農化學會誌 第八號 (1967)

葉煙草 醱酵中 酵素活性度의 變化에 關한 硏究

金浩植・全在根・李瑞來
서울大學校 農科大學

裵孝元・成絢淳
中央專賣技術硏究所

(1967 年 3 月 21 日 受理)

Studies on the Change of Enzyme Activities during the Fermentation of Tobacco Leaves

H. S. Kim, J. K. Chun and S. R. Lee
College of Agriculture, Seoul National University, Suwon

H. W. Bae and H. S. Sung
Technical Institute of Monopoly Office, Seoul

Summary

In order to investigate the change of enzyme activities during the fermentation of tobacco leaves, whole and cut leaves were treated for twenty days at 30° and 39°C by the normal procedure and inoculation of yeast, respectively, and the activity of several enzymes was measured at proper intervals.

1) Alpha-amylase activity was steadily decreased with the progress of fermentation.

2) Invertase and catalase activities were steadily decreased until the mid of the period, and then increased again toward the end of the fermentation. The latter enzyme activity showed more marked change than the former.

3) Most of the polyphenol oxidase activity were decreased abruptly in the early stage of the fermentation, and thereafter leveled down slowly.

4) Peroxidase activity was detected throughout the fermentation but no remarkable change was observed.

5) Protease activtty was not detected through the fermentation period.

Ⅰ. 緖 論

乾燥過程이 끝난 葉煙草에서 煙草製品을 만들기 직전에 實施하는 熟成過程에 關하여 오래전부터 硏究되어 왔었다. Suchsland[1]는 1891 년 葉煙草로부터 몇가지 細菌과 絲狀菌을 分離하여 微生物에 의한 醱酵說을 처음으로 提唱하였다. 그 후 여러 學者들도 煙草의 熟成에 微生物이 關與함을 報告하였다[2,3]. 또한 熟成中의 葉煙草로부터 여러 가지 酵素들을 검출[4]함을 비롯하여 煙草의 品質이 煙草中의 微生物數와 密接한 關係가 있을 뿐만 아니라 微生物은 catalase의 活性度에 影響을 주고 있음이 報告되었다[5]. 그리고 catalase는 煙草의 主成分의 하나인 nicotine의 酸化的 分解에 關與하며[6,7,8], 한편 褐變現象이 polyphenol oxidase와 같은 酸化酵素에 의한 phenol性 物質의 變化에 起因한다는 硏究結果[7~12]들은 葉煙草의 熟成過程에서 微生物과 各種酵素들의 役割이 至大함을 뜻하고 있다. 더욱이 酵素의 根源이 微生物이건 煙草組織이건 여러 化學的 反應에 參與하여 各種成分의 變化를 일으키며, 煙草製品의 品質에 큰 影響을 줄 것은 明白한 일이다.

따라서 著者들은 葉煙草人工熟成에 對한 機作을 解明하는 同時에 葉煙草의 品質에 미치는 化學成分의 影響을 理解하므로써 製品의 品質向上을 圖謀하려는 意圖下에 現在 短期間의 醱酵處理로 所期의 熟成效果를 얻고 있는 葉煙草醱酵에 있어서 微生物群의 變化에 對한 旣報[13]에 이어 酵素化學的 硏究를 試圖하였다. 그리하여 葉煙草의 醱酵中 主要한 役割을 가질 것이라 豫想되는 amylase, invertase, protease, peroxidase 및 polyphenol oxidase 등 酵素

活性度의 變化를 測定하였으므로 그 結果를 이에 報告한다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1) 試　料

本 實驗의 醱酵에 使用한 煙草는 1965 年産 黃色種(*Nicotiana tabacum L. var. Bright Yellow*)으로 乾燥操作을 마치고 一年間 貯藏한 것이다.

2) 醱 酵 方 法

上記葉煙草를 表 Ⅰ과 같은 여러가지 方法으로 水分이 14 %가 되도록 조절한 후 20 日間 醱酵過程을 거쳤다.

