

Lysozyme 및 Glycine 의 첨가가 막걸리의 품질에 미치는 영향

이 성 기
(응용연구실)

I. 서 론

Lysozyme 은 이미 잘 알려진 바와 같이 박테리아 세포벽의 주요 구성성분인 mucopolysaccharide 의 N-acetylglucosamine 과 muramic acid 사이에 연결되어 있는 β -linkage 를 가수분해 시키는 효소이다. 특히 박테리아 세포벽을 분해시키기 때문에 그람양성균에게 유리한 효소이다. 또한 lysozyme 은 박테리아 뿐 아니라 virus 등에도 불용성 물질을 생성하여 불활성화 시키는 작용을 하여¹⁾ 예전부터 소염제, 항생물질 대용 등 의약품의 원료로 이용하여 왔거나 가능성이 제시되어 왔다²⁾.

식품의 저장성면에서도 육제품, 치즈, 주류³⁾, 절임류, 수산물⁴⁾ 등에 관심을 가지고 한창 연구가 진행되고 있다. 자연 치즈를 즐겨 먹는 유럽지역에서는 치즈의 장기 숙성시 생기기 쉬운 불필요한 butyric acid 를 생산하는 균을 억제하거나 억제작용 기작을 구명하기도 하였으며⁵⁾, 가스에 의해 생성된 browning 현상을 막기 위해 널리 이용하기도 하였다. 이외에도 분유에 lysozyme 을 첨가하여 유아의 장에서 유익한 균의 성장을 돕고, 유해한 균을 억제시킨다는 보고⁶⁻⁷⁾와 살균하기 곤란한 식품이나 저온 살균이 요구되는 캔 제품에 이용 가능성을 제시한 보고⁸⁾도 있다.

Lysozyme 을 이용한 주류의 품질에 관한 연구를 보면, 일본의 청주에서 p -hydroxybenzoic esters 나 β -glycopyranose aerodehydrogenase 와 함께 lysozyme 을 이용하여 저장기간을 증가시켰다고 한 바⁹⁾ 있고, Yasima 등¹⁰⁾에 의하면 청주의 부패원인

은 *Hiochi* 균인데, *L. heterohiochii* 는 10ppm, *L. homohiochii* 는 20ppm, *L. fermenti* 는 1ppm, *L. acidophilus* 는 100ppm 의 lysozyme 으로 성장억제시킬 수 있었으며, salicylic acid 500ppm 과 혼합하면, 그 효과가 상승한다고 하였다. 이들⁹⁾은 청주에서 자라는 균중에서 *L. acidophilus* 가 lysozyme 에 저항성이 가장 강하다고 발표하였고, 청주에서 효과적으로 lysozyme 을 이용하려면 20% 이상의 알코올 농도에 5ppm 이상 첨가가 바람직하다고 하였다¹¹⁾.

우리나라 막걸리에 대한 lysozyme 의 처리효과를 보면, 유일하게 宋 등³⁾의 보고가 있다. 그는 제성된 막걸리에 lysozyme 을 5~100ppm 만큼 처리하였을 때 농도증가에 따른 산도증가 및 산생성균 성장의 억제현상을 발표하였으나, pH 나 저장온도에 따른 영향력에 비해 lysozyme 단독처리에 따른 효과는 미약한 것으로 보고하였다.

식품저장을 목적으로 이용된 lysozyme 의 단독효과 외에도 lysozyme 과 함께 상승효과를 보기 위한 기타 보존제 사용의 연구도 활발히 진행되었다. 예를 들면, phytic acid, POBB¹²⁾, amino acids¹³⁾, hydrogen peroxide, 유기산¹⁴⁾ 등을 lysozyme 과 같이 병용하여 식품에 사용하므로써 저장효과를 높일 수 있다고 하였다.

특히 아미노산류는 각 식품에 첨가하여도 안전상 문제가 없기 때문에 glycine, threonine, lysine 등이 연구의 대상이 되기도 하였다¹⁵⁻¹⁶⁾. 그 중에서 glycine 은 lysozyme 이 균 세포벽을 파괴할때 가장 도움을 주는 아미노산으로 알려져 연구가 활발히

진행되었다¹²⁾.

그러므로 본 연구는 막걸리 제조과정중에 lysozyme 과 glycine 을 첨가하여 발효시킨 다음 제성하여 저장중 품질변화를 구명하기 위해 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험에 사용된 lysozyme 은 캐나다 Brookside 社에서 제조한 순도 98% 이상의 등전점형 추출물이었고, glycine 은 일본 Showa denko 社에서 제조한 순도 99% 이상의 분말제품이었다. 막걸리 제조에 쓰인 조효소(GIRO-120), 주모, 입국 등은 배한산업(주)에서 구입하였다.

