

## Lysozyme 및 glycine의 첨가가 막걸리의 품질에 미치는 영향

이성기 · 김인호 · 민병용

한국 식품개발 연구원

**초록 :** 막걸리의 제조과정 중 2단사입시에 lysozyme 270ppm과 glycine 0.27%구 및 lysozyme 450ppm과 glycine 0.45% 구를 첨가하여 발효시킨 후, 주요를 2배 희석시켜 발효성분변화, pH 변화, acetic acid 함량, 핵산 관련물질의 함량, 관능검사 등을 측정하였다. 제조과정 중 lysozyme과 glycine의 첨가는 막걸리 발효에 어떠한 영향도 미치지 않았으며, lysozyme 혼합 처리구는 대조구에 비해 저장기간 동안 pH의 감소가 둔화되었고, 초산 생성량이 현저히 억제되었다. 또한 3°C에서 2주 저장한 막걸리의 핵산 관련물질은 대조구에 비해 IMP, inosine 함량이 더 많았고 관능검사에서도 lysozyme 혼합 처리구가 맛과 기호성 면에서 그 유의성이 인정되었다(1990년 8월 23일 접수, 1990년 9월 20일 수리).

Lysozyme은 이미 잘 알려진 바와 같이 박테리아 세포벽의 주요 구성성분인 mucopolysaccharide의 N-acetylglucosamine과 muramic acid 사이에 연결되어 있는  $\beta$ -linkage를 가수분해시키는 효소이다. 특히 박테리아 세포벽을 분해시키기 때문에 그람 양성균에게 유리한 효소이다. 또한 lysozyme은 박테리아뿐 아니라 바이러스 등에도 불용성 물질을 생성하여 불활성화시키는 작용을 하여<sup>1)</sup> 예전부터 소염제, 항생물질 대용등 의약품의 원료로 이용하여 왔거나 그 가능성이 제시되어 왔다<sup>2)</sup>. 식품의 저장성 면에서도 육제품, 치즈, 주류<sup>3)</sup>, 절임류, 수산물<sup>4)</sup>등에 관심을 가지고 연구가 진행되고 있다. 자연치즈를 즐겨 먹는 유럽 지역에서는 치즈의 장기 숙성시 생기기 쉬운 불필요한 butyric acid 생산균을 억제하거나 그 작용기작을 규명하기도 하였고<sup>5)</sup>, 가스에 의해 생성된 browning 현상을 막기 위해 널리 이용하기도 하였다. 이외에도 분유에 lysozyme을 첨가하여 유아의 장내에서 유익한 균의 성장을 돕고, 유해한 균을 억제시킨다는 보고<sup>6,7)</sup>와 살균하기 곤란한 식품이나 저온 살균이 요구되는 통조림 제품에 이용가능성을 제시한 보고<sup>8)</sup>도 있다.

Lysozyme을 이용한 주류의 품질에 관한 연구를 보면, 일본의 청주에서 p-hydroxybenzoic esters나  $\beta$ -glycopyranose aerodehydrogenase와 함께 lysozyme을 이용하여 저장기간을 연장시켰다는 보고가 있고<sup>9)</sup>, Yajima등<sup>10)</sup>에 의하면 청주의 부패원인균은 히오치 균인데, 일반적으로 50~500ppm의 lysozyme으로 그 생

육이 억제되며 *L. heterohiuchii*는 10ppm, *L. homohiuchii*는 20ppm, *L. fermenti*는 1ppm, *L. acidophilus*는 10ppm의 lysozyme으로 성장을 억제 시킬수 있고, salicylic acid 500ppm과 혼합하면, 그 효과가 상승한다고 하였다. 또한 청주에서 자라는 균중에서 *L. acidophilus*가 lysozyme에 저항성이 가장 강하다고 발표하였고<sup>9)</sup>, 청주의 경우 효과적으로 lysozyme을 이용하려면 20% 이상의 알콜 농도에 5ppm 이상의 첨가가 바람직하다고 하였다<sup>11)</sup>.

