

# *Dothiorella ribis* 가 생산하는 응유효소에 관한 연구

## 제 1 보 응유효소의 생산

유주현 · 김유삼 · 홍윤명\* · 아리마 케이\*\*

연세대학교 이공대학 식품공학과 · \*화공과 · \*\*동경대학 농학부 농예화학과  
(1971년 6월 22일 수리)

## Studies on Milk-clotting Enzyme of *Dothiorella ribis*

### Part I. The Production of Milk-clotting Enzyme

by

Ju Hyun Yu, Yu Sam Kim, Yun Myung Hong\* and Kei Arima\*\*

Department of Food Engineering, College of Science and Engineering, Yonsei University

(Received June 22, 1971)

#### Abstract

Microorganisms producing milk-clotting enzyme were isolated from 1,506 strains which were collected from soil on the various places of Korea, and from strains which were already identified. *Dothiorella ribis* was taken as a good strain producing milk-clotting enzyme. When it is cultured on wheat bran, the optimum experimental conditions for the production of milk-clotting enzyme were consequently obtained as follows:

- 1) 30~35°C of temperature and 4.0 of pH.
- 2) 60~80% of cultivating water to the weight of wheat bran.
- 3) addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as a nitrogen source, NaCl and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as an inorganic salt, and 3% of sucrose as a carbon source.
- 4) four days for a period of cultivation.

#### 서 언

치이즈를 제조하는 데는 우유(혹은 양유, 염소유, 나무, 순록유 등)를 응고시켜야하며 이를 위하여 생후3~5주되는 송아지의 제 4 위(胃)에서 추출되는 송아지 rennet 라는 효소가 이용되어 왔다. 그러나 이와같은 효소를 얻기위하여는 송아지를 죽여야한다는 점이있고 물론 송아지가 효소추출을 위하여 사용되는 것이 일반적이거나 송아지 일지라도 육우로 사육하는 것이 더욱 합리적이라는 사실과 또 세계적으로 치즈의 생산량이 증가되고 있어 이러한 송아지 rennet 가 아닌 대용응유효소의 필요성이 요청되어 왔다.

최근 20 여년동안 동물, 식물 및 미생물학자들에 의하여 이러한 대용응유효소의 개발이 활발히 진행되어 왔고 동물성 대용응유효소로는 hog pepsin, <sup>(1-5)</sup> chymotrypsin, <sup>(6)</sup> trypsin<sup>(7)</sup> 등이 있으며 식물성효소로는 *Ficus carica* 의 유즙중에 있는 ficin, <sup>(8-13)</sup> *Withania coagulans* 의 열매 추출액, <sup>(14)</sup> *Carica papaya* 의 papain <sup>(14)</sup>, *Cynara cardunculus* 의 꽃, *Strebulus asper*, <sup>(11)</sup> *Pumpkin*<sup>(2-3)</sup> 등의 식물로부터 얻은 것이 보고된바 있고 미생물분야에서는 *Aspergillus oryzae*, <sup>(15-18)</sup> *Bacillus subtilis*, <sup>(15-18)</sup> *Basidiomycetes*, <sup>(20-21)</sup> *Endothia paracitica* <sup>(19)</sup>, *Mucor rouxii*, <sup>(17)</sup> *Mucor pusillus*, <sup>(18)</sup> *Rhizopus candidus*, <sup>(18)</sup> *Serratia marcescens*, <sup>(18)</sup> *Streptomyces*

\* Department of Chemical Engineering, Yonsei University

\*\* Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University

*albus*<sup>(18)</sup> 등 수 많은 미생물들이 생산하는 대용응유효소가 제시되었다.

그러나 이러한 효소들이 갖추어야 되는 기본적인 조건은 송아지 rennet 에 비하여 curd 의 수율 및 제조, 숙성된 치즈의 맛과 냄새 등의 점에서 같거나 우수해야 된다는 사실이다.

이러한 점에 비추어 현재까지 제시된 많은 대용응유효소들 중 동물성응유효소인 hog pepsin 과 *Mucor pusillus* 라고하는 미생물이 생산하는 *Mucor rennet* 를 제외하고는 대부분이 실용화되지 못하고 연구단계에서 그쳤거나 송아지 rennet 와 소량을 혼용하는 예에 그치고 말았다.

