

# 분리균 *Aspergillus* sp. GF 015를 이용한 柑橘果皮의 糖化

朴奭圭\* · 成洛癸 · 全孝坤

\*慶南大學校 食品工學科  
慶尙大學校 食品加工學科  
(1985년 2월 11일 수리)

## Enzymatic Saccharification of *Citrus* Peel by *Aspergillus* sp. GF 015

Seok Kyu Park\*, Nack Kie Sung and Hyo Kon Chun

\*Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan, Korea  
Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National  
University, Jinju, Korea

(Received February 11, 1985)

In order to utilize *Citrus* peel as fermentative substrate of microorganisms, enzymatic saccharification of *Citrus* peel by the crude enzyme of *Aspergillus* sp. GF 015 isolated and identified from nature was investigated. When the fungus was cultured at 27°C for 3 days in wheat bran medium containing 0.6% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, the maximal production of the enzyme was observed. Optimal conditions for enzymatic reaction of crude enzyme were 15 ml (97.5 unit)/g of enzyme solution to *Citrus* peel powder ratio, pH4.0, 45°C of temperature and 12 hours of reaction time. As the result of saccharifying *Citrus* peel under optimum conditions, reducing sugar on the weight of dry matter was formed 60.2% and saccharifying rate was 76.3%. The sugar solution obtained were mainly composed of glucose, xylose and galacturonic acid. Hydrolyzing enzymes produced by *Aspergillus* sp. GF 015 were pectinase, cellulase and xylanase.

최근 우리나라에서 감귤류의 재배를 적극적으로 권장한 결과, 매년 그 생산량이 급격히 증가되어 1982년에는 322,000M/T에 이르고 있다<sup>(1)</sup>. 이 막대한 양의 감귤류에서 감귤과피는 대개 搾汁粕을 포함하여 60%정도가 부산물로 나오게 되는데, 일부는 飼料 또는 藥用으로 쓰이고 있으나 효과적이지 않은 이용방법이 되지 못하고 있으며 특히 대단위 공장에서 나오는 폐과피의 경제적 이용방법이 절실히 요망되고 있는 실정이다. 20~30%의 全糖을 함유하는 감귤과피는 pectin이 다량 존재하며, 효소의 작용을 거의 받지 않는 lignin의 함량이 적기 때문에 炭水化物的 결합구조 자체가 느슨하여 효소적 처리에 의한 당화가 벚짚, 보릿짚과 같은 다른 농산

폐섬유자원에 비하여 쉬울 것으로 생각된다. 이와 같은 감귤의 과피 및 가공부산물 재이용에 관한 연구는 외국의 경우 주요성분의 추출 및 직접 탄소원으로서의 이용에 대한 연구<sup>(2~4)</sup>가 활발히 진행되고 있으며 국내의 경우도 과피의 성분함량, 추출 및 飼料化에 관한 연구<sup>(5~7)</sup> 등이 되고 있으나 아직 감귤과피의 당화 및 당화액의 미생물 醱酵基質로서 이용에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 감귤과피를 미생물의 발효기질로서 이용하고자 자연계로부터 당화력이 우수한 菌株를 분리하여 最適糖化條件 및 糖化液의 成分組成 등에 관하여 몇가지 조사한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 実験材料

시중에서 구입한温州柑橘(*Citrus unshiu*)의 과피를 5 일 동안 자연건조하여 ball mill에서 20mesh 이하로 분쇄하여 사용하였다.

### 菌株의分離 및選定

곰팡이가 번식한 감귤껍질, 썩은 나무등 균 분리용 試料 1g을 시험관에 넣고 멸균수 10ml를 가하여 잘 현탁시켜, 그 상정액 1ml를 가압 살균한 malt extract agar 培地 15ml에 혼합하여 30℃ 항온기에서 3 일간 평판배양한 후 성장속도가 빠른 colony 만을 순수분리하여 1 차 선정하였다. 1차 순수분리균을 다음의 粗酵素液 調製過程과 糖化活性測定法으로 균주 각각에 대해 糖化力을 측정 한 후, 가장 우수한 곰팡이를 최종적으로 2 차 선정하여 The Genus *Aspergillus* 법<sup>13)</sup>에 준하여 同定하였다.

