

Malo-Alcohol 醱酵에 있어서 사과산의 代謝經路

鄭基澤 · 俞大植¹ · 宋亨翼 · 金在根 · 金燦祚²

慶北大學校 農科大學

Metabolic Pathway of L-Malate in Malo-Alcoholic Fermentation

Ki Taek Chung, Tae Shick Yu, Hyung Ik Song, Jae Kuen Kim and Chan Jo Kim

College of Agriculture, Kyungpook National University

Abstract

We deduced a possible metabolic pathway of L-malate in a malo-alcoholic yeast, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* St-3. The malic enzyme (EC 1.1.1.40) prepared from the microorganism was about four times as active as that of malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37). And Km values of malic enzyme and malate dehydrogenase for malate were found to be 3.125 mM and 4.761 mM, respectively, which referred to the fact that the affinity of malic enzyme for the substrate was greater than that of malate dehydrogenase. We also found that pyruvate was produced with disappearing malate in malo-alcoholic fermentation, and that the addition of Mn^{2+} activated malic enzyme activity. Based on these results obtained we have deduced a main pathway of "malate \rightarrow pyruvate \rightarrow acetaldehyde \rightarrow ethanol" for the utilization of L-malate by this malo-alcoholic yeast strain.

序 論

酵母를 이용한 減酸, 즉 malo-alcohol 醱酵의 機構에 대해서는 아직까지 명확히 알려져 있지 않다.⁽¹⁾

分裂酵母에 의한 사과산 分解機構에 관한 研究는 주로 *Schizosaccharomyces pombe*를 대상으로 하고 있다. Mayer⁽²⁾는 사과산이 혐기적 條件下에서 직접 脫炭酸되어 ethanol과 이산화탄소로 分解된다고 했으며 岡山⁽³⁾는 사과산이 oxaloacetate와 pyruvate를 거쳐 代謝된다고 報告하고 있다. 이밖에도 代謝經路和 關連된 몇몇 研究報告⁽⁴⁻⁶⁾, 關連 酵素에 관한 研究⁽⁷⁻⁹⁾가 있으나 그나마 分解經路가 명확하지 않으며 또한 他 分裂酵母를 대상으로한 研究는 거의 찾아 볼 수 없는 실정이다.

이에 著者들은 供試菌 *Schizo. japonicus* var. *japonicus* St-3의 減酸機構에 관한 研究를 위하여 前報⁽¹⁰⁾에서 사과산分解 關連酵素인 malate dehydrogenase(d-

ecarboxylating), 즉 malic enzyme (以下 malic enzyme 이라함)의 몇가지 性質을 檢討한 바 있다.

本 研究에서는 사과산 分解과정의 最初단계에 關與하는 酵素 malic enzyme (EC 1.1.1.40)과 malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)의 酵素活性 등을 比較· 檢討하여 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3에 의한 사과산 分解機構를 究明하고자 한다.

材料 및 方法

供試菌株

供試菌株는 啓明大學校 微生物學研究室에 所藏中인 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* St-3⁽¹¹⁾을 使用하였다.

酵素活性의 測定

가. 供試菌의 培養

合成培地, 즉 sucrose 10%, $HH_4H_2PO_4$ 0.13%,

¹ 계명대학교 이공대학 ² 충남대학교 농과대학

peptone 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.2%, yeast extract 0.1% (pH 6.0)에 供試菌 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3을 接種하여 30℃에서 24시간 진탕배양 (120 strokes/min., 진폭 7cm) 하였다.

나. 粗酵素液의 調製

대수증식기 後期の 菌체를 냉동 원심분리기 (Beckman, model J2-21)로써 7,000×g에서 10分間 원심분리하고 다시 菌체를 0.05M phosphate buffer (pH7.0)에 2회 세척한 後 얼음을 채운 약 20w/v%의 효모현탁액을 sonic oscillator (美國 Lab-Line 製)로 120Hz, 15分間 細胞를 破碎하였다. 이어 12,000×g에서 1시간 원심하여 그 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였다.

