



치즈製造를 위한 生産 rennet 微生物

〈上〉柳 洲 鉉
 (延世大 食品工學科長)
 有 馬 啓
 (東京大 教授)

치즈製造에 必要한 Calf-rennet(rennet은 다른 不純物이 包含되어 있으나, 結晶化된 純粹한 酵素를 rennin이라 한다)은 송아지의 第4胃, 그것도 生後 1~2週間되고 젖을 마시고 있는 숫송아지의 第4胃에서만 採集할 수 있으나, 송아지가 풀을 먹기始作할 때는 胃中の rennet은 없어지면서 Pepsin 등을 分泌하게 됨으로 치즈製造에 使用할 수 없게 된다 그리고 암송아지는 牛乳를 生産하기 爲하여 飼育한다.

最近 世界的인 소고기不足으로 숫송아지도 1年以上飼育하고 있는 실정임으로 rennet의 資源이 減少되고 있다. 美國에서 1945~1972年間に 숫송아지의 屠殺數는 年間 1,200萬頭로 부터 400萬頭로 減少되고, 全世界에서는 이의 約 3倍程度의 屠殺數이다. 다시 말하면 15年間に 年間 3000~4,000萬頭 屠殺되었던것이 4分1之로 減少되고 있다고 할 수 있다.

한편 치즈生産量은 世界的으로 急增하여, 過去 20年間に 約 2倍로 되고, 現在는 年間 約 400萬톤 生産되고 있다. 따라서 송아지의

第4胃 Vell은 不足함으로 calf-rennet의 價格暴騰에 고민하고 있다.

calf-rennet 供給不足에 對備하여 約 10여年前부터 世界의 研究者들에 依하여 calf-rennet 代用酵素를 植物體, 動物體, 微生物에서 얻으려는 많은 研究가 되어 왔다¹⁻¹⁷.

calf-rennet의 代用酵素가 되려면 다음의 여러條件을 具備하여야만 한다.

i) rennet은 Protease이고, 이 Proteolytic action이 凝乳作用을 나타낸다. 但 단백질 分解 活性이 凝乳活性보다 強하면 Peptonization 이 일어나 치즈用 凝乳酵素로서 使用할 수 없다. 따라서 凝乳作用이 強하고, 蛋白質分解作用이 弱한 Protease의 性質이 必要하다.

ii) Curd의 收率이 Calf-rennet와 같어야 한다.

iii) 만들어진 Curd가 Calf-rennet curd와 같이 物理的으로 같은 性質이어야 한다.

iv) Whey部分으로 脂肪의 流出이 적어야 한다.

v) 苦味를 生成치 않고, 맛이 좋아야 한다.

그外 人間에 無害하여야 한다.

植物性 凝乳酵素로써 Ficin, Papain, Witheringia coagulans의 Protease等 여러 種類가 있으나, 이들의 酵素는 위의 條件의 全體 또는 一部를 滿足시킬수 없었으므로, 치즈製造에 不適當하며, rennet代用酵素를 求하려는 研究에 成功하지 못하고 있다.

著者等은 10年前부터, 本研究에 着手하여, *Mucor pusillus*가 生産하는 凝乳酵素 Mucor rennet의 製造에 成功하였고, 現在 世界 여러 나라에서 치즈生産에 利用되고 있다^{5,8,23,36)}

第 I 編 *Mucor Pusillus*의 凝乳酵素 Mucon-rennin의 製造 및 그의 一般 性質

1. 分離菌 *Mucor Pusillus*의 同定 및 酵 素, 製造

a. 凝乳酵素生産菌의 分離⁵⁾

菌分離는 東京大學 醱酵學教室의 Culture collection 및 自然界로 부터 分離한菌 約 1000 株에 對하여 檢討하였다(Table 1).

Table 1 Screening에 使用한 菌株

Bacteria	Total	450		
<i>Staphylococcus</i>		197	<i>Aerobacter</i>	10
<i>Erwinia</i>		2	<i>Brevibacterium</i>	2
<i>Serratia</i>		12	<i>Pseudomonas</i>	25
<i>Sarcina</i>		3	<i>Corynebacterium</i>	3
<i>Bacillus</i>		27	<i>Xanthomonas</i>	1
<i>Vibrio</i>		2	Isolated strains	154
<i>Micrococcus</i>		12		
Streptomyces	Total	98		
Molds	Total	279	<i>Mottierella</i>	2
<i>Absidia</i>		17	<i>Penicillium</i>	16
<i>Aspergillus</i>		19	<i>Paecilomyces</i>	1
<i>Actinomucor</i>		1	<i>Phycomyces</i>	1
<i>Blakeslea</i>		1	<i>Pullularia</i>	1
<i>Chaetomium</i>		22	<i>Rhizopus</i>	42
<i>Circinella</i>		7	<i>Scopulariopsis</i>	1
<i>Clacosporium</i>		1	<i>Syncephalastrm</i>	1
<i>Cunninghamella</i>		4	<i>Zygorhynchus</i>	2
<i>Helicostylum</i>		2	Plant Pathogenic Molds	68
<i>Mucor</i>		30	Isolated strains	23
<i>Monascus</i>		17		

凝乳活性(Milk clotting activity을 M.C.A 로 略한다)의 測定은 菌의 培養液 0.5ml을 10% 脫脂牛乳(0.01M CaCl₂ 包含) 4.5ml 에 加하여, Curd fragment가 나타나는 時間(milk clotting time)을 測定함으로써 1時間以內에 凝乳하는 菌을 Table 2~4에 表示하였다.

Bacteria 中에는 강한 M.C.A. 를 나타내는

것은 없었다(Table 2). Streptomyces屬中에는 강한 M.A.C. 를 나타내는 菌株는 있으나 이屬의 菌은 강한 Protease를 生産하는 것이 알려져 있고 時間이 經過되면 Peptonization 이 일어나 치즈製造에 不適合하였다(Table 3).

