

微生物이 生産하는 凝乳酵素 (第10報)

Mucor-pusillus 의 固體培養으로부터 單離된 結晶 凝乳酵素

Mucor-rennin 의 一般的 性質과 그의 貯藏性

柳洲鉉* · 田村學造 · 洪允命** · 有馬啓

延世大學校理工大學 食品工學科*, 化學工學科**

東京大學 農藝化學科 醱酵學教室

(1969. 7. 31 受理)

Milk-clotting Enzyme from Microorganisms, Part 10, Studies on General Properties and storage of *Mucor-rennin* (Milk-clotting Enzyme) isolated from *Mucor pusillus var. Lindt*

Juhyun Yu,* Gakuzo Tamura, Yunmyung Hong** and Kei Arima,
Department of Agricultural chemistry The University of Tokyo, Tokyo, Japan,

*Department of Food Engineering, **Department of Chemical Engineering,
Yonsei University, Seoul, Korea

Summary

Mucor-rennin, the crystalline milk-clotting enzyme, isolated from *Mucor pusillus var. Lindt*, has an acid protease activity.

The optimum pH for the digestion of k-casein is 4.5, while that for hemoglobin digestion is 4.0. The skim milk solution was easily clotted acidic solution than alkaline solution, and the milk clotting activated by Ca ion.

The enzyme was heat stable against heat from pH 4.0 to 6.0 but was more stable at pH 5.0. The activity of the enzyme at pH 5.0 did not decrease at 30 C for 15 days and the activity was not effected by sodium propionate and salicylic acid. Therefore, the enzyme of liquid type could store for a long time and could be transported from Erzyme production Co. to Manufacture of cheese Co. by adding the antiseptic and by adjusting pH to 5.0.

Cheese 生産에 있어서 안되는 酵素 rennet 은 生後數週日된 송아지의 第4胃에서 抽出生産된다. 最近 cheese 의 消費量은 急激히 增加하고, 이와 反對로

송아지는 죽이지 않고 食用牛肉으로 飼肉하는 傾向이 있기 때문에 Calf-rennet 은 世界的으로 不足하다. 實際적으로 cheese 製造에 使用할 수 있는 代用酵素를 開發하는 것은 産業上 重要함으로 世界の 여러 나라에서 代用酵素의 研究가 活潑히 進行되고 있으나¹⁻¹⁸⁾ 全部가 凝乳力에 比較하여 蛋白質分解力이 強力한 酵素이기 때문에 cheese 生産에 缺陷이 많아 實用되지 못하고 있다.

有馬等¹⁹⁻³²⁾에 依하여 實際工業적으로 利用할 수 있는 Calf-rennet 代用酵素를 *Mucor pusillus var. Lindt* 라는 微生物을 밀기울에 固體培養해서 生産하고, 現在 日本의 名糖産業株式會社에서 工業적으로 生産하여 粉末狀態로 美國, 歐洲等 各地로 輸出하고 있다. 이 酵素를 結晶化시켜 그의 物理化學的性質에 對하여 報告하였다.

粉末酵素의 製造工程은 밀기울에 微生物을 培養한 다음 酵素를 抽出하여 硫酸或은 ethanol로 沈澱시킨다. 그 沈澱物을 分雜하고 乾燥하여 粉末酵素를 만든다.

이와같이 粉末酵素를 生産하려면 抽出酵素液의 生産時보다 沈澱, 分離, 乾燥等の 別途工程을 더 要하므로 生産價가 높아진다. 抽出酵素液을 cheese 製造工場으로 運搬使用하므로써 그 缺陷을 없앨수 있

으므로 酵素液의 貯藏性과 一般의 性質에 關하여 研究하였다.