다. 酵素活性的 測定

Malic enzyme (EC1.1.1.40) 및 malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)의 活性은 L-malate를 基質로 하여 反應에 따른 NADPH 및 NADH의 量을 spectrophotometer (Beckman, model 26)를 使用하여 340nm에서의 吸光度의 증가로 各各 測定하였다.⁽¹⁰⁾

Malic enzyme의 反應液 (3ml)은 0.05M glycine buffer (pH 10.09) 0.9ml, 0.05M L-malate 0.5ml, 0.01M MnCl₂·4H₂O 0.1ml, NADP (mg/ml) 0.5 ml, 粗酵素液 1.0ml였으며 malate dehydrogenase의 경우는 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 1.0ml, 0.05M L-malate 0.5ml, NAD (mg/ml) 0.5 ml, 粗酵素液 1.0ml였다. 그러나 基質濃도에 따른 효소活性은 上記의 표준反應液에서 기질농도를 各各 달리 조정하여 측정하였다.

酵素反應液은 25℃에서 反應初期 1分間の 340nm에서의 吸光度의 增加 0.01을 1unit로 하였으며 효소단백질 1mg當의 比活性을 계산하였다. 酵素蛋白質은 Lowry法⁽¹²⁾으로 定量하였으며 표준蛋白質로서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

Malo-alcohol 醱酵過程中 有機酸 및 알콜의 檢索

사과산의 代謝經路를 推定하기 위하여 合成培地, 즉 NH₄H₂PO₄ 0.13%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.2%, L-asparagine 0.01%, L-malate 0.5% (pH 6.0)에 供試菌을 接種, 30℃에서 malo-alcohol 醱酵을 誘導시켜 經時的으로 有機酸의 變化를 ppc法⁽¹³⁾에 準하여 調査하였으며 各 有機酸의 檢索은 標準品의 同時 展開에 依하여 行하였다. 또한 사과산이 分解되어 最終產物 알콜이 生成되는가를 확인하기 위하여 malo-alcohol 醱酵 終了後에 酸化還元法⁽¹⁴⁾으로 微量알콜의 生成여부를 조사하였다.

試 藥

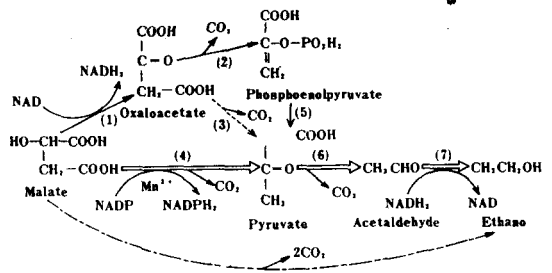


Fig. 1. Tentative pathway of malo-alcolic fermentation by *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3

→ : A, --- : B, ⇌ : C, - - - : D

1. Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37), 2. Phosphopyruvate carboxylase (EC 4.1.1.38), 3. Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1), 4. Malate dehydrogenase (decarboxylating) (malic enzyme) (EC 1.1.1.40), 5. Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40), 6. Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1), 7. Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)

NADP 및 NAD는 Sigma 製品, bovine serum albumin은 日本東京化成製品; L-malate는 日本純藥製品을 各各 使用하였으며 기타 일반시약은 시판 1급품을 사용하였다.

結果 및 考察

理論的인 사과산의 代謝經路

사과산이 알콜과 이산화탄소로 分解되는 理論的인 대사경로는 Fig. 1에서 보는바와 같이 사과산이 酵母中の NAD-dependent L-malate dehydrogenase의 作用으로 oxaloacetate로 酸化되어 phosphoenolpyruvate로 脫炭酸되고 다시 pyruvate Kinase에 의해 pyruvate를 經유하여 ethanol로 分解되는 經路(A), 사과산이 oxaloacetate, pyruvate를 거쳐 ethanol로 分解되는 經路(B), 사과산이 malic enzyme의 作用으로 직접 pyruvate가 된 후 代謝되는 經路(C), 사과산이 脫炭酸되어 直接 알콜로 分解되는 經路(D) 등 4가지의 經路가 可能하다.⁽¹⁵⁾

사과산 分解過程中 유기산의 消長 및 알콜의 檢索

本 供試菌인 *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3가 어떤 經路를 거쳐서 사과산을 分解하는지를 調査할 目的으로 먼저 대사경로와 關連된 有機酸을 대상으로 malo-alcohol 醱酵과정중의 消長關係를 調査하여 Fig. 2에 나타내었다.