### 菌培養 및 粗酵素液의 調製

100ml 삼각플라스크에 감귤과피의 분말과 밀기울의 혼합물(중량비 1 : 4) 5g과 증류수 5 ml를 잘 혼합한 후, 121℃, 1kg/cm<sup>2</sup>에서 30분간 가압살균하여 孢子懸濁液으로 균을 접종시켜 27℃에서 3 일간 배양하였다. 배양물에 0.2M-citrate phosphate buffer (pH 5.0) 30ml를 가하여 실온에서 2시간 동안 방치하여 추출하고 깨끗한 가아제로 먼저 여과한 후 6000rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상정액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 0.7飽和시켜 냉장고에서 6시간 침전시켰으며, 침전액을 다시 8000rpm에서 15분간 원심분리하여 침전 단백질을 동일한 buffer 로 용해하고 24시간 동안 4℃에서 透析한 후 25ml로 定溶하여 조효소액으로 사용하였다.

### 酵素의 糖化活性測定

감귤과피 200mg을 100ml 삼각플라스크에 넣고 조효소액 10ml와 0.2M-citrate phosphate buffer (pH 5.0) 15ml를 가하여 rotary shaking incubator (40℃, 150rpm)에서 24시간 반응시켜 여과(Toyo No.3)한 후, 100ml로 정용하여 환원당을 측정하였다. 효소 1 unit는 앞의 조건하에서 효소액 1ml가 감귤과피로부터 30분 동안에 환원당 1mg을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

### 糖의 分析

Glucose의 정량은 Shaffer-Somogyi micro 법<sup>14)</sup>, 환원당은 Somogyi 법<sup>15)</sup>, 총당은 phenol-sulfuric acid 법<sup>16)</sup>으로 정량하여 모두 glucose의 양으로 표시하였다. total uronic acid는 carbazol-sulfuric acid

법<sup>17)</sup>으로 정량하여 galacturonic acid의 양으로 나타내었다. 糖의 定性分析은 silica gel(60G, Merck製)을 이용하여 薄層 chromatography 법<sup>18)</sup>으로 실시하였으며 전개용매는 butanol-isopropanol-water (10 : 5 : 4)를 사용하여 상승법으로 하였다. 발색제는 orcinol-sulfuric acid (0.1% orcinol/2N- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 사용하였다.

### 蛋白質의 定量

효소 column chromatography 중의 단백질 농도는 spectrophotometer (Shimadzu UV-240)를 사용하여 280nm에서 그 吸光度를 구하였다.

### 酵素 column chromatography

앞의 조효소액 조제과정을 거쳐 침전한 단백질을 원심분리(8000rpm, 10min)하여 모은 다음, 0.2M-citrate phosphate buffer (pH 4.0) 5ml에 녹여 4℃에서 하룻동안 투석한 후, 그 중 3ml를 sephadex G-200 column (2.5×90cm)에 통과시켰다. 이때의 유속은 시간당 15ml되게 하여 5ml씩 분취하였으며, 그 중 0.5ml씩을 감귤과피, pectin, xylan, avicel, CMC (carboxy methyl cellulose), 0.05g과 동일한 buffer 15ml와 혼합하여 반응시킨 후 생성된 환

Table 1. Effect of various carbon sources on optimum cultural condition for saccharification of *Citrus* peel by *Aspergillus* sp. GF 015

Carbon sources	Concentration (%)	Relative activity (%)
Arabinose	1.5	86.4
Cellobiose	"	91.8
Galactose	"	90.3
Glucose	"	98.8
Lactose	"	94.5
Maltose	"	92.9
Mannitol	"	93.7
Pectin	"	94.1
Raffinose	"	93.1
Rhamnose	"	96.5
Ribose	"	95.7
Soluble starch	"	87.8
Sorbose	"	100.9
Sucrose	"	94.5
Trehalose	"	90.3
Xylose	"	102.8
Control	No addition	100.0

원당량을 측정하여 각 분획효소의 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

菌株의 選定

분리한 곰팡이 127株중에서 35株를 1차 선별에서 선정하였으며, 2차 선별에서 당화력이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선정하였다. 최종 선정된 균주의 形態學的 特性은 *Aspergillus* 屬의 균주와 일치하였으며 GF-015로 명명하였다.

酵素生産에 미치는 炭素源의 影響

여러가지 탄소원을 밀기울 고체배지에 1.5% 농도로 첨가한 후 对照區와 동일하게 27°C에서 3일간 배양하여 효소생산을 비교하여 본 결과는 Table 1과 같았으며 sorbose와 xylose 외에는 대조구보다 오히려 相對活性이 낮았다. 이와 같은 결과는 밀기울 배지에 있는 澱粉등이 탄소원으로써 효소생산에 충분하기 때문에 첨가함으로써 미생물의 대사합성 과정에 영향을 주는 것으로 생각됨으로 본 균주에 대해서는 탄소원을 따로 첨가할 필요가 없다고 본다.

