

청주 제조 중 Ethyl Caproate 생성에 미치는 청주효모 Esterases의 영향

이 종 훈*

경기대학교 식품생물공학과

Effect of Esterases from Rice Wine Yeast on the Ethyl Caproate Production during Rice Wine Brewing. Lee, Jong-Hoon*. Department of Foods and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea - Ethyl caproate is one of the important flavor compounds produced during the brewing of rice wine. The rice wine yeast and koji were reported to produce the esterases which synthesize and also hydrolyze ethyl caproate. From the results of monitoring the esterase activities of rice wine yeast and koji, their roles for producing ethyl caproate during brewing were postulated. In case of rice wine yeast, the production of esterase synthesizing ethyl caproate was influenced by the substrate, caproate but that of esterase hydrolyzing ethyl caproate was promoted by ethyl caproate but inhibited by caproate. The production of esterases of koji were not influenced by the substrates for ethyl caproate production but influenced by the growth of koji. The maximum concentration of ethyl caproate produced by rice wine yeast was 0.4 ppm in this research but the production of ethyl caproate by koji was not detected under our experimental conditions. Considering the results of this research, ethyl caproate is not produced by the esterases of koji during brewing but produced by the esterases of rice wine yeast. The growth of rice wine yeast represses that of koji because of the high concentration of ethanol produced by rice wine yeast. The esterases of rice wine yeast may decide the production of ethyl caproate during brewing.

Key words: esterase, ethyl caproate, rice wine, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*

청주가 지닌 향기는 청주의 품질을 결정하는 주요 요인 중의 하나이다. 청주의 향기는 발효과정 중 주로 효모에 의해서 발생하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 바람직한 향기성분을 생성하는 효모를 탐색 또는 개발하려는 노력들이 많이 진행되고 있고, 돌연변이법에 의해서 향기성분 생산이 증가된 효모들이 얻어졌다[1-4, 10].

청주의 향기성분으로는 여러 가지가 알려져 있고 ethyl caproate는 그 중 한 성분으로 alcohol acyltransferase와 esterase에 의해서 생성되는 것으로 보고되었다[5]. Alcohol acyltransferase는 ethanol과 caproyl CoA를 기질로 하여 ethyl caproate를 생성하는 것으로 밝혀졌고 esterase는 ethanol과 caproate로부터 ethyl caproate를 생성하는 것으로 보고되었다[6-8]. 청주효모는 여러 종류의 esterase들을 가지고 있는 것으로 보고되고 있고, 이들 esterase 중에는 ethyl caproate의 생성과 분해에 관련하는 esterase가 각각 존재하는 것으로 보고되었다[5, 6, 8]. 한편 ethyl caproate의 생성과 분해에 관여하고 있는 esterase들은 코지균도 가지고 있는 것으로 보고되었다[5, 7-9].

본 연구에서는 청주 제조 중 발생하는 ethyl caproate의 생성에 미치는 청주효모와 코지균이 가지고 있는 est-

erase들의 영향을 알아보기 위하여 코지균과 청주효모의 성장 중 발생하는 ethyl caproate 합성과 분해에 관련하고 있는 esterase들의 배양 중 변화에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

청주효모와 코지균은 Institute for Fermentation Osaka(일본)에서 구입한 *Saccharomyces cerevisiae* Kyo-kai No. 9와 *Aspergillus oryzae* IFO 30102를 사용하였다. 두 균주의 보존에는 YEPD 한천배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose, 1.6% agar)를 사용하였고 배양에는 YEPD 액체배지를 사용하였다.

청주효모의 배양 및 성장 측정

1 L의 YEPD 액체배지 또는 첨가물을 첨가한 YEPD 액체배지가 들어 있는 5 L 용량의 삼각플라스크에 전배양한 효모 균체를 1% 접종하고 25°C에서 진탕배양(20 rpm)하였다. 5시간마다 배양액 40 ml를 취해 균체를 회수하여 멸균 증류수로 2회 세척한 후 적당한 농도로 희석하여 균체의 성장을 측정하고 esterase 활성 측정에 사용하였다.