實 驗

結晶 Mucor-rennin

Mucor pusillus var. Lindt 가 生産하는 粗凝乳酵素를 Amberlite CG-50, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100의 column 을 가지고 精製한 다음 結晶化하였다^{25, 30)} 粗酵素溶液(5.2×10^7 units 比活性 460units/OD280)을 1N-HCl 가지고 pH3.5로 調節한 다음, Amberlite CG-50 column 에 吸着시킨다. 不純蛋白質을 pH3.5의 酢酸 buffer 로 溶出하고, 그後 活性部分을 pH5.0의 酢酸 buffer 로 溶出하여 모은다. 이와같은 方法으로 rechromatography 해서 4×10^7 units, 總量 16.5l의 酵素溶液을 回收했다. 이 酵素溶液을 直接 DEAE Sephadex A-50 column 에 吸着시켜, KCl 0.0~0.5M의 gradient로 chromatography 를 行하였다. 이때 活性部分은 KCl 濃度 0.3~0.45mole 範圍에서 溶出되므로 溶出液中的 KCl 濃度を 0.2mole 以下까지 調節한다. 그後 새로운 DEAE Sephadex A-50 column 에 流通시켜 活性部分을 吸着시킨다. 이 column 을 上記와같은 方法으로 rechromatography 를 한다. 여기서 回收한 酵素는 2.5×10^7 units(比活性 6040 units/OD280)이다. DEAE Sephadex A-50 column 에 處理하므로써 酵素溶液量 16.5l에서 0.78l까지 濃縮할 수 있다. 이 酵素液을 70%飽和硫酸으로써 鹽析分離하여 Sephadex G-100 column 의 Gel filtration 을 두번한다. 活性部分을 硫酸鹽析하여 總活性 1.9×10^7 units, 比活性 6670units/OD280의 精製酵素를 回收했다. 이 酵素의 蛋白質濃度を 酢酸 buffer(pH 5.0)에 녹여서 2~3%로 한 다음 硫酸을 使用하여 自然蒸發 結晶化法, 또는 透析結晶化法으로 結晶化시킨다. 이러한 方法으로써 單離된 結晶酵素 Mucor-rennin (MRC)을 遠心分離하여 最低量의 buffer 에 녹여서 물로 透析한 다음 冷凍乾燥하여 乾燥酵素를 만들어 下記의 實驗에 使用하였다.

凝乳活性의 測定法

0.01M CaCl₂ 에 雪卵脫脂粉乳를 懸濁하여서 10% (w/v) 脫脂粉乳液을 調製한다. 이 液 5ml 를 25ml 의 試驗管에 取하고, 35°C 에 放置한다. 酵素液 0.5ml 를 위의 試驗管에 넣어 混合하고, 粉乳液의 凝固時間을 測定한다. 이 測定時間을 soxhlet units 의 換算式으로 算出하여 凝乳活性을 定한다.

10%牛乳液 1ml 을 60秒에 凝固시키는 酵素의 凝乳活性을 40units 라고 定義했다.

蛋白質分解活性의 測定法

蛋白質分解活性의 測定法은 Ansons 의 改良法을 應用하였다. Casein 을 0.02M phosphate buffer(pH 6.0)에 녹여서 2% casein 液을 調製한다.

이 casein 液 2.5ml 를 25ml의 試驗管에 넣어 35°C 의 恒溫槽에서 10分間 放置한다. 그後 酵素液 0.5ml 를 넣어 混合한다. 35°C 에서 20分間 反應시킨 다음 0.44M trichloro acetic acid(TCA)液 2.5ml 를 添加하고 30分後에 濾過한다. 이 濾液 1ml 를 새로운 試驗管에 取하고 0.55M Na₂CO₃ 液 2.5ml 와 3 倍로 稀釋한 Follin 試藥 0.5ml 를 加하고 35°C 에 放置하여 둔다. 20分後에 Hitachi spectrophotometer 를 가지고 660mm 의 吸收를 測定하였다. 이 測定值로부터 蛋白質分解活性을 算出하였다.