우리나라 막걸리에 대한 lysozyme의 처리효과를 보면, 송<sup>3)</sup>의 보고가 있다. 그는 제성된 막걸리에 대해 lysozyme을 5~100ppm 범위로 처리하였을 때 농도 증가에 따른 산도증가 및 산 생성균 성장의 억제현상을 발표하였으나, pH나 저장온도에 따른 영향력에 비해 lysozyme 단독처리에 따른 효과는 미약한 것으로 보고하였다.

식품저장을 목적으로 이용된 lysozyme의 단독효과 외에도 lysozyme과 함께 상승효과를 보기 위한 기타 보존제 사용의 연구도 활발히 진행되었다. 예를 들면 phytic acid, POBB<sup>12)</sup>, amino acids<sup>13)</sup>, hydrogen peroxide, 유기산<sup>14)</sup>등을 lysozyme과 같이 병용하여 식품에 사용함으로써 저장효과를 높일 수 있다고 하였다. 특히 아미노산류는 각 식품에 첨가하여도 안전상 문제가 없기 때문에 glycine, threonine, lysine 등이 연구의 대상이 되기도 하였다<sup>15,16)</sup>. 그 중에서도 glycine은 lysozyme이 균의 세포벽을 파괴할 때 가장 도움을 주

는 아미노산으로 Yashidake와 Sinichiro<sup>15)</sup>에 의해 연구가 활발히 진행되었다<sup>12)</sup>.

따라서 본 연구는 막걸리 제조공정 중에 lysozyme과 glycine을 첨가하여 발효시킨 다음 제성하여 저장중 품질 변화를 구명하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시재료

##### 1) 재료 및 시약

본 실험에 사용된 lysozyme은 캐나다 Brookside사에서 제조한 순도 98% 이상의 등전점형 추출물이었고, glycine은 일본 Showa Denko사에서 제조한 순도 99% 이상의 분말제품이었다. 막걸리 제조에 쓰인 조효소(GURO-120), 주모, 입국 등은 배한산업(주)에서 구입하였다.

##### 2) 막걸리 제조

효모 전배양은 지하수에 glucose 5%, yeast extract 0.5%, pH 4.5~5.0으로 조절하여 150ml씩 500ml 삼각플라스크에 분주하여 121°C, 1.1kg/cm<sup>2</sup>에서 15분간 멸균한 다음 실온까지 냉각시켰다. 배양효모 slant로부터 *Saccharomyces cerevisiae*를 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 왕복 진탕시키면서 배양하였다. 본 배양은 입국 *Aspergillus kawachii* 중량을 기준으로 물 150%를 넣었으며, 이어서 앞서 24시간 동안 배양시킨 효모 배양액을 총 부피의 10% 접종하여 25°C에서 3일간 배양시켰다. 배양기간 중에는 매일 2~3회씩 교반하여 폼은 조절과 산소 공급을 하였으며, 초단사입은 입국 400g, 주모 100ml에 물 680ml를 가해 25°C에서 48시간 배양시켰고 2단사입은 초단 후 40~48시간에 조효소제(GURO-120), 증미 1.6kg, 물 2.71ℓ를 계속 첨가하여 25°C에서 3일간 배양시켜 완성하였다. Lysozyme과 glycine은 2단사입시에 첨가하였으며 발효가 끝난 후 동량의 물로 제성하여 3°C와 30°C에서 저장하면서 품질의 변화를 고찰하였으며 대조구와 lysozyme 270ppm + glycine 0.27% 첨가구, lysozyme 450ppm + glycine 0.45% 첨가구로 나누어 실험하였다.

