

응유효소 생산을 위한 *Mucor mucedo* C-7의 배양조건

조재민[†] · 이용수 · 김교창*

충주공업전문대학 식품공업과
*충북대학교 농과대학 식품공학과

The Culture Conditions of *Mucor mucedo* C-7 for Producing the Milk-Clotting Enzyme

Chae-Min Cho[†], Ung-Soo Lee and Kyo-Chang Kim*

Dept. of Food Technology, National Chung-Ju Technical College, Jung-Won Gun 383-870, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chung-Buk National University, Cheang-Ju 363-763, Korea

Abstract

Mucor mucedo C-7 selected as a potent fungus for producing milk-clotting enzyme was cultured on wheat bran solid medium and the optimum culture conditions for the production of milk clotting enzyme were obtained as follows. Amount of water added to wheat bran was 100% to the weight of wheat bran and culture temperature and time was 30° C and 72hrs, respectively. The production of milk-clotting enzyme was markedly increased by the addition of MacIlvaine buffer solution (pH4.5) instead of water added to wheat bran solid medium and milk-clotting activity was stable for culture period.

Key words : *Mucor mucedo*, milk-clotting enzyme

서 론

치즈 제조에 필요한 응유효소를 calf rennet 이라 하며 이는 생후 4~5주된 송아지의 제 4위에서만 추출 생산된다. 최근 치즈 생산과 그 소비량의 증가에 따라 calf rennet은 그 수요를 충족시키기에 부족한 실정으로 이와 유사한 성질을 가진 우수한 대용 응유효소의 개발이 요구된다. 따라서 세계 여러 나라에서 대용 응유효소의 개발을 위해 동물¹⁻³⁾, 식물⁴⁻⁶⁾ 및 미생물⁷⁻¹⁰⁾ 등에서 생산한 응유효소에 대하여 많은 연구가 진행되었으며 특히 미생물이 생산하는 응유효소의 개발과 이들 응유효소 생산균주로 부터 값싸게 대량으로 효과적인

응유효소 생산을 얻기위해 배양조건에 따른 많은 연구가 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 본 연구에서는 효소 생산을 위해 밀기울 고체배지를 이용한 연구 보고^{15,16)}에 따라 토양으로 부터 분리한 강력한 응유효소 생산균인 *Mucor mucedo* C-7을 밀기울 고체배지에 배양하였을때 보다 효율적인 응유효소 생산을 얻기위해 배양시간, 배양온도, 배지의 pH 등 배양조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균 주

조 등¹⁷⁾의 보고에서 분리 동정한 *Mucor mucedo* C-7을 감자포도당 한천 사면배지에 1 백금이 접종하여

[†]To whom all correspondence should be addressed

4°C에 보존된 것을 사용전 30°C에서 72시간 배양하여 나타난 포자를 사용하였다.

기본배지

300ml들이 삼각 후라스크에 밀기울 5g과 증류수 5ml를 첨가하여 잘 혼합한 다음 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하였다.

포자 현탁액의 조제

포자 현탁액의 조제는 Somkuti와 Babel¹⁴⁾의 방법에 따라 선정된 균주를 세번 계대 배양하여 생산된 포자를 밀기울 기본배지에 1 백금이 접종한 후 30°C에서 72시간 배양하고 여기에 멸균 증류수 50ml를 첨가하여 진탕한 후 멸균 탈지면으로 여과하였다. 얻어진 여액을 5000 ×g에서 10분간 원심 분리한 후 침전된 포자에 멸균 증류수를 첨가하여 접종포자 현탁액으로 사용하였다.

배양

300ml들이 삼각후라스크에 밀기울 5g과 일정량의 증류수를 첨가하여 잘 혼합한 것을 121°C에서 20분간 멸균한 후 포자현탁액 100μl (1 × 10⁹/ml)를 접종하여 소정의 온도에서 일정시간 동안 배양하였다.