2. 막걸리 제조

효모 전 배양은 지하수에 glucose 5%, yeast extract 0.5%, pH 를 4.5~5.0으로 조절하여 150 ml 씩 500ml 삼각플라스크에 분주하여 121°C 1.1 kg/cm²에서 15분간 멸균한 다음 실온까지 냉각시켰다.

배양효모 slant 로부터 *Aspergillus kawachii* 를 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 왕복 진탕시키면서 배양하였다. 본 배양은 입국 중량에 물 1.5 배를 넣고, 이어서 이미 24시간 동안 배양시킨 효모액을 총 부피의 10%에 해당되게 접종하여 25°C에서 3일간 배양시켰다. 배양기간중에 하루 2~3회씩 교반하여 품온조절과 산소공급을 원활하게 해주었다.

초단사입은 입국 400g, 주모 100ml 에 물 680ml 을 가해 25°C에서 48시간 동안 배양시켰다. 2단사입은 초단사입한 후 40~48시간째에 조효소제(GIRO-120), 증미 1.6kg, 물 2.7l 를 초단사입구에 다시 넣고 25°C에서 3일간 배양시키므로 완성시켰다.

2단 사입시에 대조구와 lysozyme 0.054%에 glycine 0.54%를 넣은 구, lysozyme 0.09%에 glycine 0.9%를 넣은 구로 각각 나누어 처리하였다. 발

효가 완성된 처리구에 물을 동량 가하여 제성을 실시하였으며, 각 처리구별로 3°C와 30°C로 나누어 저장하면서 품질실험을 실시하였다.

3. 조사항목 및 방법

1) 핵산 및 핵산관련물질

핵산 및 핵산관련 물질은 Valentine¹⁷⁾ 방법에 의해 시료액 5g 을 0.6N HClO₄ 용액 50ml 에 넣고 균질한후 여과시켰다. 이 여액과 동량의 potassium hydroxide phosphate 완충용액(KOH-PO₄, pH 7.04)을 넣어 혼합한 다음, 다시 여과시켜 받아진 여액을 최종 HPLC 의 분석용 시료로 사용하였다.

분석용 기체는 Water associate HPLC 이고, μ Bondapak TMC₈ 컬럼의 300 nm×4mm 를 이용하였으며, 유출속도 1ml/min 에 10 μ l 의 시료를 투입하였다.

2) 초산 측정

초산함량은 보사부 식품공전(1988) 방법¹⁸⁾에 의해 시료 20ml 에 새로 끓여 식힌물 30ml 를 가하고, 0.1N NaOH 액으로 적정하여 환산하였다.

3) 관능검사

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

4) 산도측정

여과한 시료액 10ml 에 pH 7.0까지 소요되는 0.1N NaOH 의 ml 수를 당량비로 계산하였다.

5) 알코올 함량

시료 100ml 에 동량의 증류수를 넣고 소량의 소포제와 α -amylase 를 첨가한 후 증류를 실시하였다. 증류액 100ml 을 회수하여 주정제를 담그어 측정한다음 주정도수 환산표에 의해 주정도수를 계산하였다.

III. 결과 및 고찰

막걸리의 제조과정중 lysozyme 과 glycine 의 복합효과를 검토한 바, 표 1과 같다.

1단사입이 끝난후 2단사입때 이들을 처리하여 22°C에서 발효를 실시하였는데 발효시간이 경과할 수록 pH는 낮아지고, 알코올 및 산도는 증가하였지만 대조구와 처리구간의 차이는 인정되지 않았다.

표 1. Chemical change of *Macguli* during manufacturing

Treatment	Valuable	First fermentation		Second fermentation			Dilution*
		0hr	24hr	0hr	24hr	48hr	0hr
Control	pH	3.2	3.3	4.1	3.8	3.9	3.8
	T.A.(%)**		18.8		5.4	5.9	3.0
	Temperature (°C)	19	27	22	27	27	
	Alchole (%)				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%	Temperature (°C)			22	27	27	
	Alchole (%)				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%	Temperature (°C)			22	27	27	
	Alchole (%)				7.5	10.1	5.0

* Mother *Macguli* was diluted with the same rate of water

** T.A.: Titratable acidity

발효가 끝난 술덧을 물과 1대 1로 제성하여 3°C와 30°C에 저장하면서 pH 변화와 초산함량을 조사하였다. 그림 1과 같이 저장 7일동안 pH는 서서히 감소하였고, 무처리구에 비해 lysozyme 혼합처리구가 약간 높은 pH를 유지하였다. 즉, 제성 즉시 lysozyme 450ppm 혼합구의 pH는 3.85였는데, 저장 7일째 3.80으로 0.05만큼 떨어졌으나 대조구는 pH 3.85에서 3.71로써 0.14만큼 더 떨어졌다.