코지균의 배양 및 성장 측정

1 L의 YEPD 액체배지 또는 첨가물을 첨가한 YEPD

*Corresponding author

Tel. 82-331-249-9656, Fax. 82-331-253-1165
E-mail: jhl@kuic.kyonggi.ac.kr

액체배지가 들어 있는 5 L 용량의 삼각플라스크에 약 10^4 의 코지균의 포자를 접종하고 25°C에서 진탕배양(100 rpm)하였다. 균체의 생장은 1일 단위로 배양액 10 ml를 취해 균체를 회수하고 filter paper(Toyo #4A, Japan)를 사용하여 수분을 제거한 후 건조하여 균체량의 변화를 측정하였다.

청주효모의 esterase 활성 측정

Ethyl caproate 관련 esterase의 활성 측정은 Kuriyama 등의 방법[6]을 응용하여 측정하였다. 균체가 가지고 있는 활성의 측정은 배양액으로부터 균체를 회수하여 멸균 증류수로 2회 세척한 후 활성 측정에 사용하였다.

Ethyl caproate 합성 esterase의 활성 측정 반응은 5 ml의 0.1 M acetate buffer(pH 5)에 균체와 함께 기질인 sodium caproate와 ethanol의 농도가 20 mM과 3%가 되게 첨가하여 27°C에서 1시간 반응시킨 후, silicon rubber stopper로 밀봉할 수 있는 20 ml 용량의 sample vial에 반응액과 내부표준액으로 *n*-butanol을 첨가하여 밀봉하고 60°C에서 10분간 열처리하여 증결시켰다. 반응액으로부터 생성되는 ethyl caproate의 양을 head space gas chromatography에 의하여 측정하고 내부표준액의 농도와 비교하여 활성으로 환산하였다. 27°C에서 1시간 반응하여 1 ppm의 ethyl caproate를 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

Ethyl caproate 분해 esterase의 활성은 0.1 mM의 농도로 ethyl caproate를 포함하는 5 ml의 1/15 M phosphate buffer(pH 7)에 균체를 현탁하여 27°C에서 1시간 반응시킨 후 silicon rubber stopper로 밀봉할 수 있는 20 ml 용량의 sample vial에 반응액과 내부표준액으로 *n*-butanol을 첨가하여 밀봉하고 60°C에서 10분간 가열하여 반응을 증결시켜 합성활성 측정방법과 같은 head space chromatography에 의해서 측정하였다. 분해활성의 경우, 1 unit는 27°C에서 1시간 반응하여 생성하는 1 ppm의 ethanol량으로 결정하였다.

코지균의 esterase 활성 측정

Ethyl caproate의 합성과 분해 esterase 활성 측정방법은 청주효모의 경우와 동일한 방법을 사용하였지만 반응에 필요한 효소액은 배양액을 membrane filter(0.45 μ m cellulose acetate filter)로 여과한 것을 100 μ l 사용하였고 반응액의 전체량은 1.5 ml로 줄여서 반응시켰다[8, 9].

생성 ethyl caproate의 정량

균체의 생장과 더불어 생성된 ethyl caproate는 silicon rubber stopper로 밀봉할 수 있는 20 ml 용량의 sample vial에 청주효모 또는 코지균의 배양액 5 ml와 내부표준액으로 *n*-butanol을 첨가하여 밀봉하고 gas ch-

romatography로 분석하였다[9].

Gas chromatography

가열하여 반응을 정지시킨 후, 시료가 들어 있는 20 ml의 vial을 55°C에서 30분 가열하여 증발시킨 향기성분을 headspace sampler(Perkin Elmer)를 사용하여 gas chromatograph(GC)에 주입하였다. GC는 FID 검출기가 장착된 Shimadzu GC-17A(Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 컬럼은 30 m \times 0.25 mm i.d. DB-Wax column (d_f =0.25 μ , bonded carbowax 20-M, J&W Scientific, Inc.)을 사용하였다. 헬륨가스를 carrier gas로 유속 2 ml/min(40:1 split vent ratio)에서 사용하였고, 컬럼의 온도는 처음 2분간은 80°C를 유지시키고 150°C까지 5°C/min로 상승시켰다. Injector와 detector의 온도는 250°C로 유지시켰다.