表 1. 醱酵方法과 內容

醱酵方法	試料狀態	醱酵溫度
通常醱酵	葉草	39°C
	刻草	30°, 39°C
酵母接種醱酵	葉草	39°C
	刻草	30°, 39°C

酵母接種醱酵區는 葉煙草에서 純粹培養時 良好한 香味를 주는 *Hansenula angustus*[14]를 煙草浸出液에 通氣培養하여 遠沈시킨 후 殺菌水로 3 回 洗滌하고 殺菌水에 다시 현탁시킨 것을 煙草에 噴霧하였다. 刻草는 2 mm 의 幅으로 細切한 것이다.

3) 酵素液의 調製

試料 2~3 g 을 적당한 pH 의 0.05 M McIlvain 燐酸緩衝液(以後에 緩衝液이라 함은 이를 意味함) 또는 蒸溜水를 加하고 海砂와 함께 約 10 分間 磨碎抽出하여 綿布로 濾過하고 濾液을 10,000 rpm에서 20 分間 冷凍遠心分離하여 上澄液을 酵素液으로 하였다. invertase 測定用 酵素液은 透析에 의하여 還元性物質을 除去한 후 적당히 희석하여 사용하였다.

(a) α-Amyalse

Blue value 法[15]에 準하여 pH 7.0 의 緩衝液으로 抽出한 酵素液 1 ml 에 同一緩衝液 4 ml, 1 % 可溶性澱粉溶液 5 ml 을 가하여 40°C 에서 15 分間 反應시킨다음 2 N H_2SO_4 10 ml 를 가하여 反應을 停止시킨다. 이 反應液과 同對照反應液 1 ml 씩을 取하여 0.001 M I_2 용액 10 ml 를 가하고 650 mμ 에서의 吸光度를 測定하였다. 酵素活性度의 單位는 上記條件下에서 乾物 每 g 當 變化한 吸光度의 百分率로 表示하였다.

(b) Invertase

緩衝液(pH 6.0)으로 稀釋한 酵素液 1 ml 에 緩衝液 2 ml, 1 % sucrose 溶液 2 ml 를 가하여 40°C 에서 30 分間 反應시키고, 이 때 生成된 還元性糖을 Somogyi 滴定法[16]에 依하여 定量하였다. 酵素의 單位는 同條件下에서 乾物 每 g 當 生成된 glucose 의 mg 數로 表示하였다.

(c) Protease

Formol 滴定法[17]에 準하여 中和한 2 % casein 溶液 5 ml 와 蒸溜水로 抽出한 酵素液 1 ml 를 40°C 에서 30 分間 反應시키고 formaline 1 ml 를 加하여 反應을 停止시킨 후 0.02 N NaOH 로 滴定하였다. 酵素活性度는 同一條件下에서 乾物 每 g 當 所要된 NaOH 溶液의 ml 數로 表示하였다.

(d) Catalase

pH 6.0 의 緩衝液으로 抽出한 酵素液을 使用하여 沃度滴定法[18]에 準하여 測定하고 所要된 0.005 N $Na_2S_2O_3$의 ml 數를 酵素單位로 하였다[9].

(e) Peroxidase

0.05 M Sörensen 緩衝液(pH 7.0)으로 抽出한 酵素液을 使用하여 Warburg 檢壓法[19]에 依하여 測定하였다. 즉 主室에 1 % H_2O_2 溶液 1 ml 와 5 % pyrogallol 용액 0.5 ml, 側室에 酵素液 0.5 ml, 副室에 10 % KOH 0.2 ml 를 가하여 25°C 에서 10 分間 平衡後 反應時間 5 分間에 發生한 CO_2의 量을 測定하였다. 酵素의 活性度는 同反應條件下에서 乾物 每 g 當 發生한 CO_2의 μl 數로 表示하였다.

(f) Polyphenol oxidase(o-diphenal oxidase)

緩衝液(pH 6.0)으로 抽出한 酵素液을 Warburg 檢壓法[9,10]에 의하여 측정하였다. 즉 主室에 酵素液 1 ml, 側室에 M/100 chlorogenic acid 용액 0.4ml, 副室에 10 % KOH 용액 0.2 ml 를 가하고 30°C 에서 15 分間 平衡시킨 後 10 分間에 吸收한 O_2의 量을 測定하였으며, 同反應條件下에서 乾物 每 g 當 吸收한 O_2의 μl 數를 酵素의 單位로 하였다.