結 果

蛋白質分解 및 活性에 對한 pH 의 影響

K-casein 또는 hemoglobin 을 0.05M 酢酸 buffer (pH 5.0~8.0)로 各 pH 의 蛋白質液을 調製하였다. 이 蛋白質液 5ml 를 取하여 Mucor rennin 과 混合하고 10分間 反應시켜 蛋白質을 分解함에 있어서 pH 의 影響에 對하여 檢討하였다(Fig. 1). 蛋白質

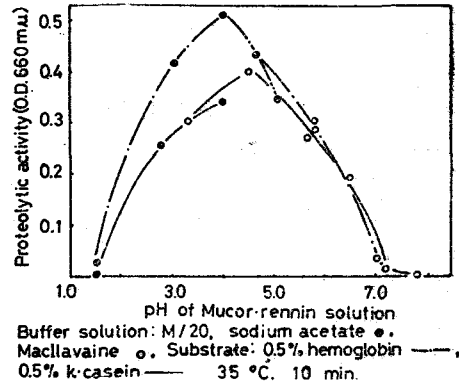


Fig. 1. Effect of pH Proteolytic Activity by Mucor rennin

을 分解하는 때 最適 pH는 hemoglobin 을 使用하였을 때 4.0, K-casein 을 使用할 때 4.5임을 알았다.

10%脫脂粉乳液을 1N-HCl 과 1N-NaOH 液으로 各 pH로 調節하였다. pH5.5以下에서는 牛乳液中的 casein 自體가 凝固하므로 pH5.5~7.0內에서 凝乳活性에 對한 pH 의 影響을 檢討하였다(Fig. 2). pH5.5의 粉乳液은 24秒에 凝固하나, pH7.0의 粉乳液은 30分間 反應시켜도 凝固하지 않았다. 이와

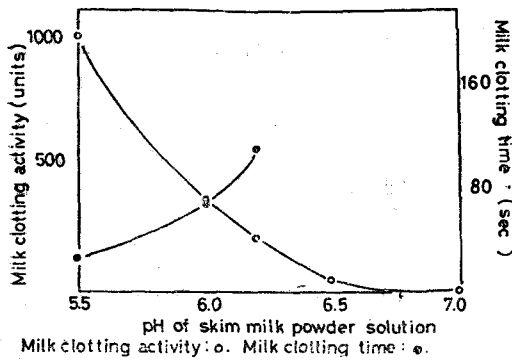


Fig. 2. Effect of pH on Milk-clotting Activity of Mucor rennin

같이 Mucor rennin 은 alkali 에서보다 酸性에서 凝乳活性이 強함을 알 수 있다.

凝乳活性에 對한 反應溫度의 影響

各溫度에서 凝乳活性을 測定한 結果를 (Fig. 3)

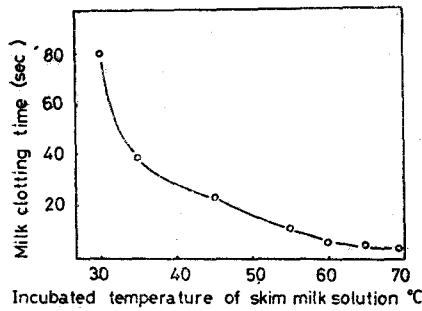


Fig. 3. Effect of Temperature on milk clotting time

에 表示하였다. 30°C 에서 12秒에 凝乳하는 酵素가 60°C 에서 12秒에 凝固하였다. 70°C 까지는 反應溫度가 높아질수록 빨리 굳어졌다. 그 以上の 溫度에서는 牛乳 casein 自體가 熱에 依하여 굳어지므로 70°C 以上에서는 檢討할 수가 없었다.

凝乳活性에 對한 Ca ion 의 影響

0.01M CaCl₂ 溶液에 懸濁한 脫脂粉乳液을 0.01M CaCl₂ 溶液으로 稀釋하고, 各濃度의 基質을 만들어 凝乳時間을 測定하였다. (Fig. 4)에서 볼 수 있는 바와 같이 脫脂粉乳의 濃度가 진할수록 늦게 굳어진다.

그러나 물로 稀釋하면 그와같이 되지 않고 2%의 濃度보다 5%의 濃度에서 빨리 굳어진다. 全般的으로 考察하여 볼 때 Ca ion 을 넣으므로써 凝乳時間이 短縮된다.