결 과

청주효모의 esterase가 ethyl caproate 생성에 미치는 영향

청주효모에 의한 발효과정 중 ethyl caproate의 생성과 분해에 관련된 esterase의 활성에 미치는 기질의 영향을 알아보기에 앞서 ethyl caproate 생합성의 기질이 되는 caproic acid와 ethanol이 효모균체의 성장에 미치는 영향을 알아보았다. 효모의 생육은 YEPD배지 중의 glucose 양의 증가에 따라 증가했으나 5% 농도까지의 ethanol 첨가는 효모의 성장에 크게 영향을 미치지 못했다. 반면 caproic acid의 대응으로 첨가한 sodium caproate는 생육을 저해하는 것으로 나타났고 1 mg/ml 농도의 첨가는 생육을 반으로 감소시켰다(Fig. 1, A).

각 배지에서 자란 효모세포의 세포(wet cell)당 ethyl caproate 합성 esterase 활성은 YEPD배지에서 자란 세포와 큰 차이를 나타내지 않았지만 1 mg/ml의 sodium caproate가 첨가된 YEPD배지에서 자란 효모의 세포당 활성은 2배로 증가하였다. 이러한 합성활성의 증가는 ethyl caproate 합성의 기질이 되는 sodium caproate의 증가에 따른 효소 활성의 증가로 생각된다(Fig. 1, C).

YEPD배지에서 배양한 효모의 ethyl caproate 분해 esterase 활성은 접종 후 15시간 이후에 급격히 증가하여 25시간에서 최대 활성을 보인 후 서서히 감소하였다. 이러한 현상은 ethyl caproate의 분해활성이 균체의 생장과 더불어 ethyl caproate가 생성된 후에 유도되기 때문이라고 생각된다. 또한 sodium caproate와 glucose농도의 증가가 활성에 현저한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 0.1 mg/ml 농도의 sodium caproate의 첨가는 분해 활성을 YEPD에서 자란 세포의 1.5배 정도 증가시켰지만 1 mg/ml 농도의 첨가는 1/70 수준으로 활성을 감