Ⅱ. 結　果

1) α-Amylase

α-amylase 의 活性度는 그림 1 에서 보는 바와 같이 酵母處理區와 非處理區에서 뚜렷한 差異를 發見할 수 없었고, 다만 低溫醱酵(30°C)에서 高溫醱酵보다 약간 緩慢한 變化를 보였으며, 醱酵全期間을 거쳐 모든 處理區에서 活性度는 계속 감소하였다.

2) Invertase.

未醱酵葉中 旣存하는 酵素의 活性度는 醱酵가 進行됨에 따라 減少되어 醱酵中期에 이르러 最少値를

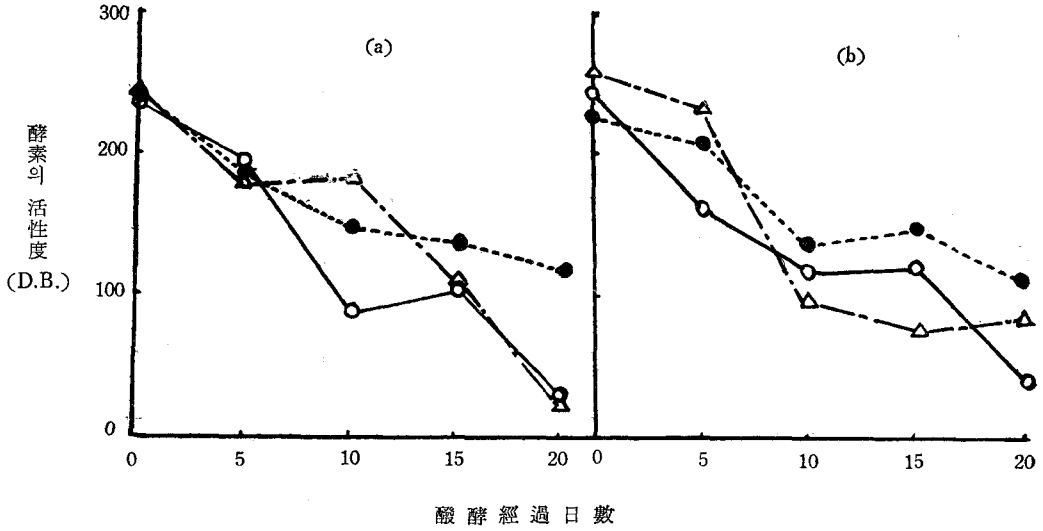

그림 1. 葉煙草 醱酵中 α-Amylase 活性度의 變化
(a) 通常醱酵 (b) 酵母接種醱酵
○——○ 刻草, 39°C; ●·····● 刻草, 30°C; △——△ 葉草, 39°C

보였으나 그 以後 차츰 活性이 恢復되었으며, 末期에 이르러 急激히 增加하였다. 酵母 處理區에서는 温度 및 葉草, 刻草의 處理에 따라 相異한 結果를 나타내었고, 末期에 있어서도 非處理區에서와 같은 急激한 增加는 볼 수 없었다. 그러나 中期에 그 活性度가 最低로 되는 것은 同一하였다(**그림** 2).

