THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vol. 26, No 2, p281-286 June 1998
Copyright © 1998 by The Korean Society of Mycology
Printed in S. KOREA

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 Polygalacturonase를 이용한 과즙청징

윤 숙 · 김명곤*[1] · 홍재식 · 박일웅[2]

전북대학교 농과대학 식품공학과, [1]국립 이리농공전문대학 식량자원학과, [1]전북 산업대학교 식품공학과

Juice Clarification with the Use of Polygalacturonase Produced by *Ganoderma lucidum*

Sook Yoon, Myung-Kon Kim*[1], Jai-Sik Hong and Il-Woong Park[2]

Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk, 560-756
[1]Department of Food Resources, Iri National College of Agriculture & Technology, Iksan, Chonbuk, 570-110
[2]Department of Food Science & Technology, Chonbuk Sanup University, Impi, Kunsan, Chonbuk, 575-930, Korea

ABSTRACT: ***Ganoderma lucidum*** **produced the potent pectolytic enzymes for clarifying cloudy fruit juice. Among the purified polygalacturonases (endo- and exo-polygalacturonase), endo-polygalacturonase had a good effect on juice clarification. The optimum temperature and concentration of endo-polygalacturonase for the juice clarification were 40°C and 4 unit/5 m*l* juice, respectively. The apple juice was almost completely clarified at 40°C for 60 min. It was suggested that culture filtrate of *Ganoderma lucidum* or it's ammonium sulfate fraction should be used as a good source of pectolytic enzyme for juice clarification.**

KEYWORDS: Endo- and exo-polygalacturonase, *Ganoderma lucidum*, Juice clarification

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 활엽수의 그루터기나 뿌리 밑동에서 서식하고 6~9월 경의 고온기에 활발히 생육하는 1년생 담자균류에 속하는 백색부후균(中村, 1983)으로 2000년 전부터 중국에서는 각종 질병에 효능이 있어 만병통치, 불로장수 등에 진귀한 약재로 활용(朴, 1985; Hyun 등, 1990; Chang 등, 1993)되어 오고 있다. 현재도 건강지향적 사고에 의해 현대인들의 건강보조식 또는 건강 drink제의 원료로 사용되고 있으며 영지 중의 미지의 특수 생리활성성분 및 약효성분들이 계속 밝혀지고 있기 때문에 이의 사용범위는 훨씬 더 증대될 것으로 생각된다.

Pectin질은 미생물을 비롯하여 고등식물계 및 하등식물계에 이르기까지 자연계에 널리 분포되어 있고, galacturonic acid로 구성된 직쇄상의 polygalacturonide로 평균 분자량(川端와 澤山, 1977)이 20~30×10^4이며, 약 1000~1500개의 galacturonic acid가 α-1.4-glucoside 결합에 의해 중합된 polygalacturonic acid이다. 많은 미생물들은 복잡한 형태로 여러가지 pectin 분해효소를 생산하는데, 식물체의 구성성분인 pectin을 분해하여 식물체의 연화(Gross와 Wallner, 1979; Hobson, 1964; 藤井, 1956)에 깊이 관여하고, 옛부터 삼의 발효정련(島, 1985), 과즙의 청징(Endo, 1965a; 岡田 등, 1969; 綾野 등, 1959) 등에 사용되어 온 효소이다.

과실에는 비타민과 무기질 등이 풍부하고, 당분 및 유기산 등이 많아 단맛과 상쾌감을 주므로 과실들의 대부분은 생식용 뿐만 아니라 과실주, 통조림, 쥬스, 건조제품 등으로 다양하게 가공되어 상품화되고 있다. 과실에서 천연 쥬스나 과실주를 제조하는 공정 중에는 과실중의 pectin질에 의하여 과즙의 압착이 곤란하고 쥬스의 수량이 낮아지며 더욱이 제품이 혼탁되는 어려운 문제들이 남아 있다. 이러

*Corresponding author

한 문제들을 해결하기 위하여 pectin질 분해효소제를 사용하려는 연구는 오래 전 부터 많은 연구자(Endo, 1965b; 岡田 등, 1969; 綾野와 井上, 1959; 島, 1985)들에 의해서 시도되었고, 외국에서는 1930연대 부터 과실 쥬스, 과실주를 제조할 때 청징제 또는 여과 촉진제로서 공업적으로 사용되어 오고 있다(島, 1985).