#### 방법

##### 1) 핵산 및 핵산 관련 물질

핵산 및 핵산 관련 물질은 Valentine 방법<sup>17)</sup>에 의해 시료액 5g을 0.6N HClO<sub>4</sub> 용액 50ml에 넣고 균질화한 후 여과시켜 여액과 동량의 potassium hydroxide-

phosphate완충용액(KOH-PO<sub>4</sub>, pH7.04)을 혼합한 다음, 여과하여 그 여액을 HPLC 분석용 시료로 하였다. HPLC는 Waters associated HPLC이며,  $\mu$  Bondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>컬럼의 300nm×4nm를 사용하였고, 1ml/min의 유출속도로 시료 5 $\mu$ ℓ를 투입하였다. 이때 사용된 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

##### 2) 초산 함량 측정

초산함량은 보사부 식품공전(1988)<sup>18)</sup>에 따라 시료 20ml에 30ml 물을 가하고, 0.1N NaOH액으로 적정, 환산하였다.

##### 3) 관능검사

막걸리의 관능검사는 30°C에서 3일간 저장한 것으로 맛, 향기, 선호도로 구분하여 9점 : 매우좋다 에서 1점 : 매우 나쁘다의 직선 척도법으로 조사하였다.

##### 4) 산도 측정

여과한 시료액 10ml에 pH7.0까지 소요되는 0.1N NaOH의 ml수를 당량비로 계산하였다.

##### 5) 알콜 함량 측정

시료 100ml에 동량의 증류수를 가하고 소량의 소포제와  $\alpha$ -amylase를 첨가한 후 증류하여 증류액 80ml를 회수하여 증류수로 100ml까지 희석하고 주정계로 측정된 값과 그 액의 온도로 부터 주정도수 환산표에 의하여 주정도수를 구하였다.

### 결과 및 고찰

막걸리 제조과정 중 lysozyme과 glycine의 복합효과

Table 1. Operating conditions for analysis of nucleotide and its related compounds by HPLC

|                  |   |
|------------------|---|
| Instrument       | : Waters associates HPLC  |
| Column           | : Waters Assoc. $\mu$ Bondapak <sup>TM</sup> C <sub>18</sub> , 300nm×4nm<br>Phosphate buffer, pH 7.04<br>Phosphate buffer, pH 3.20 containing acetonitrile and PIC reagent A. |
| Flow rate        | : 1.0ml/min   |
| Injection volume | : 5 $\mu$ ℓ   |
| Detector         | : Waters associates, Model 440 at 254nm with 0.02 AUF <sub>G</sub>  |
| Recorder         | : LKB 2210 at 5mm/min chart speed<br>10mV full scale  |
| Data calculator  | : Varian CDS III  |

를 검토한 바, Table 2와 같다.

발효과정 중에 lysozyme과 glycine의 첨가는 품온과 산도 변화에 영향을 미치지 않았으며 잡균오염을 억제하여 0.4% 정도의 알코올 생성을 증가시켰다.

발효가 끝난 술덧을 물과 1:1로 제성하여 3°C와 30°C에 저장하면서 pH의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다.

저장 7일 동안 pH는 서서히 감소하였으며, 무처리구에 비해 lysozyme 혼합처리구가 약간 높은 pH를 유지하였다. 즉, lysozyme 450ppm 혼합구의 pH는 제성시 3.85에서, 저장 7일째는 3.80으로 감소하였으나 대조구는 pH3.85에서 3.71로 감소하였다.

Table 2. Chemical change of *Mageoly* during manufacturing

| Treatments      | Variable   | The primary brewing process |      | The main brewing process |      |      | Dil.* |
|-----------------|------------|-----------------------------|------|--------------------------|------|------|-------|
|                 |            | 0hr                         | 24hr | 0hr                      | 24hr | 48hr |       |
| Control         | pH         | 3.2                         | 3.3  | 4.1                      | 3.8  | 3.9  | 3.8   |
|                 | T.A.(%)**  |                             | 18.8 |                          | 5.4  | 5.9  | 3.0   |
|                 | Temp.(°C)  | 19                          | 27   | 22                       | 27   | 27   |       |
|                 | Alcohol(%) |                             |      |                          | 7.1  | 10.1 | 5.0   |
| Lysozyme 0.054% | pH         |                             |      | 4.1                      | 3.8  | 3.9  | 3.9   |
|                 | + T.A.(%)  |                             |      |                          | 5.5  | 5.9  | 3.0   |
| Glycine 0.54%   | Temp.(°C)  |                             |      | 22                       | 27   | 27   |       |
|                 | Alcohol(%) |                             |      |                          | 7.5  | 10.1 | 5.0   |
| Lysozyme 0.09%  | pH         |                             |      | 4.1                      | 3.8  | 3.9  | 3.9   |
|                 | + T.A.(%)  |                             |      |                          | 5.5  | 5.8  | 3.0   |
| Glycine 0.9%    | Temp.(°C)  |                             |      | 22                       | 27   | 27   |       |
|                 | Alcohol(%) |                             |      |                          | 7.5  | 10.1 | 5.0   |

