

Malo-Alcohol 醱酵에 關与하는 分裂酵母菌이 生成하는 Malic Enzyme의 酵素学的 性質

鄭基澤·俞大植*·金在根
慶北大学校 農科大学 *啓明大学校 理工大学
(1983年 7月 1日 수리)

Some Properties of Malic Enzyme from Malo-Alcoholic Yeast

Ki Taek Chung, Tae Shick Yu* and Jae Keun Kim
College of Agriculture, Kyungpook National University
*College of Science and Engineering, Keimyung University
(Received July 1, 1983)

Abstract

Some properties of malic enzyme (EC 1.1.1.40) prepared from malate-decomposition yeast, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* St-3 were investigated.

The activity of malic enzyme was maximum when it was cultured for 24 hours. The optimum conditions for the enzyme reaction were pH 10.0 and temperature of 25°C. The crude enzyme was very stable at the range of pH 7.0-8.4, and almost 50 percent of enzyme activity was lost by heating at 60°C for 10 minutes. The malic enzyme activity was enhanced by the addition of Mn^{++} . But the enzyme activity was not affected by the addition of organic acids, amino acids and ethanol, respectively.

序 論

酵母를 利用한 사과주의 減酸, 즉 malo-alcohol 醱酵에 關하여 供試酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* St-3의 醱造学的 性質, 이 菌의 실제 사과주醱造에의 利用性은 이미 前報^(1,2)에 報告한 바 있다.

分裂酵母인 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3를 利用하면 사과주내의 강한 酸味를 가진 사과산이 알콜과 이산화탄소로 分解·代謝되므로 결국 사과주내의 酸이 減少되어 減酸效果가 나타나게 된다.⁽³⁾ 그러나 사과산이 어떤 중간代謝經路를 거쳐 最終分解產物인 알콜과 이산화탄소로 分解되는지는 아직 완전히 알려져 있지 않다.⁽⁴⁾

사과산分解의 最初단계에 關与하는 酵素는 malate d-

ehydrogenase, malate dehydrogenase (decarboxylating) 즉 malic enzyme 등이 지금까지 알려져 있다.⁽⁵⁻⁹⁾ 그런데 본 供試酵母 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3에 의한 減酸機構는 malic enzyme을 거치는 經路가 主經路인 것으로 판단된다. 이 酵素는 사과산을 pyruvate로 전환시키는데 關여하고 있다.⁽¹⁰⁾

이에 著者들은 사과산의 代謝經路연구의 일환으로 공시효모 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3가 生成하는 malic enzyme (EC 1.1.1.40)의 몇가지 性質을 檢討하였다.

材料 및 方法

供試菌株

供試菌株로서는 啓明大学校 微生物學研究室에 所藏한 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3^(11,12)을 使

用하였다.

酵素活性的 測定

가. 供試菌의 培養

合成培地, 즉 sucrose 10%, $NH_4H_2PO_4$ 0.13%, peptone 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%, yeast extract 0.1% (pH 6.0)에 供試菌 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3를 接種하여 30°C에서 24시간 진탕배양(120 strokes/min., 진폭 7cm)하였다.

나. 粗酵素液의 調製

대수증식기 後期의 菌體를 원심분리기(Beckman, model J2-21)로써 7,000×g에서 10分間 원심분리하고 다시 菌體를 0.05M phosphate buffer (pH 7.0)에 2回세척후 약 20w/v%의 효모현탁액을 sonic oscillator (美國, Lab-Line製)로 120Hz, 15分間 세포를 파쇄하였다. 이어 12,000×g에서 1시간 원심분리하여 그 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였다.

다. 酵素活性的 測定

Malic enzyme (EC 1.1.1.40)의 活性은 L-malate를 基質로 하여 反應에 따른 환원형 NADPH의 量을 spectrophotometer (Beckman, model 26)를 使用하여 340nm에서의 吸光度의 증가로 測定하였다. 이 효소의 반응액(3ml)은 0.05M glycine buffer (pH 10.0) 0.9ml, 0.05M L-malate 0.5ml, 0.01M $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1ml, NADP (mg/ml) 0.5ml, 粗酵素液 1.0ml였다.

酵素反應液은 25°C 反應初期 1分間의 340nm에서의 吸光度의 增加 0.01을 1 unit로 하였으며, 酵素蛋白質 1 mg當의 比活性을 計算하였다. 酵素단백질은 Lowry法⁽¹²⁾으로 定量하였으며 標準蛋白質로서는 bovine serum albumin을 使用하였다.

