

*Verticillium* sp.가 생산하는 Protopectin  
용해효소에 관한 연구  
(제 1 보) Protopectin 용해효소의 생산조건 및 이용

유주현 · 진효상 · 이봉기 · 오두환  
연세대학교 공과대학 식품공학과  
(1982년 1월 22일 수리)

Studies on the Protopectinase Produced by *Verticillium* sp.  
(Part 1) Optimum Conditions for the Protopectinase  
Production and Utilization

**Juhyun Yu, Hyosang Jin, Bong Kie and Doohwan Oh**

Dept. of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received January 22, 1982)

**Abstract**

A fungus with the highest protopectinase productivity was selected among 205 strains isolated from the soil and identified as a *Verticillium* sp.

The *Verticillium* sp. was cultivated on wheat bran and the crude extract of its culture medium showed the highest protopectinase activity on the following conditions: 3 days of cultivation time, 27°C of cultivation temperature, 1.2ml/g wheat bran of water content, and reinforcement of ammonium nitrate and calcium chloride at the concentration of 0.5 and 0.02%, respectively.

The optimum conditions for pectin production from Citrus peel pulp by the protopectinase were consequently obtained as follows: 20ml/g of liquid volume-to-pulp weight ratio, 40°C of reaction temperature, and 4 of reaction pH. The higher the enzyme concentration, the better the yield of pectin and the shorter the reaction time. Total 45.6mg of pectin/g peel was produced by 1 hour reaction at the enzyme concentration of 10.5 units/ml. Molecular weight of the pectin produced by the enzyme was estimated to be about 62,000 by Smit and Bryant's method.

서 론

펙틴은 식품가공원료로 쓰이고 있는 물질로서 주로 과피와 과육에 다량 함유되어 있으며<sup>(1)</sup>, 식물체 중에서는 대부분 불용성 원구물질인 Protopectin 상태로 존재하고 있다.<sup>(2)</sup>

이 protopectin을 pectin으로 용해시킨다고 추측되는 protopectinase라는 효소의 명칭은 Amer-

ican Chemical Society에 의해 채택되어서 이 효소에 대한 연구가 선발적으로 이루어져온 결과 protopectinase는 macerating activity에 의해 타 효소와 구별되나 pectolytic enzyme과 다른 별개의 효소는 아닌 것으로 밝혀지고 있다<sup>(3-9)</sup>

이 효소의 macerating activity는 채소 및 과일 puree제모와 식물체로부터 유용물질 추출에 이용되며,<sup>(10)</sup> Sakai 등<sup>(11,12)</sup>은 yeast가 생산

하는 protopectinase를 감귤류 과피를 이용한 pectin발효에 이용한 바 있다.

본 연구에서는 protopectin을 용해하는 효소 생산균주를 분리하여 동정하였고 효소의 생산조건을 검토한 다음 이 효소의 산업적 이용의 일부로 주스공업의 부산물인 pulp로부터의 pectin 생산에 대한 기초적인 사항을 연구하였다.

## 실험재료 및 방법

### Pectic substance

Galacturonic acid는 동경화성주식회사 제품을 사용하고 protopectin은 시판 감귤피로부터 Ripa의 방법<sup>(13)</sup>에 따라 조제하였다. 즉 분쇄된 감귤피 1.2kg을 매회 5ℓ의 ethanol 처리로 당 및 지방성분을 반복 추출 제거한 다음, 고형분을 건조 분쇄하여 224g을 얻고, 이 고형분으로부터 매회 7ℓ의 물로 가용성 pectin 물질을 5회 추출 제거한 후, 최종적으로 ethanol 5ℓ로 추출한 다음 건조 분쇄하여 163g을 얻었다. 이중 입자의 직경이 0.4~0.9mm인 것을 선별하여 사용하였다.

### 균주의 선정과 동정법

시험균주들은 streak plate method<sup>(14)</sup>에 의하여 Sadaurad's agar에서 순수 분리하였다.

