

쌀막걸리의 微生物学的 研究

第 4 報 : 담금중 核酸分解酵素系의 性質 및 核酸關聯物質의 变化

金英傑* · 成洛癸 · 鄭德和 · 姜仁秀**

*太平洋化学, 慶尙大学校 食品加工学科, **晋州実業專門大学
(1983年 2月 6日 수리)

Microbiological Studies on the Rice *Makgeoly*

IV. Properties of Nucleic Acid Degrading Enzymes and their Related Substances during Brewing

Young-Geol Kim*, Nack-Kie Sung, Duck-Hwa Chung and In-Soo Kang**

*Pacific Chemical IND. CO., LTD., Suwon 170, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 620-15, **Jinju Technical College, Jinju 620

(Received February 6, 1983)

Abstract

Nucleic acid degrading enzymes (RNase, PDase, PMase) isolated from rice *Makgeoly* brewing were purified by DEAE-cellulose column technique and their enzymological properties were examined. Changes of nucleotides and their related substances during the brewing were also investigated. The results obtained were as follows:

1. RNase activity was increased in the earlier phase of brewing and then decreased after 3 days brewing, while PDase and PMase activities were decreased with the lapse of time.
2. The optimum pH of RNase was 5.0 and those of PDase and PMase were 6.0. Activities of these three enzymes were almost stable in the range of pH 6.0-7.0.
3. The optimum temperature of RNase and PDase were in the range of 55 - 60°C and that of PMase was about 50°C. When RNase was treated at 100°C for 10 min., 80% of activity was lost PDase lost 90% of activity when heated at 70°C for 10 min., while PMase was completely inactivated at the same condition.
4. Cu^{++} , Zn^{++} inhibited the activity of NRase, Activity of PMase was reduced about 30% by adding $10^{-3}\text{M Na}_2\text{PHO}_4$.
5. Until 4 day brewing, IMP was increased, while UMP, GMP, AMP were decreased gradually.

서 론

쌀막걸리에 관한 연구는 武田⁽¹⁾가 우리나라 각지방의 곡자와 막걸리술덧을 蒐集하여 곡자의 일반성분의 분석과 미생물을 분리하여 그중 *Saccharomyces* 屬에

대한 형태학적 성질을 발표한 것을 비롯하여 대체로 쌀막걸리의 일반적성질에 대한 연구가 이루어져왔다⁽²⁻⁹⁾.

저자들도 우리나라 전통주인 쌀막걸리의 주질개선을 위한 일련의 연구로 자연계에서 분리한 製麹用麹菌 M-80을 사용하여 製麹中の 핵산관련물질 및 핵산분해효소에 관한 연구와 그 이용성에 대한 報文을 발표한

바 있다⁽¹⁰⁻¹²⁾.

本報에서는 前報에 이어 쌀막걸리 담금중에 있어서 경시적으로 핵산관련물질의 변화와 관련효소들의 활성을 조사하고, 이들을 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 분리정제한 다음 정제효소들의 몇 가지 효소학적성질을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 시료는 밀알23호를 9분도로 도정하여 製麴 및 담금하는데 사용하였다.

공시균주

실험에 사용한 製麴種菌은 本 實驗室에서 분리보관 중인 *Aspergillus usamii* M-80을, 발효용 효모로서는 *Saccharomyces coreanus*를 사용하였다.

핵산관련물질 및 단백질 정량

가. 핵산관련물질의 추출

牛島等⁽¹³⁾의 方法을 참조하였다. 즉 막걸리 담금중의 술밀과 술덧을 25g씩 취하여 혼합마쇄한후 10%냉과염 소산 50ml를 가하고 homogenizer에서 20분간 균질화시켜 4,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 침전물은 다시 5%냉과염소산 30ml를 가하여 homogenizer에서 20분간 균질화시킨후 원심분리하며, 이조작을 반복하여 취한 상등액은 모두 합하여 60%수산화칼륨으로 중화시키고 이때 생성된 침전은 4,000rpm으로 10분간 원심분리하여 제거하고 상등액은 증류수를 첨가하여 125ml로 정용한후 탈염 및 탈색을 하였다.