菌의 生育度 및 pH

菌의 生育度는 培養液을 직접 spectrophotometer (Shimadzu, UV-100-01)를 使用하여 660nm에서의 吸光度로 表示하였으며, pH는 Fisher製의 pH meter (model, 230)로써 測定하였다.

試 藥

NADP는 Sigma製品, L-malate는 日本純藥製品, bovine serum albumin은 日本東京化成製品을 각각 使用하였으며 기타 一般試藥은 市販 1급품을 使用하였다.

結果 및 考察

酵素活性에 미치는 反應時間의 영향

供試菌 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3가 生成하는 malic enzyme의 酵素活性測定에 있어서 酵素反應時間의 영향은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 酵素反應時間이 경과함에 따라 酵素活性이 둔화되는 경향을 보였다.

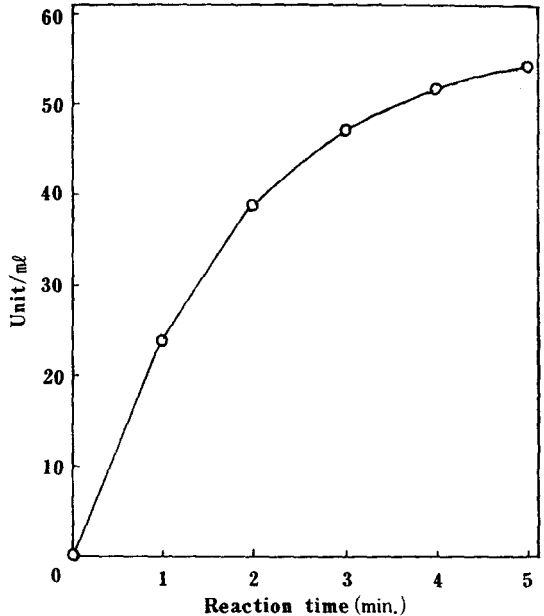


Fig. 1. Effect of reaction time on malic enzyme activity

이와같은 結果는 基質인 L-malate가 pyruate로 酵素分解되어 基質의 濃度가 減少되기 때문이라 생각된다. 따라서 本 實驗에 있어서는 酵素活性을 測定함에 있어서 反應初期 1分間의 NADPH의 生成에 따른 340nm에서의 吸光度 증가를 酵素活性으로 表示했다.

酵素量에 따른 酵素活性度

酵素量에 따른 酵素活性을 測定한 바, Fig. 2에 나타난 바와 같이 酵素濃度와 酵素活性度 사이에는 비례관계가 成立되었다.

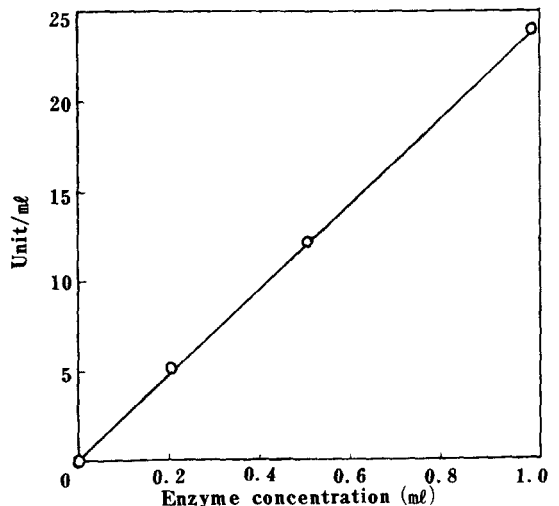


Fig. 2. Effect of enzyme concentration on malic enzyme activity

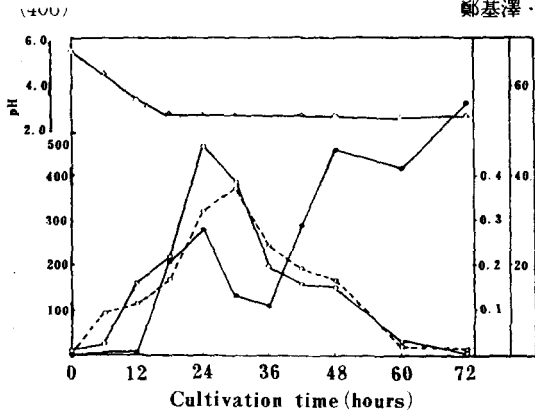


Fig. 3. Time course of malic enzyme activity
 ○—○: Total activity (unit)
 ○---○: Specific activity (unit)
 ●—●: Growth (O. D. at 660nm)

培養時間에 따른 酵素生成

基本培地에 菌을 배양하면서 經時的으로 培養時間에 따른 酵素生成을 測定하여 Fig. 3에 나타내었다.