시험균주의 효소활성 유무는 조효소액으로 검정하였고, 조효소액은 밀기울 5g에 물 6ml를 가하여 가압살균한 배지에 균을 접종하고 30°C에서 3일 동안 배양한 후 물 40ml를 가하여 추출 여과하여 얻었다.

효소생산균주는 protopectin 50mg에 조효소액 2.5ml와 0.04M acetate buffer, pH 5, 2.5ml를 가하여 1시간 반응시킨 후 여과하고, 여과액 0.5ml에 2% KOH용액을 2~3적 가한 다음 5분 후 1N HCl용액을 5~6적 가하여 반응여액의 gel 형성정도로 1차 선별하였다.

1차 선별된 균주들 중 protopectin 용해활성이 크고 pectolytic activity가 작은 균주를 최종 선정하였다.

선정된 곰팡이는 slide culture<sup>(15)</sup>로 배양하고 배양 5일 후부터 표본을 취하여 관찰하였고, 관찰된 형태에 따라 분류하였다.<sup>(16,17)</sup>

### Protopectin 용해활성 측정법

Protopectin 50mg, 효소액 0.5ml 및 0.04M acetate buffer, pH 5, 4.5ml을 혼합한 반응액을 40°C에서 1시간 반응시켰을 때 총 1mg의 pectic substance를 용해시켜 낸 효소량을 1단위로 하였다.

Pectic substance 정량은 carbazole sulfuric acid method<sup>(18)</sup>에 의하였으며, 동일방법에 의해 작성한 표준곡선을 이용하였다.

### 감귤피 pulp의 조제

건조 감귤피 5g을 물 100ml에 담기 하룻밤 방치한 다음 mixer를 사용하여 일정한 정도를 분쇄한 후 silk cloth로 압착 탈수시킨 고형분을 사용하였다.

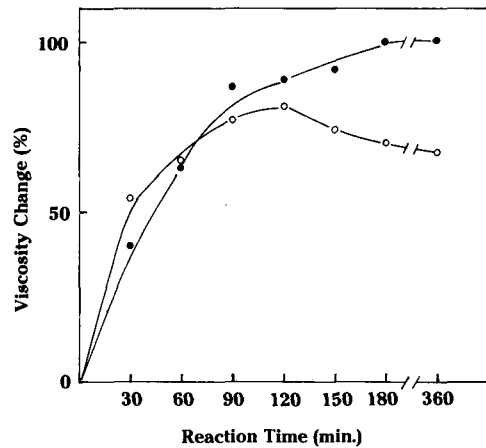


Fig. 1. Changes in Viscosity of Filtrate from Protopectin by Crude Enzymes of A and B Strain

A reaction mixture containing 100 mg of protopectin, 1 ml of crude enzyme extract, and 7 ml of 0.04 M acetate buffer, pH 5, was incubated at 40°C for indicated period and filtered. The viscosity of the filtrate was measured with Ostwald viscometer.

The changes in viscosity of each filtrate were the relative percentages, compared with the viscosity of the filtrate from 360 minute reaction mixture containing the crude enzyme of A strain

● : A strain, ○ : B strain

## Pectin의 분리 및 정량법

여과한 반응액 5 ml를 취하여 ethanol (90%, 0.05N HCl)과 1 : 3으로 섞어<sup>(3)</sup> 단시간 냉각한 후 8,000 RPM에서 10분간 원심분리하여 침전물을 모았다. 다음 이 침전물을 일정량의 물로 희석하고 희석액의 pectin 농도를 carbazole sulfuric acid method<sup>(18)</sup>로 측정하였다.

## pectin의 분자량

Smit and Bryant법<sup>(19)</sup>에 따라서 건조 pectin 0.1g을 sodium metahexaphosphate 1% 용액에 녹여 100ml로 조절한 다음 Ostwald 점도계로 상대점도를 구하고 다음의 식에 의하여 분자량을 계산하였다.

$$MW = \frac{(\eta_r^{1/P} - 1)P}{CK}$$

$\eta_r$  = relative viscosity     $P = 6$      $K = 4.7 \times 10^{-5}$   
 $C$  = Concentration in terms of g galacturonic acid/100ml