탈염 및 탈색시 상단에는 정제된 duolite S-30(30~60mesh) 탈색수지를 column(內徑 1.5cm, 높이15cm)에 충전하고 하단에는 상단과 같은 규격에 D제A-2형(30~60mesh) 탈염수지를 15cm높이로 충전하고 원료를 진한 염산으로 pH3.0으로 조절하여 0.5ml/min의 유속으로 흡착시키고 다음에 pH3.0염산용액 150ml를 흘려 핵산관련물질을 완전히 하단column에 이행시킨후 상단 column을 제거하고 증류수 500ml로서 수세한 다음 0.3N암모니아수 20ml로써 溶離시킨것을 일정량 취하여 실험에 사용하였다.

나. 핵산관련물질의 정량

上記와 같이 추출한 시료를 Table 1과 같은 조건으로 high speed liquid chromatography(Water ALC/244)로써 정량하였다.

Table 1. Conditions of high speed liquid chromatography for the analysis of nucleotides and related compounds

Type	Water ALC/244
Sample No.	Standard, seed mash, makeoly brewing
Sample size	5 ~ 10μl
Column	μbondapak C118
Column temp.	Room temp.
Liquid	0.1M (NH ₄) ₂ HPO ₄
Chart speed	0.5cm/min.
*AUFS	0.15~0.20

*Absorbance unit full scale

다. 단백질정량

Folin, Ciocalteu의 呈色法⁽¹⁴⁾과 자외선흡수법(280nm)에 의하여 spectrophotometer MPS-5000(Shimadzu)으로 측정하였다.

핵산관련효소활성의 측정

가. 시료조제

星立等⁽¹⁵⁾의 方法으로 3일째 술덧을 균일하게 채취하여 5배가량의 증류수와 함께 homogenizer에서 균질화하여 5℃에서 4시간동안 추출하고 이것을 celite를 이용하여 여과후 조효소액으로 사용하였으며 이것을 정제하기위하여 DEAE-Cellulose column에 의하여 분획하였다.

나. 효소활성의 측정

RNase활성은 효모RNA(和光純藥工業株式會社製), PDase활성은 BPNPP(bis-p-nitro-phenyl phosphoric acid; 半井化學藥品株式會社製)를, 그리고 PMase는 PNP(p-nitro-phenyl phosphoric acid; 和光純藥工業株式會社製)를 기질로 하여 前報⁽¹¹⁾와 같은 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

담금일수에 따른 효소활성

담금일수에 따른 효소활성의 경시적변화를 측정하기 위하여 담금 1일부터 8일까지의 술밀과 술덧을 균일하게 채취하여 각각의 활성을 상대활성도로 나타낸 결과 Fig.1에서 보는 바와 같이분리균 M-80으로 담금 술밀은 시간이 경과함에 따라 효소활성이 점차 감소하였으며 특히 PDase는 3~4일에서 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 鄭等⁽¹¹⁾이 보고한 製麴工程

중에서의 시간이 경과함에 따라 활성이 증가하는 경향과는 대조적인 결과를 나타내고있다. 술덧에 있어서는 술밑과 같이 PDase 및 PMase는 시간이 경과할수록 점차감소하였으나 RNase의 경우 담금 3일까지는 활성이 점차 증가하다가 그이후는 감소하는 경향을 나타내었다. 이와같이 製麴工程中에서는 활성이 점차 강해지며 담금후에는 대조적으로 점차감소하는 것은 足立 등이 청주에서 실험한 결과와 비슷한 경향을 보이고 있다.

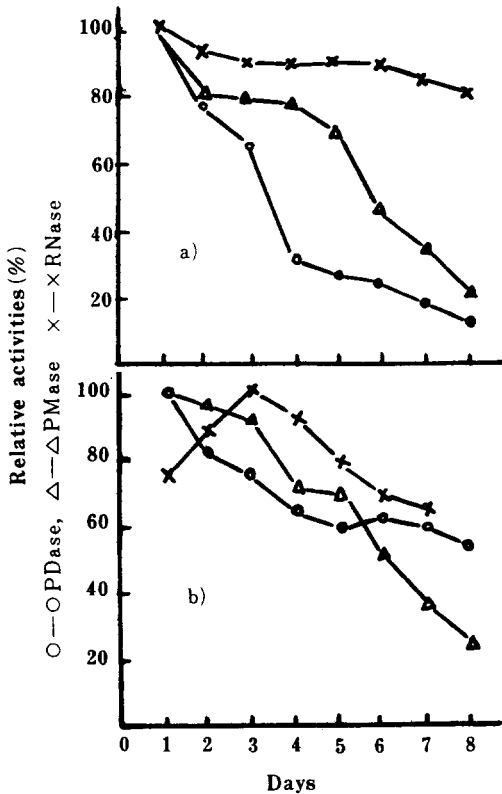


Fig.1. Changes of nucleic acid degrading enzymes in the course of seed mash and *Makgeoly* brewing as crude extract.
a) seed mash b) *Makgeoly* brewing