Table 2. Effect of nitrogen sources on optimum cultural condition for enzymatic saccharification of Citrus peel by *Aspergillus* sp. GF 015

Nitrogen sources	Concentration (%)	Relative activity (%)
NaNO <sub>3</sub>	0.1	104.5
KNO <sub>3</sub>	"	102.8
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	"	103.7
NH <sub>4</sub> Cl	"	103.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	"	103.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	"	101.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	"	103.5
NaNO <sub>2</sub>	"	103.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	"	101.4
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	"	103.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	"	98.2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	"	105.7
CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> COOH	"	103.3
Arginine	"	104.6
Yeast extract	"	108.7
Peptone	"	111.8
Control	No addition	100.0

Table 3. Effect of inorganic salts on optimum cultural condition for enzymatic saccharification of Citrus peel by *Aspergillus* sp. GF 015

Inorganic salts	Concentration (%)	Relative activity (%)
CaCl <sub>2</sub>	0.05	118.2
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	"	112.8
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	"	116.3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	"	106.7
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	"	105.1
NaCl	"	108.4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	"	113.7
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	"	115.0
BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	"	115.5
KCl	"	114.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	"	130.2
LiSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	"	112.5
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	"	115.3
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	"	112.5
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	"	113.1
Control	No addition	100.0

酵素生産에 미치는 窒素源의 影響

질소원 농도를 0.1%로 첨가한 후 27°C에서 3일간 배양하였을 때 효소의 상대활성도는 Table 2와 같았다. 탄소원의 첨가에 비하여 효소활성이 약간 증가하였으며 특히 무기태 질소 중의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 유기태 질소중의 peptone이 비교적 양호하였다. 그런데 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 가격이 훨씬 저렴하고 효소활성도 peptone에 비하여 크게 떨어지지 않기 때문에 이후의 실험에는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 사용하였으며 최적 첨가량은 0.6%였다.

酵素生産에 미치는 無機鹽의 影響

밀기울 고체배지에 0.05% 무기염과 앞서 구한 질소원을 첨가한 후 대조구와 동일하게 27°C에서 3일간 배양한 결과, 효소의 상대 활성도는 Table 3과 같았다.

표에서 나타난 바와 같이 탄소원, 질소원에 비해서 전반적으로 월등한 효소활성의 증가를 나타내었고, 특히 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>는 대조구에 비하여 30.2%의 증가를 보였으며 그 최적 첨가량은 0.05%였다.

酵素反應에 미치는 酵素濃度の 影響

효소반응에 있어서 基質과 酵素液의 比率을 알아

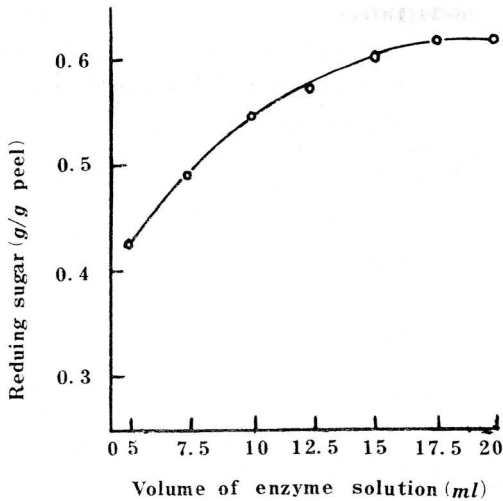


Fig. 1. Effect of volume of enzyme solution on enzymatic saccharification of *Citrus* peel by *Aspergillus* sp. GF 015.

보기 위하여 감귤과피 1g에 효소액 (6.5 unit/ml) 을 5~20ml 가하고, 여기에 다시 0.2M-citrate phosphate buffer (pH 4.0) 15ml를 첨가하여 45 °C 에서 24시간 반응시킨 결과, 반응액중의 환원당량은 Fig. 1 과 같았다.

효소의 농도가 증가함에 따라 환원당량이 증가하였으나 15ml (6.5 unit/ml) 이상 효소액을 첨가하였을 때는 그 糖化率이 비교적 완만하였다.