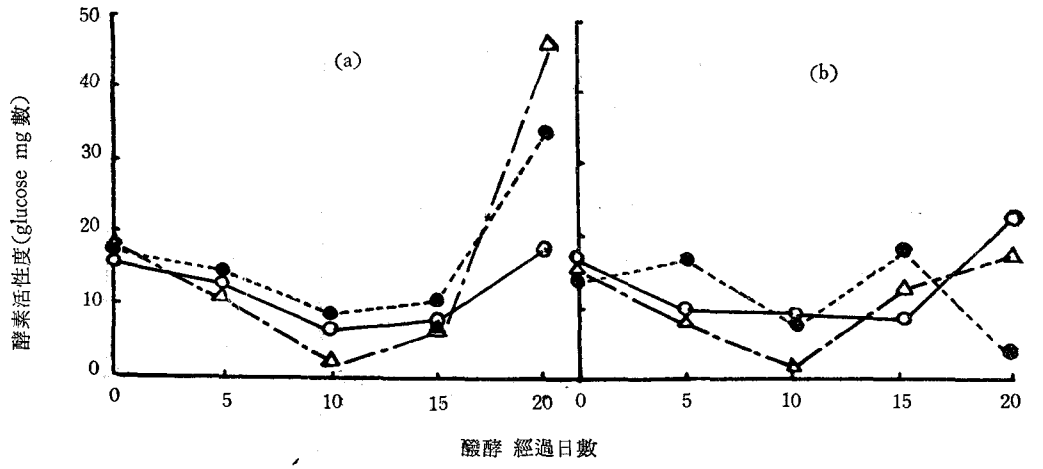

그림 2. 葉煙草 醱酵中 Invertase 活性度의 變化
(a) 通常醱酵, (b) 酵母接種醱酵
○——○ 刻草, 39°C; ●·····● 刻草, 30°C; △——△ 葉草, 39°C

3) Catalase

未醱酵葉에서 상당히 높았던 活性度는 醱酵初期 急速히 減少되어 醱酵經過 10日 後에 完全히 失活되었다. 그러나 그 以後 곧 活性이 다시 增加하였으며, 酵母處理區에서도 大體로 같은 결과를 나타냈다(그림 3).

4) Peroxidase

그림 4에서 보는 바와 같이 酵母處理區와 非處

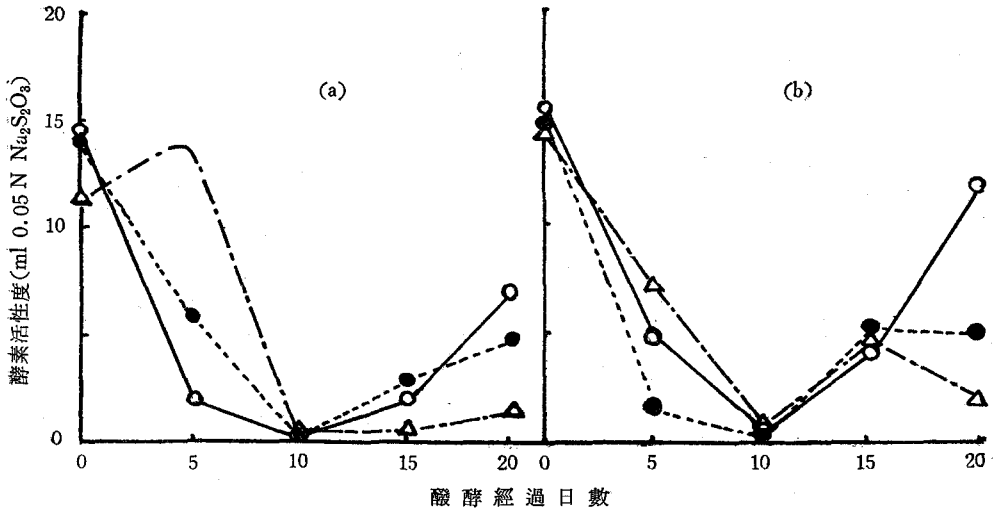

그림 3. 葉煙草 醱酵中 Catalase 活性度의 變化
(a) 通常醱酵, (b) 酵母接種醱酵
○——○ 刻草, 39°C; ●·····● 刻草, 30°C; △——△ 刻草, 39°C

理區間의 差異는 別로 없었다. 그러나 兩處理區에 있어서 醱酵溫度, 刻草 또는 葉草의 區別에 따라 他酵素에서 볼 수 없었던 傾向을 보여주었다. 즉 39°C 刻草區에서는 醱酵 第5日에 일단 活性度가 增加하였다가 다시 減少되었다. 한편 同溫度의 葉草區에 있어서는 初期에 若干 減少하였다가 다시 增加하였고 30°C 刻草區에서는 醱酵 全期間을 通하여 큰 變化가 없었다.