초산함량을 보면(그림 2) 3°C에 비해 30°C에서 7일간 저장중에 현저히 증가하였고, 대조구에 비해 lysozyme 혼합처리구에서 증가율이 둔화되어 처리구간 차이가 인정되었다. 3°C에 저장할때 저장 0일의 초산함량은 0.15%였는데, 저장 7일까지 처리구 모두 서서히 증가하였지만 처리구간 큰 차이는 없었다. 그러나 30°C에 저장할때는 저장 2일부터 5일까

지 급격히 증가하고 있고, 또 처리구간 현저한 차이도 인정되었다.

저장 5일째 대조구의 초산함량이 0.62%인데 비해 270ppm lysozyme 혼합구가 0.55%, 450ppm lysozyme 혼합구가 0.52%로 약 0.1%만큼 낮게 나타났다. 그러므로 막걸리 제조과정중에 lysozyme 과 glycine 첨가가 발효에 영향을 끼치지 않았지만 제성하여 저장할때 초산 생성을 둔화시키는 역할을 함으로써, 결국 막걸리의 저장성에 기여함을 알수 있다.

청주에 있어서 lysozyme의 주요 역할은 *Hiochi* 균의 성장을 억제 또는 둔화시키는 것으로 알려져 있고, 알코올 20%에 pH 4.0-4.5에서 lysozyme의 활력이 1년 동안 85%이상 유지된다고 하였다¹⁰⁾. 이와 같은 사실에 비추어 막걸리내에서도 lyso-

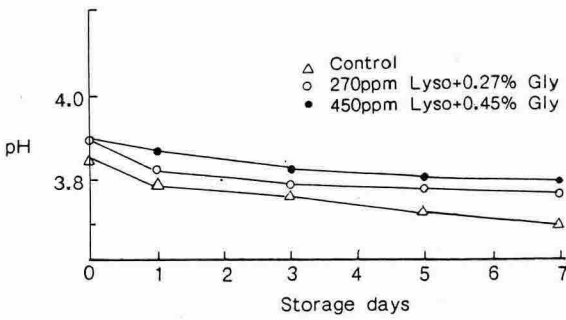


그림 1. Effects of lysozyme and glycine on the change of pH in *Macguli* during storage at 30°C.

zyme의 활력은 장시간 동안 고도로 유지되리라 생각된다. 또한 청주에 lysozyme과 함께 salicylic acid나 butyl ρ -hydroxy-benzoate 등을 넣어 보존성을 향상시켰다는 보고도 있는 것으로 보아 막걸리에서도 glycine의 기타 보존제와의 병용효과에 대해서 향후 더 연구해야 되겠고, 이들 물질을 첨가

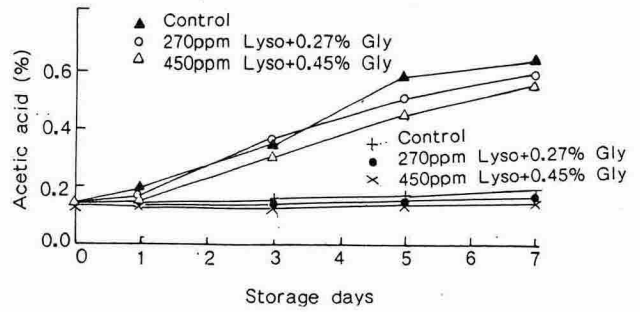


그림 2. Effects of lysozyme and glycine on the change of acetic acid content in *Macguli* during storage at 3°C and 30°C.

할 수 있는 법적인 고려도 해보아야 할 것이다.

막걸리는 제조과정과 유통중에도 끊임없이 핵산 관련 물질들이 생성되거나 소실되어가는데, 이들 성분중에 맛과 관련이 깊은 것으로 알려지고 있다. 표 2와 같이 제성하여 3°C에서 2주째 저장한 막걸리의 핵산 및 핵산관련 물질의 양을 보면, 전반적으로

표 2. Content of nucleotides and their related compounds in lysozyme added *Macguli* after 2 weeks at 3°C. Unit: μ mole/ml

Variable	Control	270ppm Lysozyme + 0.27% Glycine	450ppm Lysozyme + 0.45% Glycine
AMP	0.08	0.06	0.05
ADP	0.10	0.13	0.14
ATP	0.08	0.04	0.05
IMP	0.92	1.08	1.15
Inosine	1.43	1.71	2.01
Hypoxanthine	0.28	0.41	0.45

표 3. Sensory evaluation* of lysozyme added *Macguli* after 3 days at 30°C

Variable	Control	270ppm Lysozyme + 0.27% Glycine	450ppm Lysozyme + 0.45% Glycine
Taste	4.57 ^c	5.57 ^b	6.54 ^a
Flavor	5.43 ^b	5.50 ^a	6.05 ^a
Aceptability	5.14 ^b	6.57 ^a	6.71 ^a

* 9: like extremely, 5: neither like nor dislike, 1: dislike extremely
 abc: Means with a row with different superscripts are significantly different(P<0.05)

IMP와 inosine 함량이 높고, 이어서 hypoxanthine 함량도 $0.28\sim 0.45\mu\text{mol/ml}$ 로 높았으나 AMP는 $0.1\mu\text{mol/ml}$ 이하로 매우 소량만 잔존하였다.