천연에 존재하는 pectin 질은 대부분 methyl기가 고도로 ester화된 고 methyl polygalacturonic acid의 형태(Endo, 1965a)가 대부분으로 이들을 가수분해시키기 위해서는 polygalacturonase 단독으로는 어려워 1차적으로 pectin 질에서 methyl기를 가수분해하는 pectin methyl esterase가 작용하여 pectin 질을 pectic acid로 분해한 다음 이 polygalacturonic acid(pectic acid)에 endo-polygalacturonase가 작용하여 galacturonic acid의 oligomer로 분해 용해시킴으로서 pectin 질에 의한 과즙 혼탁방지 및 식물조직 연화(Endo, 1965b; Yamasaki 등, 1966a; Kaji와 Okada, 1969; Mussell과 Strouse, 1972)를 이룰 수 있다. 그리고 천연 pectin 질을 분해하는데 endo-polygalacturonase와 pectin-esterase의 공동작용에 의해서나 혹은 endo-polygalacturonase 중 고 methyl polygalacturonic acid에 선택적 특이성이 있는 endo-methyl polygalacturonase의 생산능이 우수한 균주의 활용이 바람직하나 대부분의 미생물이 생산하는 polygalacturonase는 pectin보다 pectic acid에 친화성이 강한 endo-polygalacturoanse가 대부분(Ishii와 Yokotsuka, 1972; Yamasaki 등, 1966a; Kaji와 Okada, 1969; Mussell과 Strouse, 1972)으로, 이것 단독으로는 각종 식품공업의 pectin 분해 효소제로서 활용하기에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 그러나 버섯류가 생산하는 pectin 분해효소 screening 과정 중 pectin질 중 pectic acid 뿐만 아니라 고 methyl polygalactuonic acid에 속하는 apple pectin에도 높은 친화성을 보이는 endo-methyl polygalacturonase의 높은 생산능을 *Ganoderma lucidum*에서 확인한 바 있고(윤 등, 1994ab), 영지 버섯은 자실체 뿐만 아니라 균사체에도 유용한 생리활성물질을 함유하고 있어 향후 균체를 대량생산할 때 배양액에 다량 잔존하게 되는 pectinase의 유용한 자원으로도 활용할 수 있으며, 밀감 쥬스 산업에서 대량으로 폐기되는 밀감 껍질 폐자원의 유용활용을 위한 기초 실험 결과 담자균류 중 다른 담자균류에 비하여 영지버섯에서 다량의 균사체와 강력한 pectin 분해효소를 생산할 수 있음도 또한 확인하였다. 따라서 영지버섯이 생산한 효소의 이용적 측면에서 polygalacturonase를 활용한 과즙청징 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주

전보(윤 등, 1994a)에서와 같이 polygalacturonase 생산 능력이 가장 우수한 균주로 *Ganoderma lucidum* A001 균주를 공시균주로 사용하였다.

배양 방법

*Ganoderma lucidum*을 Table 1과 같은 polygalacturonase 생산용 배지(윤 등, 1994a) 50 m*l*에 직경 0.5 cm의 균편을 접종하여 25°C에서 7일간 종배양한 후 Omni mixer로 2분간 무균적으로 마쇄한 균사 현탁액 4 m*l*를, 250 m*l* 삼각 flask에 배양액을 50 m*l*씩 넣어 1.2 kg/cm^2 압력에서 15분간 살균한 배지에 접종하여 30°C에서 10일간 배양 후 배양 여액을 적당히 희석하여 효소활성을 측정하였다.

조효소액의 조제

Table 1. Composition of medium for polygalacturonase production from *Ganoderma lucidum*

Pectin	10 g
Soluble starch	10 g
Yeast extract	1 g
Peptone	2 g
Phenylalanine	1 g
KH_2PO_4	2 g
$MgSO_4$	0.2 g
$CaCl_2$	50 mg
Thiamin.HCl	100 μg
Distilled water	1000 m*l*
pH	5.5

*Ganoderma lucidum*을 상기의 액체배지에서 10일간 정치배양한 배양물을 여과하여 endo- 및 exo-polygalacturonase의 조효소액으로 하였다.