조효소액의 조제

Arima 등¹⁶⁾의 방법에 따라 배양후 기본배지에 대하여 10 배량의 증류수와 방부제로서 toluene 1ml를 가한후 실온에서 2시간 진탕 교반시키고 5°C에서 12시간 정지한 다음 5000 ×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 여지 (Toyo No. 2)로 여과하고 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

응유활성 측정

조 등¹⁷⁾의 방법에 따라 시험관에 기질액 5ml를 주입하고 이를 35°C에서 10분간 보온한 다음 여기에 조효소액 0.5ml를 가하여 미리 35°C로 조정된 항온조에 넣어 우유액이 시험관 내면벽에 유 응고 입자가 출현하기 시작할 때까지의 시간을 응고 시간으로 하고 이를 soxhlet unit (이하 S.U로 약함)로 나타내었다

단백질 분해 활성의 측정

단백질 분해활성의 측정은 조 등¹⁷⁾의 방법에 따라

0.6% - Hammarsten casein 용액을 기질로 하여 이 기질용액 5ml에 조효소액 1ml를 첨가하고 35°C에서 10분간 반응 시킨후 즉시 0.44M TCA용액 5ml를 첨가하여 이를 다시 35°C에서 20분간 보온한후 동양여지 No. 2로 여과하였다. 여액 2ml에 0.55M Na₂CO₃ 5ml와 Folin시액 (3배 희석액) 1ml를 첨가하여 35°C에서 20분간 발색시킨후 660nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 분해활성의 값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

배지의 첨수량

밀기울 고체배지의 경우 효소 생산은 배지의 수분함량에 따라 크게 영향을 받으므로 첨수량에 따른 milk clotting activity (이하 MCA로 약함)와의 관계를 검토하여 보았다. 밀기울 고체배지에 첨수량을 달리하여 30°C에서 48시간 배양한 후 조효소액을 추출하여 응유활성을 측정한 결과 Fig. 1과 같았다.

응유효소 생산은 첨수량이 90~110% 일때 효과적이었으며 특히 첨수량이 100%인 경우 MCA 430 S. U/ml로 가장 높은 활성을 나타내었다. 다른 균주의 경

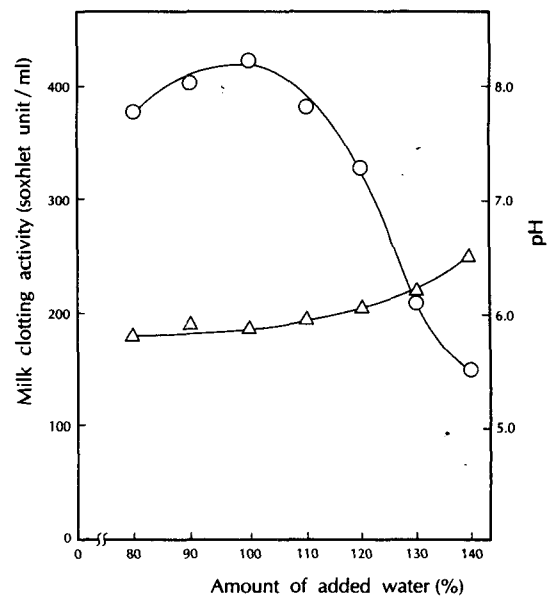


Fig. 1. Effect of amount of added water to wheat bran medium on the production of milk clotting enzyme.
 Culture temperature : 30°C Culture time : 42hrs
 ○ : MCA (milk clotting activity)
 △ : pH of culture extract

우 응유효소 생산을 위해 Arima 등¹⁸⁾은 *Mucor puicillus*를 30°C에서 70% 침수한 밀기울 고체배지를, Higashi¹⁹⁾는 *Mucor racemosus* No. 50을 20°C에서 100% 침수한 밀기울 고체배지를, Sannabhadi²⁰⁾은 *Absidia ramosa*를 22°C에서 50% 침수한 밀기울 고체배지를 사용하였으며 유 등¹²⁾은 *Dotiorella ribis*의 경우 35°C에서 산수량 60~80%가 가장 적절하다고 하였다. 이와같은 결과로 보아 침수량의 차이는 균주의 종류, 배양온도와 배양시간 등에 따라 차이가 있다고 생각되었으며 또 우유의 응고가 효소에 의한 경우 보다 산 생성에 의한 것인지를 확인하기 위해 추출된 조효소액의 pH를 측정하여 본 결과 배양 추출액의 pH는 5.8~6.5의 범위를 나타내어 우유의 응고는 산 생성에 의한 경우보다 효소의 활성에 의한 것임을 알 수 있었다.