곰팡이 中에는 30分以內에 M.C.A를 나타내

Table 2 分離된 凝乳酵素生産 Bacteria

Bacteria	Strain No.	pH of broth	Clotting time(min.)
<i>Serratia marcescens</i>	B-181-4	6.2	30
	B-181-5	6.4	30
	B-181-6	6.0	30
	B-181-7	6.6	30
	B-181-8	6.2	30
	B-181-9	6.4	30
	B-181-10	6.6	60
	B-182-1	5.6	30
	B-183-1	6.4	30
	<i>Bacillus subtilis</i>	B-201-4	6.6
B-201-6		6.4	60
<i>Bacillus cereus</i>	B-204-1	6.0	20
	B-204-2	6.2	60
	B-204-3	6.0	65
	B-204-6	5.8	60
	B-204-8	5.8	60
<i>Corynebacterium hoagi</i>	B-271-3	6.0	60
<i>Bacillus sphericus</i>	B-205-8	6.6	60
<i>Bacillus firmis</i>	B-206-6	6.2	60
<i>Pseudomonas schuylikilensis</i>	B-4-1	7.2	60
	B-4-2	7.0	60

Table 3 分離된 凝乳酵素生産 Streptomyces

Streptomyces	Strain No.	pH of broth	Clotting time(min.)
<i>Streptomyces albus</i>	ATCC 618	5.6	30
<i>Streptomyces ehimensis</i>	138 IFO	6.2	5
<i>Streptomyces griseochromogenus</i>	2A 327	5.0	15
<i>Streptomyces hachijoens</i>	H 2552	7.6	1
<i>Streptomyces rimosus</i>	B 2234	4.8	3
<i>Streptomyces rubescens</i>	Z-5-2	7.4	15
<i>Streptomyces</i> sp.	54-5	5.6	25
<i>Streptomyces</i>	93	5.2	25
<i>Streptomyces</i>	212	5.4	5
<i>Streptomyces</i>	666	4.2	50
<i>Streptomyces</i>	1279	4.8	5
<i>Streptomyces</i>	1488	5.4	2S
<i>Streptomyces</i>	1620	5.8	5
<i>Streptomyces</i>	1628	6.4	4

Table 4

分離된 凝乳酵素生産 곰팡이

Molds	Strain No.	Clotting time (min.)
<i>Absidia lichtheimi</i>	IAM 6183	60
<i>Ascochyta viciae</i>	IAM A-12	10
<i>Chaetomium brasillieuse</i>	IAM 8017	60
<i>Colletotrichum atramentarium</i>	IAM C-49	20
<i>Colletotrichum lindenruthianum</i>	IAM C-53	40
<i>Monascus anka</i>	IAM 8001	10
<i>Mucor spinescens</i>	ATU Mu-3	60
<i>Mucor mandshuricus</i>	ATU Mu-5	60
<i>Rhizopus achlamyosporus</i>	ATU 1-8	30
<i>Rhizopus batatae</i> strain H	ATU 4-3	5
<i>Rhizopus batatae</i> strain T	ATU 4-4	10
<i>Rhizopus candidus</i>	ATU 3-2	5
<i>Rhizopus chinensis</i> var. <i>liquefaciens</i> strain T	IAM 8901	40
<i>Rhizopus chinensis</i>	ATU 4-5	15
<i>Rhizopus chinniary</i>	ATU 4-7	40
<i>Rhizopus chungkuoensis</i> var. <i>isofermentarius</i>	IAM 4601	30
<i>Rhizopus chungkuensis</i>	ATU 4-6	10
<i>Rhizopus delemar</i> var. <i>minimus</i> strain T	IAM 7301	25
<i>Rhizopus delemar</i>	ATU 3-5	10
<i>Rhizopus japonicus</i>	ATU 5-1	60
<i>Rhizopus nigricans</i>	ATU 5-4	40
<i>Rhizopus nigricans</i>	ATU 7-7	50
<i>Rhizopus nigricans</i>	NRRL 45	40
<i>Rhizopus niveus</i>	ATU 2-1	20
<i>Rhizopus nodosus</i>	ATU 2-2	25
<i>Rhizopus oryzae</i>	ATU 5-7	60
<i>Rhizopus peka</i> II	ATU 5-9	10
<i>Rhizopus pseudokinensis</i>	ATU 2-3	40
<i>Rhizopus salebrosus</i>	ATU 2-6	30
<i>Rhizopus thermosus</i>	ATU 2-7	25
<i>Rhizopus</i> sp. strain 2-Usami	ATU 6-6	10
<i>Rhizopus</i> sp. strain 3-tonkinensis	ATU 6-7	60
<i>Rhizopus</i> sp. strain 4-septata	ATU 6-8	60
<i>Rhizopus</i> sp. strain G-36 Yamazaki	ATU 3-8	15
<i>Rhizopus</i> sp. strain M ₁	ATU 7-1	30
<i>Sclerotium oryzae-sativa</i>	IAM S-3	30
Isolated strain	No. F-27	5
Isolated strain	No. 116-1	20

는 菌株가 많았고 *Rhizopus* 18株, Plant Pathogenes 2株, 土壤分離菌 2株이었다(Table 4). 이들中 *Rhizopus*는 M.C.A가 强하나 Protease活性이 强하여 Peptonization이 일어

나 不適當하다. 이와 反對로 흡으로부터 分離된 F-27菌株는 M.C.A가 强하고 Protease活性이 매우 弱한 特徵을 갖고 있었다. 그러므로 F-27菌株만을 追求하였다.

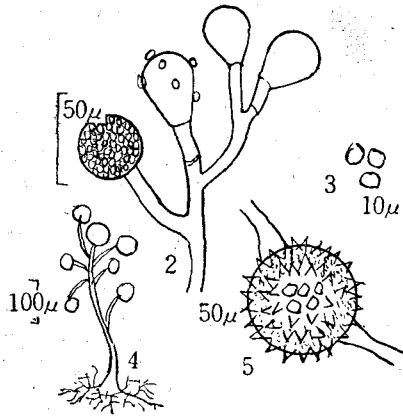


Fig1 *Mucor pusillus*.

Fig. 2. Apical portion of a sporangiophore bearing a mature sporangium; to the right are three columellae of dehiscent sporangia. Fig. 3. Sporangiospores. Fig. 4. Sporangiophore which has developed directly from a single spore. Fig. 5. Mature zygospore.

b. 分離菌의 同定

여러種類의 實驗結果, F-27株가 凝乳酵素로써 適當한 菌株임을 알고 이 菌株을 Zycha 分類法에 依하여 *Mucor Pusillus* Lindt로 同定하였다⁵⁸⁹⁾.

그 分類의 Key는 다음과 같다.