\*The main brewing process was diluted with the same rate of water.

\*\*T.A.; Titrable acidity.

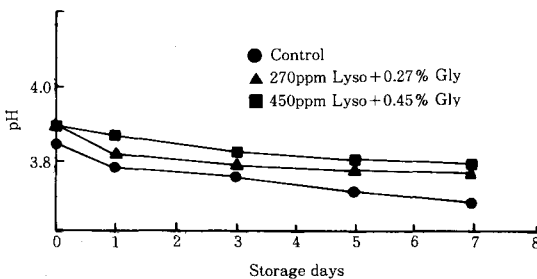


Fig. 1. Effects of lysozyme and glycine on the change of pH in *Mageoly* during storage at 30°C

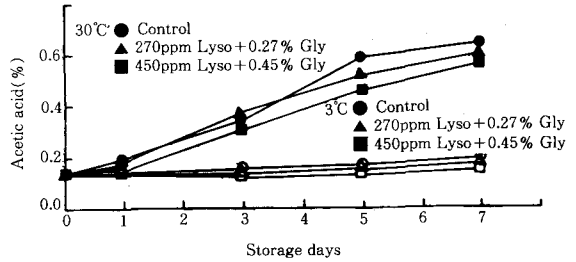


Fig. 2. Effects of lysozyme and glycine on the change of acidity in *Mageoly* during storage at 3°C and 30°C

초산 함량은 Fig. 2와 같이 3°C에 비해 30°C에 저장할 경우 저장 당일의 초산 함량은 0.15%이므로, 저장 7일 동안 처리구 모두 서서히 증가하였으며 처리구 간에 큰 차이는 없었다. 그러나 30°C에 저장할 때는 저장 1일로부터 5일까지 급격히 증가하여, 처리구 간에 현저한 차이를 나타내었다. 저장 5일째 대조구의 초산함량이 0.62%인데 비하여 270ppm lysozyme 혼합구가 0.55%, 450ppm lysozyme 혼합구가 0.52%로 약 0.1%만큼 낮게 나타났다.

이상의 결과로 막걸리 제조과정 중에 lysozyme과 glycine의 첨가가 발효에는 영향을 미치지 않지만 제성하여 저장할때 Yajima등<sup>10)</sup>의 보고처럼 막걸리에서도 lysozyme의 활력은 장시간 동안 고도로 유지되어 고초균, 화락균, 초산균 등의 생육을 억제함으로써 초산생성을 둔화시키는 역할과 동시에, 막걸리의 저장성에도 기여함을 알 수 있었다.

막걸리는 제조 및 유통 과정중에도 끊임없이 핵산 관련 물질들이 생성되거나 소실되며, 이들 성분들은 맛과 관련이 깊은 것으로 알려지고 있는데, Table 3은 2단 사입시에 lysozyme과 glycine을 혼합처리하여 제성한 후 3°C에서 2주동안 저장한 막걸리의 핵산 및 핵산 관련 물질의 양을 보여준다.