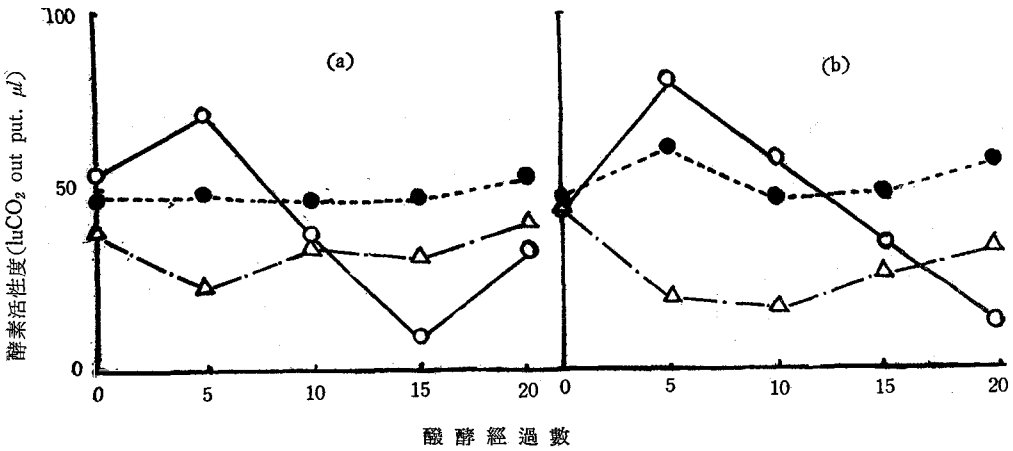

그림 4. 葉煙草 醱酵中 Peroxidase 活性度의 變化
(a) 通常醱酵 (b) 酵母接種醱酵
○——○ 刻草, 39°C; ●·····● 刻草, 30°C; △——△ 葉草, 39°C

5) Polyphenol oxidase

그림 5 에서와 같이 酵母處理區 및 非處理區에서 비슷한 活性度의 變化를 보여주고 있는데 未醱酵葉에 相當量 存在하였던 活性度가 醱酵經過 第5日에 이르러 大部分 失活되었다. 그 以後에는 別變化가 없었으나, 酵母處理區에서 第15日에 活性이 若干 增加하였다.