- i) 孢子囊柄의 길이, 直徑, 分枝의 有無
- ii) 孢子囊壁의 性質
- iii) 接合孢子의 有無
- iv) Colony의 特徵, 色調와 氣菌糸

이 分離菌은 Koji 汁培地에서 처음 白色이 되고 後에 灰色의 Colony를 形成한다. 孢子囊柄은 直徑 5~20μ, 孢子낭을 形成과 더불어 分枝하여 灰色이다. 大體의으로 孢子囊壁은 先端附近이 觀察된다. 中軸은 長圓形 연한 茶色이고, 孢子는 球形, 直徑 2.5~4.0μ, 厚膜 孢子는 形成되지 않는다. 15~50°C에서 生育 可能하다.

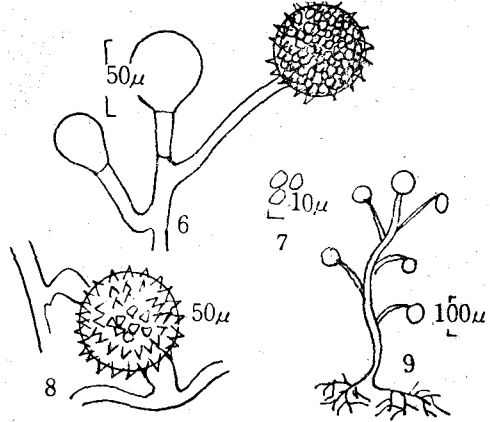


Fig2 *Mucormiehei*.

Fig. 6. Terminal portion of a sporangiophore showing a sporangium and two columellae. Fig. 7. Sporangiospores. Fig. 8. Mature zygospore. Fig. 9. Sporangiophore which has developed from a single spore.

*Mucor Pusillus*의 形態의 特徵은 以上과 같으며, 後에 새로히 分離된 *Mucor miehei*는 이와 거의 같아 事實은 오랫동안 現在 *Mucor miehei*로 記載된 菌은 *Mucor pusillus*에 屬한 species의 菌으로써 同定되어 왔다. Fig에 *Mucor Pusillus*와 *Mucor miehei*의 形態를 圖示하였으나, 相互間에 差가 거의 없다.

c. 酵素生産을 爲한 培養

*Mucor Pusillus*에 依한 凝乳酵素를 生成하기 爲하여 液體培養 및 固體培養의 實驗을 行하였다⁵⁹⁾. 液體培養은 1% 脫脂粉乳, 1% Glucose, 1/200M CaCl₂의 組成培地와 30°C 5~8日間 振盪培養하였다. 固體培養은 밀기를 10g에 물 7ml을 加하여 混合殺菌한 固體培地를 利用하여 30°C에서 2~6日間 培養하였다. 이 結果 固體培養 3日間에 最大活性의 酵素가 生産되고, 使用한 原料當 液體培養에 比하여 約 10倍의 力價를 얻을 수 있었으므로 固體培養에 依하여 酵素를 生産하였다.

Table 5.

F-27 株에 의한 酵素生成

Time of culture (hrs)	44	67	92	116	150
pH of extract	{ 5.5	6.0	6.4	—	—
	{ 5.8	6.0	6.4	—	—
Clotting activity	{ 686	906	738	394	320
ml of extract	{ 540	686	774	432	280
Mean of activity	613	796	750	413	300
Enzyme produced from 1g of wheat bran	6130	7960	7500	4130	3000

2. 酵素活性 測定法

a. Milk clotting activity (MCA로 省略)

MCA는 10% 脫脂粉乳液을 凝乳하는데 要하는 時間으로 換算한다. CaCl_2 0.01M을 包含한 10% (w/v) 脫脂粉乳液 5ml에 酵素液 5ml 加하여, 35°C에 反應시킨다. 이때 牛乳에 酵素를 添加한때 부터 凝乳되어 固體(curd fragment)가 最初로 나타나는 時間을 測定하여 milk clotting time으로 한다. 酵素活性은 milk clotting time과 反比例함으로 다음 式으로 부터 計算된다.

$$U = \frac{S}{E} \times \frac{350}{T} \times \frac{2,400}{t}$$

U; Soxhlet Unit/gr or ml enzyme

S; ml of milk

E; enzyme concentration

(gr or mgr/ml)

t; Milk clotting time

T; assay temperature

Soxhlet Unit²⁴⁾은 35°C에서 1ml의 牛乳를 40분에 凝固시키는 酵素量으로 定義하고 있다. 따라서 위의 條件下에 1分間에 凝乳시키는 酵素量은 400 Soxhlet Unit가 된다.

b. Proteolytic activity

Proteolytic activity는 Anson改良法에 依하여 測定한다. 0.02M Potassium Phosphate buffer에 녹인 0.5~1.5% (w/w) Hammarstein in casein溶液(pH 6.5) 5ml에 酵素液 0.5ml를

加하여 35°C에서 10分間 反應시킨다음 0.44M TCA을 加하여 反應을 停止시킨다. 그後 濾過한다. 濾液 1ml에 1ml의 Folin試藥 2.5ml의 0.55M sodium carbonate를 加하여 35°C에서 20分間發色시켜 O.D. 660nm에서 測定한다.

3. Mucor rennin의 精製

a. 粗酵素의 生産²⁰⁾

本菌은 液體培養에서도 酵素를 生成하나 培地原料當의 酵素生産量은 Koji tray을 利用하는 固體培養法이 더 많이 生成된다. 一般的으로 菌糸에 Septora가 없는 *Phycomycetes*의 菌, 即 *Rhizopus*에 依한 α -amino-glucosidase의 培養에서도 固體培養하는 便이 液體培養하는 것 보다 酵素生産量이 많았다.

本菌의 Mucor-rennin의 生産은 아래와 같이 行한다. 밀기울 2kg을 물 1.4kg과 잘 混合하여, 115°C에서 20分間 殺菌한다음, 冷却시켜 孢子懸濁液을 接種하여 Koji tray上에서 30°C 72時間 培養한다.