本酵素는 24時間 培養時 酵素生成이 最大로 되었고 菌의 生育과 酵素生成은 一致되는 傾向이었으며 比活性은 30時間에 最大值를 보였다. 以上の 結果로 本實驗에서는 供試菌을 24시간 培養시켜 使用하였다.

酵素的 pH에 대한 安定性

Malic enzyme의 pH에 대한 安定性을 檢討하기 위하여 구연산buffer (pH 4.0~7.0) 및 인산buffer (pH 7.0~9.0)를 使用하여 pH 4.0에서 9.0의 酵素液을 各各 調製하여 50°C에서 10分間 熱處理後 pH 10.0, 25°C에서 殘存酵素活性을 各各 測定하여 相對活性度를 얻었다.

Fig. 4에 나타난 바와같이 本酵素는 pH 7.0~8.4에서 높은 酵素安定性을 나타내므로 比較적 좁은 安定pH 領域을 가진 것으로 나타났다.

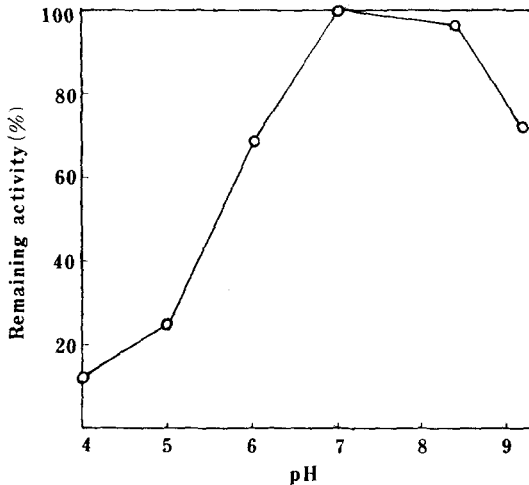


Fig. 4. Effect of pH on malic enzyme stability

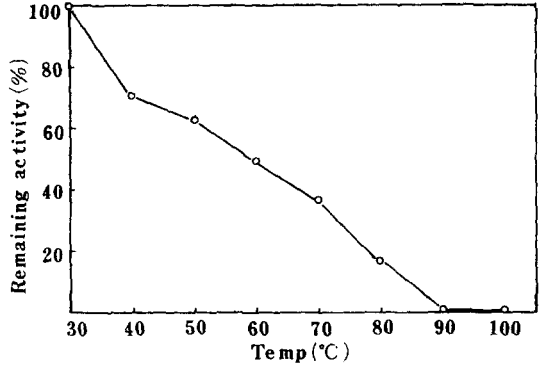


Fig. 5. Effect of temperature on malic enzyme stability

酵素的 熱에 대한 安定性

酵素液 (pH 10)을 各 溫度에서 10分間 熱處理한 後 25°C에서 酵素反應을 시켜 殘存하는 酵素活性을 測定한 結果를 Fig. 5에 나타내었다.

本酵素는 60°C에서 10分間 열처리로 50% 失活되었으며 90°C, 10分間 열처리로 完全 失活되었다.

酵素活性에 미치는 pH의 影響

Malic enzyme의 活性에 미치는 pH의 影響을 檢討하기 위하여 glycine buffer (pH 8.5~11.0) 및 NaHCO₃ buffer (pH 9.0~11.0)로 pH를 各各 조절하여 25°C에서 酵素活性을 測定하였다.