酵素反應에 미치는 反應時間의 影響

감귤과피의 당화에 대한 효소의 最的 反應時間을 조사한 결과 (Fig. 2), 시간이 경과함에 따라 환원

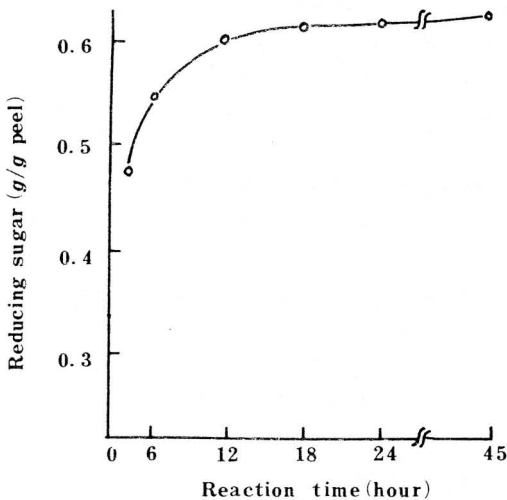


Fig. 2. Time course of enzymatic saccharification of *Citrus* peel by *Aspergillus* sp. GF 015.

Table 4. Composition of saccharifying solution in supernatant after hydrolysis of *Citrus* peel by hydrochloric acid and enzyme.

	(g/g peel)				
	Total sugar	Reducing sugar	RS/TS ×100 (%)	Glucose	Total uronate
None a)	0.29	0.14	48.3	0.05	0.08
Acid+ Autoclave b)	0.53	0.39	75.2	0.11	0.17
Enzyme c)	0.65	0.61	95.0	0.19	0.23

- a) Soaked in distilled water at room temperature for 24hours
- b) Treated with 0.7% HCl at 1.5kg/cm<sup>2</sup> for 30min. (1 g peel/100ml acid)
- c) Treated with enzyme solution at 45°C for 12hr.

당량이 증가하였으나 12시간 부근이 가장 적당하였으며, 과피로 부터 60.2%의 환원당이 생성되어 76.3%의 당화율을 나타내었다.

糖化液의 分析

원료 감귤과피를 앞서 얻은 처리조건으로 당화한 후, 당화액중의 주요성분함량을 무처리 및 산·가압처리와 비교한 결과는 Table 4 와 같았다. 환원당 생성율은 효소처리가 무처리 및 산·가압처리 보다 각각 4.4배, 1.6배의 현저한 증가를 나타내었으며 total uronic acid의 함량은 각각 3배, 1.4 배로 증가하였다. 또한 총당에 대한 환원당의 비율이 산·가압처리 때가 75.2%인데 비하여 효소처리는 95%로 상당히 底分子化되어 있기 때문에 미생물의 탄소원으로 이용하는데 매우 바람직할 것으로 판단된다. 한편 감귤과피의 최종 당화액 성분조성을 다른 두가지의 처리와 비교하기 위하여 TLC 한 결과는 Fig. 3 과 같았다.

효소처리시는 다른 두가지의 처리에 비하여 glucose, xylose, galacturonic acid가 다량 검출되었으며 Nishio<sup>(6)</sup> 등의 보고와 대개 비슷하나 중성 단당류인 arabinose 대신에 xylose가 다량 검출되었다. 그런데 xylose는 hemicellulose界의 약 반 정도를 차지하고 있는 xylan에서 분해된 것으로 종래에는 미생물의 발효기질로 부적합하다고 믿어왔지만 최근에는 미생물의 資化가 가능하며 여러가지 발효미생물을 생산하기 위한 기질로 사용할 수 있다는 것이 알려져 있기 때문<sup>(18)</sup>에 감귤과피의 xylose도 발효기질로 충분히 이용될 것으로 생각된다. 또한 다량 함유되어 있는 galacturonic acid를 잘 資化할

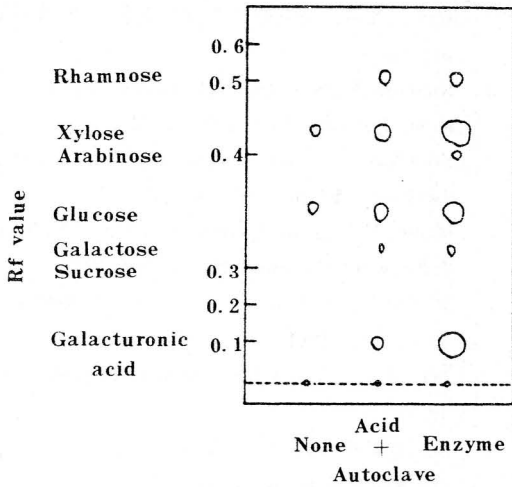


Fig. 3. Thin layer chromatogram of saccharifying solution in three treatments of *Citrus* peel.