## 결과 및 고찰

### Protopectinase 생산균주의 분리 및 동정

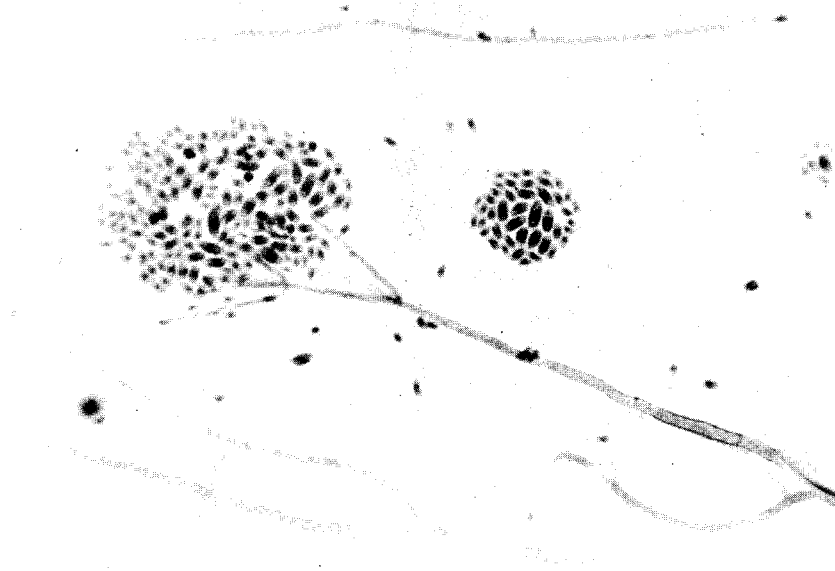
연세대학교 식품공학과 보관 곰팡이 63주와 토양에서 순수분리한 곰팡이 142주, 계 205주로부터 gel forming activity가 나타나는 21주를 선발한 다음 protopectin 용해활성이 큰 5주를 분리하였다.

이 중 pectolytic activity가 가장 낮은, 토양에서 분리된 균주 A와 가장 높은 균주 B를 선별한 다음 protopectin에 대한 두 균주의 작용을 비교하였다.

A 균주는 반응시간의 경과에 따라 점도의 증가를 보였으나 B 균주는 최초 증가를 보이다가 120분 이후에는 반응액의 점도를 감소시켰으므로 pectin 분해활성이 작아보이는 A 균주를 최종 선정하였다 (Fig. 1).

선정된 곰팡이를 동정하기 위하여 그 형태를 관찰하였다.

Colony는 radial surface growth를 보였고,



(x 450)

**Fig. 2. Microscopic Form of Selected Fungus**

It shows the typical characteristics of *Verticillium* sp., which are elongated conidiophores with a pointed apex, originating from the septate hyphae and arranged in whorls, and oval microconidia in clusters at the end of conidiophores.

초기에는 희색이나 차차 붉은색을 나타내었다.

현미경 관찰에 의하면 균사는 격벽이 있으며, 분생자병은 verticillate form을 보이고, 포자는 타원형의 단일세포로서 분생자병 끝에 단독 또는 군집으로 나타났다 (Fig. 2).

이상의 형태에 따라 Burnett 등<sup>(16)</sup>과 Moore 등<sup>(15)</sup>의 분류에 의하여 선정된 곰팡이를 *Verticillium* sp.로 동정하였다.

***Verticillium* sp.에 의한 protopectinase의 생산조건**

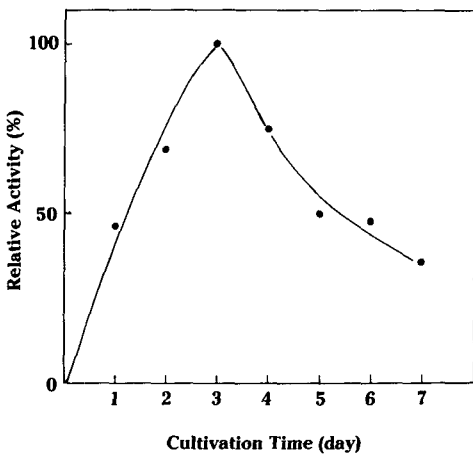


Fig. 3. Time Course of Protopectinase Production by *Verticillium* sp.