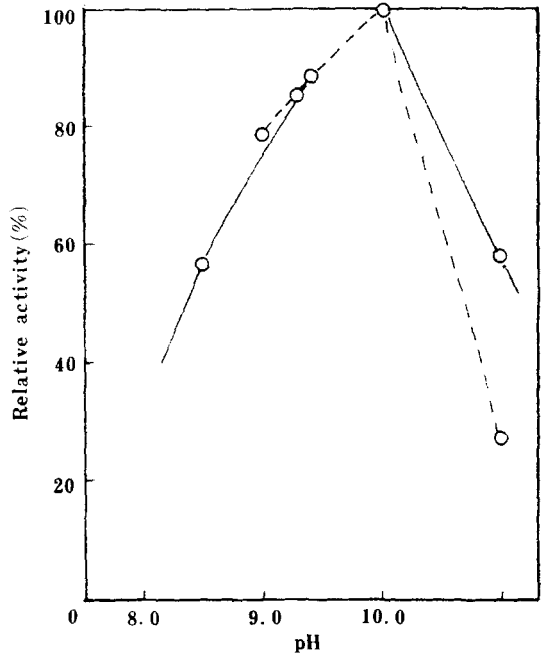


Fig. 6. Effect of pH on malic enzyme activity
 ○—○Glycine buffer ○---○ NaHCO₃ buffer

Fig. 6에 나타난 바와 같이 本酵素는 pH 10.0에서 가장 活性이 높았으며 다른 pH領域에서는 급격한 酵素 活性의 減少를 보였다. 이 결과는 *Schiz. pombe*의 malic enzyme (EC 1.1.1.38)의 最適pH가 7.0~7.5였다는 Temperli⁽⁷⁾의 報告와는 相異했다.

酵素活性에 미치는 溫度의 影響

酵素의 最適溫度를 測定하기 위하여 pH 10.0에서 酵素反應溫度 20, 22, 25, 30, 35, 40 및 45°C에서 酵素活性을 測定하였다. (Fig. 7)

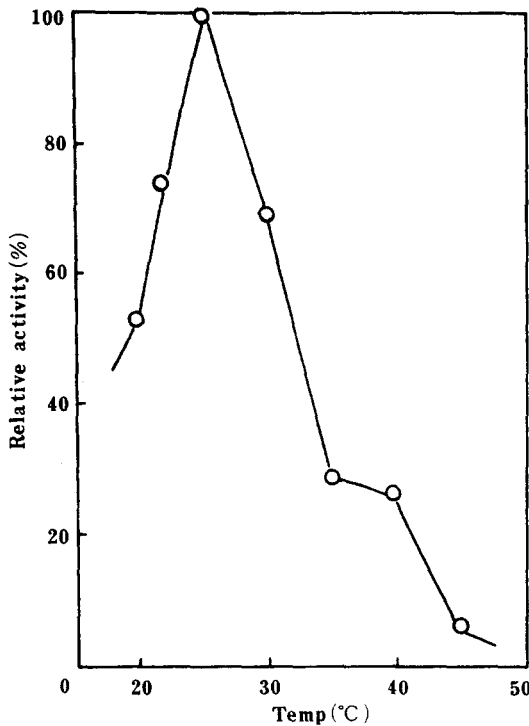


Fig. 7. Effect of temperature on malic enzyme activity

本 酵素는 最適反應溫度가 25°C였으며 다른 溫度에서는 급격히 酵素活性이 떨어졌다. 또한, 溫度의 變化에 따른 酵素活性을 Arrhenius 방정식⁽¹⁴⁾에 의해 plot한 바 Fig. 8과 같이 나타났으며 malic enzyme의 活性化에너지는 0.7206kCal/mol이었다.

酵素活性에 미치는 金屬이온의 影響

本 酵素의 活性에 미치는 金屬이온의 影響을 檢討한 바 Table 1에서와 같이 Mn²⁺添加가 가장 높은 活性을 보였으며 Ca²⁺, Mg²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺ 등은 阻害하는 것으로 나타났다.

Mn²⁺에 의한 酵素活性촉진은 Mn²⁺이 malic enzyme의 cofactor로 作用하기 때문이 아닌가 사료된다.

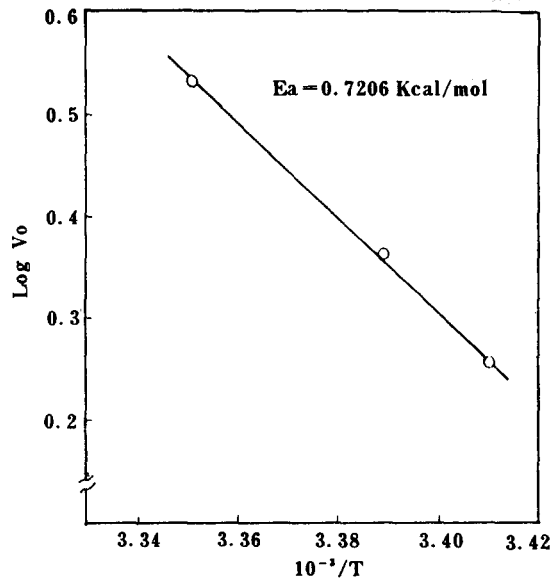


Fig. 8. Arrhenius plot of malic enzyme activity

Table 1. Effect of metal ion on malic enzyme activity

Metal ion (10 mM)	Relative activity (%)
Control	100
Mn ²⁺	124
Ba ²⁺	80
Ca ²⁺	53
Mg ²⁺	22
Hg ²⁺	11
Zn ²⁺	6

