



치즈製造를 爲한 微生物 生産 rennet

<中>

柳 洲 鉉
 <延世大 食品工學科長>
 有 馬 啓
 <東京大 教授>

第II編 Mucorrennin의 活性中心과 作用機構

前編에서 *Mucor pusillus*을 利用하여 Mucorrennin의 生活法, 精製法 및 그의 物理化學的諸性質에 關하여 記述하였다.

여기에서는 Mucorrennin의 活性中心과 作用 및 凝乳機構에 關하여 生覺해 보고저 한다.

Table. II-1 金屬 ion의 影響

Metal	Proteolytic activity
AgNO ₃	54%
NiCl ₂	—
MgCl ₂	100
SnCl ₂	98
CdCl ₂	85
Pb(NO ₃) ₂	80
ZnSO ₄	50
CuSO ₄	—
HgCl ₂	68
BaCl ₂	105
MnSO ₄	129
CaCl ₂	102
NaCl	104
None	100

M.R. : 9.5mg/ml, Metal 10⁻³M (final conc.)
 35°C, 30分反應

1. Mucorrennin의 Active site

Mucor rennin의 活性中心을 알기 爲하여 여러 金屬 ion 및 化學修飾劑가 酵素活性에 미치는 影響을 調査하였다(Table II-1, II-2)^{1,2,3)} 金屬 ion이 活性을 顯著히 阻害하는것은 없었고, SH 試藥, Serine 化學修飾劑들中 어느것이고 阻害하는것은 볼수 없었다. I₂만이 酵素活性을 顯著하게 阻害하였다(Fig. II-1), I₂는 어떤 酵素蛋白質의 Tyrosine, Cystine, Histidine, Tryptophan 殘基와 結合하여 酵素活性을 阻害하는 것으로 알려져 있다. I₂에 依한 Mucor-

Table. II-2. 化學修飾劑의 影響

Chemical reagents	Final concentration, M	Relative rate of milk-clotting activity, %
None		100
Nekelgon	2×10 ⁻³	93
N-Ethyl maleimide	2×10 ⁻³	96
p-Chloromercuribenzoic acid	2×10 ⁻⁴	96
EDTA	2×10 ⁻³	113
Diisopropyl phosphate	2.5×10 ⁻²	96
Propylene oxide	2×10 ⁻³	96
Iodoacetamide	2×10 ⁻²	96

Mucorrennin : 0.2ml of 1×10⁻⁵M (pH6.0)
 35°C, 3時間反應

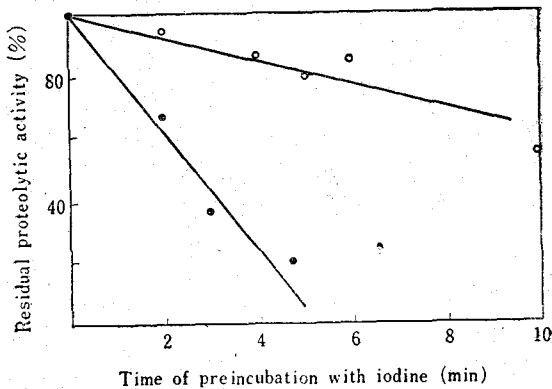


Fig. II-1. I₂에 의한阻害

M.R : 0.175M in McIlvaine buffer pH6.7
 $1 \times 10^{-4}M I_2$
 $1 \times 10^{-3}M I_1$ (final conc.)
 35°C

ennin 酵素活性의 阻害는 pH 5.0 以上에서 顯著하게 일어난다(Fig. II-2). 다시 $^{131}I_2$ 을 各 pH에서 酵

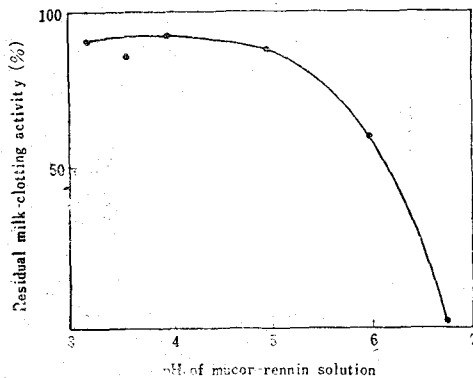


Fig. II-2. I₂에 의한阻害에 對하여 미치는 pH의 影響

I₂ : $2 \times 10^{-4}M$ (final conc)
 35°C, 30分反應

Table II-3. $^{131}I_2$ 의 取込에 對한 pH의 影響

pH of Mucor- rennin solution	Volume of 1.5% Mucor- rennin, ml		Count of $^{131}I_2$	
	Mucor- rennin, ml	Water ml	Observed cpm	Incorporated cpm
3.2	0.5	0.2	8984	3360
4.3	0.5	0.2	11118	5494
5.1	0.5	0.2	8636	3120
6.0	0.5	0.2	19661	14037
7.0	0.5	0.2	16252	10628
Contro	—	0.7	5624	0

素를 作用시켰을때, pH 5.0 以下에서는 酵素蛋白質에 6,000 p.p.m 以下, pH 6.0 以上에서는 10,000 p.p.m 以上の 取込이 觀察되었다(Table. II-3)^{3,4)}

以上の 結果로부터 Mucor rennin의 Active site에 는 Histidine, Tyrosin, Tryptophan 殘基中 一部 또는 全體가 關與한다고 推定된다.