수 있는 미생물이 산업적으로 이용된다면 더욱 더 바람직할 것으로 판단된다.

柑橘果皮 分解酵素의 Column Chromatography

공시균주의 감귤과피 당화에 관여하는 주효소를 알아 보기 위하여 pectin 및 여러가지 섬유성 기질에 대한 粗酵素液의 분해활성을 앞의 당화 활성측정법에 따라 측정해 본 결과 (Table 5), xylan, pectin을 각각 80, 51% 분해하였으며 CMC, avicel도 상당량 분해하였다. 이와 같은 효소를 좀 더 명확히 밝혀보기 위하여 sephadex G-200을 사용하여 gel filtration시켜 본 결과는 Fig. 4 와 같았다.

단백질의 peak는 5개 구간으로 나타났으며, 이 중 감귤과피의 당화에 크게 관여하는 것은 I, II, III 3개였으며 pectinase, cellulase 및 xylanase 로 판단되었다. 각 효소의 정제 및 효소학적 특성은 계속적으로 실험하고자 한다.

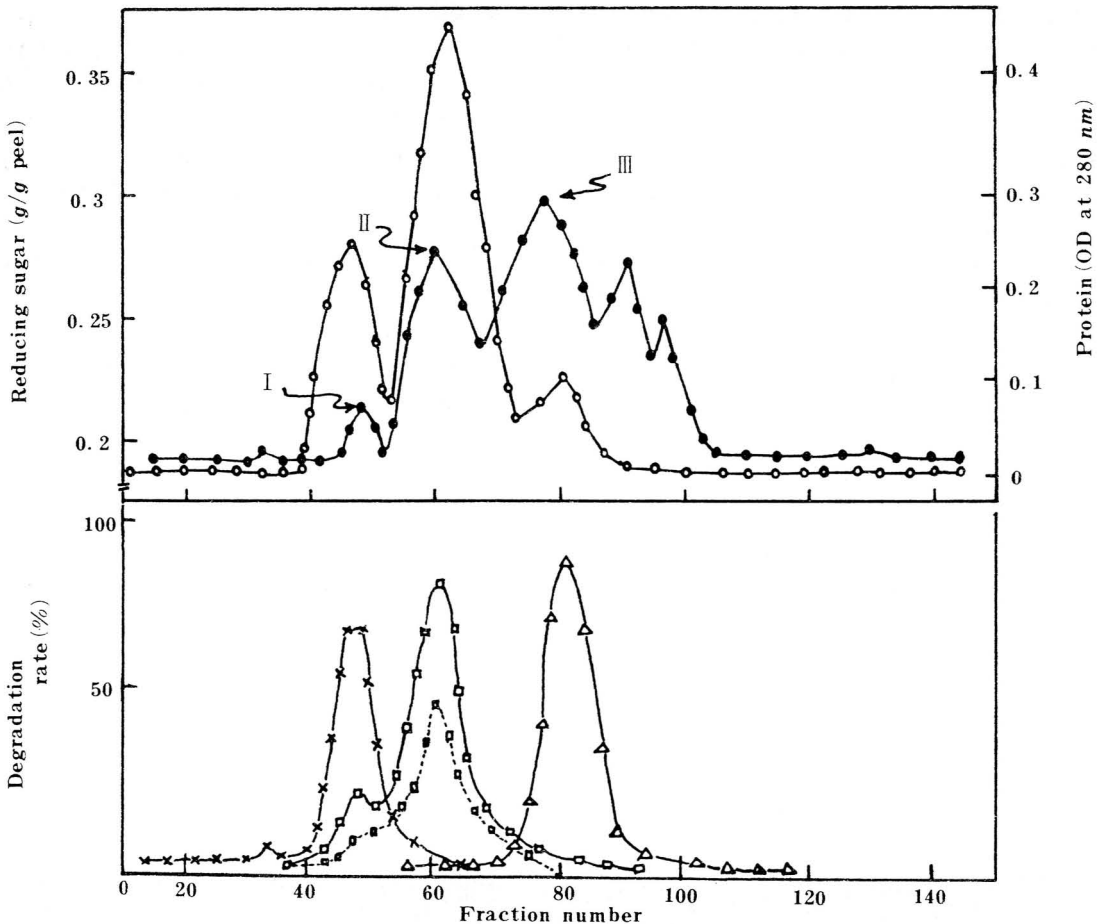


Fig. 4. Gel filtration of crude enzyme with sephadex G-200.