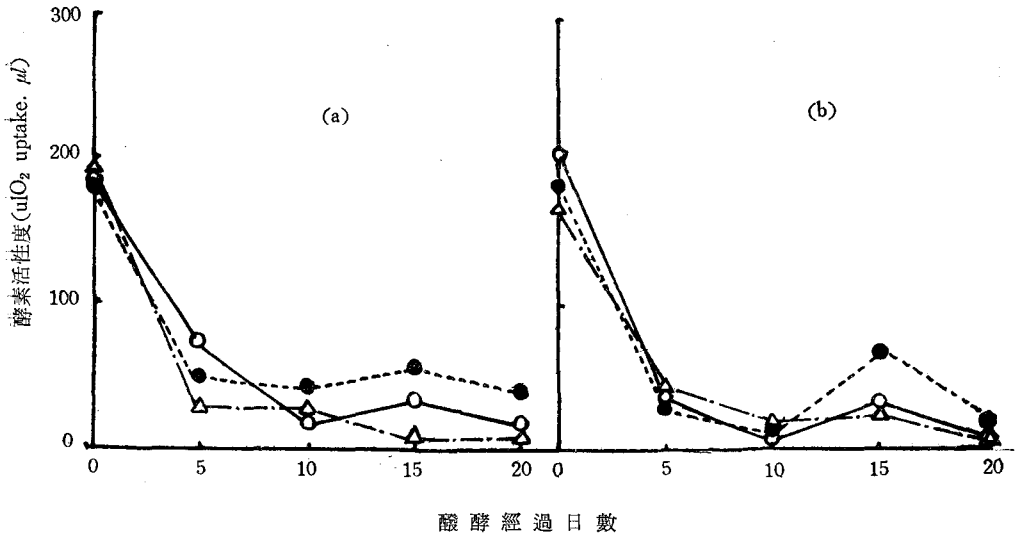

그림 5. 葉煙草 醱酵中 Polyphenol oxidase의 變化

(a) 通常醱酵 ((b) 酵母接種醱酵

○——○ 刻草, 39°C; ●·····● 刻草 30°C; △——△ 葉草, 39°C

Ⅳ. 考 察

葉煙草의 醱酵가 進行되는 동안 各種酵素의 關與와 이들 活性의 變化가 있음은 以上의 結果들로 부터 알 수 있다. 그러나 이들 酵素의 給源과 役割에 對하여 明確한 결론을 내릴 수는 없으나 複雜한 葉煙草 人工熟成機構의 一面을 考察하는 데에는 有助할 것같다.

炭水化物 分解酵素인 α-amylase는 熟成過程中 계속 減少하였는데, 이는 微生物에 依한 生成이 거의 없고 葉中 旣存酵素의 失活 때문에 活性의 減少로 나타난 것이라고 推想된다. 한편 invertase는 未醱酵葉에도 相當히 存在하며 비록 初期에는 醱酵進行과 더불러 減少하여 中期에 이르러서 거의 失活되나 더 醱酵가 進行되면 다시 活性을 回復하게 되는데 이것은 醱酵中의 微生物 增殖과 密接한 關係가 있음을 證明하는 것이다. 더욱이 酵母接種醱酵區에서 이와같은 現像이 뚜렷함은 人爲的으로 酵母를 處理함으로써 增加된 微生物에서 起因한 것임을 뒷받침하여 주는 것이다. 이들 炭水化物 分解酵素의 葉煙草熟成過程에서의 役割은 잘 알려져 있지 않으나 葉煙草中에는 상당량의 糖分이 存在함으로 醱酵에 關與하는 微生物은 β-amylase 같은 糖化酵素의 生產이 必要없을 것이므로 醱酵中 그 活性度가 減少一路에 있으나 invertase와 같은 酵素는 微生物이 亦是 포도당과 같은 單糖類를 더 잘 利用하는데 起因하여 醱酵中期 以後에 그 增加를 보이는 것같다.

酸化酵素인 catalase의 경우도 中期 以後 그 活性이 增加함은 微生物에 의한 酵素의 生成을 의미하는 것이다. 特히 catalase는 煙草의 品質과 密接한 關係가 있으므로[7,8] 本實驗에서 未醱酵葉에 旣存하였던 酵素가 醱酵條件下에서 쉽게 失活되고 微生物의 增殖期에 뒤이어 곧 活性이 增加된 結果는 사실상 酵素의 상당한 變性을 考慮한다면 더 많은 효소가 醱酵過程에서 生成되었다고 보아야 하겠다.

Peroxidase는 醱酵期間中 別로 變化없이 相當한 活性을 持續하였는데 이 亦是 이 酵素의 不安定度를 생각할 때 실제로 더 많이 生成되어 catalase와 더부러 葉煙草의 成分中 nicotine을 위시하여 다른 alkaloid 및 catechol, pyrogallol 등 phenol性物質의 酸化的 分解에 關與하고 있는 것이 아닌가 推想된다. 또한 polyphenol oxidase는 葉煙草의 褐變現象에 關與하는 것으로 널리 報告되어 있는데[10,11,12,20] 本實驗에서 未醱酵葉에 相當量의 活性이 남아 있었고, 初期에 急激히 減少한 後 그 變化가 완만하다가 말기에 若干 增加하는 듯한 傾向은 微生物에 의한 이 酵素의 生成을 의미하는것 같으며, 또한 醱酵過程中에서도 어느정도의 褐變現象이 일어나고 있음을 뜻하고, 더욱이 熟成된 葉煙草中에 chlorogenic acid 같은 phenol性 化合物이 많음을 考慮한다면 polyphenol oxidase는 이 phenol性物質을 酸化하며, quinone系物質을 生成토록 하므로써 褐