蛋白質溶液을 Methylene blue 存在下에서 빛을 照射할때, 光增感反應에 依하여 Histidine 殘基가 酸化된다. I₂를 作用하여 修飾後, Mucor rennin의 光酸化에 依한 修飾을 行하였다.^{1,2,5)} 이 方法에서는 酵素蛋白中 Histidine, Tyrosine, Tryptophan 殘基가 酸化된다. 酸化時間別로 酵素의 UV Spectrogram을 圖示할때 Fig. II-3과 같이 O.D. 276 μm 吸收과 비

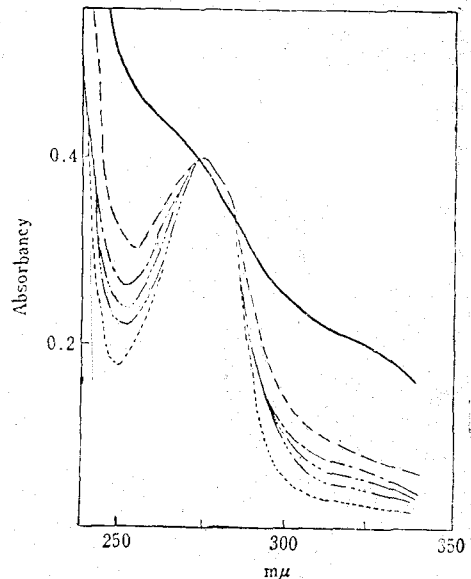


Fig. II-3. 光酸化에 依한 Mucor rennin의 Ultra-violet Spectrum의 變化

照射時間(min); 0....., 30....., 60.....,
 90....., 150....., 280.....,

較하여 O.D. 250 μm 의 吸收値는 增加한다. 250 μm /276 μm 에 對하여 酵素의 殘存活性을 Pilot할 때 이 値의 增加와 더불어 MCA의 減少가 나타났다(Fig. II-4).

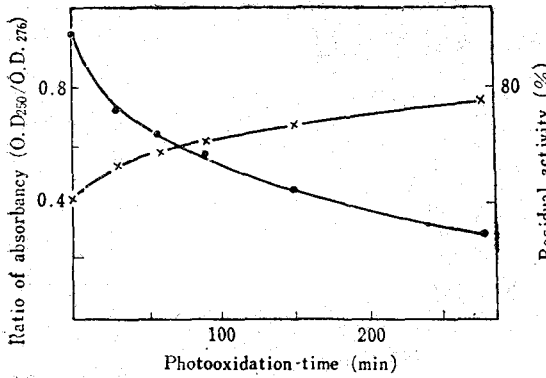


Fig. II-4 O.D.₂₅₀/O.D.₂₇₆과 殘有活性 (milk clotting activity)

x : absorbancy ratio O.D.₂₅₀/O.D.₂₇₆

다시 Mucor-*rennin*의 M.C.A.의 減少와 酵素蛋白質 質中の Histidine, Tyrosine, Tryptophan 殘基의 減少를 보면 Fig. II-5와 같이 酸化에 의하여 殘基의

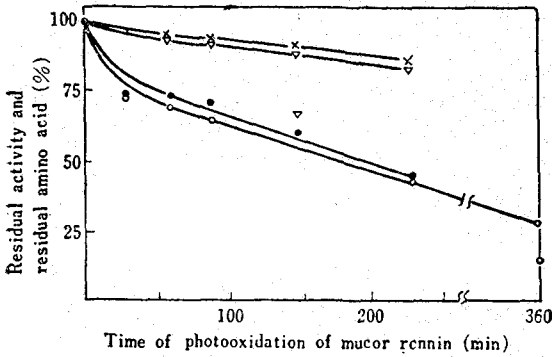


Fig. II-5 光酸化에 의한 殘有 amino acid 殘基와 殘存活性的 變化

○ : M.C.A. ▽ : Tyrosine
● : Histidine × : Tryptophan

減少와 M.C.A.의 減少間에 平行關係가 있었다. 이 結果 Mucor-*rennin* 中の Histidine 殘基가 活性中心에 存在하는 可能性이 豫測되었다.⁸⁹⁾

I₂, 光酸化修飾에 의하여 Mucor *rennin*의 活性中心에 Histidine 殘基가 存在할 可能性이 豫測되었으나 이보다 明確히 하기爲한 目的으로 D.H.T를 酵素蛋白質에 反應시켜 蛋白質中の Histidine, Tryptophane 殘基를 修飾하였다.⁴⁾ 이 反應으로 생긴 Biazohistidine, Biazotyrosine 誘導體는 480 μm, 550 μm에 各各 最大吸收를 갖고 있으므로, 別個로 修飾殘基量

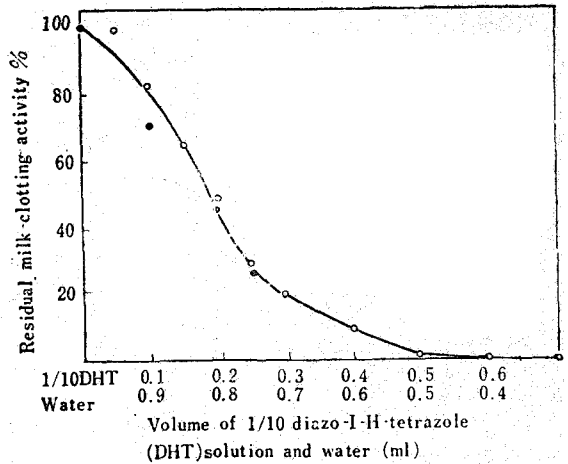


Fig. II-6 DHT에 의한 失活

○ : 90分反應
● : 180分反應
35°C

을 定量할수있다.⁹⁾ Mucor *rennin*은 D.H.T에 의하여 特異하게 阻害된다(Fig. II-6).