DEAE-Cellulose에 의한 효소계의 분획정제

조효소액 2.5 l 를 황산암모늄으로 완전 포화시켜서 18, 500rpm으로 원심분리하고 그때 생긴 침전을 0.01M acetate buffer (pH6.0)에 용해하고 그상등액을 5℃에서 0.01 M acetate buffer (pH6.0)액으로 1일간 투석하였다 투석내액을 DEAE-cellulose column (3 × 25cm)에 흡착시켜 acetate buffer (pH6.0)로써 0.1~0.6M 까지 gradient elution 한 결과 Fig. 2에서와 같이 각각의

효소는 용출위치가 다르며 그중 PMase가 매우 강한 활성을 나타내었으며 단백질은 대체로 초기단계에서 용출되었다. 그리고 RNase의 peak부분은 단백질과 같은 위치에서 용출되었기 때문에 상호분리할 목적으로 re-chromatography하였다.

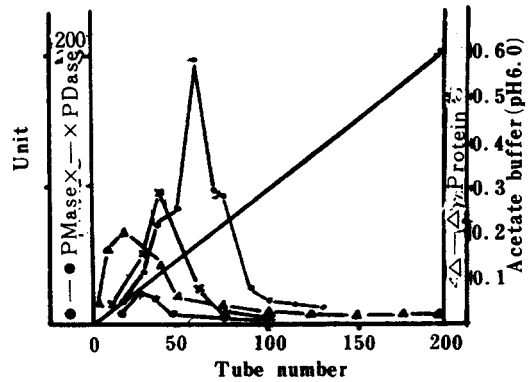


Fig 2. Chromatogram of the extract from *Makgeoly* brewing on DEAE-cellulose column.

즉 RNase의 peak부분을 황산암모늄으로 완전 포화시킨 후 침전물을 0.01M acetate buffer (pH6.0) 로 1일 투석한후 DEAE-cellulose에 흡착한 다음 0.1~0.4M acetate buffer (pH6.0)로 gradient elution 한 결과는 Fig. 3과 같이 단일 peak를 나타내었다.

위와 같이 조효소액을 황산암모늄으로 鹽析하여 DEAE-cellulose로 정제하는 과정에서 RNase, PDase, PMase의 활성은 Table 2과 같으며 RNase는 60배, PDase는 10배, 그리고 PMase는 15배정도 농축되었다.

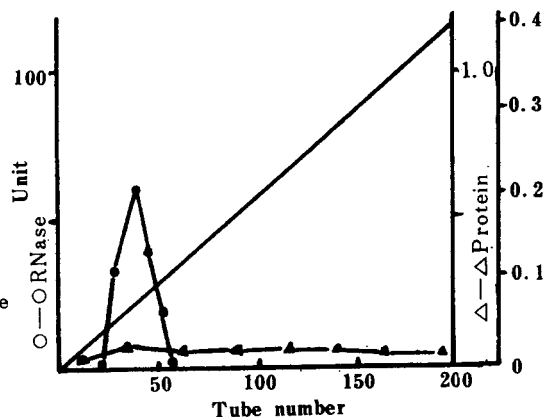


Fig 3. Rechromatogram of RNase from *Makgeoly* brewing on DEAE-cellulose column.

Table 2. Purification of enzyme from *Makgeoly* brewing

Purification step	Unit	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
RNase			
Filterate of extract	20,811.9	3,720.0	5.6
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting out			
	3,750.0	525.0	7.1
DEAE-cellulose 1	875.0	22.3	39.2
DEAE-cellulose 2	207.0	207.0	295.7
PDase			
Filterate of extract	31,440.7	3,720.0	8.5
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting out			
	4,800.0	525.0	9.1
DEAE-cellulose 1	1,272.0	14.2	89.6
PMase			
Filterate of extract			
	161,976.3	3,720.0	46.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting out			
	87,000.0	525.0	46.2
DEAE-cellulose 1	4,216.0	7.1	593.8

정제된 효소액의 제성질

정제된 효소들의 성질을 조사하기 위하여 RNase 는 그대로 사용하였으며 PDase는 5배, PMase는 10배 희석하여 실험하였다.