The culture media containing 5 g of wheat bran and 6 ml of water were incubated at 30°C for various periods after inoculation. The crude culture extracts were tested for protopectinase activity.

배양일수의 영향 : 회분식 배양시 배양일수의 경과에 따른 효소생산의 변화를 알아보기 위하여 밀기울 5g에 물 6 ml를 가하고 100ml flask에서 가압살균한 배지에 균을 접종하고 30°C에서 배양하여 경시적으로 효소의 생산을 비교한 결과 Fig. 3과 같았다.

Protopectinase 생산은 배양 3일 만에 최대치를 나타내었고 그 이후는 급격히 감소하였으므로 이 후의 생산조건은 3일배양의 조건에서 검토하였다.

배양온도의 영향 : 배양온도를 3°C 간격으로 다르게 고정시킨 항온조에 각각 배양하여 효소

배지중의 수분함량의 영향 : 배지의 수분함량을 다르게 조절하고 효소생산을 비교한 결과 Fig. 5와 같았으며, 이 때의 최적 수분함량은 1.2ml/g 밀기울이었으며 이 이상의 함량에서는 서서히 감소하였다.

탄소원의 영향 Waggoner 등<sup>(22)</sup>도 endopolygalacturase의 생산이 pectin 첨가에 의해 증가함을 보였다.

이에 따라 본 실험의 효소생산에 미치는 pectin 및 당류의 영향을 알아보기 위하여 배지에 2% 농도로 첨가하여 효소의 생산을 비교하였다 (Table 1).

이 결과 실험균은 대조구에 비하여 효소의 생산이 저하되었고 이 중 pectin을 첨가한 실험균의 효소생성이 가장 크게 저하됨을 보였다. 생산에 미치는 온도의 영향을 비교하였다 (Fig. 4).

효소의 생산은 27°C에서 가장 컸으며 그 이상의 온도에서는 온도의 증가에 따라 저해되었다. 이 결과는 유<sup>(20)</sup> 등이 보고한 바 있는 endo-polygalacturonase의 최적 생산온도인 32°C에 비하여 낮은 온도였다.

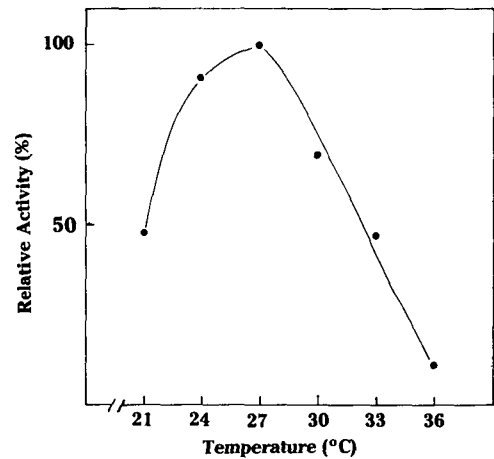
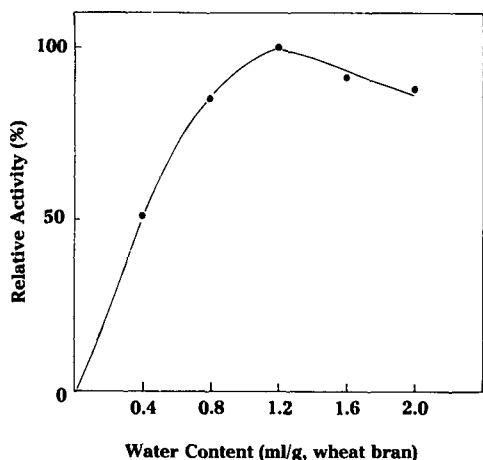


Fig. 4. Effect of Temperature on Protopectinase Production by *Verticillium* sp.

The culture media containing 5g of wheat bran and 6ml of water were incubated for 3 days at various temperatures after inoculation. The culture extracts were tested for protopectinase activity.