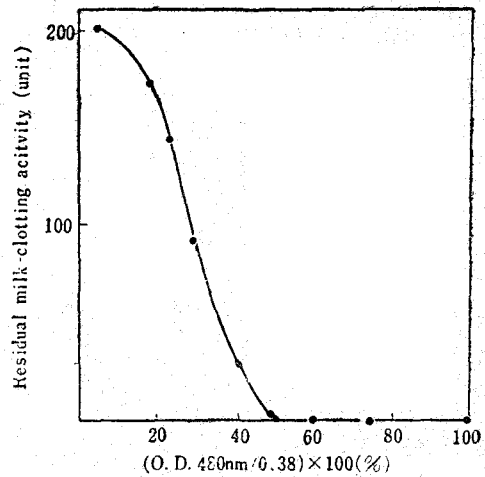


Fig. II-7 O.D.450μm의 增加와 殘有活性

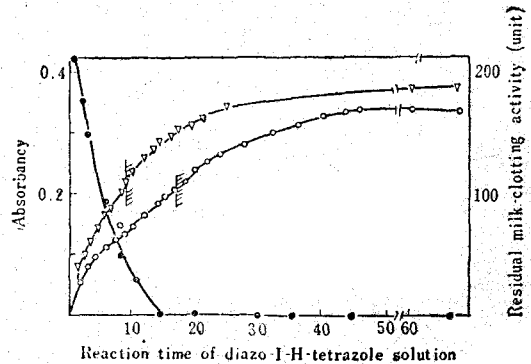


Fig. II-8. Histidine의 修飾數와 OO活性

- : M.C.A. (1/2DHT)
- : 480 μ m (1/2DHT)
- : 480 μ m (DHT) PH6.0, 21°C

480 μ m 吸收의 增加에 따라 M.C.A의 急速한 減少가 生진다(Fig. II-7), Fig. II-8은 DHT의 濃度를 달리하여, Mucor rennin의 修飾反應을 經時的으로 480 μ m의 吸收增加와 殘存 M.C.A의 變化를 檢討한 結果이다.

480 μ m의 吸收는 反應時間이 經過됨에 따라 增加하고 그의 吸收曲線의 O.D. 480 μ m이 0.19附近에서 굴곡이 生진다.

이때 100% 失活되었다.

酵素中, 全 Histidine 殘基가 Diazo 化되었을 때 O.D. 480 nm 은 0.38% 이 된다. 따라서 Amino acid 分折에서 算出한 酵素蛋白質의 2分子 Histidine中 1分子가 DHT에 依하여 修飾됨으로써 酵素活性이 100% 失活하였다고 生覺된다.

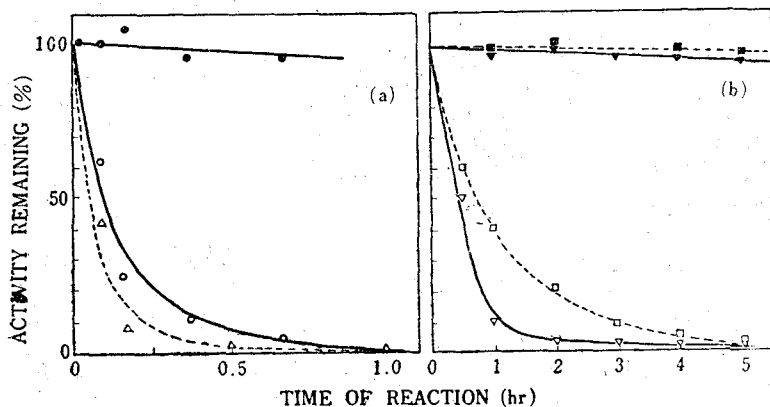
以上과 같은 化學的修飾法의 實驗結果, Mucor

rennin 蛋白質 1分子에 包含되어있는 2分子의 Histidine 中 1分子의 殘基가 Mucor-rennin의 活性에 重要한 役割을 한다고 할수 있다.

一般的으로 acid protease는 Asp 또는 Glu의 Carboxyl基가 그의 活性에 重要한 役割을 하고 있음이 確認되어 있고 Cu⁺⁺의 存在下에서 Diazo-acetyl-L-Norleucine Methyl ester(DAN)에 依하여 그의 Carboxyl基가 esterification되어 失活됨이 알려져 있다. DAN反應은 다음과 같이 일어난다. (William H. Stein, J.B.C. 244(1969))

DAN에 依한 化學修飾은 東京大學理學部生化學教室, 高稿健二氏에 依하여 Mucor-rennin, Calf-rennin, *Rhizopus Chinensis* acid protease, *Aspergillus saitoi*, protease의 連의 Acid protease에 對하여 行하였다.

Fig. 23은 DAN와 各酵素의 反應을 나타내 있지만 Cu⁺⁺非存在下에서는 거의 失活치 않으나 Cu⁺⁺存完全히 失活한다. 또는 DAN의 酵素分子로의 取込은 酵素 1分子當 Norleucine 1分子가 取込되어, 活



Rates of inactivation of acid proteases by reaction with diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester at 14°C. (a) *Rhizopus chinensis* acid protease: ●, protein (0.02%); DAN, 1 : 43 (molar ratio), pH5.0; ○, protein (0.02%); Cu (II), 1 : 43 : 220, pH5.6. *Aspergillus saitoi* acid protease : △, protein (0.02%); DAN: Cu (II), 1 : 53 : 200, pH5.6. (b) *Mucor pusillus* acid protease : ■, protein (0.1%); DAN, 1 : 45, pH5.6; □, protein (0.1%); DAN: Cu (II), 1 : 45 : 40, pH5.6; Calf rennin : ▼, protein (0.1%); DAN, 1 : 45, pH5.6; ▽, protein (0.1%); DAN: Cu (II), 1 : 45 : 40, pH5.6.