가. 액량에 따른 효소활성

기질의 양은 일정하게 하고 각 효소액(RNase, PDase, PMase)의 양을 0.1~0.5ml까지 점차적으로 증가시키면서 각 효소활성과의 관계를 조사해본 결과는 Fig. 4 와 같으며 각 효소의 액량이 증가함에 따라 효소활성은 대체로 정비례하는 경향을 나타내었다.

나. 최적pH

반응액의 pH를 3-9 까지 조절하여 30분씩 반응시킨다음 각 효소의 pH변화에 따른 활성을 측정 한 것은 Fig. 5와 같으며 효모RNA를 기질로 한 RNase의 최적 pH는 5.0부근이었고 BPNPP를 기질로 한 PDase 와 PNPP를 기질로 한 PMase의 경우 모두 최적pH는6.0 부근이었다. 이것은 일본청주에서의 실험¹¹⁾보다 약간 높게 나타났으며 이때 각 반응액의 pH 3~6까지는 acetate buffer를 사용하였고 pH 7~9까지는 tris buffer를 사용하였다.

다. 최적온도

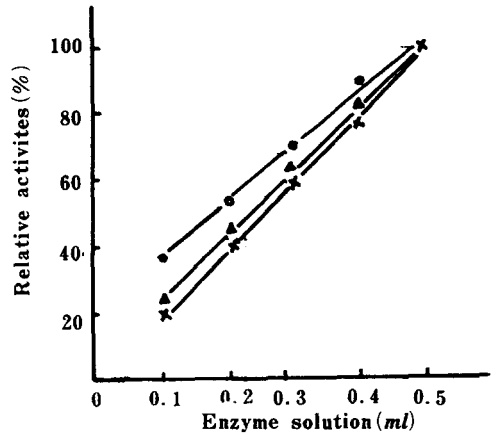


Fig 4. Relationship between activity and volume of enzyme solution from *Makgeoly* brewing
×—×RNase ○—○PDase △—△PMase

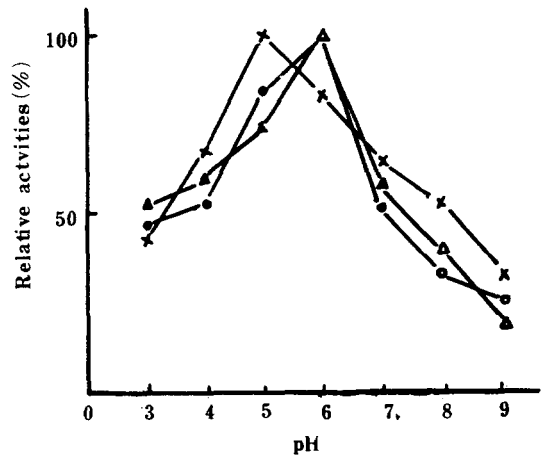


Fig 5. Effect of pH on enzymatic activities of *Makgeoly* brewing
×—×RNase ○—○PDase △—△PMase

각 효소의 반응최적온도를 조사하기위해 water bath에서 30-90℃의 각온도별로 30분간 반응시켜 상대활성도를 조사한 결과는 Fig.6과 같으며 RNase와 PDase는 60℃, PMase는 50℃부근에서 최대활성을 나타내었다. 이것은 製麴工程中에 있어서의 효소반응 및 최적온도와 거의 일치하게 나타났다.