Lysozyme 혼합 처리구는 대조구에 비하여 ATP는 0.02~0.03 μmole/ml, APT는 0.03~0.04 μmole/ml 정도 낮았으나, ADP는 0.03~0.04 μmole/ml, IMP는 0.16~0.23 μmole/ml, inosine은 0.28~0.58 μmole/ml, hypoxanthine은 0.13~0.17 μmole/ml 높았다. 이는 glycine 첨가가 맛 물질의 형성에 기여한다는 것을 시사하며, 특히 2주 후에도 IMP등의 양이 대조구에 비하여 많은 것은, 술덧 담금 4일 후부터 IMP의 양이 감소하여 7일 후 막걸리 소비시에는 핵산 관련 물질에 의한 맛을 거의 느끼지 못할 것이라고한 김등<sup>19)</sup>의

Table 3. Content of nucleotides and their related compounds in lysozyme added *Mageoly* after 2 weeks at 3°C

| Variable     | Control | Unit: $\mu$ mole/ml                |                                    |
|--------------|---------|------------------------------------|------------------------------------|
|              |         | Lysozyme 270ppm<br>+ Glycine 0.27% | Lysozyme 450ppm<br>+ Glycine 0.45% |
| ATP          | 0.08    | 0.04                               | 0.05                               |
| ADP          | 0.10    | 0.13                               | 0.14                               |
| AMP          | 0.08    | 0.06                               | 0.05                               |
| IMP          | 0.92    | 1.08                               | 1.15                               |
| Inosine      | 1.43    | 1.71                               | 2.01                               |
| Hypoxanthine | 0.28    | 0.41                               | 0.45                               |

Table 4. Sensory evaluation\* of lysozyme added *mageoly* after 3days at 30°C

| Variable      | Control | Lysozyme                  |                           |
|---------------|---------|---------------------------|---------------------------|
|               |         | 270ppm<br>+ 0.27% glycine | 450ppm<br>+ 0.45% glycine |
| Taste         | 4.57c   | 5.57b                     | 6.54a                     |
| Flavor        | 5.43b   | 5.50a                     | 6.05a                     |
| Acceptability | 5.14b   | 6.57a                     | 6.71a                     |

\*9: Like extremely, 5: Neither like nor dislike, 1: Dislike extremely  
a, b, c: Means with a row with different superscripts are significantly different(p<0.05)

연구와 다소 상이한 결과였다.

30°C에서 3일 동안 저장한 막걸리의 관능검사 결과는 Table 4와 같다.

막걸리의 기호도와 밀접한 관계가 있는 맛의 차이를 보면, 대조구의 4.57점에 비하여 lysozyme 혼합 처리구는 5.57점 및 6.54점으로 각각 1~2점 높은 값을 나타내었으며 처리구 간에 5% 유의성이 인정되었다. 또한 종합 기호도와 향기 면에서도 대조구에 비하여 유의성과 함께 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 lysozyme과 glycine이 막걸리 발효 중 형성되는 초산의 생성을 억제하여 신맛에 의한 기호도 감소를 지연시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

이상으로 lysozyme과 glycine의 처리는 막걸리의 유통 중 품질을 유지시키고, 특히 glycine은 미생물 세포벽의 아미노산과 치환되거나 배열을 변형시켜 glycine의 작용을 돕고, 핵산 관련 물질의 생성에도 기여함을 Table 2의 결과로부터 추정할 수 있었다. 앞으로, lysozyme과 glycine의 첨가뿐만 아니라 salicylic acid나 butyl p-hydroxybenzoate등과 같은 기타 보존제를 함께 첨가하였을 때 저장성 및 성분변화도 구명되어야 할 것이다.