성을 완전히 잃게 된다(Fig. II-9). 따라서 Mucor rennin의 효소分子中에는, 다른 Acid protease와 같이 효소活性에 關與하는 Carboxyl基 1個가 存在함이 分明하나, Asp 殘基인지 Glu 殘基인지는 檢討中이다.⁴⁾

2. 基質 特異성과 凝乳機構

a) 合成基質에 對한 特異性^{7,8)}

Mucor-rennin은 acid protease의 一種이다. 一般的으로 acid protease는 aromatic, hydrophobic, amino acid, 즉 Phe, Tyr, Leu, Val, Ile 등에 隣接한 peptide 結合을 切斷하는것이 알려져 있다. 多數의 合成 dipeptide에 對하여 Mucor-rennin作用을 調査하였으나 dipeptide에는 극히 限定된 作用을 하였다(Table. II-5).

Table. II-4

Stoichiometry of reaction of diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester with acid proteases.⁴

Enzyme	Extent of inactivation (%)	No. of norleucine residue introduced/molecule
<i>Rhizopus chinensis</i> acid protease	100	0.98
<i>Aspergillus saitoi</i> acid protease	100	0.93
<i>Mucor pusillus</i> acid protease	93	0.97
Calf rennin	92	0.98

1) The proteins were treated with DAN and Cu (II) under similar conditions to those described

N-Ac-L-Phe ¹ -L-TyrOH	--	Z-L-Gly-L-ArgOH	-
N-Ac-L-Phe ¹ -L-TyrI ₂	--	Z-L-Gly-L-Hi-OH	-
Z-L-Phe ¹ -L-TyrOH	+	Z-L-Gly-L-ProOH	-
Z-L-Phe ¹ -L-PheOH	±	Z-L-Pro-L-TyrOH	-
Z-L-Phe ¹ -L-LeuOH	-	L-Leu-L-TyrOH	-
Z-L-Phe-L-GlyOH	-	D-Leu-L-TyrOH	-
Z-L-Tyr-L-LeuOH	-	L-Leu-L-PheOH	-
Z-L-Tyr-L-LeuNH ₂	-	L-Leu-L-GlyOH	-
Z-L-Glu-L-TyrOH	-	D-Leu-L-GlyOH	-
Z-L-Glu-L-PheOH	-	L-Tyr-L-LeuOH	-
Z-L-Val-L-TyrOH	-	L-Leu-Gly-PheOH	-
Z-L-Gly-L-PheOH	-	L-Leu ¹ -Gly-GlyOH	±
Z-L-Gly-L-PheNH ₂	-	D-Leu-Gly-GlyOH	-
Z-L-Gly-L-LeuOH	-	L-Gly-Pro-AlaOH	-
Z-L-Gly-L-LeuNH ₂	-	Z-Gly-Pro-LeuOH	-
		Z-Gly-Pro-Leu ¹ GlyCl	+

Table. II-5 合成 dipeptide에 對한 特異性

가장 分解率이 높은 基質은 pepsin의 最適基質인 N-AC-L-Phe-L, Tyr I₂이고, 그 外에 Phe-Tyr의 dipeptide에 若干 作用하였다. Calf-rennin, pepsin의 좋은 基質인 Z-L-Glu-L-Tyr OH에 對하여는 活性이 없었다. 一般的으로 곰팡이의 acid protease는 合成 dipeptide에 對하여 낮은 活性을 나타내나, Mucor-rennin은 depeptide에 對하여 매우 限定된 特異性을 갖고 있다. Fig. II-10의 N-Ac-L-Phe-L-Tyr I₂에 對한 Lineureuer-Burk plot을 보면 Km,

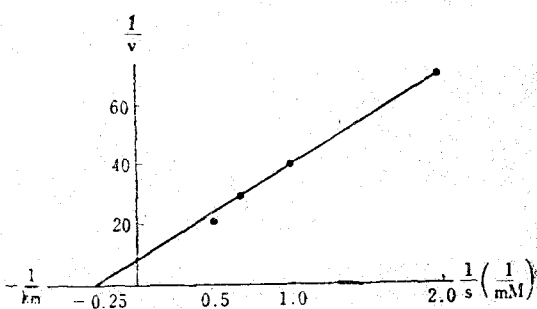


Fig. II-10 N-Ac-L-Phe-L-Tyr I₂에 對한 Km, Kcat

	Km(mM)	Kcat(sec ⁻¹)
Mucor-rennin pH3.5	4.0	0.004
Pepsin	pH2.0	0.08
	4.5	0.07

Kcat 値는 pepsin에 比하여 數10分之1 値이다. 다음 合成 tripeptide 以上の 合成基質에 對한 特異性을 본 것이 Table. II-6이다.