본 연구에서는 보다 우수한 대용응유효소를 생산하는 미생물을 분리할 목적으로 전국 각지의 토양에서 미생물을 분리하고 이와같이 토양에서 분리한 미생물 및 교실 보존 미생물 중에서 응유효소 생산균을 검색한 결과 아직까지 응유효소 생산균으로 알려지지 않은 *Dothiorella ribis* 를 선정하고 이 균에서 생산되는 효소의 성질 및 치즈제조에 사용여부를 검토하기 위한 다량배양목적으로 밀기울에 배양할 때 응유효소 생산 조건을 검토하여 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 실험방법

### 토양미생물의 분리

토양으로부터 미생물을 분리하는데 배지 A [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.16%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.08%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.08%, Sucrose 0.83%, Glucose 0.83%, Rice bran extract 8.3%, pH 5.0]와 배지 B [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.16%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.08%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.08%, Sucrose 0.83%, Glucose 0.83%, Engroulis japonicus extract 8.3%, pH 7.0]를 사용하여 30°C 에서 배양하여 48~72 시간 사이에 나타나는 colony 를 취하였다.

### 응유효소 생산균의 1차분리

70%의 수분을 첨가시킨 밀기울 1g의 배지에 토양에서 분리한 균 및 보존균을 접종하여 30°C에서 72시간 배양후 3ml의 수도물로 실온에서 3시간 추출한다. 추출된 액을 직경 7mm 되는 여과지의 원판에 흡착시킨 후 점점접시에 놓고 0.01 M  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가한 생우유 0.5ml를 가하여 우유가 응고하는 시간을 관찰하는 유(柳)의 방법<sup>(20)</sup>에 준하여 분리하였다.

### 응유효소 생산균의 2차분리

일단 1차분리에서 단 시간에 우유를 응고시킬 수 있었

던 균들만 70%의 수분을 첨가한 5g의 밀기울배지에 접종하여 30°C에서 72시간 배양한 후 수도물 20ml를 가하여 3시간 추출된 추출액을 Soxhlet unit 법<sup>(21)</sup>에 의하여 응유활성을 측정하였다.

### *Dothiorella ribis*의 기본배양법

80%의 수분을 첨가시킨 밀기울 5g의 배지를 1.5  $\text{kg}/\text{cm}^2$ 의 압력에서 30분간 살균시킨 후 종균을 접종하고 35°C의 배양기에서 4일간 배양하였다.

### 효소의 추출 및 응유활성측정

*Dothiorella ribis*가 배양된 밀기울에 수도물 20ml를 가하고 실온에서 3시간 추출하여 Toyo filter paper No. 2로 자연여과 시킨액을 Soxhlet unit 법에 의하여 응유활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균분리

전국 각지에서 채집한 토양 800점으로부터 배지 A에 의해서 분리된 균은 총 461주였으며 이들 중 응유효소 생산균의 1차 분리법에 의해서 30분 내에 우유를 응고시킬 수 있었던 것이 9주였고, 배지 B에 의해서 분리된 균은 총 1,045주로서 이들 중에는 30분 내에 우유를 응고시킬 수 있었던 균이 11주였다.

교실보존균과 이들 1차분리에서 우수균주로 선정된 미생물들을 Soxhlet unit 법으로 2차분리하여 본 결과 교실보존균중의 *Dothiorella ribis*가 비교적 우수한 응유효소 생산균임을 알수 있었다.

### *Dothiorella ribis* 배양에 관한 산수량의 영향

밀기울의 기본배지에 수도물을 50%에서 110%까지 산수시켜 35°C에서 96시간 배양하여 수도물로 추출한 효소액의 응유활성은 Fig. 1과 같으며 밀기울에 대한 산수량은 60~80%가 적절함을 알수 있었다.

### *Dothiorella ribis* 배양에 관한 산수 pH의 영향

밀기울의 기본배지에 대한 산수량 80%를 수도물을 가하지 않고 McIlvaine buffer를 사용하여 산수의 pH를 2~7까지 다르게 가하였다. 그 결과 산수의 pH 4.0정도이었을 때 *Dothiorella ribis*의 생육이 왕성하였고 추출된 효소액의 응유활성이 높다는 것을 알수 있었다.