酵素活性에 미치는 有機酸의 影響

사과산의 代謝經路와 關連된 有機酸이 酵素活性에 미치는 影響을 檢討한 바 Table 2에서와 같이 아무런 影響이 없는 것으로 나타났다.

Table 2. Effect of organic acid on malic enzyme activity

Organic acid (0.2mM)	Relative activity (%)
Control	100
Oxaloacetate	94
Pyruvate	91
Succinate	98
α-Ketoglutarate	85
Fumarate	110
Citrate	94

Table 3. Effect of amino acid on malic enzyme activity

Amino acid (10mM)	Relative activity (%)
Control	100
L-Asparagine	95
L-Aspartic acid	99
L-Alanine	103
L-Arginine	108
L-Cystine	94
L-Isoleucine	111
L-Threonine	111
L-Serine	111
L-Phenylalanine	107

酵素活性에 미치는 아미노산의 影響

本 酵素의 活性에 미치는 아미노酸의 影響을 조사하여 Table 3에 나타내었다. 어떤 아미노산도 本 酵素의 活性에 별다른 影響이 認定되지 않았다.

酵素活性에 미치는 알콜의 影響

사과산의 最終分解産物인 알콜이 本 酵素 malic enzyme 活性에 미치는 影響을 各 濃度別로 조사하여 Table 4에 나타내었다.

알콜 濃度에 關係없이 알콜이 malic enzyme 活性에 아무런 影響을 미치지 못하는 것으로 보아 本 酵素는 終末産物 阻害를 받지 않는 것으로 보인다.

Table 4. Effect of ethanol on malic enzyme activity

Ethanol concentration (mM)	Relative activity (%)
None	100
10	101
20	103
50	105
100	101

要 約

Malo-alcohol 醱酵에 關与하는 分裂酵母菌, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* St-3가 生成

하는 malic enzyme (EC 1. 1. 1. 40)의 몇가지 性質을 조사하였다.

Malic enzyme의 生成은 培養 24時間에 最大에 이르렀고 酵素反應의 最適 pH는 10.0, 溫度는 25°C였다. 本 酵素는 pH 7.0-8.4에서 安定하였으며 60°C, 10分間 熱處理로 50% 失活되었다. Mn²⁺添加는 酵素活性을 促進시켰으며 有機酸, 아미노酸 및 ethanol의 添加는 酵素活性에 아무런 影響이 없었다.

文 献

- 鄭基澤, 俞大根, 金在根, 金燦祚, : 韓國食品科學會誌, 14, 236 (1982)
- 鄭基澤, 金燦祚 : 韓國食品科學會誌, 14, 244 (1982)
- 鄭基澤 : 食品工業, 8, 63 (1979)
- Beelman, R. B. and Gallander, J. F. : *Advances in Food Research*, Vol. 25, Academic Press, New York, p. 1 (1979)
- Mayer, K. and Temperli, A. : *Arch. Mikrobiol.*, 46, 321 (1963)
- 岡本辰夫, 原田順厚, 小山内たか : 弘前大學農學部 學術報告, 17, 1 (1971)
- Temperli, A., Künsch, U., Mayer, K. and Busch, I. : *Biochim. Biophys. Acta*, 110, 630 (1965)
- Flury, U., Heer, B. and Fiechter, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 341, 465 (1974)
- Flury, U. and Fiechter, A. : *Pathol. Microbiol.*, 40, 145 (1974)
- Ishimoto, M., Minakami, S., Oshima, T. and Wada, H. : *Metabolic Maps*, 3rd ed., Kyoritsu Publishing Co., Ltd. p. 13 (1973)
- 俞大植 : 産業微生物學會誌, 6, 23 (1978)
- 俞大植 : 産業微生物學會誌, 6, 27 (1978)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- Clark, J. M. Jr. and Switzer, R. L. : *Experimental Biochemistry*, 2nd ed., Freeman, San Francisco, p. 82 (1977)