라. pH안정성

각반응액을 acetate buffer로서 pH 3~6으로, tris buffer로서 pH7.0까지 조절하여 37℃에서 18시간 방치한 후 각 효소들의 잔류활성을 상대활성으로 나타낸 것은 Fig.7과 같으며 RNase는 pH6.0부근, RDase는 pH6.5~7.0부근에서 비교적 안정하였다. 이것은 製麴

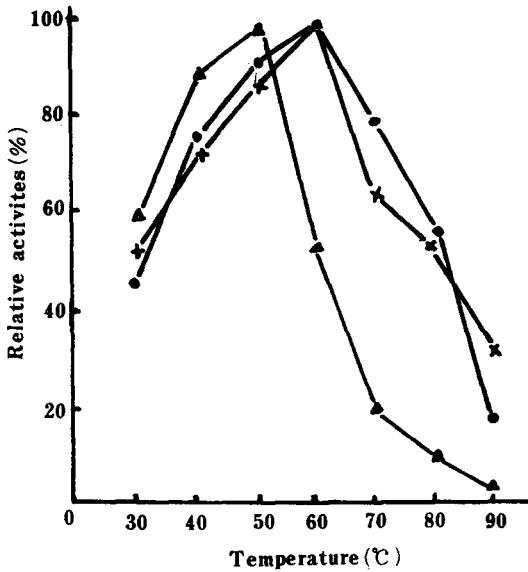


Fig 6. Effect of temperature on enzymatic activities of Makgeoly brewing
 ×—×RNase ○—○PDase △—△PMase

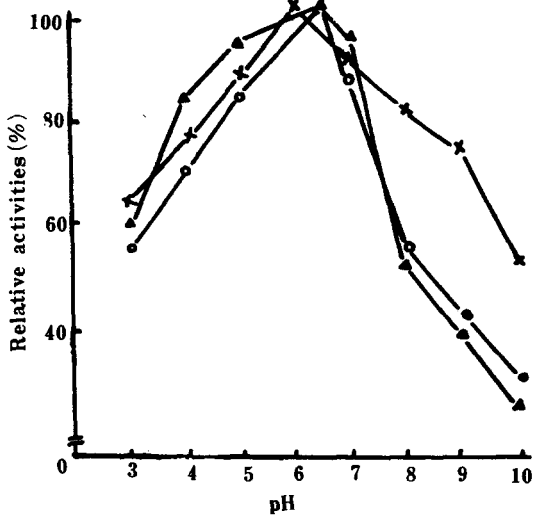


Fig 7. pH stability of enzymatic activities of Makgeoly brewing
 ×—×RNase ○—○PDase △—△PMase

서 10% 잔류했으나 PMase는 70°C 부근에서 거의 실활하였다. 이것은 毛利等⁽¹⁰⁾이 정제한 핵산분해 효소들이 열안정성을 조사한 결과 RNase는 100°C에서 15% 잔류했으나 PDase는 85°C에서, 그리고 PMase는 60°C에서 10분간 처리함으로써 거의 실활되었다는 보고와 비슷한 경향을 나타냈다.

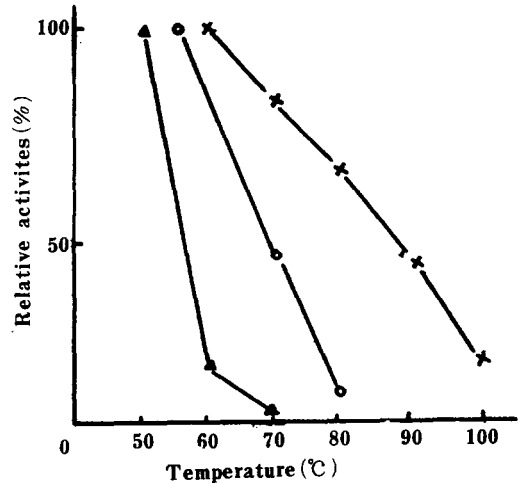


Fig 8. Heat stability of enzymatic activities of Makgeoly brewing
 ×—×RNase ○—○PDase △—△PMase

바. 금속이온 및 저해제의 영향

각효소들의 활성에 대하여 금속이온 또는 저해제들이 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 금속이온 및 저해제를 각각 10⁻⁴M, 10⁻³M로 하여 효소액량과 동량 첨가하여 30분간 처리한 결과 Table 3 과 같이 RNase의 경우 Cu²⁺, Zn²⁺, PMase는 Na₂HPO₄ 10⁻³M의 저농도에서 각30%의 효소활성이 저해되었으며 그외의 것은 큰 영향이 없었다. 따라서 막걸리담금중에 Na₂HPO₄를 소량 첨가하므로써 PMase의 활성을 저해시켜 핵산관련면을 분해를 약화하고 그결과 맛에 영향을 주는 점미성분의 함량을 증진시킬뿐만 아니라 효모의 영양제로서의 역할을 겸하게 되므로 이중의 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

핵산관련물질의 변화

막걸리담금중의 핵산관련물질의 함량변화를 조사하기 위해 5종의 핵산관련물질(5'UMP, 5'CMP, 5'GMP, 5'IMP, 5'AMP)을 혼합한 표준물질과 前記와 같이 추출한 시료를 high speed liquid chromatography 한 결과는 Fig.9와 같이 술덧의 peak 3,5,7,8,12는 표준물질의 위치와 일치하여 동정할 수 있었으나 그외의 것은

工程中⁽¹¹⁾ 조효소의 경우와 비슷한 경향을 나타내었다.