효소의 정제

Ammonium sulfate에 의한 분획 *Ganoderma lucidum* 배양 여액에 ammonium sulfate를 가하여 30~85% 포화시켜 침전물에 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 가하여 용해하고 동일 완충용액에서 하룻밤 투석하고 동결건조하였다.

Biogel P-100 Column chromatography Ammonium sulfate로 염석 및 투석하고 동결건조시킨 조효소를 소량의 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 용해하고 동일 완충용액으로 평형화시킨 Biogel P-100 column에 주입하여 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 분당 0.2 m*l*의 속도로 5.2 m*l*씩 분취하였다.

DEAE-Cellulose column chromatography Biogel P-100 column chromatography의 활성 peak를 모아 동결건조하고 소량의 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 용해하여 동일 완충용액으로 평형화한 DEAE-cellulose column에 주입하고 동일 완충용액에서 1 M NaCl로 linear gradient elution 시키면서 5.2 m*l*씩 분취하여 활성 peak를 모았다.

Sephadex G-150 Column chromatography DEAE-cellulose column chromatography의 활성 peak를 모아 투석하여 동결건조하고 소량의 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 용해하고, 동일 완충용액으로 평형화시킨 Sephadex G-150 column에 주입하여 동일 완충용액으로 분당 0.2 m*l*의 속도로 5.2 m*l*씩 분취하여 활성 peak를 모았다.

Endo-polygalacturonase 활성 측정

1% pectin을 함유한 0.04 M sodium acetate buffer(pH 4.6) 5.6 m*l*에 조효소액 1 m*l*를 가하고 40°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 boiling water bath에서 3분간 반응정지 후 반응액 1 m*l*를 취하여 유리된 환원당을 DNS법(Miller, 1959)에 의하여 540 nm에서 비색정량하였다. Galacturonic acid를 사용하여 같은 방법으로 표준곡선을 작성하였으며 효소활성도는 galacturonic acid를 1분당 1 μM 생성하는 능력을 1 unit로 하여 활성의 비교단위로 하였다.

과즙청징 활성의 측정

천연과즙의 청징효과는 岡田 등(1969)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 천연과즙으로는 밀감, 또는 사과를 마쇄, 압착한 후 혼탁과즙 5 m*l*를 원심분리관에 넣고 효소액 0.5 m*l*를 가하여 40°C에서 1시간 반응시켰다. 이를 원심분리(3,000 rpm)하여 상징액을 증류수에 5배로 희석한 것을 spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도를 측정하고 대조구(효소액 대신 증류수를 사용한 것)에 대한 청징도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{과즙청징도}(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{반응액의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

이상과 같이 하여 청징도가 80%에 도달하면 육안적으로 거의 투명하게 된다. 따라서 위와 같은 조건하에서 과즙 1 m*l*를 80% 청징화하는데 요하는 효소력을 과즙청징활성 1 Unit로 하였다.

결과 및 고찰

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase의 응용을 위한 실험으로 전보(윤 등, 1994b)에서와 같이 생산 분리 정제한 효소를 각종 과일 쥬스를 대상으로 이들 효소에 의한 과즙청징 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다.

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase 중 exo-polygalacturonase는 과즙청징에 거의 효과가 없었으나 endo-polygalacturonase를 함유하는 fraction에서만 과즙청징 활성이 높아 과즙청징은 전적으로 endo-polygalacturonase에 의해서 만 일어남을 알 수 있었다. 일반적으로 과일 쥬스는 청징도가 80% 이상일 때 육안적으로거의 투명한 것으로 느끼기 때문에, 80% 청징도를 기준으로 효소들의 과즙청징 활성을 비교하여 보면 endo-polygalacturonase의 정제도가 증가할

Table 2. Juice clarifying activity of crude and purified polygalacturonase in apple juice

Enzymes	Polygalcturonase (Unit/mg protein)	Juice clarifying value (Unit/mg protein)
Culture filtrate	19.5	15
Ammonium sulfate fraction	44.8	900
Exo-polygalacturonase	147.0	9
Endo-polygalacturonase	892.0	54,000