### *Dothiorella ribis* 배양에 관한 질소원의 영향

기본배지에 대하여 0.5%되도록 질소원으로 사용한

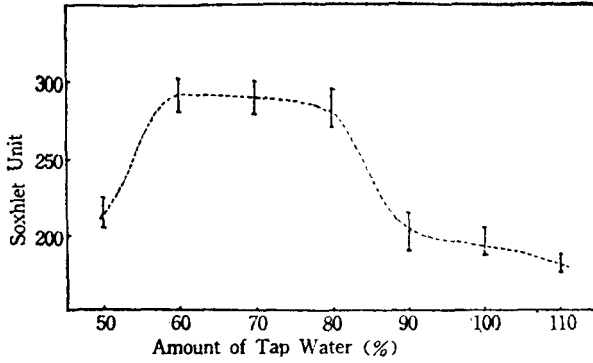


Fig. 1. Effect of Amount of Tap Water added to Wheat Bran on Production of Milk-clotting Enzyme

Incubation temperature; 35°C, Incubation time; 96 hrs.

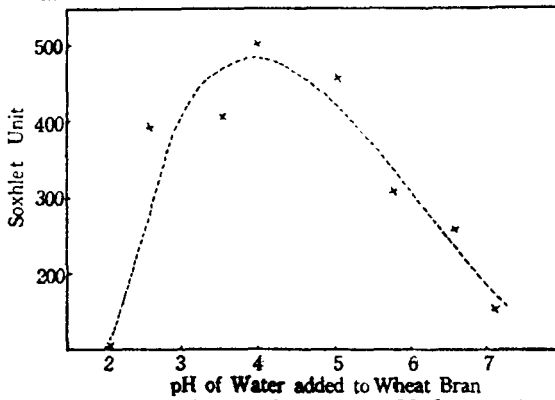


Fig. 2. Effect of pH of Water added to Wheat Bran on Production of Milk-clotting Enzyme

Incubation temperature; 35°C, Incubation time; 96 hrs.

Table 1. Effect of Nitrogen Source on Production of Milk-clotting Enzyme

Incubation temperature: 35°C  
Incubation time: 96 hrs.

Nitrogen source	Milk-clotting activity(%)
Control	100
NH <sub>4</sub> Cl	142
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CS	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	113
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	161
NaNO <sub>2</sub>	103
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	157
Urea	126
Polypeptone	141
KNO <sub>3</sub>	146

각 물질을 산수에 용해시켜 가해 본 결과 몇 가지 질소원들 대부분이 약간의 용유효소생산을 증가시킬 수 있었으며 그들 중 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 가 가장 효과적이었다. 그러나 (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CS 를 가했을 때는 *Dothiorella ribis* 가 생육할 수 없었으며 물론 용유효소생산도 없었다. 이것으로서는 생육에 질소원이 될수있다는 사실보다 생육저해물질임을 알수있었다.

*Dothiorella ribis* 배양에 관한 탄소원의 영향

탄소원으로는 sucrose, glucose, lactose, soluble starch, glycerine 등을 선정하며 배지에 대하여 첨가량이 3% 되도록하고 35°C 에서 96 시간 배양한 결과 이들 모두가 용유효소생산을 증가시켰으며 특히 sucrose 의 경우 탄소원을 별도로 가하지 않았을 때보다 1.5 배 이상의 효과를 나타낸다는 것을 알수 있었다.

Table 2. Effect of Carbon Source on Production of Milk-clotting Enzyme

Incubation temperature: 35°C  
Incubation time: 96 hrs.