- : *Citrus* peel, ●-● : Absorbance at 280nm, △-△ : Xylan,
- ×-× : Pectin, □-□ : CM-cellulose, □-□ : Avicel

**Table 5. Saccharifying activity against various cellulose substrate of crude enzyme extracted from *Aspergillus* sp. GF 015**

Saccharification Substrate	Treatment (%)	Control (%)
Orange peel	61.3	13.8
CM-cellulose	24.4	0
Avicel	15.0	0
Pectin	51.3	0
Xylan	80.9	0
Filter paper	11.9	0
Soluble starch	18.8	0
D(+)-Cellobiose	100.0	65.6

요 약

감귤과피를 미생물의 발효기질로 이용하기 위하여 우선 미생물이 생산하는 효소로서 감귤과피의 최적 당화조건을 실험한 결과는 다음과 같다.

감귤과피를 용이하게 당화시키는 균주로서 *Aspergillus* sp. GF 015를 분리·동정하였으며, 그菌株의 酵素生産은 밀기울 고체배지에 질소원(NH<sub>4</sub>N O<sub>3</sub>)무기염(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)을 각각 0.6, 0.05%의 농도로 첨가하여 27°C에서 3일간 배양하였을 때가 가장 좋았다. 한편 酵素의 最的反應條件은 기질과 조효소액의 비율 15ml (97.5 unit)/g peel, pH 4.0, 반응온도 45°C, 반응 12시간이 적당하였다. 그 결과 원료감귤과피에 대해 60.2% 환원당을 생성하여 76.3%의 당화율을 나타내었으며 총당에 대한 환원당의 비율이 95%로 상당히 저분자화 되어 있다.

또한 최종당화액중의 주요성분은 glucose, xylose, galacturonic acid였으며, 감귤과피 분해에 관여하는 주효소는 cellulase, pectinase였는데 xylanase 도 약간 관여하였다.

참고문헌

1. 제주도 통계년보, (1983).

2. 岡田, 太田, 海老根: 農藝化学会大会 要旨集, 264 (1978).

3. Kumagai, K., S. Usami and S. Hattori: *J. Ferment. Technol.* 59 (5), 461 (1981).

4. Yoshikawa K. and H. Tsuetaki: *J. Ferment. Technol.* 57 (6), 467 (1979).

5. Nishio, N. Y., Oku, D. Kawamura and S. Nagai: *J. Ferment. Technol.* 51 (5), 354 (1979).

6. 態谷和夫, 宇佐美昭次, 服部達彦: 醱酵工学, 59 (5), 461 (1981).

7. 吉川光一, 濱滝はまよ: 醱酵工学 57 (6), 467 (1979).

8. 上田誠之助: 有用物質生産 第二回 シンポジウム 講演豫橋集, 41 (1983).

9. Toshio Hara, J. Y. Lim, Yusak Fujio and Seinosuke Ueda: *Nippon Shokuhim Kogyo Gakkaiishi* 31 (9), 581 (1984).

10. Moon, S. J., K. H. Sohn and M. H. Lee: *Korean J. Food Sci. Technol.* 14 (1), 63 (1982).

11. Yang S. J., J. J. Chung and C. J. Chung: *Korean J. Anim. Sci.* 26 (3), 236 (1984).

12. Chang, H. N. and K. E. Nam: *Korean J. Food Sci. Technol.* 9 (4), 251 (1977).

13. Raper, K. B., D. I. Fennel: *The Genus Aspergillus*, The Williams and Wilkins company, Baltimore, (1965).

14. Association of Official Analytical Chemists: *Official method of A. O. A. C.*, 574 (1980).

15. 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩宅裕之: 食品分析ハンドブック, 建帛社, (1972).

16. 日本生化学編: 糖質の化学 下, 375 (1974).

17. 安藤鋭郎, 寺山密, 西澤一俊: 生化学研究法 I, 258, 朝倉書店, (1967).

18. Han M. H. and Y. D. Lee: *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* 9 (4), 241 (1981).