Table II-6 Secondary interaction

Peptides	Action on Z-X-Tyr-Ala	
	2hr	Hydrolysis% 20hr
Z-Tyr-Ala	0	0
Z-Gly-Tyr-Ala		7
Z-Ser-Tyr-Ala		22
Z-Ala-Tyr-Ala		5
Z-Val-Tyr-Ala	8	29
Z-Ile-Tyr-Ala	10	43
Z-Leu-Tyr-Ala	5	19
Z-Phe-Tyr-Ala	13	58
Z-Tyr-Tyr-Ala	20	78

Action on Z-X-Phe-Leu-Ala and Z-X-Gly-Phe-Tyr Peptides P ₄ -P ₃ -P ₂ -P ₁ -P ₁ -P ₂	Hydrolysis%	
	2hr	20hr
Z-Phe-Leu-Ala	9	39
Z-Gly-Phe-Leu-Ala	56	100
Z-Ala-Phe-Leu-Ala	44	94
Z-D-Ala-Phe-Leu-Ala	25	78
Z-Phe-Tyr		4
Z-Gly-Phe-Tyr	10	42
Z-Gly-Gly-Phe-Tyr	7	16
Z-Ala-Gly-Phe-Tyr	18	60
Z-D-Ala-Gly-Phe-Tyr		6

Action on Z-Phe-X-Ala		
Peptides P ₂ -P ₁ -P ₁ -P ₂	Hydrolysis%	
	2hr	20hr
Z-Phe-Gly-Ala		0
Z-Phe-Ser-Ala		3
Z-Phe-Ala-Ala		7
Z-Phe-Val-Ala	13	42
Z-Phe-Ile-Ala	20	58
Z-Phe-Leu-Ala	9	39
Z-Phe-D-Leu-Ala		0
Z-Phe-Phe-Ala		4
Z-Phe-tyr-Ala	17	76

Action on Z-Phe-Leu-X and Z-Phe-Leu-Ala-Z		
Peptides P ₂ -P ₁ -P ₁ -P ₂ -P ₃	Hydrolysis%	
	2hr	20hr
Z-Phe-Leu		0
Z-Phe-LeuNH ₂		0
Z-Phe-Leu-Gly		22

Z-Phe-Leu-Ala	9	39
Z-Phe-Leu-D-Ala		6
Z-Phe-Leu-Ala-Ala	39	100
Z-Phe-Leu-Ala-D-Ala	12	34

이것은 tripeptide Z-Phe-Leu-X, Z-X-Tyr-Ala, Z-Phe-X-Ala, tetrapeptide Z-Phe-Leu-Ala-X, Z-X-Phe-Leu-Ala의 X 위치에 여러 종류의 amino acid를 결합시켜 切斷點에 있어서 Amino acid 종류가 미치는 活性的 影響, 切斷點의 C 末端側, N 末端側에 amino acid 鎖를 延長시켰을때의 活性에 미치는 效果 即 secondary interaction을 調査하였다.

그 結果, aromatic hydrophobic amino acid 類에 特異性을 갖고, 切斷된 peptide 結合으로부터 C 末端側, N 末端側으로 2~3 殘基의 amino acid를 延長시킨것이 飛躍的인 活性을 나타냄으로서 이 位置의 amino acid 殘基가 切斷된 peptide 結合의 susceptibility에 重要な 役割을 하고 있음이 밝혀졌다.

b) Insulin B Chain에 對한 特異性

Protease의 基質異性的 研究에는 一般的으로 amino acid 殘基數 30個를 가지고 있는 Insulin B-chain을 使用한다. Mucor-rennin에서도 E(Enzyme) : S(Substrate)=1 : 100(重量比), pH 3.2, 40°C, 10分間, E : S=1 : 1,000, pH 3.9, 37°C 19時間의 2個條件下에서 各各 反應시켜 調査하였다. primary로 Mucor-rennin에 依한 切斷되는 peptide 結合은 Phe