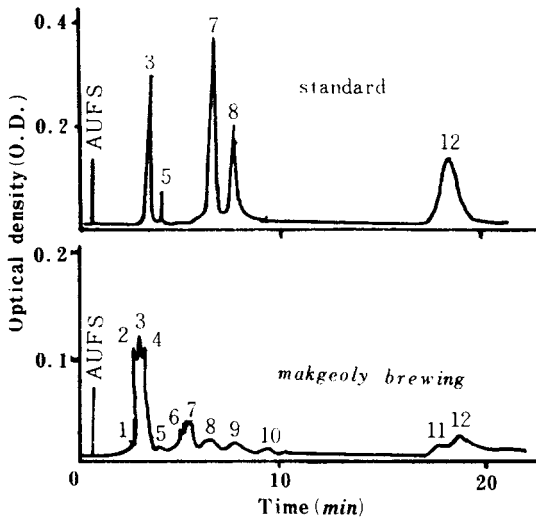
마. 열안정성

각효소를 최적pH에서 열안정성을 조사하기 위하여 50~100°C까지 각 온도에서 10분간 가온처리한후 급냉시켜 상법에 따라 잔류활성도를 측정한 결과는 Fig. 8 과 같으며 RNase는 100°C에서 약20%, PDase는 80°C에

Table 3. Effect of metal ions and inhibitors on enzymes activities of *makgeolj* brewing

Enzyme Conc.	RNase		PDase		PMase	
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M
Agents						
Control	100	100	100	100	100	100
MgCl ₂	102	108	97	98	99	103
CaCl ₂	103	100	92	100	100	95
CuSO ₄	85	91	-5.8	90	88.7	97.4
FeCl ₃	97	100	-	-	-	-
MnSO ₄	97	98	9	-	-	-
ZnSO ₄	67	78	89	99	95	96
KCl	95	98	99	91	101.5	88.6
NaF	101	108	92	92.5	92.4	92
Na ₂ HPO ₄	98	100	92	94	65	70.6
EDTA	100	103	91	95	93.7	98
Na-citrate	101	110	91.5	92	96.1	96

(-; The experiment was not done)

Fig 9. Chromatogram of nucleotides and their related compounds from *Makgeolj* brewing

1. Unknown. 2. Unknown. 3. CMP.
4. Unknown. 5. UMP. 6. Unknown.
7. GMP. 8. IMP. 9. Unknown.
10. Unknown. 11. Unknown. 12. AMP.

동정하지 못하였다. 그리고 담금과정중에 있어서 핵산 관련물질들의 변화를 정량한 결과는 Table 4와 같이 담금후 4일까지는 각종정미성분이 상당량 함유되어 있었으나 시간이 경과됨에 따라 점차 감소하여 담금 7일에는 GMP를 제외하고는 강한 PMase의 활성에 의해

거의 분해되어 미량밖에 존재하지않았다. 그리고 Tarr와 Comer¹⁷, 毛利¹⁶, Suryanarayana¹⁸ 및 篠野와 平田等¹⁹은 새우, 계 등의 甲殼類에는 AMP-deaminase의 활성이 있기 때문에 어류나 포유동물과 같이 ATP 관련물질을 분해하여 IMP를 생성하나 무척추동물에서는 AMP-deaminase의 활성이 없거나 아주 미약하여 IMP를 많이 생성하지않는다고 보고되고 있으나 술덧에서 IMP가 증가하는 것을 볼때 AMP-deaminase의 활성에 의하여 AMP를 분해하여 IMP가 생성되는 것으로 생각된다. 이것은 毛利等²⁰이 청주양조 공정중에 있어서도 비슷한 경향을 나타내고 있다. 上記의 결과로 미루어 볼때 일반소비자들이 시중에서 마시는 막걸리는 약 7일간 발효후에 소비자에게 공급되므로 핵산물질에 의한 맛성분은 거의 느끼지 못할것으로 생각되며 핵산관련물질을 막걸리중에 가급적 많이 함유시키는 방법으로서 PMase가 열에 비교적 약하므로 열처리하면