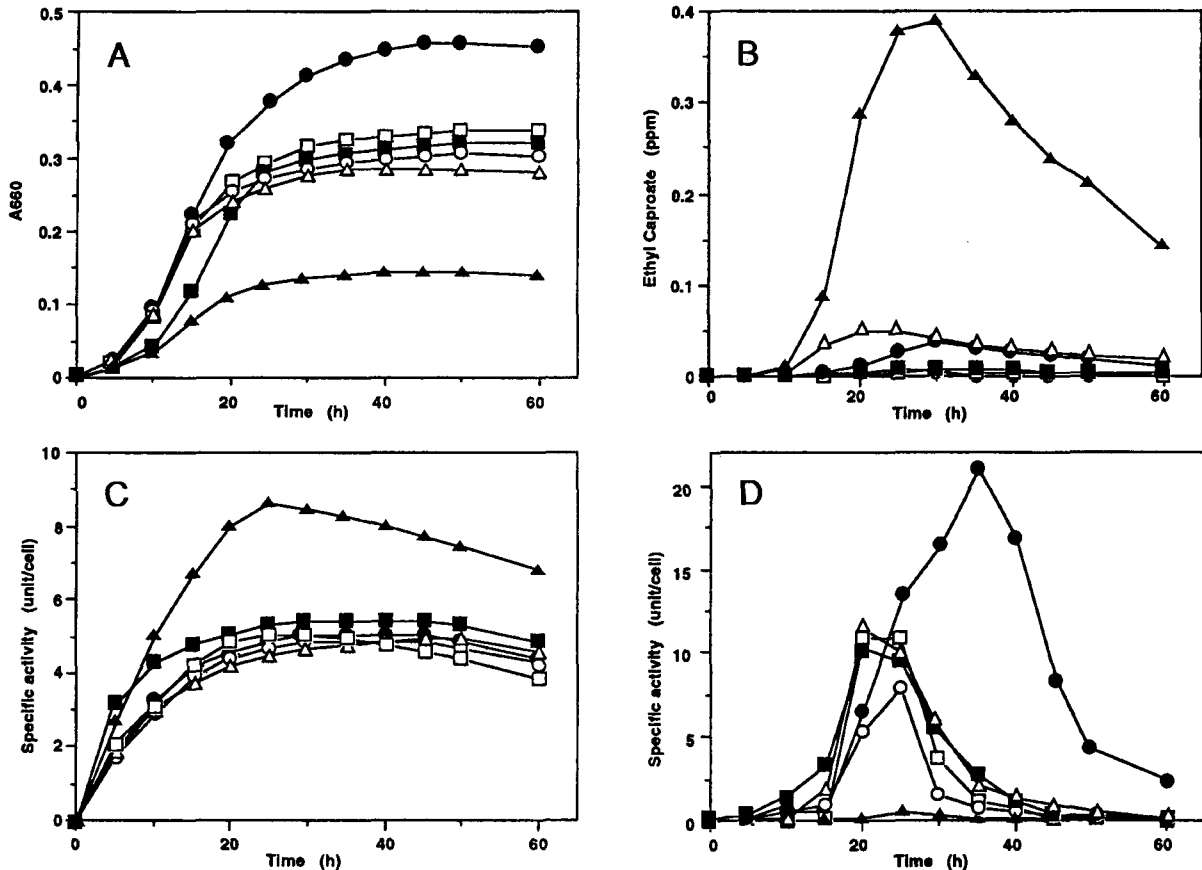


Fig. 1. Effects of substrates on the growth, ethyl caproate production, and activities of esterases during the culture of *S. cerevisiae*. A, growth; B, ethyl caproate production; C, activity of esterase(synthesis); D, activity of esterase(hydrolysis). ○, YEPD; ●, YEP +5% glucose; △, YEPD +0.1 mg/ml sodium caproate; ▲, YEPD +1 mg/ml sodium caproate; □, YEPD +1% EtOH; ■, YEPD +5% EtOH.

소시켰다. 고농도의 sodium caproate를 첨가한 배지에서 자란 세포가 낮은 분해활성을 나타내는 것은 caproate가 분해활성을 억제하는 것으로 추측된다. Ethanol의 첨가에 의해서 분해활성이 약간 증가되었지만 농도에 의한 영향은 크게 나타나지 않았다. 0.1 mg/ml 농도의 sodium caproate의 첨가와 ethanol을 첨가한 경우에 분해활성이 약간 증가하고 최고치에 도달하는 시간이 빨라지는 현상은 ethyl caproate의 합성에 필요한 기질이 먼저 공급되어 있었기 때문으로 추측된다. Glucose농도를 5%로 증가시킨 배지에서 자란 효모의 분해활성은 3배로 증가하였다. 이러한 결과는 glucose로부터 생성된 ethyl caproate의 양이 증가되었기 때문으로 생각된다(Fig. 1, D).

배지 중의 ethyl caproate의 양은 ethanol의 농도에는 거의 영향을 받지 않았고 sodium caproate가 충분히 존재할 때 가장 많이 생성되었다(Fig. 1, B).

지금까지의 ethyl caproate의 생성과 분해에 관한 결과를 종합하면, 청주효모가 가지고 있는 ethyl caproate 합성 esterase는 caproate에 의해서 유도되고, 분해 est-

erase는 ethyl caproate에 의해서 유도되는 것으로 나타났다지만 ethanol에 의한 영향은 없는 것으로 보인다. 또한 분해활성은 caproate에 의해서 저해되는 것으로 나타났다. 따라서 최종적으로 ethyl caproate의 생산은 효모의 생육이 저해되지 않는 범위 내에서 caproate의 농도에 의해서 결정되는 것으로 추정된다.

코지균의 esterase가 ethyl caproate 생성에 미치는 영향

코지균의 성장은 저농도의 sodium caproate와 ethanol의 첨가에 의해서는 약간 증가하였으나 고농도(sodium caproate: 1 mg/ml, ethanol: 5%)의 첨가는 생육 저해를 초래했고 glucose 농도의 증가에 따라 증가했다(Fig. 2, A).