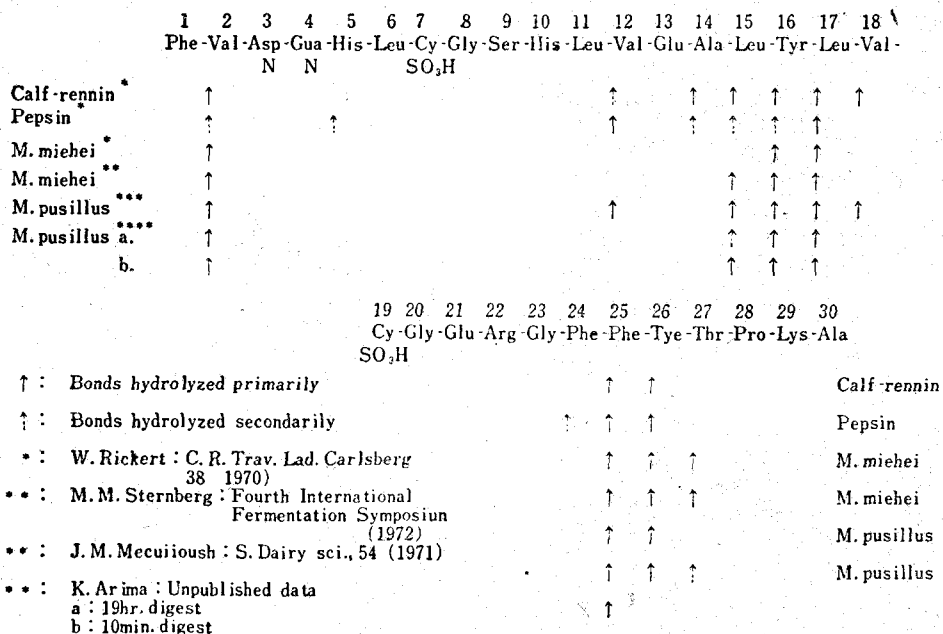


Fig. II-11 Insulin B-chain에 對한 特異性
— 30 —

(1)-Val(2), Leu(15)-Tyr(16), Tyr(16)-Leu(17), Phe(24)-Phe(25)이지만 그중에서도 Tyr(16)-Leu(17)이 무엇보다 용이하게加水分解되었다. Mucor-rennin은 合成基質의 경우와 같이 Tyr, Leu, Phe, Val을 포함한 peptide結合을 特異하게 加水分解한다(Fig. II-11). 다른 acid protease, pepsin, calf-rennin 등과 比較時 pepsin 보다는 基質特異성이 限定되어 있음으로, calf-rennin에 類似한 特異성을 갖고 있으나, 이것보다는 限定되어 있다. 이와 같이 Mucor-rennin은 acid protease 中에서도 가장 限定된 基質特異성을 나타내는 酵素이다. 이 酵素의 M.C.A에 比하여 낮은 蛋白質分解活性을 考慮하면 흥미있는 일이다. 그리고 Mucor-miehei가 生産하는 acid protease는 合成基質, Insulin β -chain에 對한 特異性도 Mucor-rennin과 同一한 結果를 나타냈다.

C) Mucor-rennin에 의한 凝乳機構

i) k-casein 造構과 Calf-rennin 作用

牛乳中의 蛋白質 casein은 $\alpha_s, \beta, \gamma, \kappa$ -Casein으로 構成되어 있다. 約 90%程度가 ($\alpha_s + \beta$) casein으로써, κ -casein은 全體의 10%程度이다. κ -casein은 牛乳中의 Casein 蛋白質 安全化, 即 Casein micelle의 形成에 對하여 protective colloid로써 寄與하고 있다. 牛乳中의 蛋白質이 凝乳沈澱치 않는 것은 κ -casein 役割때문이다. 現在까지 解明되어 있는 κ -ca-

sein의 Amino acid 組成은 Fig. II-12와 같으나 protease 作用으로 因한 凝乳現像은 κ -casein이 分解되어 micelle의 安定化力이 상실됨으로써 일어난다.

Calf-rennin은 κ -casein에 對한 一次的 反應으로 peptide 鎖中 1個所 \sim Phe-Met \sim 間을 加水分解하여⁴⁹⁾ para- κ -casein과 casein glycopeptide를 生成한다. 이 casein glycopeptide部分에는 κ -casein의 carbohydrate moiety가 包含되어 있고 또 Ca^{++} 濃度의 增加에 依하여 Clotting time의 短縮이 일어난다. 따라서 Mucor-rennin의 凝乳機構의 解明을 以上과 같은 觀點下에서 calf rennin과 比較하였다.

ii) Mucor-rennin의 κ -casein에 對한 作用

Mucor-rennin(MR), Calf-rennin(C.R.)은 ($\alpha_s - \beta$) Casein보다 κ -casein을 容易하게 加水分解시킴으로써 κ -casein에 對한 作用을 檢討하였다.⁵⁰⁾ C.R.은 κ -casein에 作用하여 凝集性的 para- κ -casein과 含糖 peptide인 casein glycopeptide를 生成하고, 이 Casein glycopeptide는 結合되어있는 糖의 效果로 12% TCA 中에서도 可溶性이 된다.

M.R과 C.R의 作用中, 各 5% TCA 可溶性區分의 peptide 增加는 거의 같다(Fig. II-13).

para- κ -casein, casein glycopeptide의 元素 및 Amino acid 分析의 結果를 比較하여 보아도 Table II-7, II-8과 같이 相互間에 同一하다. 特히 amino acid 分析值中의 para- κ -casein의 phenylalanine 量,

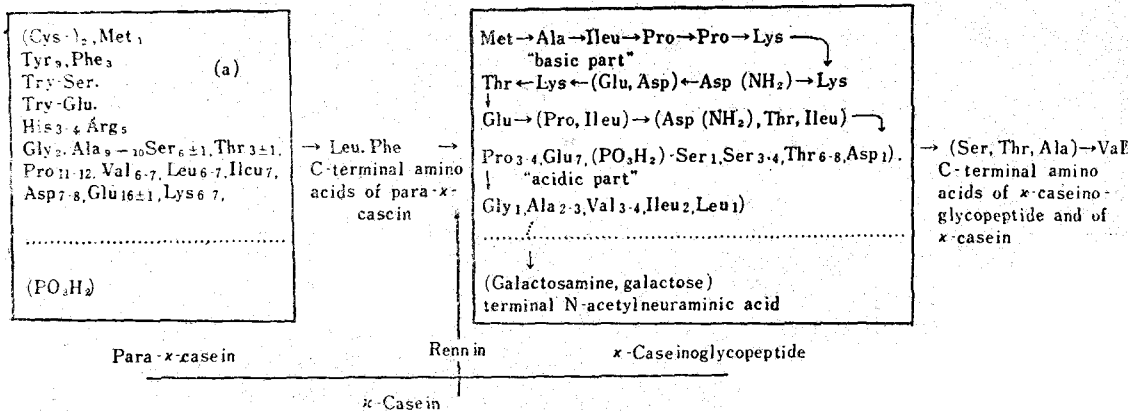


Fig. -12. κ -casein의 構造와 rennin作用⁴⁹⁾

caseinglycopeptide의 Methionine 量이 거의 같다는 것은, MR과 CR 양쪽 모두가 k-casein 中の Phe-Met 間을 加水分解함이 豫想된다.