變現象을 이르키는것 같다. 이 밖에 polyphenol性 物質로 알려진 lignin, tannin, catechin[24]의 酸化的 分解에도 參與하여 香氣成分으로 豫想되는 여러가지 分解産物을 生成하므로써 煙草의 香味에 重要한 役割을 가지는 것이 아닌가 推理되므로 매우 興味있는 문제로 생각된다. 더욱이 煙草의 熟成途中 各種 phenol性 物質과 α-amino態窒素 化合物은 相互作用하여 melanoid類似의 不溶性 物質을 生成하여 煙草의 燃燒時 香味에 영향을 미친다는 報告[12]를 考慮하면 葉煙草의 人工熟成中 여러가지 酸化酵素에 의한 香味成分의 生成機構를 究明함은 人工熟成의 機作을 理解하는 데 도움이 되는 同時에 品質이 向上된 煙草製品을 生産하는 데 一助가 될 수 있는 것이라 思料된다.

Ⅴ. 要　　約

葉煙草醱酵過程中 酵素活性度의 變化를 觀察하기 위하여 葉煙草를 葉草와 刻草의 狀態로 30°C와 39°C에서 酵母接種에 依한 醱酵와 通常醱酵에 의하여 20日間 熟成中 每 5日마다 여러가지 酵素의 活性度를 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) Amylase의 活性은 醱酵가 進行됨에 따라 계속 감소하였다.

2) Invertase와 catalase는 醱酵中期까지 계속 減少하고 그 후 다시 증가하였으며 catalase의 경우 그 變化가 더욱 현저하였다. Peroxidase는 醱酵全過程을 通하여 相當한 活性을 보여주었고, 뚜렷한 增減이 없었다.

3) 酵母處理區와 非處理區間에는 酵素活性의 差異가 거의 없었으나 葉草, 刻草 및 醱酵溫度의 區分에 따라 差異가 있었으며, 그 傾向은 一律的이 아니었다.

4) Polyphenol oxidase는 未醱酵葉에서 상당한 活性을 보였으나 발효가 進行됨에 따라 激減하였다.

引 用 文 獻

(1) E. Suchsland: Ber. Deut. Bot. Gesell., **9**, 79 (1891).
(2) O. Loew: U.S. Dept. Agr. Rept., **59**, 34(1899).
(3) J. Johnson: J.Agr. Research, **49**, 137 (1934).
(4) 仁勝武雄, 北村榮壽：日農化, **12**, 87 (1936).
(5) J. J. Reid, D. E. Haley, D. W. Mckinstry and J. D. Surmatis: J. Biol. Chem., **34**, 460 (1937).
(6) L. I. Hochstein and S.C. Ritenberg: J. Biol. Chem., **240**, 3671 (1965).
(7) W. G. Frankenberg and A. A. Vaitenkunas: Arch. Biochem. Biophys., **58**, 509 (1955).
(8) W. G. Frankenberg: Advan. Enzymol., **6**, 309 (1946).
(9) 富田英夫, 玉置英之助： 日農化, **36**, 704 (1962).
(10) 松山晋：日農化, **35**. 405 (1961).
(11) V. K. Yunoskev; Pishvevaya Tekhnol No. **5**, 97 (1960); C.A., **54**, 25599 (1960).
(12) I. Zelitch and M. Zucker: Plant Physiol., **33**, 151 (1958).
(13) 梁且範, 全在根, 金在薰, 裵孝元：韓農化, **7**, 53 (1966).
(14) 金浩植, 全在根：未發表
(15) H. Fuwa: J. Biochem. (Japan), **41**, 5 (1954).
(16) M. Somogyi: J. Biol. Chem., **195**, 19 (1952).
(17) K. Hofmann and M. Bergmann: J. Biol. Chem., **138**, 243 (1941).
(18) H. V. Euler and K. Josephson: Chem. Ber., **56**, 1749 (1928).
(19) 赤堀四郎 編：酵素研究法, **1**, 551 (1955).
(20) 松山晋：日農化, **34**, 662 (1962).