*A. oryzae*는 많은 종류의 효소를 세포 밖으로 분비하는 것으로 알려져 있기 때문에 코지균의 esterase 활성 측정에는 균체를 사용하지 않고 배양액을 조효소액으로 사용하였고, 균체의 성장이 크게 저해받는 경우 균체에 대한 비활성으로 나타내는데는 어려움이 있어 반응에 첨가한 조

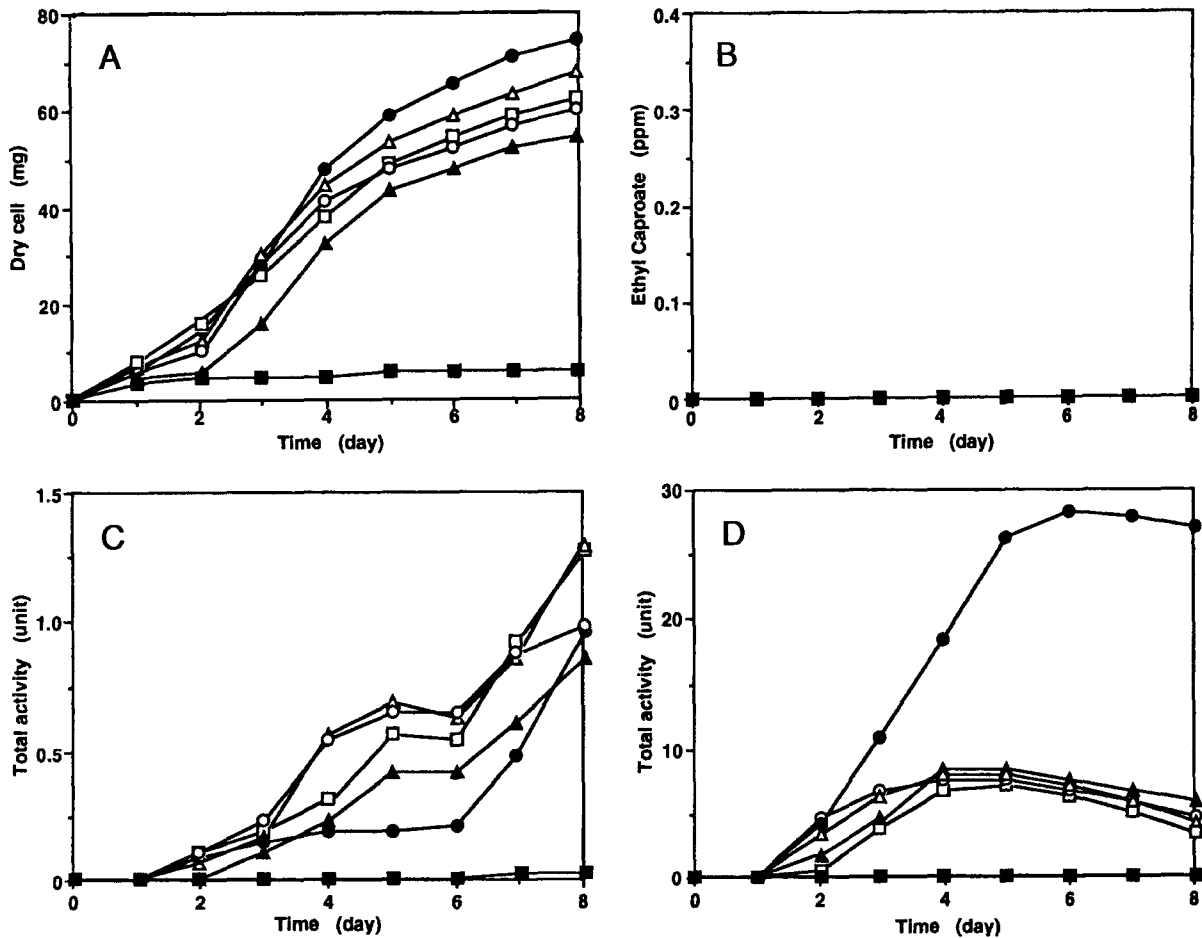


Fig. 2. Effects of substrates on the growth, ethyl caproate production, and activities of esterases during the culture of *A. oryzae*. A, growth; B, ethyl caproate production; C, activity of esterase (synthesis); D, activity of esterase (hydrolysis). ○, YEPD; ●, YEP +5% glucose; △, YEPD +0.1 mg/ml sodium caproate; ▲, YEPD +1 mg/ml sodium caproate; □, YEPD +1% EtOH; ■, YEPD +5% EtOH.

효소액이 가지고 있는 활성을 총활성으로 나타내었다. 코지균의 ethyl caproate 합성 esterase 활성은 성장에 비례하여 증가하였으나 ethyl caproate 생성의 기질이 되는 sodium caproate와 ethanol의 첨가는 청주효모의 경우와는 달리 합성활성에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 2, C).

코지균의 배양액이 가지고 있는 ethyl caproate 분해 활성은 sodium caproate나 ethanol의 첨가에 의해서 증가되지 않았지만 glucose 농도의 증가에 의해서 증가하였다. YEPD배지에서 코지균을 4, 5일 배양한 경우, 분해 활성이 최고치를 기록한 후 서서히 감소되었는데 이러한 경향은 5% ethanol 첨가로 균체의 성장이 억제되는 경우를 제외하고는 거의 비슷하게 나타났다. 이러한 현상은 glucose농도의 증가에 의해 균체의 증식과 더불어 분해 활성을 가진 esterase의 생산을 유도할 수 있는 물질이 많이 생산되었기 때문이라고 추측된다(Fig. 2, D).