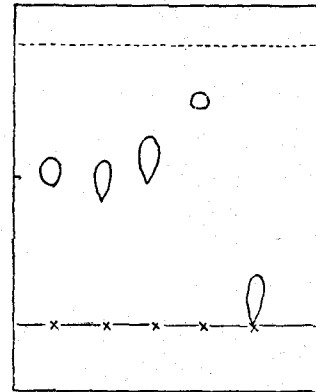
이 k-casein의 切斷點을 確實케 하기 위하여 para-k-casein의 C 末端 Amino acid 을 carboxypeptidase A, caseinglycopeptide의 N 末端 Amino acid 를 Edman 法에 依하여 調査하였다.

Table II-7. para k-casein, glycomacropeptide의 元素分析

	C %	H %	N %
Calf-rennin에 依한 para k-casein	43.22	71.8	13.12
Mucor rennin에 依한 para k-casein	43.21	7.00	13.13
Calf rennin에 依한 Glycomacropeptide	21.86	4.02	5.02
Mucor rennin에 依한 Glycomacropeptide	21.75	4.07	4.95

Casein glycopeptide는 kalan 등의 方法에 依하여 para-k-casein 除去後 反應液에 같은 量의 24% TCA 를 加하여 그의 可溶性 區分으로 부터 調製하였다.

Edman 法에 依한 N 末端 amino acid 의 paper Chromatography 의 結果, N 末端은 CR 과 같이 Methionine 으로 確認되었다(Fig. II-14). 따라서 12% TCA 可溶性 區分에는 Methionine 을 N 末端을 가진 C.R 과 같은 casein glycopeptide 가 存在하고 있음이 確認되었다.



試料 PTH PTH PTH PTH

Met. Phe. Leu. Tyr.

Fig. II-14. Caseinglycopeptide의 N末端 Amino acid의 paper Chromatogram.

Table. II-8. para k-casein, Glycomacropeptide의 Amino acid組成

Amino acid	k-Casein		para-k-Casein			Glycomacropeptide		
	Kalan-Woychik	authors	Kalan-Woychik	authors Calf rennin	authors Mucor rennin	Kalan-Woychik	authors Calf rennin	authors Mucor rennin
Aspartic acid	11.0	11.7	8.2	8.4	8.6	3.3	3.9	3.9
Threonine	12.1	10.7	5.2	3.8	4.2	7.4	7.2	6.8
Serine	11.0	10.4	7.6	7.0	7.1	3.4	4.2	4.0
Glutamic acid	24.9	26.0	17.9	18.4	18.9	8.7	8.4	8.4
Proline	17.5	18.3	12.9	13.6	13.4	5.3	6.2	5.9
Glycine	2.6	2.6	1.7	1.9	1.9	0.8	1.1	1.2
Alanine	13.4	12.8	9.7	9.8	10.2	4.0	4.0	3.9
Valine	10.2	10.0	6.5	6.4	6.6	3.9	3.9	3.8
Methionine	1.9	2.0	1.3	1.3	1.2	0.6	0.2
Isoleucine	11.5	11.4	7.4	7.0	6.8	4.8	4.9	4.9
Leucine	8.7	9.0	8.0	8.3	8.2	0.6	1.0	1.3
Tyrosine	8.8	8.6	8.8	9.4	8.8	0.05	0.1
Phenylalanine	4.2	4.2	4.1	4.2	4.1	0.2	0.3	0.4
Lysine	9.1	9.2	7.0	6.9	6.8	2.5	1.1	1.7
Histidine	3.0	3.0	2.9	2.8	2.8	0.1	0.1
Arginine	5.0	5.0	5.0	4.9	4.7	0.3	0.3	0.4
Total residues	154.9	154.9	114.2	114.2	114.2	46.8	46.8	46.8

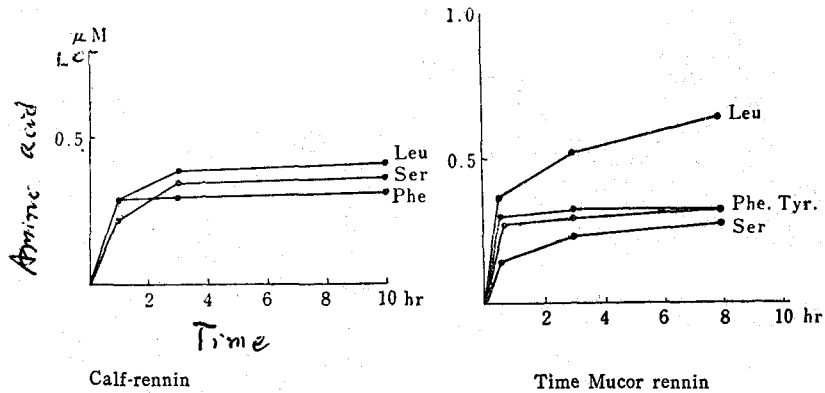


Fig. II-16. Carboxypeptidase에 의한 para k-casein의 C末端 amino acid의遊離

Fig. II-16은 para k-casein의 C末端 amino acid가 Ccase A에 의하여遊離된 Amino acid로서 對照의 CR은 Phe, Ser, Leu이遊離된 것에比하여 MR의 경우는 Phe, Ser, Leu外에 Tyr이 確認되고

同量の Tyr倍量の Leu이 檢出되었다.