배양온도

밀기울 기본배지에 침수량 100%를 가하여 배양온도를 27°C, 30°C, 33°C의 3구간으로 나누어 배양시간에 따라 응유효소 생산의 경시적 변화를 검토하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 응유효소의 생산은 30°C와 33°C의 경우 72시간 배양에서 최대 생산을 나타내

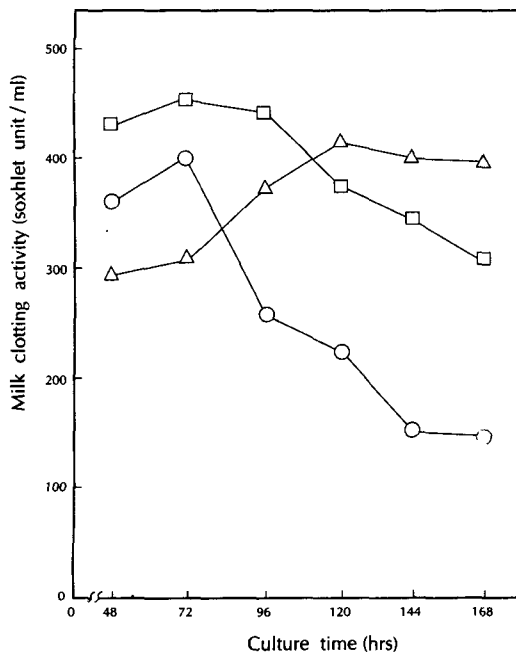


Fig. 2. Effect of culture temperature on the production of milk clotting enzyme.

culture temperature : △ : 27°C □ : 30°C
○ : 33°C

었으며 그 이후부터 배양시간이 경과함에 따라 효소의 생산은 급격히 감소하였다. 27°C의 경우는 120시간 배양 하였을 때 최대 생산을 나타내었으나 이는 30°C의 최대 생산량보다 낮았으며 그 이후 배양시간 부터 효소 생산은 서서히 감소하여 효소의 활성은 30°C와 33°C의 경우보다 안정함을 볼 수 있었다.

따라서 배양온도의 상승 및 배양시간의 경과에 따라 효소생산에 차이를 나타낸것은 온도의 상승에 의해 균의 생육이 저해된 것으로 생각되며 또 배양시간이 경과함에 따라 배양에 적합한 수분함량의 감소에도 그 원인이 있다고 생각 되었다. 이 결과 효소 생산에 적합한 배양온도와 배양시간은 30°C에서 72시간이 가장 적절하였다.

한편 다른 응유효소 생산균주의 경우 Park 등²¹⁾에 의한 *Bacillus K2P5G-7*은 합성배지에서 35°C, 72시간이 적절하였고 Park 등¹¹⁾에 의한 *Mucor L-42*는 밀기울 고체배지에서 30°C, 48시간, Somkuti와 Babel²²⁾에 의한 *Mucor pusillus* Lindt는 4% 밀기울 액체배지에서 35°C, 120시간, 손과 박²³⁾에 의한 *Aspergillus niger*는 밀기울 고체 배지에서 30°C, 72~96시간이 효소 생산에 적절하다고 보고하였다. 이와같이 효소 생산을 위한 배양온도와 시간은 균주의 생리적 특성 및 배지의 종류에 따라 차이가 있다고 생각되었으며, 본 균주의 경우 최대 응유효소 생산은 MCA 453 S.U/ml를 나타내어 이는 *Mucor racemosus*¹⁹⁾의 MCA 650 S.U/ml, *Mucor puicillus*¹⁸⁾의 MCA 800 S.U/ml에 비하여 볼 때 응유효소의 생산을 증가시키기 위한 여러 검토가 필요하다고 생각 되었다.

MacIlvaine 완충 용액의 pH

중류수 대신 1/10 M MacIlvaine 완충 용액의 pH를 3.5~6.5 까지 조정하여 밀기울 배지에 첨가하고 30°C에서 48시간 배양한 후 응유활성을 측정된 결과는 Table 1 과 같다.

완충 용액을 첨가한 경우는 중류수를 사용한 경우보다 대부분 효소 생산을 촉진시켰으며 특히 첨가된 완충용액의 pH가 4.5이었을 때 MCA 583 S.U/ml로써 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 중류수를 첨가한 경우에 비하여 약 38%의 효소 생산을 증가시켰으며, 또 완충용액의 pH가 6.5의 경우는 오히려 효소 생산의 감소를 가져왔다.