培養된 Koji에 물 10l을 加하여 室溫에서 酵素를 抽出 濾過한다. 이 때 6l의 抽出液을 얻을수 있으나 800Unit/ml, 밀기울 1g當 2,400Unit의 酵素液을 얻는다. 이의 抽出液 1l當 3l의 ethanol을 加하여 沈澱物을 얻을수 있고, 이를 遠心分離, 乾燥하여 粗酵素로

使用하였다.

b. 粗酵素의 性質

(i) Proteolytic activity의 比較

同一한 MCA를 갖인 酵素를 Hammerstein casein에 對한 Proteolytic activity을 比較할 때 calf-rennet, Mucor-rennet은 *Aspergillus saitoi*가 生産하는 acid protease에 比하여 比較的 casein加水分解速度가 빨랐다(Fig 2).

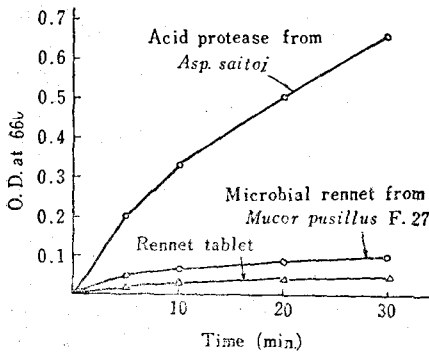


Fig. 2. 3種類의 Acid protease의 Proteolytic activity.

ii) CaCl₂의 MAC에 對한 影響

calf-rennet과 Mucor-rennet은 兩쪽 모두 微

Table 7. 熱 安 定 性

Time of heating at 55°C (min.)	Milk clotting activity (%)		Temperature of heating for 10 min. (°C)	Milk clotting activity (%)	
	Ren ^P et	MR		Rennet	MR
Control	100	100	Control	100	100
5	33	75	45	86	94
10	29	71	55	31	71
20	< 3	68	65	< 5	< 10
30		42			
60		20			

(Table 7).

c. 精製

i) Amberlite CG50

Table 6. Milk clotting activity에 對한 CaCl₂ 濃度의 影響

Ca (mg %)	Milk-clotting activity (%)	
	AR	MR
94.3	45	00
96.7	69	43
99.9	100	100
101.4	126	195
104.2	155	363
106.7	185	423
109.2	210	488
111.8	221	598
114.2	226	763
116.7	361	889

Fresh skimmed milk was used in this experiment.

*Ca (mg %) of original milk.

A.R. : Calf-rennet

M.R. : Mucor-rennet

量의 Ca濃度 增加에 따라 MCA이 急增하나 Mucor-rennin쪽이 더 影響이 크다(Table 6). 不過 5mg%의 CaCl₂ 濃度增加로 MCA는 3倍 20mg%에서는 8倍의 增加를 나타냄으로 Ca⁺⁺의 添加는 치즈生産에 有利한 點이 있다.

iii) 熱安定性

55°C, 加熱處理, 45, 55, 65°C에서 10分間 加熱處理한 結果를 보면, Mucor-rennet쪽이 calf-rennet보다 熱에 對한 安定性이 强하다

牛乳 50,000%을 凝乳할 수 있는 粗酵素 5.2 × 10⁷ units를 물에 녹여 pH 3.5로 調節한 酵素液을 pH 3.5로 緩衝化한 樹脂에 吸着시킨

다음 0.05M Na-Acetate buffer (PH 3.5) 로 색소 및 다른 불순蛋白質을 용출한다. 그 다음에 0.05M Na-acetate buffer (pH 5.0) 로 酵素區分을 용출시켜, 再 chromatogram을 행함으로써, 比活性은 6.2배 上昇하였다 (Fig 3).

ii) DEAE Sephadex A-50

酵素活性區分을 pH 5.0에서 DEAE Sephadex A-50 column에 吸着한後 0.05M Sodium acetate buffer (pH 5.0) 0~0.5M KCl 範圍의 Gradient로 용출한다. 이때 酵素區分은 KCN 濃度 0.3~0.4M 範圍內에서 용출되고, 이 區分에 buffer를 加하여 鹽의 含量을 0.2M以下로 調節한 다음, 새로운 column에 吸着시켜 rechromatography를 行한다. 여기서 分

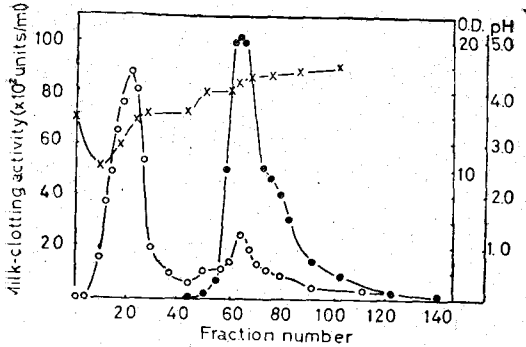


Fig 3. Amberlite CG-50 Column Chromatogram column; 10x60cm, ○—○; Milk clotting activity, ○—○; O.D. 280nm, x—x; pH.

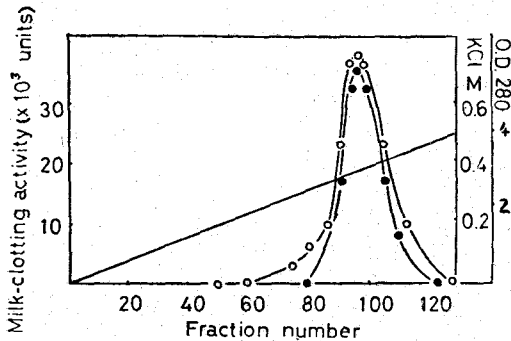


Fig 5. DEAE-Sephadex A-50의 Rechromatogram Column; 4x29cm, ○—○; Milk blotting activity, ○—○; O.D. 280nm —; KCl濃度

離된 酵素는 比活性이 13.2배로 增加되고 收率이 約 50%程度이었다.

iii) Sephadex G 100

DEAE Sephadex A-50의 溶出液에 硫酸을 加하여 70% 飽和液에서 酵素를 沈澱, 分離하

고, 여기에 少量의 0.05M acetate buffer (pH 5:0)를 加하여 溶解시켜, Sephadex G 100으로 Gel濾過를 2번 하여 精製酵素를 얻는다. 比活性은 14.5배 MCA의 最終收率은 38.7%이었다.