Table 3. Juice clarification by polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*

Enzyme (10 unit/ml)	Juice clarifying activity (unit/ml)	
	Apple juice	Orange juice
Culture filtrate	16	15
Ammonium sulfate fraction	18	16
Purified exo-polygalacturonase	0	0
Purified endo-polygalacturonase	15	14

수록 과즙청징 활성도 증가하여 정제 endo-polygalacturonase(892 unit/mg protein, endo-PG unit)의 경우 54,000 unit/mg protein의 과즙청징 활성을 보였다. 따라서 DNS 환원력으로 각 효소의 농도를 10 unit/ml되게 조정하고 사과 쥬스와 밀감 쥬스를 대상으로 과즙청징 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다.

사과 쥬스 및 밀감 쥬스에 대하여 exo-polygalacturonase는 두 시료 모두에 과즙청징 활성을 나타내지 않았던 반면 영지버섯 균사체 배양여액은 16, 15 unit/ml의 활성을 나타보였고, ammonium sulfate 분획물은 18, 16 unit/ml, 정제 endo-polygalacturonase는 15, 14 unit/ml의 과즙청징활성을 각각 나타내어 정제도가 증가할 수록 과즙청징 활성도 약간씩 상승하기는 하나 정제 endo-polygalacturonase 보다도 영지버섯 균사체 배양여액이나 ammonium sulfate 분획물이 오히려 과즙청징 활성이 약간 더 우수한 것으로 미루어 과즙의 청징활성은 endo-polygalacturonase에 의해 주로 일어나지만 endo-polygalacturonase 이외에도 다른 요인들이 과즙청징에 촉진 작용을 하지 않았나 생각된다. Endo(1964a)와 Yamasaki 등(1966b)은 polygalacturonase와 pectinesterase의 공동작용 뿐만 아니라 protease의 관여가 필요하다고 하였고, McLellan 등(1985)은 polygalacturonase 단독으로는 곤란하여 혼탁과즙에 꿀과 같은 응집제를 혼용하였을 때 그 작용이 증진된다고 하였다. 또한 岡田 등(1969)과 井上 등(1970ab)은 사과나 포도 쥬스의 청징에 효과적으로 작용하는 효소제가 감귤 쥬스의 청징에는 별로 효과가 없는 것을 발견하고 감귤 쥬스의 청징은 주로 polygalacturonase에 의하여 일어나고 일종의 hemicellulase가 그의 작용을 특이적으로 촉진시킨다고 주장한 바 있다. 따라서 실제 과즙청징을 위해서는 완전 정제한 endo-polygalacturonase를 이용하는 것보다 조 추출물인 배양액이나 ammonium sulfate 분획물을 이용하는 방안이 더 경제적이며 효율적인 것으로 판단된다.

온도의 영향

과즙청징에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 배양여액, ammonium sulfate 분획, endo- 및 exo-polygalacturonase를 20~70°C의 범위의 온도에서 30분간 반응시킨 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서와 같이 40°C에서 최대의 활성을 나타내었고 30~60°C의 범위에서 비교적 높은 활성을 유지하였는데 이는 본 endo-polygalacturonase의 최적 반응 온도 실험에서와 거의 유사한 경향이었다(윤 등, 1994b). 효소원의 종류에 따라서는 exo-polygalacturonase 구를 제외하고는 큰 차이를 나

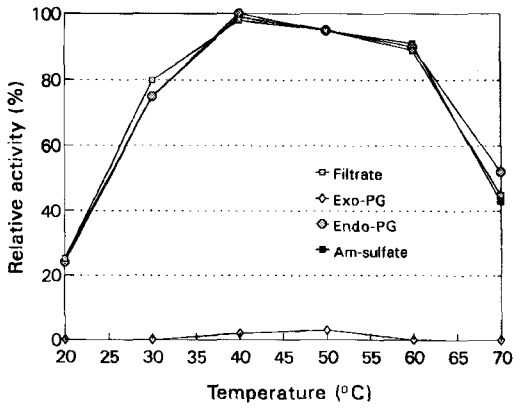

Fig. 1. Effect of temperature on the clarification of apple juice by *Ganoderma lucidum* polygalacturonase

타내지 않았다.