#### 감사의 글

본 연구의 원활한 수행을 위해 협조해주신 배한산업(주) 임직원 여러분께 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

- Hasselberger, F. X.: "Uses of Enzymes and Immobilized Enzymes", Nelson-Hall Inc. publishers Chicago, P. 128(1978)
- Wooley, R. E., Schall, W. D., Eagon, R. G. and Scott, T. A.: Efficacy of EDTA-tris-lysozyme Lavage in the Treatment of Experimentally Induced *Pseudomonas aeruginosa* Cystitis and the Dog, Am. J. Vet. Res., 35
- 송미라 : 난백 Lysozyme 첨가에 의한 탁주 보존성에 관한 연구, 고려대학교 대학원 석사학위 논문 (1985)
- 김영만, 이병호, 이상훈, 신일식, 이태식 : 난백 Lysozyme에 의한 연제품의 방부효과, 한국수산학회지, 21 : 269(1988)
- Arnes, G.: Substances with Antimicrobial Effect of Importance in Cheese making Meieriposten, 63 : 415 (1974)
- Dubois-Preyost, R. : Dietary Used of Lysozyme, Aliment. Vie., 58 : 44(1970)
- Sawada, J., Misaki, T., Yamagishi, M. and Kitehara, T.: Destabilization of Casein Micells by Lysozyme, Can. J. Biochem., 49 : 882(1971)
- Eisai, K. K.: Sake Storage, Japanese Examined Patent., 5 : 535(1980)
- Yajima, M., Hidaka, Y. and Matsuoka, Y.: Studies on Egg White Lysozyme as a Preservative of Sake II, J. Ferment. Technol., 49 : 693(1971)
- Yajima, M., Hidaka, Y. and Matsuoka, Y.: Studies on Egg White Lysozyme as a Preservative of Sake, J. Ferment. Technol., 46 : 782(1968)
- Uchida, M., Yokomura, S. and Nagahama, G.: Studies of *Lactobacilli* Isolated from Mirin Liquor, V. Antiseptic Effects of Egg White Lysozyme on the Growth of *Lactobacillus* in Mirin Liquor, J. Ferment. Technol., 50 : 292(1972)
- Yashima, M., Hidaka, Y., Ota, R., Hara, K. and Matsuoka, Y.: Japanese Patent., 1972 : 7359(1972)
- Igarashi, H., and Zaima, H.: Japanese Patent., 1971 : 19876(1971)

- 14. Miller, T. E.:Killing and Lysis of Gram Negative Bacteria through the Synergistic Effect of Hydrogen Peroxide, Ascorbic acid, and Lysozyme, J. Bacteriol., 98 : 949(1969)
- 15. Yashidake, S. and Sinichiro, A.:Use of Egg White Lysozyme in the Food Industry, New Food Inc., 19 : 17(1977)
- 16. Chassy, B. M. and Giuffrida, A.:Method for the Lysis of Gram Positive, Asporogenous Bacteria with Lysozyme, Appl. Environ. Microbiol., 39 : 153(1980)
- 17. Valentine,D.:Determ-ination of Adeno-sine Triphosphate and its Degradation Products in Fish Muscle by High Pressure Liquid Chromatography, Torry Research Sandwich Station, Student Report
- 18. 보건사회부 : 식품공전, 제 4. 식품별 기준 및 규격, p. 329(1988)
- 19. 김영걸, 성낙규, 정덕화, 강인수 : 쌀막걸리의 미생물학적인 연구, 제 4보, 담금 중 핵산 분해계의 성질 및 핵산 관련 물질의 변화, 한국식품과학회지, 15 : 245(1983)

**Effect of lysozyme and glycine on the *Mageoly* brewing process**

Sung-Ki Lee, In-Ho Kim and Byong-Yong Min(Korea Food Research Institute, Hwasong 445-820, Korea)

**Abstract:**Characteristics of brewing product, *Mageoly* mashes diluted by the same ratio of water was investigated for alcohol formation, pH change, acid formation, nucleotide content and sensory evaluation stored at 3°C or 30°C during 7 days. Each sample was mixed with lysozyme 270ppm and glycine 0.27%, or lysozyme 450ppm and glycine 0.45% on the secondary brewing process in *Mageoly* brewing. The brewing was not affected by addition of lysozyme and glycine mixture. When the lysozyme-glycine mixture was added during brewing, that resulted in a decrease in pH, a suppression of acid formation and an increase in IMP and inosine content. Therefore there was significantly improved in taste and palatability.