**Fig. 5. Effect of Water Content of Culture Medium on Protopectinase Production by *Verticillium sp.***

The culture media containing 5g of wheat bran and various volumes of water were incubated at 27°C for 3 days after inoculation. The culture extracts were tested for protopectinase activity.

이것은 배지에 첨가된 pectin이 조효소액에 용존됨으로서 효소의 활성이 저하되었거나 pectin에 의하여 효소의 생합성이 억제되었기 때문인 것으로 생각되나 확실한 원인은 추후 밝혀져야 하겠다.

질소원의 영향 : 배지에 여러가지 질소원을 0.12%로 첨가하여 효소생산에 미치는 영향을 비교한 결과는 Table 2와 같았다.

효소의 생산은  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와 Urea에 의해 촉진되었으나,  $\text{NaNO}_2$ 에 의해서는 저하되었다.

Waggoner 등<sup>(21)</sup>과 Juntongjin 등<sup>(23)</sup>은 pectic enzyme 생산균의 배지에  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 가한 바

**Table 1. Effect of Carbon Sources on Protopectinase Production by *Verticillium sp.***

Carbon Source (2%)	Relative Activity (%)
Glucose	96
Lactose	90
Sucrose	84
Maltose	90
Starch	94
Pectin	78
None	100

있다.

무기염류의 영향 : 배지에 무기염류를 0.05% 농도로 첨가하여 효소생산에 대한 그 영향을 보았을 때 실험된 무기염들은 효소의 생성을 증가시켰으며 그 중  $\text{CaCl}_2$ 의 영향이 가장 컸다 (Table 3).

보강 영양원 농도의 영향 : 질소원 및 무기염류의 영향을 본 실험에서 효소의 생성은  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와  $\text{CaCl}_2$ 에 의해 촉진되었으므로 그 농도의

**Table 2. Effect of Nitrogen Sources on Protopectinase Production by *Verticillium sp.***

Nitrogen Source (0.12%)	Relative Activity (%)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	122
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	99
$\text{NH}_4\text{Cl}$	92
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100
$\text{NaNO}_2$	85
$\text{NaNO}_3$	109
Urea	120
None	100

**Table 3. Effect of Inorganic Salts on Protopectinase Production by *Verticillium sp.***

Inorganic Salt (0.05%)	Relative Activity (%)
$\text{CaCl}_2$	138
$\text{CuSO}_4$	117
$\text{FeSO}_4$	124
$\text{MgSO}_4$	117
$\text{MnCl}_2$	129
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	129
$\text{NaCl}$	133
None	100

최적조건을 알아보기 위해 먼저  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 여러 농도로 배지에 첨가한 후 효소의 생성을 비교한 결과 최적농도는 0.5%였고,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 가 0.5%농도로 함유된 배지에  $\text{CaCl}_2$ 를 여러 농도로 가하여 그 영향을 보았을 때 최적농도는 0.02%였다 (Fig. 6).

효소의 반응조건

기질과 효소액의 비율효과 : 건조 감귤피 5g으로 부터 조제한 pulp에 효소액(5.7units/ml)의 부피를 달리하여 가하고 2시간 진탕반응 시킨 후 반응액중에 용해된 pectin을 분리하여 정량한 결과는 Table 4와 같았다.

건조피를 기준하여 g당 20ml의 효소액을 가했을 때 최대의 pectin을 얻을 수 있었으며 그 이상의 부피에서는 감소하였는데 그 이유는 용해

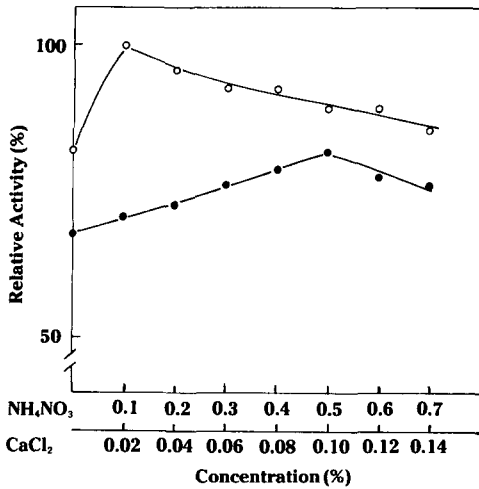


Fig. 6. Effect of Enforced Nutrient Concentration on protopectinase Production by *Verticillium* sp.