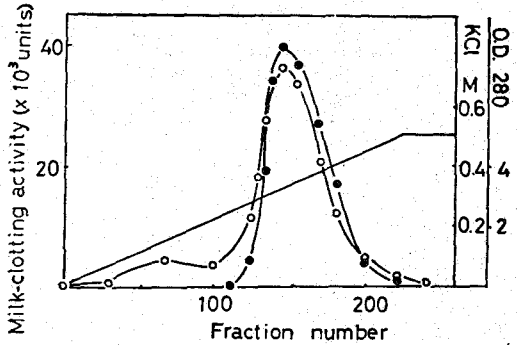


Fig 4. DEAE Sephadex A-50의 Column Chromatogram Column; 6x24mc, ○—○; Milk clotting activity, ○—○; O.D. 280nm —; KCl濃度

고, 여기에 少量의 0.05M acetate buffer (pH 5:0)를 加하여 溶解시켜, Sephadex G 100으로 Gel濾過를 2번 하여 精製酵素를 얻는다. 比活性은 14.5배 MCA의 最終收率은 38.7%이었다.

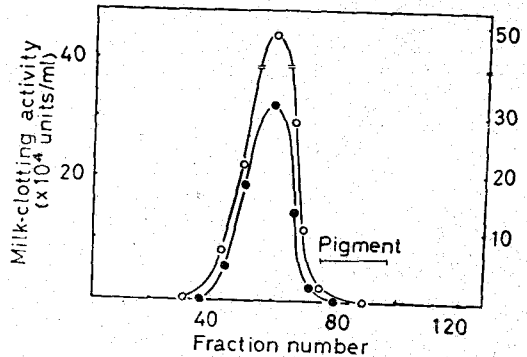


Fig 6. Sephadex G-100의 Column Chromatogram of Mucor rennin on Sephadex G-100 (3 by 8 cm). Milk-clotting activity, ●; OD 280 nm, ○; elution buffer, 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0).

Fig 6. Sephadex G-100의 Column Chromatogram of Mucor rennin on Sephadex G-100 (3 by 8 cm). Milk-clotting activity, ●; OD 280 nm, ○; elution buffer, 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0).

mato gram column; 3×8cm, ○-○;
Milk clotting activity, ○-○; O.D.
280nm

d. *Mucor rennin*의 結晶化

精製된 最終酵素液을 70% 飽和硫安으로 하

여 酵素를 沈澱시키고, 0.1M Na-acetate
buffer (pH 5.0)로 2~3% 酵素蛋白溶液으로
調節한 다음, cellophane tube에 넣어 外液에
硫安을 添加하여 5°C에서 徐徐히 透析한다.

硫安濃度 70% 飽和가 되면서 結晶이 생긴다.

Table. 8 Purification Process of *Mucor Rennin* Crystal

Determination	OD 280nm		Milk Clotting activity		Specific activity	
	OD 280 nm	Yield (%)	×10 ³ Units	Yield (%)	OD 280nm	Ratio of purification
Crude enzyme	113,400	100	52,000	100	460	1.0
Amherlite CG-50	24,000	21.5	51,000	99.3	2,140	4.7
Amherlite CG-50	14,000	12.4	40,240	77.3	2,870	6.2
DHAE-Sephadex-A-50	6,600	5.9	29,667	57.2	4,450	9.1
DHAE-Sephadex A-50 (NH ₄) ₂ SO ₄ saturated 0.7	4,220	3.7	25,480	49.0	6,040	13.2
Sephadex G-100	3,850	3.4	23,320	44.8	6,050	13.3
Sephadex G-100	3,050	3.0	20,310	38.7	6,650	14.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,910	2.6	19,300	37.1	6,670	14.4
<i>Mucor rennin</i> crystal; 2.35g	2,580	2.6	17,200	33.1	6,670	14.5

結晶條件의 差에 따라 寫眞과 같은 여러 形態의 結晶을 單離할 수 있었으나 어느 것이고 比活性은 같았다. 酵素를 精製할 때 比活性의 增加, 收率에 對하여 Table 8에 綜合하였다. 最終縮晶酵素收率은 33% 이었고 結晶酵素 Ig 은 約 700萬 units의 活性을 갖고 있으며²⁵⁾, 約 700,000l 의 牛乳을 原料로 하여 치즈를 만들 수 있다.

4. 結晶 *Mucor-rennin*의 性質

a. 純度

結晶 *Mucor-rennin*의 純度を 알기 爲하여 Tiselius 電氣泳動과 超遠心分析을 行하였다. Tiselius 電氣泳動은 0V, 5mA의 條件下에

서 單一의 對稱 Peak을 나타냈다(Fig 7). 超遠心分析을 55,400rpm 113°C下에서 檢討하였을 때도 單一對稱 Peak을 보였다(Fig 8). 이러한 結果로 부터 單一蛋白質임을 確認하였다(Fig 9).

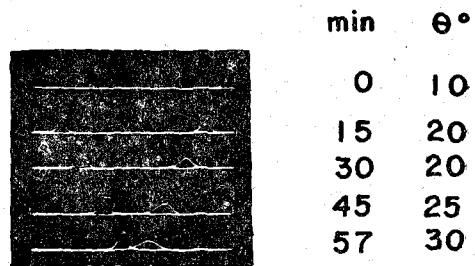


Fig 7. Tiselius 電氣泳動

2% *Mucor rennin* in 1×10⁻⁴M Sodium acetate buffer (pH 5.0) 5mA, 71~90V

Table 9. *Mucor rennin*의 物理的 性質

Property	Value		
	<i>Mucor rennin</i>	Rennin ^a	Prorennin ^a
Frictional coefficient	f/f_0 1.33	0.98 ^b	
Sedimentation coefficient	s_{20w} 2.39×10^{-10}	3.2×10^{-10}	3.5×10^{-10}
Diffusion coefficient	D_{20w}^0 7.9×10^{-7}	4×10^{-10b} 9×10^{-7} 9.5×10^{-7b}	
Partial specific volume	V 0.742	0.794 ^b	
Molecular weight			
Svedberg	29,000	31,000 40,000 ^b	36,200
Yphantis	30,600		
Andrews	32,500		
Amino acid analysis	29,690 30,312 (approx)		
Isoelectric point.	5.5	4.6	