반응시간의 영향

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 endo-polygalacturonase의 과즙청징에 미치는 반응 시간의 영향을 검토하기 위하여 효소원의 농도를 DNS 환원력으로 환산하여 10 unit/0.5 m*l* 및 5 unit/0.5 m*l*가 되도록 조정하고, 사과 쥬스 5 m*l*에 효소원 0.5 m*l*(v/v, 10%)씩 첨가하여 경시적으로 과즙청징 활성을 검토한 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다.

Fig. 2에서와 같이 반응 시간이 경과됨에 따라 10 unit/5.5 m*l*의 효소첨가 구는 10분 까지는 과즙청징 활성이 급격히 증가하였고, 그 이상의 반응 시간에서는 비교적 완만한 상승을 보이다 20분 이상의 반응시간에서는 큰 활성도의 변화를 나타내지 않았

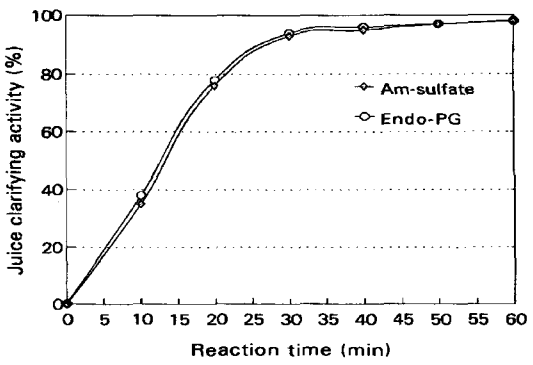

Fig. 2. Effect of reaction time on the clarification of apple juice (10 unit/5.5 m*l* juice).

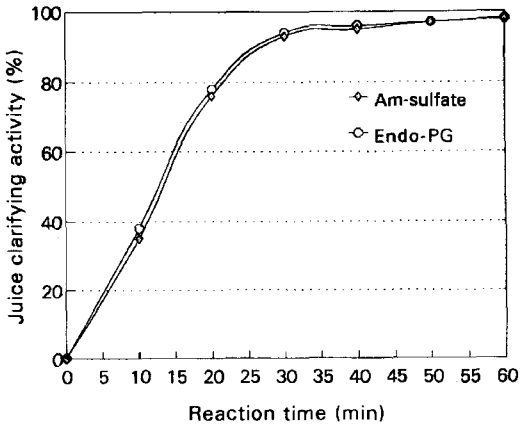

Fig. 3. Effect of reaction time on the clarification of apple juice (5 unit/5.5 m*l* juice.

으며, 80%의 청징활성은 약 10분의 시간이 소요되었던 반면, 5 unit/5.5 m*l*의 효소 첨가구는 30분 까지는 거의 지수적으로 증가하다 그 이상의 반응 시간에서는 큰 활성도의 변화를 나타내지 않았으며 80%의 과즙청징활성을 나타내는데 약 20분 정도가 소요되었다(Fig. 3).

효소농도의 영향

과즙청징을 위한 적정 수준의 효소농도를 검토하기 위하여 효소 농도를 DNS 환원력으로 0~10 unit/m*l*되게 조정하고 5 m*l*의 사과 쥬스에 효소원을 0.5 m*l*씩 첨가하여 60분간 반응 후 이들의 과즙청징도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서와 같이 3 unit/m*l*의 효소농도 까지 거의 비례적으로 급격한 증가 추세를 보이다가 4

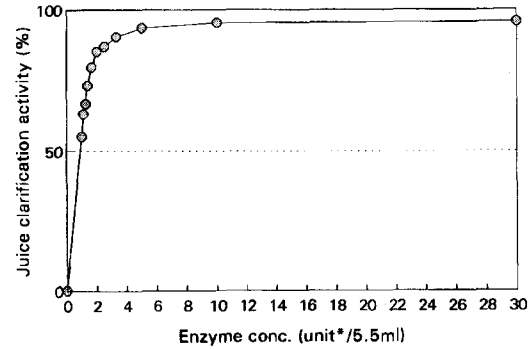

Fig. 4. Effect of endo-polygalacturonase conc. on the clarification of apple juice. ○, 40°C, 60 min reaction, *Reducing activity

unit 이상의 농도에서는 청징도에 뚜렷한 효과를 나타내지 않아 4 unit/ml의 효소액을 과일 쥬스에 10%(v/v) 첨가하는 것이 가장 효율적일 것으로 생각된다.