한편 앞의 실험의 결과로 미루어 보아 완충용액을 사용하면 배양시간에 따라 효소의 생산이 더욱 증가

Table 1. Effect of pH of Macllvaine buffer solution added to wheat bran on the production of milk clotting enzyme

pH of buffer soln.	Milk clotting activity (soxhlet unit/ml)	Relative activity (%)
3.5	548	133.0
4.5	583	141.5
5.5	490	118.9
6.5	393	95.3
*Control (pH 5.8)	412	100.0

Basal medium (control) contained 5g wheat bran and 5ml water

Test medium prepared by exchange of distilled water in basal medium for Macllvaine buffer solution with pH 3.5~6.5

Culture temperature : 30° C, Culture time : 48hrs

될것이 기대되어 Macllvaine 완충용액 (pH4.5)를 첨가한 경우와 증류수를 첨가한 경우와를 배양시간에 따라 효소 생산에 미치는 영향을 비교 검토하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 완충용액 사용배지는 72시간 배양 하였을때 MCA 668 S.U/ml로 증류수를 첨가한 경

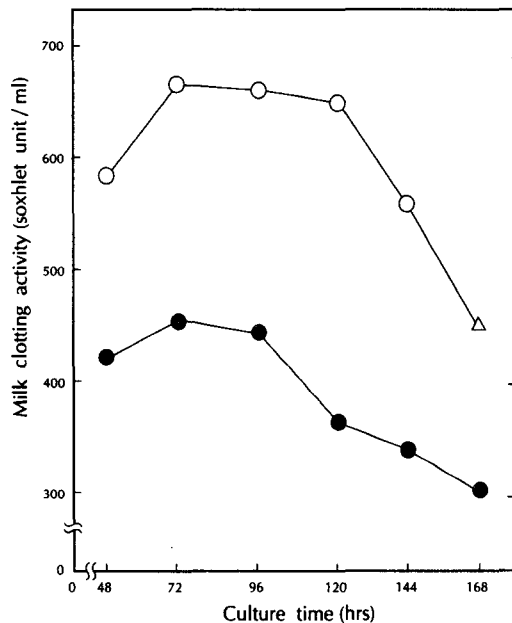


Fig. 3. Effect of Macllvaine buffer solution (pH 4.5) added to wheat bran medium on culture time for the production of milk clotting enzyme.

Culture temperature : 30° C

○ : MCA(Macllvaine buffer pH 4.5)

● : MCA(control)

우보다 67%의 효소생산 증가를 나타내었으며 효소의 활성도 배양 120시간 동안 안정함을 나타내었다.

Higashio와 Yasuo¹³⁾의 보고에 의하면 밀기울 고체배지에 Macllvaine 완충용액 (pH 5.0)을 첨가한 결과 효소활성의 안정과 효소생산의 증가를 나타내었다는 사실로 미루어 보아 본 효소의 경우도 동일한 결과를 나타낸다고 생각되었다.

요 약

효과적인 응유효소 생산을 위해 응유효소 생산 균주로 선정된 *Mucor mucedo* C-7을 밀기울 고체배지에 배양하여 최적 배양 조건을 검토 하였다. 그 결과 밀기울에 대한 침수량은 밀기울량에 100% 침수하였을때 효소 생산이 가장 양호 하였으며 배양 온도와 시간은 각각 30° C, 72시간이 가장 적당함을 알 수 있었다. 또 밀기울 배지에 증류수 대신 Macllvaine 완충용액 (pH4.5)을 첨가 하였을 경우 효소 생산은 현저히 증가 하였으며 응유효소의 활성도 증류수를 침수한 경우 보다 안정함을 알 수 있었다.