Table 10. *Mucor-rennin*의 Amino acid 組成

Amino acid	Microbial rennin		Rennin ^a	Prorennin ^a
	MW 30,600	Residues	MW 31,100	MW 36,200
Half-cys	3.31	2		
Met	3.17	3	7	7
Asp	43.6	44	31	33
Thr	21.2	21	28	21
Ser	22.1	22	27	31
Glu	19.7	20	29	36
Pro	14.1	14	12	14
Gly	33.5	34	25	29
Ala	16.4	16-17	13	15
Val	23.8	24	21	23
He	11.8	12	15	19
Leu	14.8	15	19	26
Tyr	12.8	13	15	18
Phe	18.9	19	14	14
His	1.42	1-2	4	5
Lys	11.4	11-12	8	13
Arg	4.1	4	7	5
Trp	2.45	2-3		
	277.52	277-281	263	313
NH ₂	1.4.3			

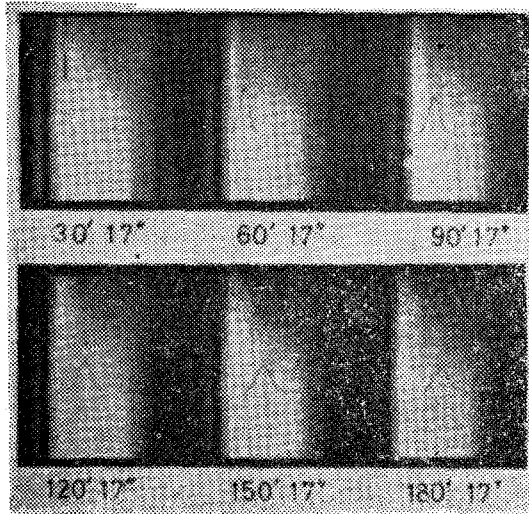
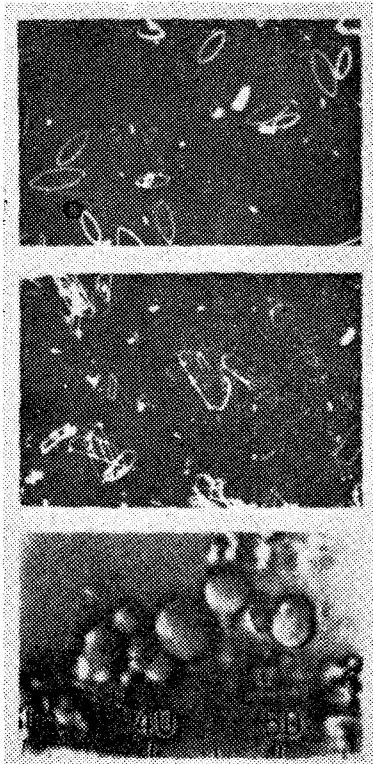


Fig 8. Mucor rennin의 Ultracentrifuge patterns 1.0% Mucor-rennin Solution in 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0), 55,400 rev/min, 11.3°C



Different forms of crystal

b. 物理的性質과 Amino acid 組成

Tiselius 電氣泳動, 超遠心分析, 粘度測定 등의 結果는 V ; 0.74, S_{20w} ; 2.39×10^{-13} (cm sec) (dyne/g), D_{20w} ; 7.9×10^{-7} cm²/sec, f/f

1.33이었다. 分子量은 Svedberg法으로 29,000 Yphantis 法으로 30,600, Andrews 法으로 32,500이 各各 算出되었다. 磨擦比가 1.33임으로 球狀蛋白質이 아니고, 水和性蛋白質로 生覺된다. Andrews法은 球狀蛋白質인 경우에 限하여 適合하므로 Mucor-rennin의 分子量은 $29,000 \pm 800$ 이다 (Table 9). 酵素蛋白質을 30,600으로 하여 Amnio acid 分析值로부터 算出하면 全 amino acid 殘基數는 277~281個로 構成되어 있으며, 其中 histidine이 1~2分子 包含되어 있다 (Table 10). 이들의 物理的 性質과 amino acid組成은 calf-rennin Prorennin과 相互間에 다르다²⁵⁾.

c. 一般性質

i) pH安定性

酵素溶液 1ml을 各 pH의 buffer 9ml 와 混合하여 5°C 24時間 및 7日間 放置後 酵素活性을 測定하였다. Mucor-rennin은 24時間處理時 pH 2.50~10.0範圍內에서 安定하고 7日間處理에서는 pH 2.5~8.0範圍에 安定하였다. pH 8.0 以上에서는 徐徐히 失活하였고 pH 10에서는 40%나 失活되어 活性이 60% 殘存하였다 (Fig 10)^{25,27)}.

ii) 耐熱性

酵素를 Fig 11과 같이 各溫度, pH 3.0 및 pH 6.0에서 處理하여 活性을 測定하였을 때, pH 3.0, 50°C, 60分間處理後에는 거의 失活치 않고 耐熱性이 比較的 强하나, pH 6.0에서는 不安定하다. 이러한 耐熱性的 傾向은 calf rennin과 비슷하나, Mucor-rennin 쪽이 耐熱性이 强하다. 특히 pH 5.0附近에서 强하다^{25,27,34)}

