. Nicol: *CSIRO Fd Res. Q.*, **35**, 79 (1975).

Table 4. Effect of Inorganic Salts on Naringinase Production by *Aspergillus nidulans*.

Inorganic Salt (0.2%)	Naringinase activity (unit)	Relative activity (%)
NaCl	44	113
MgSO ₄	45	115
CuSO ₄	44	113
KH ₂ PO ₄	41	105
FeSO ₄	42	108
CaCl ₂	42	108
CaCO ₃	50	128
None	39	100

3) Burdick E. M., and Maurer, R. H.: Removal of naringin from solutions containing the same (To Texsun Citrus Exchange) U.S. Patent 2510797 (June 6, 1950)

4) Daniel W. Fox, William L. Savage and Simon H. Wender: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2504 (1953).

5) Hall D.H.: *Chemistry and Industry*, **57**, 473 (1938).

6) Ting S.V.: *S. Agr. Food Chem.*, **6**, 546 (1958).

7) 岸清: *科工*, **29**, 140 (1955).

8) 기우경·성낙제: *한국농화학회지*, **13**, (3), 237 (1970).

9) Shintaro Kamiya, Sachiko Esaki and Misao Hama: *Agr. Biol. Chem.*, **31**(2), 133 (1967).

10) Bram B. and G.L. Solomons: *Applied Microbiology*, **13** (6), 842 (1965).

11) 岡田茂孝, 岸清, 東原昌孝, 福本壽一郎: *日農化*, **37** (2), 84 (1963).

12) 岡田茂孝, 岸清, 東原昌孝, 福本壽一郎: *日農化*, **37** (3), 142 (1963).

13) 岡田茂孝, 岸清, 東原昌孝, 福本 一郎: *日農化*, **37** (3), 146 (1963).

14) 岡田茂孝, 板公和, 福本壽一郎: *日農化*, **38** (5), 242 (1964).

15) 岡田茂孝, 矢野眞弓, 福本壽一郎: *日農化*, **38** (5), 246 (1964).

16) 龍口洋: *日農化*, **39** (5), 194 (1965).

17) 기우경, 김중규, 김명찬: *한국식품과학회지*,

- 5 (2), 78 (1973).
- 18) 大橋晋 : 日本食品工業學會誌, **11** (9), 376 (1964).
- 19) 津扱辰男 : 日本食品工業學會誌, **12** (5), 168 (1965).
- 20) 久保進, 別所康守, 眞部孝明, 兒玉信 : 日本食品工業學會誌, **13** (12), 511 (1966).
- 21) 기우경 : 한국산업미생물학회지, **2** (2), 111 (1974).
- 22) 유주현, 양한철, 정동효, 양용 : 식품공학실험서 II, 탐구당, p.53 (1975).
- 23) Arima K., Yamasaki M. and Yasui. T. : *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 248 (1964).
- 24) Wilbert F: Steele and H. Y. Yang: *Food Technology*, March p.121 (1960).
- 25) W. B. Davis: *Anal. Chem.*, **19**, 476 (1947).
- 26) 松原良, 土井信明, 河村洋治, 森下淑郎 : 日本食品工業學會誌, **21** (8), 24 (1974).
- 27) 井上雅資, 岡田茂孝 : 科工, **43**, 642 (1969).