그 結果, 培養初期에는 培地中의 사과산이 分解되지 않았으나 培養 3日부터는 사과산이 점차 分解되었으며

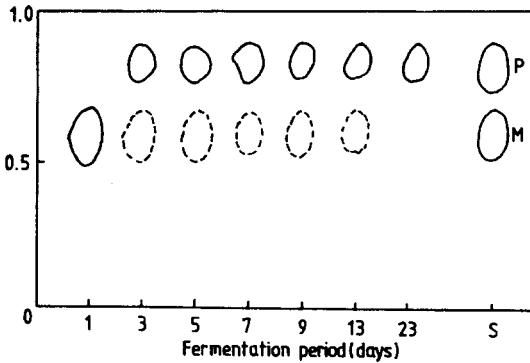


Fig. 2. Paper chromatogram of malate and pyruvate in synthetic medium induced malo-alcoholic fermentation by *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3

Standard: P; pyruvate, M; malate, Paper: Whatman No. 1, Solvent: n-butanol, acetone, water (4 : 1 : 2 v/v)

pyruvate의 spot가 나타나기 시작하였다. 따라서培養 시간이 經過함에 따라 사과산이 分解되어 pyruvate가 生成됨을 추측할 수 있었다. 또한 培養終了後의 培養液에서 微量의 알콜 生成을 定性的으로 確認할수 있었다.

關連酵素의 活性比較

供試菌의 cell-free extract를 粗酵素液으로 使用하여 사과산의 最初단계 分解酵素인 malic enzyme (EC 1. 1. 1. 40) 및 malate dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 37) 의 活性을 測定하여 Table 1에 나타내었다.

粗酵素液에는 malic enzyme과 malate dehydrogenase 두 酵素活性이 모두 認定되었다. 그러나 malic enzyme의 活性이 malate dehydrogenase보다 현저히 높았다. 이들 酵素活性을 百分率로 나타내면 malic enzyme이 77.6%, malate dehydrogenase가 22.4%로써 사과산은 약 80%가 malic enzyme에 의해 代謝되고 나머

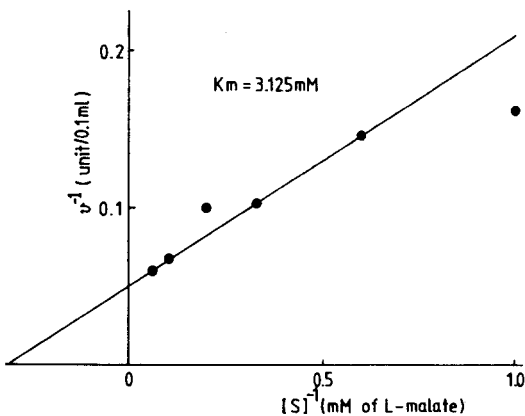


Fig. 3. Effect of L-malate concentration on malic acid activity

Table 1. Comparison of malic enzyme and malate dehydrogenase activity

Enzyme	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)	Ratio (%)
Malic enzyme	100.5	0.957	77.6
Malate dehydrogenase	29.0	0.276	22.4

지 20%가 malate dehydrogenase에 의해 oxaloacetate를 거쳐 대사되는 것으로 보인다.