다시말하면 Ca ion 은 凝乳活性을 促進시킨다고

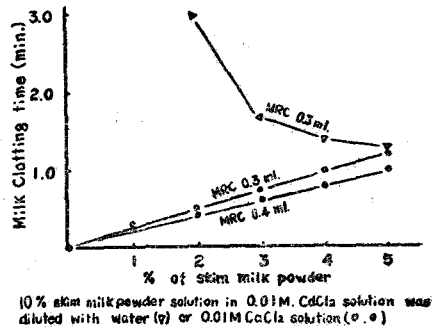


Fig. 4. Influence of Concentration of Skim Milk Powder on milk clotting Time

할 수 있다.

Mucor-rennin 의 耐熱性

Mucor-rennin 의 耐熱性 및 安全性의 最適條件을 알기 위하여 Mucor-rennin 溶液을 各 pH 로 調節하고 60°C 에서 10分間 放置한다.

그後 殘存凝乳活性을 測定하였다(Fig 5). pH4로

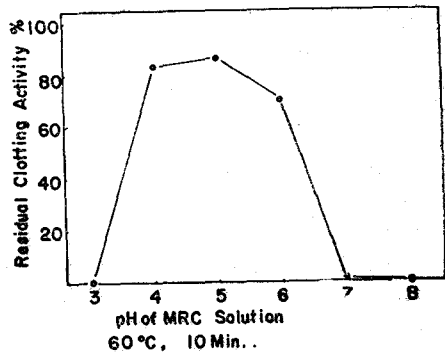


Fig. 5. Influence of pH on Heat Stability of MRC

부터 6까지는 어느程度 耐熱性이 있고 pH5.0에서 더욱 強하다.

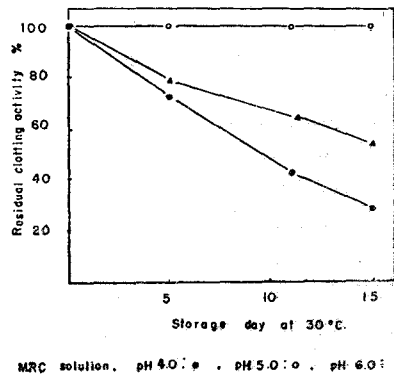


Fig. 6. Stability of milk clotting activity on storage days of MRC solution at 30°C by various pH

그러므로 酵素液을 pH 4, 5, 6의 buffer 로 녹여서 各 pH 로 만들어 30°C 에서 15日間 貯藏하여 經時的으로 殘存凝乳活性을 測定한 結果(Fig. 6) pH 4 와 6의 溶液은 15日째에 65% 以上の 活性이 減少되었으나, pH 5의 溶液은 거의 變化가 없었다. 酵素를 溶液狀에서 長時間 保存을 要할 때 微生物이 오염되어 活性의 減少를 招來할 우려가 있으므로 防腐劑를 添加함으로써 미치는 影響에 對하여 檢討하였다. 防腐劑의 濃度는 $1 \times 10^{-3}M$ 로 調節하고 35°C 에서 15日間 放置한 다음 凝乳活性을 測定하여 最初의 活性과 比較하였다(Table 1). Sodium propionate,

Table. 1. Effect of Antiseptics on Storage of MRC solution

Antiseptic	Residual Milk Clotting Activity %
Sodium benzoate	84.2
Benzoic acid	92.3
Sodium propionate	100.0
Potassium sorbate	96.0
Sodium dehydroacetate	89.6
Salicylic acid	100.0
Sorbic acid	96.5
CaCl ₂	91.5
Control	100.0

The antiseptics added to MRC solution in 0.1M sodium acetate buffer pH 5.0 and the final concentration of antiseptics were adjusted to $1 \times 10^{-3}M$. After the enzyme solutions were allowed at 35°C for 15 days, the residual milk clotting activity was measured.

salicylic acid 는 아무런 影響을 주지 않았고 其他의 防腐劑는 若干 影響이 있었다. 大體의 으로 보아 防腐劑 添加는 凝乳 活性에 無用함을 알았다.