Table 4. Nucleotides degradation in the course *Makgeolj* brewing

Nucleotides	(mole/100g)			
	Days	2	4	7
UMP		4.54	1.97	T
GMP		3.70	2.12	0.88
IMP		1.47	3.68	T
AMP		2.40	1.66	T

되나 실질적으로 불가능하며 Na_2HPO_4 를 소량 첨가하여 PMase의 활성도를 약화하여 핵산관련물질의 분해를 저지시키든지 또는 담금 4 일까지는 상당량 존재되어 있으므로 담금기간을 가급적 줄이는 방법이 좋을 것으로 사료되어지는 바이다.

요 약

쌀막걸리 담금중의 핵산분해효소들의 소장과 이효소들을 DEAE-cellulose column chromatography에 의해 분리정제하고 일반적인 성질을 검토함은 물론 핵산관련물질의 변화를 조사한 결과는 다음과 같았다.

1. 담금일수가 경과함에 따라 RNase는 담금 3 일까지 다소 증가하였다가 그후 점차 감소하였으며 PDase 및 PMase는 초기부터 활성이 감소하였다.

2. RNase의 최적pH는 5.0부근이었고, PDase, PMase는 6.0부근이었으며 pH안정성은 대체로 pH6.0~7.0부근이었다.

3. RNase 및 PDase의 최적온도는 55~60°C이고, PMase는 50부근이었으며 열안정성은 RNase는 100°C PDase는 80°C에서 10분간 반응으로 각각 80%, 90%실활되었으며, PMase는 70°C에서 10분간 반응으로 거의 실활되었다.

4. RNase는 Cu^{2+} , Zn^{2+} , PMase는 10^{-3}M Na_2HPO_4 처리로서 약 30%의 효소활성이 저해되었다.

5. 술덧담금 4 일째까지 IMP는 증가하였으며 UMP, GMP, AMP는 감소하는 경향을 보였다.

문 헌

1. 武田義人 : 日本農芸化学会誌, 6, 1023(1930)
2. 박윤중, 이석건, 오만진 : 한국농화학회지, 16, 85 (1973)
3. 홍순우, 하영철, 민경희 : 미생물학회지, 8, 197(1970)
4. 홍순우, 하영철, 윤권상 : 국제청 기술연구 소보, 2, 46 (1969)
5. 鄭址均 : 韓國農化学会誌, 8, 39(1967)
6. 고춘명, 최태주, 유준 : 미생물학회지, 11, 167(1973)
7. 김찬조, 최우영 : 한국농화학회지, 13, 105 (1970)
8. 김찬조, 최우영 : 한국농화학회지, 13, 219 (1970)
9. 신용두, 조덕현 : 미생물학회지, 8, 53(1970)
10. 조용학, 성낙계, 정덕화, 윤한대 : 한국산업미생물학회지, 7, 217 (1979)
11. 정덕화, 성낙계 : 한국산업미생물학회지, 8, 1(1980)
12. 성낙계, 심기환, 정덕화, 김영걸 : 경상대학교 농업 연구소보, 13, 25(1979)
13. 中島宜郎, 市川恒平, 藤田栄一郎 : 日本農化学会誌, 35, 803(1961)
14. Folin, O., and Ciocalteu, V. : *J. Biol. Chem.*, 73, 627 (1927)
15. 足立有, 柏秀純, 毛利威徳 : *J. Ferment. Technol.*, 46, 6 (1968)
16. 毛利威徳, 橋田度, 志賀岩雄 : 日本食品工業学会誌, 19(6), 219 (1972)
17. Tarr, H. L. and Comer, A. G. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 22(2), 307 (1965)
18. Suryanarayana, R., S. V. Rangaswamy and Lab-ily, N. L. : *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 26, 704 (1969)
19. 篠野雄, 平田史生 : 日本水産学会誌, 39(9), 951 (1973)
20. 毛利威徳, 橋田度, 志賀岩雄 : 日本醸造工業雜誌, 44(5), 248 (1966)