5% Ethanol의 첨가는 균체의 성장을 억제하여 합성활

성과 분해활성을 모두 측정할 수 없었다(Fig. 2).

코지균의 배양액에서 ethyl caproate 합성 esterase의 활성이 측정됨에도 불구하고 0.01 ppm까지 ethyl caproate를 검출할 수 있는 분석조건 하에서 배지 중의 ethyl caproate는 측정되지 않았다(Fig. 2, B).

지금까지의 결과를 종합하면 코지균은 ethyl caproate의 생성과 분해 활성을 가지고 있는 esterase를 생산하고 있으나 이들 효소가 직접적으로 ethyl caproate의 생성에는 관련되지 않은 것으로 추정된다. 코지균이 가지고 있는 esterase들이 ethyl caproate합성과 분해 활성을 나타내는 것은 넓은 기질특이성을 가지고 있기 때문이라고 추정되고, 합성효소의 경우 청주효모의 합성효소와는 달리 caproate에 의해서 유도되지 않는 것으로 생각된다.

고 찰

코지균을 배양한 배지에서 ethyl caproate가 0.01

ppm 검출 수준에서 생성되지 않았지만 청주효모와 마찬가지로 ethyl caproate 합성과 분해 활성은 나타났다. 반면 5% glucose가 포함된 배지에서 자란 청주효모는 0.4 ppm의 ethyl caproate를 생성했다. 이러한 결과는 청주 제조시의 코지균의 역할은 ethyl caproate의 생성에는 크게 기여하지 못하고 효모가 자라는데 필요한 glucose를 만드는 것이라고 제안한 Kuriyama 등의 결과[5, 7, 8]와 일치한다.

이 실험의 결과를 고려한다면 청주의 제조과정 중 생성되는 ethyl caproate는 코지균의 esterase에 의해서는 거의 생성되지 않고 당화과정 후 첨가되는 청주효모가 주로 생성하는 것으로 확인되었다. 또한 청주효모의 증식과정 중에는 효모의 성장과 더불어 ethanol이 생성되어 코지균의 성장을 억제한다. 따라서 청주제조 중 생성되는 ethyl caproate는 청주효모에 의해 생성되는 것으로 사료된다.