考 察

Mucor pusillus var. Lindt 가 生産하는 粗酵素를 Amberite CG-50, DEAE Sephadex A-50 column 으로 處理한 다음, Sephadex G-100 column 을 通하고 活性部分을 硫酸鹽析하여 低温에서 結晶酵素를 얻을 수 있다^{25,30} 結晶할 때의 硫酸濃度, 蛋白質濃度等의 條件에 따라서 六角, 正四角型, 圓板狀等의 結晶形態가 된다. 어느 것이든 比活性은 거의 같고, 또 活性回收率은 約 30% 高收率로서 單離되었다. *Mucor-rennin* 의 物理的性質은 다음과 같다^{26,30}. $\bar{v}=0.74$, $S_{20,w}=2.39 \times 10^{-13}(cm/sec)/(dyne/g)$, $D_{20,w}=7.9 \times 10^{-7}cm^2/sec$, $f/f_0=1.33$,

分子量은 Svedberg 法으로 29,000, Yphantis 法으로 30,600, Andrews 法으로 32,500이다. amino acid 組成을 amino acid 分析值로부터 算出하면, (1/2 Cys)₂, Met₃, Asp₄₄, Thr₂₁, Ser₂₂, Glu₂₀, Pro₁₄, Gly₃₄, Ala₁₆₋₁₇, Val₂₄, Ile₁₂, Leu₁₅, Tyr₁₃, Phe₁₉, His₂, Lys₁₁₋₁₂, Arg₄, Trp₂₋₃ 등으로 278~281個의 amino acid 殘基로 構成되어 있다.

Mucor-rennin 의 活性은 p-chloro-mercuric benzoic acid(PCMB), N-ethyl-maleimide, diisopropyl phosphofluoridate 등으로 阻害되지 않고 iodine, methylene blue 存在下에서의 光酸化, 또는 diazo-1-H-tetrazole(DHT) 등의 反應으로 阻害되므로 酵素의 蛋白質中에 包含하고 있는 2個의 histidine 殘基中 1個의 殘基가 活性中心에 關與함을 推定하였다^{29,30,31}.

Mucor-rennin 의 一般의 性質을 본다면 蛋白質分解의 最適 pH는 基質의 種類에 따라 다르고, hemoglobin은 4.0, k-casein은 4.5이다. 凝乳溫度는 30°C 보다 60°C 에서 빨리 凝乳한다. Alkali 側의 牛乳液보다 酸性側液이, 또 Ca ion 을 牛乳에 添加하므로 容易하게 凝固한다. 各 pH 의 酵素液을 60°C 에서 10分間 處理하였을 때 pH 4~6에서 安全性이 있고, 그 中에서 pH 5.0가 가장 耐熱성이 强하다. pH 5.0의 溶液은 30°C 에서 15日間 放置하여도 失活하지 않고, sodium propionate, salicylic acid의 防腐劑는 凝乳活性에 對하여 아무런 影響이 없으나, 其他의 防腐劑는 若干의 變化를 주었다.

粗酵素의 性質을 본다면²² Hammarsten Casein分解의 最適 pH는 3.5이고, 結晶酵素와 같이 酸性쪽의 牛乳液을 쉽게 凝乳한다.

또 牛乳液中에 Ca ion 의 含量이 많으면 凝乳活性이 增加한다. 10°C 에서 17時間 放置하였을 때 pH 3~8에서 安全하다.

Calf-*rennin* 의 蛋白質分解함에 있어서 最適 pH는 casein 을 使用할 때 3.7³³, hemoglobin 을 使用할 때는 4.0이다³⁴. pH 5.0~5.2에서 安全도가 높고³⁶, *Mucor-rennin* 과 같이 Ca ion 에 依하여 凝乳力을 促進시킨다²².

Mucor-rennin 과 Calf-*rennin* 의 性質을 서로 比較하여 볼때 物理的性質, amino acid 組成은 다르나 一般의 性質은 비슷하다.

Mucor-rennin 의 酵素溶液에 防腐劑를 添加하고, pH 5로 調節하여 保存하므로써 液狀으로 長時間 貯藏할 수 있다.