iii) Proteolytic activity에 대한 Milk clotting activity의 比

Mucor-rennin의 Proteolytic activity (PA

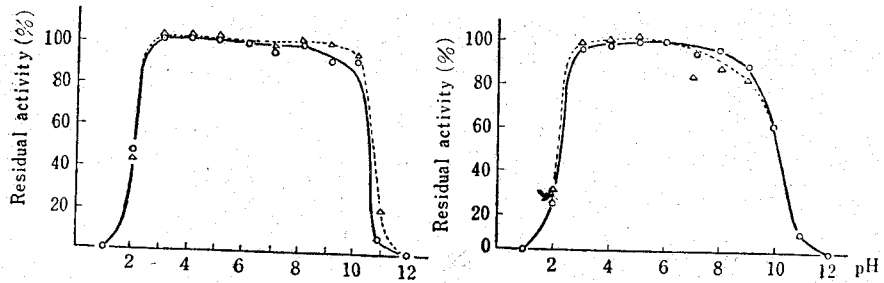


Fig 10. Mucor rennin의 pH 安定性

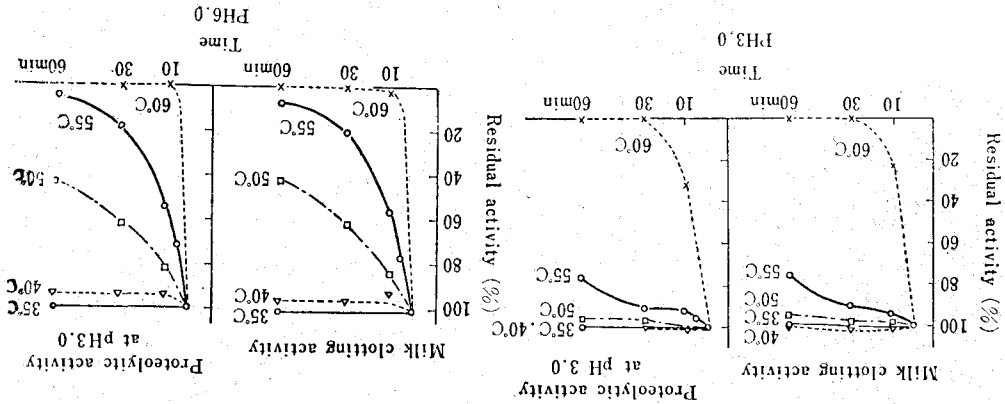


Fig 11. 耐熱性

과 MCA의 비(MCA/PA)을 다른 Protease와 비교하였다. 이 値는 calf-rennin의 代身 치즈製造用으로 使用可能如否를 決定하는 重要한 値이다. calf-rennin은 7350 S.U./O.D660nm, Mucor rennin은 4,650 S.U./O.D660nm이다. 그러나 치즈製造에 利用할 수 없는 Papain,

Trypsin, Molsin, Fisin, Biodiastase 등의 Protease는 400 S.U./O.D660nm 以下이다. 치즈製造用 酵素는 約 5,000 S.U./O.D660nm 以上이야 한다. 또 Mucor rennin은 Ca^{++} 濃度를 各國의 치즈製造法令이 허락하는 範圍內에서 높임으로써 酵素活性이 上昇한다²⁵⁾.

Table 11 Milk clotting activity와 proteolytic activity의 比

Protease	Clotting activity (units/ml)	Proteolytic activity (OD 660nm)	Ratio (units/OD 660nm)
Rennin	293	0.04	7350
Mucor rennin crystal	511	0.11	4650
Pfizer microbial rennin	750	0.29	2590
Papain	216	0.59	367
Trypsin	1.6	0.44	4
Molsin	1.3	0.18	7
Ficin	267	0.68	393
Biodiastase	115	0.83	138

lv) 最適 pH

Mucor rennin의 PA의 最適 pH는 K-casein 基質에 對하여 pH 4.5, hemoglobin 基質에서 pH 4.0, Hamnersten casein基質에 對하여는 pH 3.5이었다(Fig 12). 이들은 calf-rennin과 類似하다²⁸³²). 또 MCA는 牛乳의 pH 7.0 以上인 경우 Clot formation이 매우 늦어지고, pH를 酸性쪽으로 調節할 때, casein의 酸凝固되는 等電點에 가까울수록 빨리 凝乳되

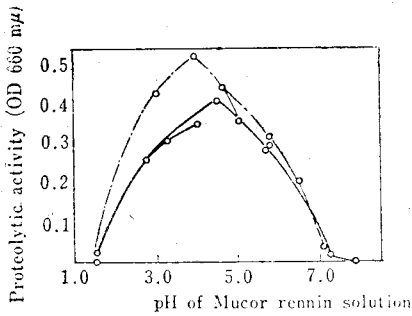


Fig 12. Proteolytic activity와 pH
Buffer solution : M/20. sodiumacetate ●
Macilvaine ○, Substrate : 0.5% hemoglobin
0.5% k-casein— 35°C, 10 min.

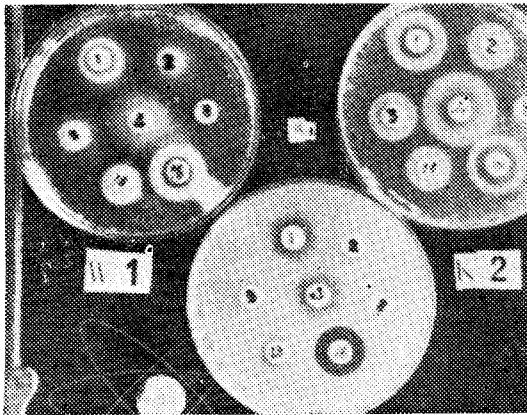


Fig 14. Protease의 casein 寒天 Gel上에서 의 作用
W1; whole casein, K2; K-casein, A1; (α+β) casein 1; Calf rennin, 2; Hansens cheese rennet, 3; Pfizer Microbial rennin, 4; Mucor rennin, 8; Papain, 13; Ficin, 16; Streptomyc Prateare

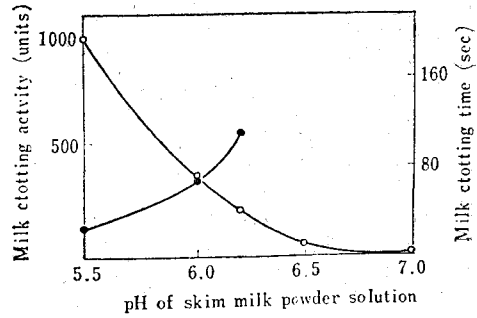


Fig 13. Milk Clotting activity와 pH
Milk clotting activity : ○, Milk clotting time : ●

었다(Fig 13).

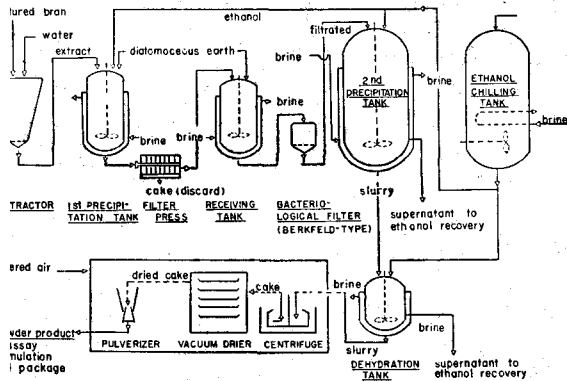
v) Casein寒天 Gel上에서의 作用

Protease를 k-casein 또는 whole(Hammersten) casein寒天 Gel上에서 反應시키면 Fig 14와 같이 白濁 zone이 形成된다. 치즈製造用으로 使用할 수 있는 Calf rennin Hansens 치즈 rennet, Pfizer microbial rennin, Mucor rennin의 protease는 whole casein 寒天 gel上보다 K-casein gel上에 白濁 zone이 신속히 形成된다. 치즈製造用으로 使用할 수 없는 그 外의 protease가 形成하는 zone의 面積은 兩 casein gel上에서 相互間에 多少 差가 있었고, K-casein보다 whole casein gel上에 形成되는 zone 쪽이 넓게 나타내는 protease도 있다. protease를 長時間反應시킴으로써 zone의 面積이 넓어진다. zone이 二重 三重으로 ring을 形成할 때도 있다. Mucor-rennin을 여러濃度로 調製하여 K-casein gel上에 反應時 凝乳活性U의 對數値는 形成된 zone 面積S와 比例함으로 $S = k \ln U + S_0$ 의 式이 成立한다. k는 zone의 形成係數, S_0 는 酵素液을 添加할 때 最初接觸面積을 表示한다. 위의 結果와 같이 mucor rennin은 casein gel上에서도 calf-rennin과 같이 zone을 形成하였다. 이러한 性質을 活用함으로써 치즈