적 요

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturoanse(endo- 및 exo-polygalacturoanse)를 이용하여 과즙청징 효과를 검토한 결과에 endo-polygalacturoanse에 의해서만 과즙청징을 이룰 수 있었으며, 과즙청징을 위한 endo-polygalacturoanse의 반응 최적 온도는 40°C이었고, 과즙 5 ml 당 약 4 unit의 endo-polygalacturoanse를 첨가하였을 때 60분에 거의 청징되었다. 그리고 polygalacturoanse의 효소원으로는 영지버섯 균사체 배양 여액이나 ammonium sulfate 분획물을 이용하는 방안이 가장 효율적일 것으로 생각되었다.

참고문헌

윤 숙, 김명곤, 홍재식, 김명숙. 1994a. *Ganoderma lucidum*으로 부터 polygalacturonase의 생산. 한국균학회지. 22: 286-297.

윤 숙, 김명곤, 홍재식, 김명숙. 1994b. *Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase의 정제 및 성질. 한국균학회지. **22**: 298-308.

岡田茂孝, 井上雅資, 福本壽一郎. 1969. 果汁清澄酵素劑に關する研究 (第1報) 柑橘果汁清澄促進因子について. 日本農藝化學會誌 **43**: 99-104.

綾野雄幸, 井上憲政. 1959. *Penicillium chrysogenium* Q176のりんご果汁清澄作用について (第4報) *Penicillium chrysogenium* Q176のもつペクチン質分解酵素の性狀とりんご果汁の清澄效果について. 日本農藝化學會誌 **33**: 410-414.

島英治. 1985. 食品工業と酵素. 朝倉書店 p 73-81.

井上雅資, 岡田茂孝, 福本壽一郎. 1970a. 果汁清澄酵素劑に關する研究 (第2報) 柑橘果汁清澄促進因子の精製とその性質. 日本農藝化學會誌 **44**: 1-7.

井上雅資, 岡田茂孝, 福本壽一郎. 1970b. 果汁清澄酵素劑に關する研究 (第3報) 柑橘果汁混濁粒子懸濁液に對するヘミセルラーゼIIIの清澄促進作用. 日本農藝化學會誌 **44**: 8-14.

Endo, A. 1964. Studies on pectolytic enzymes of molds. Part VII. Turbidimetry of apple juice clarification and its application to determination of enzyme activity. *Agric. Biol. Chem.* **28**: 234-238.

Endo, A. 1965a. Studies on pectolytic enzymes of molds, Part XIV. Properties of pectin in apple juice. *Agr. Biol. Chem.* **29**: 137-143.

Endo, A. 1965b. Studies on pectolytic enzymes of molds. Part XIII. Clarification of apple juice by the joint action of purified pectolytic enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 129-136

Ishii, S. and Yokotsuka, T. 1972. Purification and properties of endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1885-1893.

Kaji, A. and Okada, T. 1969. Purification and properties of an unusually acid-stable endo-polygalacturonase produced by *Corticium rolfsii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **131**: 203-209.

McLellan, M. R., Kime, R. W. and Lind, L. R. 1985. Apple juice clarification with the use of honey and pectinase. *J. Food Sci.* **50**: 206-208.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.

Mussell, H. W. and Strouse, B. 1972. Characterization of two polygalacturonases produced by *Verticillium albo-atrum*. *Canadian J. Biochem.* **50**: 625-632.

Yamasaki, M., Yasui, T. and Arima, K. 1966a. Studies on pectic enzymes of microorganisms. Part II. Production of endo-polygalacturonase with *Aspergillus saitoi*. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 142-148.

Yamasaki, M., Yasui, T. and Arima, K. 1966b. Studies on pectic enzymes of microorganisms. Part III. Endopolygalacturonase of *Aspergillus saitoi*. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 1119-1128.