따라서 酵素生産工場으로부터 cheese 製造工場으로 抽出液을 輸送하여 直接 使用할 수 있다고 생각된다.

参考文献

1. S.G., Knight *Can. J. Microbiol.*, **12**, 420, (1916)
2. G.A. Somukuti, G. A., and F. J. Babel, *J. Dairy Sci.*, **49**, 700 (1966)
3. N.S. Paleva and N.V. Popova, *Ferment. Spirt. Prom.*, **31**, 6 (1965)
4. A.A. Yulius and O.Kh. Tinyakova, *Prikl. Biokhim. Microbiol.*, **2**, 670 (1966)
5. I.Y. Velselov, P.Y. Tipograf and T.A. Pentina, *Prikl. Biokhim. Microbiol.*, **1**, 52, (1965)
6. P.F. Dyachenko, and V.V. Slavyanova, *XVI Intern. Dairy Congr.*, IV-I, 349 (1962)
7. J.L. Shimvell and J. E. Evans, *Brit. Pat.*, 565788 (1944)
8. K. Arima, S. Iwasaki and G. Tamura, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 540 (1967)
9. R.A. Srinivasan et al., *XVIIth Intern. Dairy Proc.*, **B401**, 506 (1962)
10. T. Tsugo and K. Yamauchi, *XVIIth Intern. Dairy Congr. Proc.*, **2**, 636, 634 (1959)
11. I. Emanuilof, *XIVth Intern. Dairy Congr. Proc.*, **2(2)**, 200 (1956)
12. J.G. Wahlin, *J. Bact.*, **16**, 355 (1928)
13. 八江淑郎, 金澤義信, 今井富雄, 日本農化大會講演要旨 p.136 (1966)
14. G.H. Richardson, J. H. Nelson, R.E. Lubnow and R.L. Schwarberg, *J. Dairy Sci.*, **50**, 1067 (1967)
15. K. Morihara, *Agr. Chem. Soc. Japan*, **39**, 514 (1965)
16. Z. Puhán, *Intern. Dairy Congr.*, XVII, D199 (1966)
17. S.G. Knight, *Can. J. Microb.*, **12**, 420 (1966)
18. J.L. Sardinas and G. Ferry, *USP* 3275453 (1966)
19. S. Iwasaki, J. Yu, G. Tamura and K. Arima, *7th Intern. Congr. Biochem. at Tokyo*, F 39 (1967)
20. S. Iwasaki, J. Yu, G. Tamura and K. Arima, *3rd Intern. Ferm. Symp.*, Sept. 2-6 (1968) at U.S.A.
21. K. Arima, S. Iwasaki and G. Tamura, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 540 (1967)
22. S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima, *ibid.*, **31**, 546 (1967)
23. S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima, *ibid.*, **31**, 1421 (1967)
24. S. Iwasaki, T. Yasui, G. Tamura and K. Arima, *ibid.*, **31**, 1427 (1967)
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, G. Tamura and K. Arima, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **43**, 60 (1969)
28. J. Yu, G. Tamura and K. Arima, *J. Biol. Chem.*, in press (1969)
29. J. Yu, J. Tamura and K. Arima, *ibid.*, in press, (1969)
30. J. Yu, S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1051 (1968)
31. J. Yu, G. Tamura and K. Arima, *ibid.*, **32**, 1048 (1968)
32. J. Yu, W. Liu, G. Tamura and K. Arima, *ibid.*, **32**, 1482 (1968)
33. E. Schram, S. Moore E. J. Bigwood, *Biochem. J.*, **57**, 33 (1954)
34. N.J. Berridge, *Biochem. J.*, **39**, 179 (1945)
35. Tsugo, U. Yoshino, K. Taniguchi, A. Ozawa, Y. Miki, S. Iwasaki and K. Arima, *Japanes. J. Zootech. Sci.*, **35**, 221 (1964)
36. Mickelsen & C.A. Ernstron, *J. Dairy Sci.*, **50**, 645 (1967)