대조구에 비하여 lysozyme 혼합처리구에서 IMP, inosine, hypoxanthine 등이 더 많아 맛 증대에 기여할 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 김 등¹⁹⁾에 의하면 막걸리의 제조과정중에 술덧담금 4일째까지 맛을 내는 IMP가 증가하였고, 그 이후로는 감소하는 경향을 보였기 때문에 시판되는 막걸리의 최종 소비기간이 발효 7일 이후이므로 실질적으로 소비자는 막걸리에 있는 핵산물질에 의한 맛을 거의 못느낄 것이라고 주장한 바 있다. 그러나 본 시험에서는 제조과정중 2단사입시에 lysozyme과 glycine을 혼합 처리하였으므로, 이들 물질에 의한 핵산관련 물질의 생성변화 뿐 아니라 소비자들이 느끼는 맛의 인식차이도 있으리라 생각된다.

앞으로 lysozyme과 glycine 첨가로 막걸리의 발효 및 유통기간중 핵산관련 물질의 변화에 대한 연구가 더 필요하다 하겠다. 30°C 에서 3일째 저장한 막걸리의 관능검사 결과를 보면 표 3과 같다. 신맛에 대한 차이는 lysozyme과 glycine 첨가가 대조구에 비해 덜하므로써 5%의 유의성이 인정되었다.

향기와 종합 기호도에서도 처리구가 대조구에 비해 유의성이 인정되었는데, 다만 처리구간에는 인정되지 않았다. 그러므로 lysozyme과 glycine 처리가 막걸리의 유통중 품질이 변화되는 것을 지연하는데 기여하는 것으로 나타났다.

IV. 요약

막걸리의 제조과정중 2단사입시에 lysozyme 0.054%+glycine 0.54% 및 lysozyme 0.09%+glycine 0.9%를 첨가하여 발효시킨 후, 술덧에 물을 동량 가해 제성시킨 다음 3°C 및 30°C 에 저장하면서 품질을 조사하였다.

제조과정중에 lysozyme과 glycine을 첨가하여도 막걸리 발효에 어떠한 영향도 끼치지 않았다.

Lysozyme 혼합처리구는 대조구에 비해 저장기간 동안 pH의 감소가 둔화되었고, 초산 생성량이 현저히 억제되었다. 3°C 에서 2주된 막걸리의 핵산관련 물질은 대조구에 비해 IMP, inosine 함량이 더 많았다.

관능검사에서도 lysozyme 혼합처리구가 대조구에 비해 맛과 기호성면에서 유의성이 인정되었다.

감사의 글

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

V. 참고 문헌

- 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 대학원석사학위 논문 (1985)
- 김영만·이병호·이상훈·신일식·이태식: 난백 Lysozyme에 의한 연제품의 방부효과, 한국수산학회지, **21**, 269(1988)
- Aarnes, G.: Substances with Antimicrobial Effect of Importnace in Cheesemaking. 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)

9. Yajima, M., Hidaka, Y., and Matsuoka, Y.: Studies on Egg White Lysozyme as a Preservative of Sake. II. J. Ferment Technol., **49**, 693(1971)

10. Yajima, M., Hidaka, Y., and Matsuoka, Y.: Studies on Egg White Lysozyme as a Preservative of Sake. J. Ferment Technol., **46**, 782(1968)

11. 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)

12. Yashima, M., Hidaka, Y., Ota, R., Hara, K., and Matsuoka, Y.: Japanese Patent, 1972-7359(1972)

13. 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. Yashitake, 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.: Determination of Adenosine Triphosphate and its Degradation Products in Fish Muscle by High Pressure Liquid Chromatography. Torrey Research Station. Sandwich Student Report.

18. 보건사회부: 식품공전, 제 4. 식품별 기준 및 규격, p.329(1988)

19. 김영걸·성낙규·정덕화·강인수: 쌀막걸리의 미생물학적인 연구, 제 4 보: 담금중 핵산분해계의 성질 및 핵산관련 물질의 변화, 한국식품과학회지, **15**, 245(1983)