酵素活性에 미치는 基質濃度の 影響

基質濃度の 變化에 따른 malic enzyme 및 malate dehydrogenase의 活性을 測定하였다. 이를 Lineweaver-Burk plot를 한 結果, L-malate에 대한 K_m 値는 malic enzyme이 3.125mM, malate dehydrogenase가 4.761mM이었다 (Fig. 3, 4).

이는 malic enzyme이 malate dehydrogenase보다 基質인 L-malate에 對한 親和性이 더 크다는 것을 나타낸다.

Malic enzyme의 活性에 미치는 Mn^{2+} 濃度の 影響

前報⁽¹⁰⁾에서 cofactor인 Mn^{2+} 이 malic enzyme의 효소활성을 促進시키는 點에 착안하여 Mn^{2+} 의 濃度別로 효소活性을 조사한 바, Fig. 5에서와 같이 20mM농도에서 가장 높은 효소活性을 보였으며 Mn^{2+} 의 cofactor로서의 역할이 재확인되었다.

사과산의 代謝經路

사과산의 대사경로에 관한 研究를 보면, 岡山⁽¹¹⁾는 S-

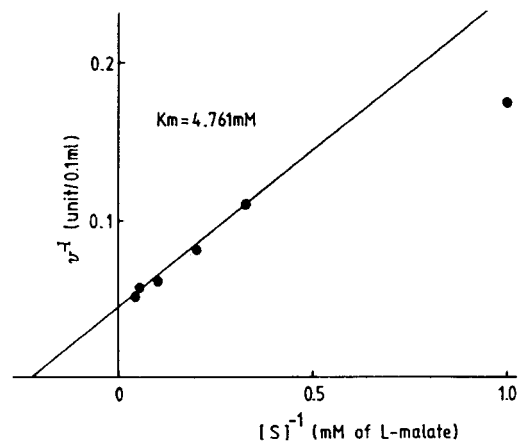


Fig. 4. Effect of L-malate concentration on malate dehydrogenase activity

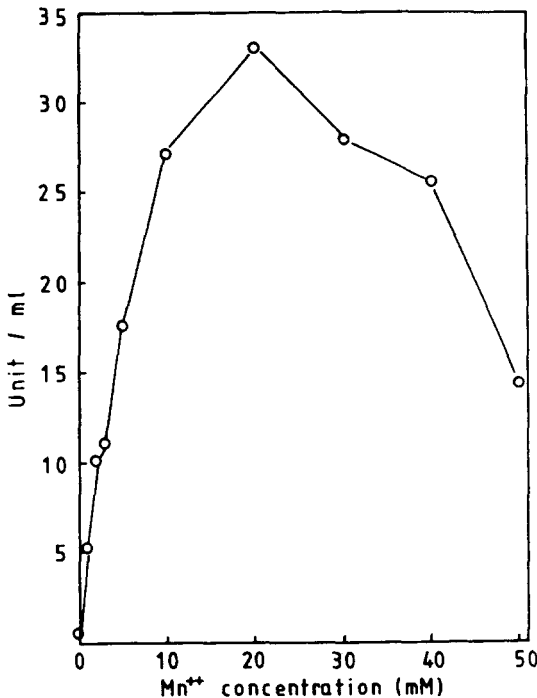


Fig. 5. Effect of Mn^{2+} concentration on malic enzyme activity

chiz. pombe IFO 0358이 B경로(Fig. 1) 즉, 사과산이 oxaloacetate, pyruvate 및 acetate를 거쳐 ethanol로 대사된다고 報告하였으며 그 理由로서 L-malate의 oxaloacetate로의 轉換에 關与하는 NAD-dependent malate dehydrogenase의 강한 活性을 指摘하고 있다. 또한 혐기적 條件下에서 사과산이 직접 脫炭酸되어 ethanol로 分解된다는 說(D경로)도 있다.⁽²⁾