문 헌

1. Babel, F. J. : Rennin pepsin mixture in cheese manufacture. *Dairy Industries*, **12**, 901(1967)
2. Fox, P. F. : Milk-clotting and proteolytic activities of rennet, bovine pepsin and porcine pepsin. *J. Dairy Res.*, **36**(2), 261(1969)
3. Green, M. L. : Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as rennet substitutes for Cheddar cheese making. *J. Dairy Res.*, **39**(2), 261(1972)
4. Krishna, S. M. A., Johar, D. S. and Subrahmanyam, V. : Manufacture of Cheddar cheese with the milk clotting enzyme from *Ficus carica* (vegetable rennet). *Food Technology*, **12**, 482(1961)
5. Wtaker, J. R. : Properties of the milk clotting activity of *Ficin*. *Food Tech.*, **13**, 86(1959)
6. Sgarbieri, V. C., Shashikant, M. G., Donald, E. K. and John, R. W. : *Ficus* enzyme. *J. Biol. Chem.*, **239**(7), 2170(1964)
7. Melachouris, N. and Tuckey, S. S. : Properties of milk clotting microbial enzyme. *J. Dairy Sci.*, **51**(5), 650(1967)
8. Knight, S. G. : Production of a rennet like enzyme by molds. *Can. J. Microbiology*, **12**, 420(1966)
9. Krishnamurthy, T. S., Sannabhad, S. S. and Srinivasan, R. A. : Comparative studies on microbial milk clotting enzymes. *J. Food Sci. Tech.*, **10**, 118(1973)

10. Masanobu, K. and Mukai, N. : Studies on milk clotting enzyme produced by *Basidiomycetes*. Part I. Screening tests of *Basidiomycetes* for the production of milk clotting enzyme. *Agr. Biol. Chem.*, **34**(2), 159 (1970)
11. 박종래, 김현옥, 김영주 : *Mucor L42*의 응유효소 생산에 관한 연구. *한국축산학회지*, **21**(2), 99(1979)
12. 유주현, 김유삼, 홍윤명, 아리마 케이 : *Dothiorella ribis*가 생산하는 응유효소에 관한연구. *한국식품과학회지*, **3**(2), 89(1971)
13. Kanjio, H. and Yoshioka, Y. : Milk clotting enzyme production by NTC induced mutant of *Mucor racemosus* No. 50. *J. Nippon Nogekagaku Kaishi*, **56**(9), 777(1982)
14. Somkuti, G. A. and Babel F. J. : Conditions influencing the synthesis of acid protease by *Mucor pusillus* Lindt. *Applied Microbiology*, **15**(6), 1309(1967)
15. Kanjio, H. and Yoshioka, Y. : Preparation and some properties of crude enzymes from *Mucor racemosus* No. 50 and its mutants (Studies on milk clotting enzyme from microorganisms. part II). *Nippon Nogekagaku Kaishi*, **55**(7), 573(1981)
16. Iwasaki, S., Tamura, G. and Arima, K. : Milk clotting enzyme from microorganisms (part I. The enzyme production and properties of crude enzyme). *Agr. Biol. Chem.*, **31**(5), 546(1967)
17. 조재민, 이용수, 김교창 : 응유 효소를 생산하는 *Mucor mucedo* C-7의 분리 및 동정, *한국산업미생물학회지*, **18**(5), 449(1990)
18. Arima, K., Iwasaki, S. and Tamura, G. : Milk clotting enzyme from microorganisms (Part I. Screening test and the identification of the potent Fungus). *Agr. Biol. Chem.*, **31**(5), 540 (1967)
19. Kanjio, H. and Yoshioka, Y. : Screening test and identification of a potent fungus for producing milk clotting enzyme and improvement of its enzymatic properties by using mutants of the fungus. *Nippon Nogekagaku kaishi*, **55**(7), 561(1981)
20. Sannabhadti, S. S. and Srinivasan, R. A. : Use of milk clotting enzyme of *Absidia ramosa* in Cheddar cheese preparation. *J. Food Sci. Tec.*, **13**, 305(1976)
21. Park, Y. W., Kusakabe, I. and Kobayashi, H. : Production and properties of a soy milk clotting enzyme system from a microorganism. *Agr. Biol. Chem.*, **49**(11), 3215(1985)
22. Somkuti, G. A. and Babel, F. J. : Acid protease synthesis by *Mucor pusillus* in chemical defined media. *J. Bac.*, **95**(4), 1415 (1968)
23. 손천배, 박윤중 : 내산성 소화효소제의 생산에 관한 연구 (내산성 효소 생산균의 분리와 효소 생산조건에 관하여). *한국식품과학회지*, **13**(3), 241(1981)
(1992년 4월 17일 접수)