The culture media containing 6 ml of water and 5 g of wheat bran enforced with various amounts of nutrients were incubated at 27°C for 3 days after inoculation. Its extracts were tested for protopectinase activity. The effect of CaCl<sub>2</sub> concentration was measured on the condition that the culture media were reinforced with NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> at the concentration of 0.5%.

• : NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ○ : CaCl<sub>2</sub>

된 pectin이 희석됨에 따라서 효소에 대한 활성 저해작용이 감소하였기 때문인 것으로 생각된다.

온도의 영향 : 위의 결과에 따라 효소액 대 기질의 비율을 20ml/g으로 하고 반응온도를 변화시켜 pectin 생산에 미치는 온도의 영향을 알아본 결과 1시간 반응시 40°C가 최적이었다

pH의 영향 : pH가 pectin 생산에 미치는 영

향을 보기 위해 McIlvaine buffer로 pH를 조절하여 1시간 동안 40°C에서 반응시켰을 때 생산된 pectin양은 Table 6과 같았다.

pH 4에서 가장 많은 pectin이 용해되었고 그 밖의 범위에서는 감소하였다.

농도별 반응시간의 영향 : 효소의 농도가 3.5, 7 및 10.5units/ml인 효소액을 가하고 생산되는 pectin을 경시적으로 정량하였을 때 Fig. 7의 결과를 얻었다.

Table 4. Effect of Liquid Volume-to-Pulp Weight Ratio on Pectin Production by Protopectinase

Ratio (ml/g, dry peel wt.)	Total Pectin (mg)
8	13
12	25
16	29
20	31
24	28
28	26

Table 5. Effect of Temperature on Pectin Production by Protopectinase

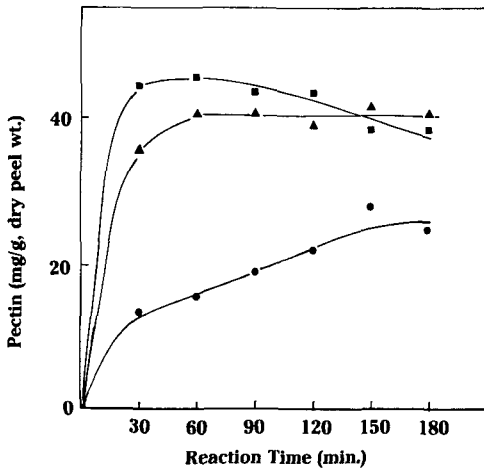
Temperature (°C)	Total Pectin (mg)
35	28
40	56
45	32

Table 6. Effect of pH of Pectin Production by protopectinase

pH	Pectin (mg)
2	26
3	39
4	112
5	77
6	59

**Table 7. Molecular Weight of Pectins**

	Relative Viscosity (%)	Galacturonic Acid (x 1,000)	Molecular Weight
Pectin Sunkist	1.032	68	60.2
Pectin Tokyo Kasei	1.07	68	131.4
This Study	1.022	45	62.4



**Fig. 7. Time Course of Pectin Production by Protopectinase**

The reaction mixtures containing 100 ml of enzyme and pulp made from 5 g of dry peel were shaken at 40°C for various periods. The pectin solubilized in the filtrate of the mixture was precipitated with ethanol and quantified by the carbazole sulfuric acid method.

● : 3.5 units/ml ▲ : 7 units/ml ■ : 10.5 units/ml

효소의 농도가 높을수록 최대 pectin 생산량이 증가하였고 최대 pectin 생산시 까지의 반응 시간은 단축되었으며, 10.5units/ml의 농도에서 1 시간 반응시 45.6mg/g 건조피의 pectin을 얻을 수 있었다.

Pectin의 평균분자량 : pH를 조절하지 않은 효소액에 의하여 생산 건조된 pectin과 시판 pectin의 분자량을 Smit and Bryant법<sup>(19)</sup>으로 측정 한 결과는 Table 7과 같았다.