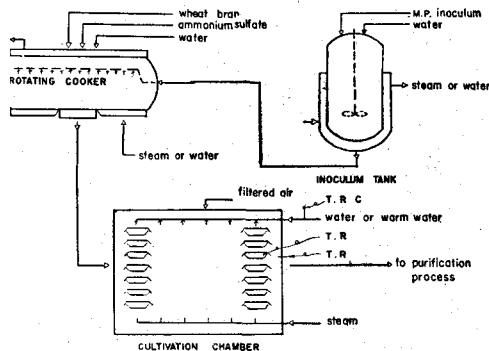
조용 凝乳酵素生産菌의 區別과 凝乳活性測定 可能하다³³⁾.

以上の 모든 結果를 比較時 *Mucor rennini* 蛋白質構造는 *Calf-rennin*과 다르나 化學的 一般性質은 相互間에 類似點이 많다.

FLOW DIAGRAM OF PURIFICATION PROCESS



FLOW DIAGRAM OF FERMENTATION PROCESS



參 考 文 獻

- 1) I.Y. Velselov, P.Y. Tipograf and T.A. Pentia, Prikl. Biokhimiya Mikrobiologiy **1**, 52(1965)
- 2) T. Tsugo and K. Yamauchi, Intern. Dairy Congr. 15th London **2**, 634, 636(1959)
- 3) N.S. Paleva and N.Y. Povova, Ferment. Spirt. Prom. **31**, 6 (1965)
- 4) P.F. Dyachenko and V.V. Slavayanova, Intern. Dairy Congr. 16th. **IV-I**, 349(196)
- 5) K. Arima, S. Iwasaki and G. Tamura, Agr. Biol. Chem. **31**, 540 (1967)
- 6) R.A. Srinivasan *et al.*, Intern. Dairy Congr. 14th. **B 401**, 506 (1962)
- 7) J.L. Shimwell and J.E. Evans, Brit. Pat. 565, 788 (1944)

- 8) I. Emanuilof, Intern. Dairy Congr. 16th **2**, 200 (1956)
- 9) D. Ya. Tipograf *et al.*, Prikl. Biokhim. Mikro-biol. **2**, 45 (1966)
- 10) A.A. Yulius and O. Kh. Tiryakova, Prikl. Bio-khim. Mikrobiol. **2**, 670 (1966)
- 11) Ilie *et al.*, Ann. Meeting Agr. Chem. Soc. Japan, p. 136 (1966)
- 12) Z. Puhan, Intern. Dairy Congr. 17th, D 199 (1966)
- 13) J.G. Wahlen, J. Bacteriol. **16**, 355 (1928)
- 14) K. Morihara, Agr. Chem. Soc. Japan **39**, 514 (1965)
- 15) G.A. Somukuti and F.J. Babel, J. Dairy Sci. **49**, 700 (1966)
- 16) J.L. Sardinas and G. Ferry, U. S. Patent 3275453 (1966)
- 17) S.G. Knight, Can. J. Microbiol. **12**, 420 (1966)
- 18) S. Iwasaki, J. Yu, G. Tamura and K. Arima, Intern. Congr. Biochem. 7th Tokyo, Japan, August, **IV**, 758 (1967)
- 19) S. Iwasaki, J. Yu, G. Tamura and K. Arima, Intern. Terment. Symp. 3rd September (1968)
- 20) S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima, Agr. Biol. Chem. **31**, 546 (1967)
- 21) S. Iwasaki, T. Yasui, G. Tamura and K. Arima, Agr. Biol. Chem. **31**, 1421 (1967)
- 22) T. Tsugo, U. Yoshino, K. Taniguchi, A. Ozawa, Y. Miki, S. Iwasaki and K. Arim, Japan J. Zootech. Sci. **35**, 229 (1964)
- 23) T. Tsugo, K. Taniguchi, U. Yoshino, Ozawa and K. Arima, Japan J. Zootech. Sci. **45**, 229 (1964)
- 24) Soxhlet, Milchzeitung **6**, 495, 513 (1877)
- 25) K. Arima, J. Yu, S. Iwasaki and G. Tamura, Appl. Microbiol. **16**, 1727 (1968)
- 26) J. Yu, G. Tamura and K. Arima, Biochem. Biophys. Acta **171**, 138 (1969)
- 27) J. Yu, S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima, Ann. Meeting Agr. Chem. Soc. Japan p. 203 (1968)
- 28) M.L. Anson, J. Gen. Physiol. **22**, 79 (1938)
- 29) H. Scd ander, P. Zahlend H. Nitscma, Helv. Chem. Acta. **25**, 553 (1952)
- 30) B. Foltmann, Acta Chem. Scand. **13**, 1927 (1959)
- 31) B. Foltmann and S. Hartley, Biochem. J. **101**, 1064 (1967)
- 32) E. Schram, S. Moore and E. J. Bavel, J. Dairy Sci. **49**, 700 (1966)
- 33) J. Yu, G. Tamura and K. Arima, J. Ag. Chem. Soc. Japan, **43** 60 (1969)
- 34) J. Yu, G. Tamura Y. Hong and K. Arim, J. Korean Agr. Chem. Soc. **12**, 7 (1969)
- 35) J. Yu, Y. Kim, Y. Hong and K. Arima, Korean J. Food Sci. Tech, **3**, 89 71
J Yu, Y. Kim, and Y. Hong, Korean J. Food Sci Tech, **3**, 11 (1971)