Carbon source	Milk-clotting activity(%)
Control	100
Sucrose	157
Glucose	129
Lactose	136
Soluble starch	110
Glycerine	110

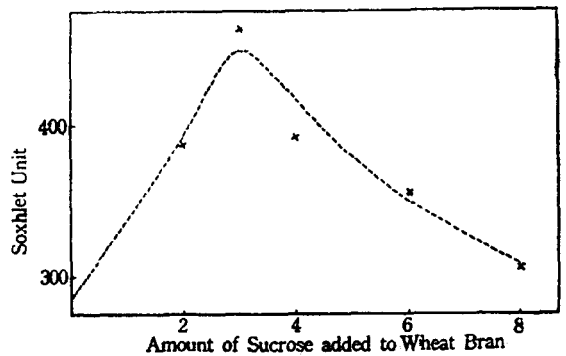


Fig. 3. Effect of Amount of Sucrose added to Wheat Bran on Production of Milk-clotting Enzyme

Incubation temperature; 35°C  
Incubation time; 96 hrs.

그래서 sucrose 의 농도에 관한 영향을 조사할 목적으로 기본배지에 대하여 sucrose 첨가량이 2~8% 되도록 조정하여 본 결과 Fig. 3과 같이 sucrose 의 농도는 3% 정도가 이상적이었고 그 이상 가하면 오히려 응유효소의 생산량이 감소되었는데 이것은 sucrose 의 농도가 커짐으로 인한 삼투압의 증가 또는 호기성 조건의 저해 등의 원인에 의한 것으로 예측된다.

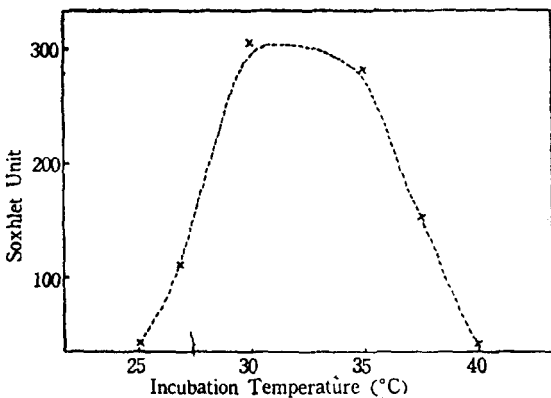
**Dothiorella ribis 배양에 관한 무기염의 영향**

각 종 무기염을 배지에 대하여 0.03% 되도록 가한 결과 사용된 염들 중  $KH_2PO_4$ , NaCl, 등이 응유효소 생산을 비교적 많이 증가시킴을 알수있었다.

**Table 3. Effect of Inorganic Salts on Production of Milk-clotting Enzyme**

Incubation temperature: 35°C  
Incubation time: 96 hrs.

Inorganic salts	Milk-clotting activity(%)
Control	100
$MgSO_4$	129.5
KCl	134
$KH_2PO_4$	137
NaCl	142
$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	109
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	121



**Fig. 4. Effect of Incubation Temperature on Production of Milk-clotting Enzyme**

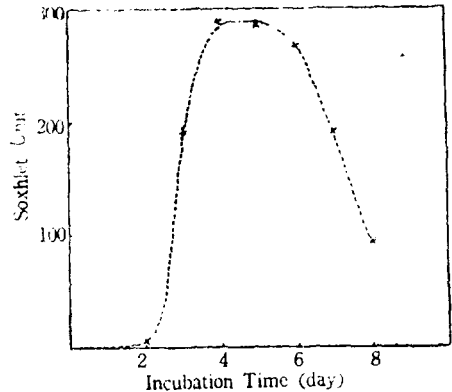
Incubation time; 96 hrs.

**Dothiorella ribis 배양에 관한 온도의 영향**

Fig. 4와 같이 배양온도는 96 시간 배양에 있어서 30~35°C가 적당함을 알수 있었다.

**Dothiorella ribis 의 적정배양기간**

배양기간은 Fig. 5에서와 같이 4일 정도가 이상적이었고 그이상 배양기간이 길면 추출액의 응유활성이 감소되었는데 이것은 일단 생성된 응유효소가 높은 온도에서 오랫동안 보존되므로서 활성이 감퇴된 것으로 예측하고



**Fig. 5. Time Course of Incubation on Production of Milk-clotting Enzyme**

Incubation temperature; 35°C

4일간 배양하여 추출한 효소액에 방부제로 미량의 formaline 을 가하여 4°C, 34°C 및 실내에 방치해두고 응유활성의 변화를 측정해본 결과 Table 4와 같이 4°C에서는 5일동안에 응유활성의 변화가 없었는데 34°C에서는 응유활성이 거의 모두 소실되는 것을 알수있었다.