본 효소에 의해 생산된 pectin의 평균 분자량은 62,000으로 동경화성 제품에 비해 작았으나

Sunkist사 제품과는 비슷하였다.

## 결 론

Protopectin 용해효소를 생산하는 곰팡이를 토양에서 분리하였고, 이 균주를 *Verticillium sp.*로 동정하였다.

*Verticillium sp.*는 밀기울을 배지로 사용하였을 때, 1.2ml/g 밀기울의 수분함량으로 27°C에서 3일간 배양시 최대의 protopectin 용해활성을 나타내었고, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 CaCl<sub>2</sub>를 각각 0.5%와 0.02% 농도로 첨가하였을 때 증가된 효소의 활성을 나타내었으나 당류에 의해서는 감소된 활성을 보였고 그 중 pectin에 의한 감소효과가 가장 컸는데 그 원인은 차후 연구되어야 겠다.

효소를 pectin 생산에 이용하고자 귤피 pulp와 반응시켰을 때 최적조건은 효소액 때 기질의 혼합비율이 20ml/g peel pulp, 반응온도가 40°C, 반응 pH는 4였다. 효소의 농도는 높을수록 pectin 생산량은 증가하였고 반응시간은 짧아졌으며, 효소농도 10.5units/ml에서 1시간 반응으로 약 45.6mg/g peel의 pectin이 생산되었다. 효소에 의해 생산된 pectin의 분자량은 Smit and Bryant법<sup>(19)</sup>에 의해 약 62,000으로 측정되었다.

## 사 사

본 연구는 1981년도 문교부 학술연구비로 수행되었음.

## References

- 1) Srirangarajan, A.N. and A.J. Shrikhande: *J. Food Sci.*, **42**, 279 (1977).
- 2) Joslyn, M.A.: *Adv. Food Res.*, **11**, 1 (1962).
- 3) Kertesz, Z.I.: the pectic substance, Interscience Publishers, New York, 1951.
- 4) Wood, R.K.S.: *Ann. Botany (London) N.S.*, **19**, 1 (1955).
- 5) Arima, K., M. Yamasaki and T. Yasui: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 248 (1964).
- 6) Yamasaki, M., T. Yasui and K. Arima: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1119 (1966).
- 7) Ishii, S. and T. Yokotsuka: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1885 (1972).

- 8) Ishii, S. and T. Yokotsuka: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 313 (1975).
- 9) Ishii, S.: *Phytopathology*, **66**, 281 (1981)
- 10) Charley, V.L.S.: *Chemistry and Industry*, **20**, 635 (1969).
- 11) Sakai, T. and M. Okushima: *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 2427 (1978).
- 12) 坂井拓夫: 發酵と工學,
- 13) Sucharipa, R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **46**, 145 (1924).
- 14) Pelczar Jr., M.J. and E.C.S. Chan: Laboratory exercises in microbiology, McGraw Hill Book Co., 1972.
- 15) Moore, G.S. and D.M. Jaciow: Mycology for the clinical laboratory, Reston Pub. Co., 1979.
- 16) Barnett, H.L. and B.B. Hunter: Illustrated genera of imperfect fungi, Burgess Pub. Co., 1972.
- 17) Buckley, P.M., T.D. Wyllie and J.E. Devay: *Mycologia*, **61**, 240 (1969).
- 18) McComb, E.A. and R.M. McReady: *Anal. Chem.*, **24**, 1630 (1952).
- 19) Smit, C.J.B. and E.H. Bryant: *J. Food Sci.*, **32**, 197 (1967).
- 20) 유주현, 이봉기, 양용, 조세훈, 유준: 산업미생물학회지, **4**, 57 (1976).
- 21) Waggoner, P.E. and A.E. Diamond: *Phytopathology*, **45**, 79 (1955).
- 22) Yamasaki, M., T. Yasui and K. Arima: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 142 (1966).
- 23) Juntongjin, K., T. Seki and H. Taguchi: *Annual Report of ICME*, **3**, 245 (1980).