本 實驗에서의 結果를 綜合해 보면, 첫째, malic enzyme과 malic enzyme의 活性을 比較한 바 malic enzyme의 活性이 malate dehydrogenase보다 약 4배 높았고, 둘째, malic enzyme의 K_m 直가 malate dehydrogenase보다 낮아 基質인 사과산에 대한 親和力이 malic enzyme쪽이 훨씬 큰 것으로 나타났으며, 셋째, malo-alcohol 醱酵과정중 사과산이 消失되고 pyruvate가 生成된 것이 paper chromatogram에서 確認된 점, 넷째, cofactor로 알려진 Mn^{2+} 에 의해 malic enzyme의 活性이 促進된다는 점, 다섯째, 사과산 0.5%를 含有한 培地에 本 供試菌을 接種·培養한 培養液에서 미량의 알콜이 檢出된 점 등을 들 수 있다.

이같은 結果로 미루어, 本 供試菌에 의한 사과산 代謝의 主經路는 Fig. 1의 推定 代謝經路에서 보는 바와 같이 pyruvate 및 acetaldehyde를 거쳐 ethanol로 대

謝되는 C경로를 거치는 것으로 推定할 수 있다. 이는 *Schiz. pombe*를 利用하여 Mayer⁽²⁾, 岡山⁽³⁾가 檢討한 사과산의 대사경로와는 다른 경로였다.

要 約

Malo-alcohol 醱酵酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* St-3에 의한 사과산의 代謝經路를 검토한 결과는 다음과 같다. *Schiz. japonicus* var. *japonicus* St-3의 粗酵素의 活性을 測定한 바, malic enzyme(EC 1. 1. 40)의 효소活性이 malate dehydrogenase(EC 1. 1. 37)보다 약 4배 높았으며 兩酵素의 基質인 L-malate에 대한 K_m 直는 malic enzyme이 3.125mM, malate dehydrogenase는 4.761 mM로써 기질에 대한 親和性에 있어서 malic enzyme 쪽이 훨씬 컸다. Malo-alcohol 醱酵과정중 사과산이 消失되어 pyruvate가 生成됨을 確認할 수 있었으며 Mn^{2+} 에 의해 malic enzyme의 活性이 促進되었다. 이상의 結果로 미루어 本 供試菌에 의한 사과산 代謝의 主經路는 malate→pyruvate→acetaldehyde→ethanol의 經路를 거치는 것으로 推定할 수 있었다.

文 獻

1. Beelman, R. B. and Gallander, J. F.: *Adv. Food Res.*, 25, 1 (1979)
2. Mayer, K. and Temperli, A.: *Arch. Mikrobiol.*, 46, 321 (1963)
3. 岡本辰夫, 原田順厚, 小山内たか: 弘前大学 農学部 学術報告, 17, 1 (1971)
4. Dittrich, H. H.: *Wein-Wiss*, 18, 406 (1963)
5. Dittrich, H. H.: *Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkd., Infektionskr. Hyg., Abt. 1: Orig.* 118, 406 (1964)
6. Peynaud, E., Domercq, S., Boidron, A. M., Lafon Lafourcade, S. et Guimberteau, G.: *Arch. Mikrobiol.*, 48, 150 (1964)
7. Temperli, A., Künsch, U., Mayer, K. and Busch, I.: *Biochim. Biophys. Acta*, 110, 630 (1965)
8. Flury, U., Heer, B. and Fiechter, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 341, 465 (1974)
9. Flury, U. and Fiechter, A.: *Pathol. Microbiol.*, 40, 145 (1974)
10. 鄭基澤, 俞大植, 金在根: 韓國食品科学會誌, 15, 404 (1983)

11. 俞大植 : 産業微生物学会誌, 6, 23 (1978) (1951)
 12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
 13. 鄭基澤, 俞大植, 金在根, 金燦祥 : 韓國食品学会誌, 14, 236 (1982)
 14. 田邊脩 : アルコール 醱酵研究法, 河出書房, p. 32
 15. Ishimoto, M., Minakami, S., Oshima, T. and Wada, H. : *Metabolic maps*, 3rd ed., Kyoritsu Publishing Co., Ltd. p. 13 (1973)
-
- (1983年 12月 5日 접수)