요 약

청주가 가지고 있는 향기는 청주의 품질을 결정하는 요인 중의 하나이다. 청주의 향기는 발효과정 중 주로 효모에 의해서 발생하는 것으로 알려지고 있고, ethyl caproate는 향기성분 중의 하나로 esterase가 생성에 관여하고 있는 효소의 하나로 보고되었다. 반면 청주 제조에 사용되는 청주효모와 코지균은 ethyl caproate의 생성과 분해 활성을 가진 esterase를 생산하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 청주 제조 중 발생하는 ethyl caproate의 생성에 미치는 청주효모와 코지균이 가지고 있는 esterase들의 영향을 알아보기 위하여 코지균과 청주효모의 성장 중 발생하는 ethyl caproate 합성과 분해에 관련하고 있는 esterase들의 활성 변화에 대하여 알아보았다. 청주효모가 가지고 있는 ethyl caproate 합성 esterase는 caproate에 의해서 유도되고, 분해 esterase는 ethyl caproate에 의해서 유도되지만 caproate에 의해서 저해되는 것으로 나타났다. 코지균의 ethyl caproate 합성과 분해 esterase 활성은 균체의 성장에 비례하여 증가하였으나 ethyl caproate 생성의 기질이 되는 caproate와 ethanol이 활성에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 또한 코지균의 배양액에서 ethyl caproate 합성 esterase의 활성이 측정됨에도 불구하고 0.01 ppm까지 ethyl caproate를 검출할 수 있는 분석조건 하에서 배지 중의 ethyl caproate는 검출되지 않았다. 본 실험의 결과를 고려한다면 청주의 제조과정 중 생성되는 ethyl caproate는 코지균의 esterase에 의해서는 거의 생성되지 않고 당화과정 후 첨가되는 청주효모가 주로 생성하는 것으로 확인되었다. 또한 청주효모의 증식과정

중에는 효모의 성장과 더불어 ethanol이 생성되어 코지균의 성장을 억제한다. 따라서 청주제조 중 생성되는 ethyl caproate는 청주효모의 esterase에 의해 생산된 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 경기대학교 교내 학술연구비지원에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ashida, S., E. Ichikawa, K. Suginami, and S. Imayasu. 1987. Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2061-2065.
2. Fukuda, K., M. Watanabe, K. Asano, H. Ueda, and S. Ohta. 1990. Breeding of brewing yeast producing a large amount of β -phenylethyl alcohol and β -phenylethyl acetate. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 269-271.
3. Fukuda, K., M. Watanabe, K. Asano, and S. Ohta. 1990. Mutants of yeast *Saccharomyces cerevisiae* producing large amounts of the flavor components isobutyl alcohol and isoamyl alcohol. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2445-2446.
4. Ichikawa, E., N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami, and S. Imayasu. 1991. Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2153-2154.
5. Kuriyama, K. 1989. Enzymatic studies of sake brewing. *Hakkokogaku* **67**: 105-117. (in Japanese)
6. Kuriyama, K., S. Ashida, Y. Saito, K. Suginami, and S. Imayasu. 1986. Ethyl caproate synthesis and hydrolysis activity of sake yeast. *Hakkokogaku* **64**: 175-180. (in Japanese)
7. Kuriyama, K., S. Ashida, Y. Saito, Y. Hata, K. Suginami, and S. Imayasu. 1986. Ethyl caproate synthesis and hydrolysis activity of koji. *Hakkokogaku* **64**: 247-251. (in Japanese)
8. Kuriyama, K., S. Ashida, Y. Saito, Y. Hata, K. Suginami, and S. Imayasu. 1986. The role of yeast and koji in the formation of ethyl caproate in moromi. *Hakkokogaku* **64**: 253-259. (in Japanese)
9. Lee, J.-H., T. Sato, Y. Kawai, and H. Enei. 1995. Purification and properties of extracellular esterases of *Aspergillus oryzae* which synthesize ethyl caproate. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 274-279.
10. Yanagiuchi, T., Y. Kiyokawa, and Y. Wakai. 1989. Isolation of sake-yeast strains accumulating large amounts of isoamyl acetate. *Hakkokogaku* **67**: 159-165. (in Japanese)

(Received October 19, 1997)