**Table 4. Storage Stability of Milk-clotting Enzyme of Dothiorella ribis**

Storage period (day)	Residual clotting activity(%)		
	at 4°C	at room temp.	at 34°C
1	100	73.5	30.6
2	100	60.4	15.0
3	100	49.2	9.2
5	100	34.5	<<1

\* Storage as liquid state

**요 약**

전국 각지의 토양 800 점에서 총 1,506 주의 균을 분리하였고 이들중에서 응유효소 생산균으로 20 주의 균을 선정하였으며 교실보존 균들 중의 응유효소 생산균을 선정하여 응유효소 생산력을 비교하였으며 이들중 보존균

중의 *Dothiorella ribis* 가 비교적 우수한 응유효소생산 균임을 알고 이것을 밀기울에 배양할 때의 배양조건을 검토한 결과 밀기울에 대한 산수량은 60~80% 산수의 pH는 4.0 정도, 질소원으로는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%, 탄소원으로는 sucrose 3% 정도, 무기염으로는 0.03%, 배양온도는 30~35°C, 배양기간은 4 일정도가 적당함을 알수 있었고 보다 장기간 배양하면 생성된 응유효소의 활성이 감퇴됨을 알수 있었다.

#### 참 고 문 헌

1. Veringe, H. A.: *Dairy Sci. Abstr.*, **23**, 187 (1961).
2. Sherwood, I. R. I.: *J. Dairy Res.*, **6**, 407 (1935).
3. Melachoiris, N. P. and Tuche, S. L.: *J. Dairy Sci.*, **47**, 1 (1964).
4. Maragoidakis, M. E., et al.: *J. Dairy Sci.*, **44**, 2339 (1961).
5. Tsugo, T., Yamauchi, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **25**, 96 (1960).
6. Knight, S. G.: *Can. J. Microbiol.*, **12**, 420 (1966).
7. Yu, J., and Arima, K.: *J. Korea Assoc. Food Sci.*, **2**(1), 21 (1970).
8. Krishnaswamy, M. A. et al.: *Food Technol.*, **15**, 482 (1961).
9. Whitaker, J. R.: *Food Technol.*, **13**, 86 (1959).
10. Robbins, B. H. and Lamson, P. D.: *J. Biol. Chem.*, **106**, 725 (1964).
11. Whitaker, J. R.: *Food Res.*, **23**, 364 (1958).
12. *ibid.*, **23**, 371 (1958).
13. Kramer, D. E. and Whitaker, J. R.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2170 (1964).
14. Winden, H. and Kasikowsky, F. V.: *J. Dairy Sci.*, **39**, 917 (1956).
15. Tsugo, T. and Yamauchi, K.: *XVth Intern. Dairy Congr. Proc.*, **2**, 634 (1959).
16. *ibid.*, **2**, 636 (1959).
17. Velsolow, I. Y., Tipigraf P. Y. and Pentica T. A.: *Prik. Biochem. Microbiol.*, **1**, 52 (1965).
18. Arima, K., Iwasaki S. and Tamura, G.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 540 (1967).
19. Sardines, J. L.: *Appl. Microbiol.* **2**(16), 248 (1968).
20. Kawi, M. and Mukai, N.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 159 (1970).
21. *ibid.*, **34**, 164 (1970).
22. Iwasaki, S., Yu, J., Tamura, G. and Arima, K.: *7th Intern. Congr. Biochem.*, Tokyo, Japan, August 19-25, IV 758 (1967).
23. Iwasaki, S., Yu, J., Tamura, G. and Arima, K.: *3rd Intern. Fermentation Symposium*, U. S. A., Sept. 2-6 (1968).
24. Iwasaki, S., Tamura, G. and Arima, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 546 (1967).
25. Iwasaki, S., Yasui T., Tamura G. and Arima, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1421 (1967).
26. 柳洲鉉: 博士學位論文集(東京大學) (1968).