MR은 Phe-Met間以外에 k-casein中の Tyr-X Leu-Y를切斷한다고生覺되나, Nijo의 Dr. De, Konig等の研究에서는 Fig. II-15과 같이 Phe,

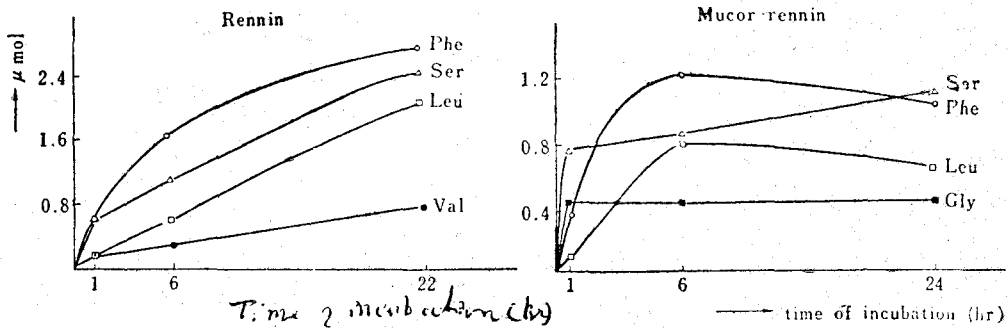


Fig. II-15. Carboxyl peptidase에 의한 para k-caslin의 C末端 amino acid의遊離

Ser, Leu은 양쪽이 다存在하나 Tyr이遊離되지 않았으나遊離된 Gly을 볼수 있었다. 그리고 MR의 N末端으로써 methionine外는檢出할수 없었다. 이것은 12%TCA中含糖 peptide가 없고 다른 peptide에는不溶性區分에包含되어있기 때문이라生覺된다.

MR에 의한 para-k-casein의 C末端 amino acid에 관한 著者の結果와 De Koning의結果가 다른原因은明確치 않으나 적어도 M.R이 k-casein의 Phe-Met間을切斷하는것은確實하다. 이 Phe-Met間은 peptide結合임으로 MR 및 CR의基質特異性

으로 볼때一次的으로切斷되리라생각하기는어려우나 그것은不安定한結合을하고있는 탓으로切斷된다고生覺된다.

k-casein中的 carbohydrate部分은 Fig. II-16과 같이結合되어있다. Calf rennin作用으로 casein glycopeptide가 생긴다. Sialic acid는 이 carbohydrate部分에 galactose와의中間에 2 Keto Sialic acid linkage을 만들고 末端基로써結合되어있다. Calf-rennin에는 이 sialic acid단을切斷遊離시키는 Neuramidase의活性은 없다. k-casein中の sialic

acid는 Warren法(Thiobarbituric發色)으로 定量된다.

Mucor-rennin을 k-casein에 作用한다음 12%TCA 中에 可溶化된 sialic acid를 定量할때 k-casein 中의 全 sialic acid의 80% 以上이 可溶性區分에 移動되고 (Table. II-8) 또 0.1N-H₂SO₄에 依하여 80°C 30

Table. II-8. Sialic acid의 含量

	Total sialic acid in casein μg/mg	Maximum sialic acid amount in TCA-soluble solution	
		μg/mg	%
x-Casein	17.78	14.22	80.5
(α ₁ +β)-Casein	3.20	0.98	30.7
Para-x-Casein	3.40		

0.6% x-casein solution, 0.6% para x-casein, solution, 1.0%(α₁+β) casein solution.

分間 處理하여 sialic acid을 carbohydrate moiety에서 遊離되지 않을 경우 Warren法으로는 陰性이였으므로 Mucor-rennin도 Neuramidase 活性이 없다.¹⁰⁾ 이러한 結果로 Mucor-rennin은 k-casein의 蛋白質部分의 peptide를 加水分解하여 para-k-casein과 caseinglycopeptide를 生成한다고 結論지었다.

iii) 凝乳機構에 있어서의 Ca⁺⁺의 作用

Calf-rennin의 M.C.A는 牛乳基質에 少量의 CaCl₂ 含量이 增加함으로써 顯著히 增加한다.^{2,11)} Mucor-

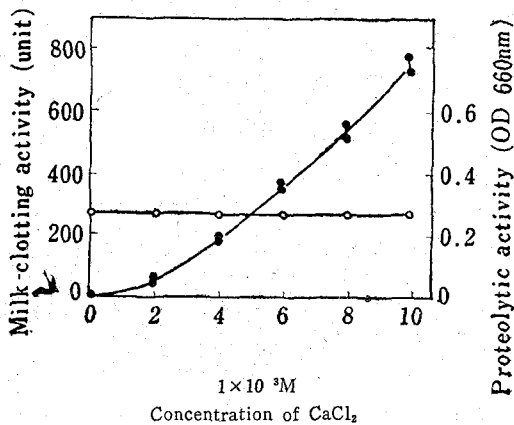


Fig. II-17. CaCl₂의 影響

●: Milk clotting activity,
○: Proteolytic activity

rennin에 對한 Ca⁺⁺濃度의 影響은 Calf-rennin보다 크다.

Proteolytic activity에 對해서는 Calf-rennin과 같이 아무런 效果가 없었다.²⁾ (Fig. II-17).

Casein의 主成分인 (α₁+β)-casein液에 一定量의 CaCl₂, k-casein, Mucor-rennin과 各各 混合하여 遠心分離後, 上層液의 Casein 溶解度를 O.D. 250 μm로 測定하였다.

Ca⁺⁺, k-casein溶液에 Ca⁺⁺, (α₁+β) Casein液의 添加量이 많아질수록 O.D. 250 μm은 增加하였으나 k-casein代身에 para-k-casein을 混合하였을 경우에는 O.D. 250 μm의 增大가 볼수 없었다(Fig. II-18). 이와같이 Mucor-rennin과 Calf-rennin은 相

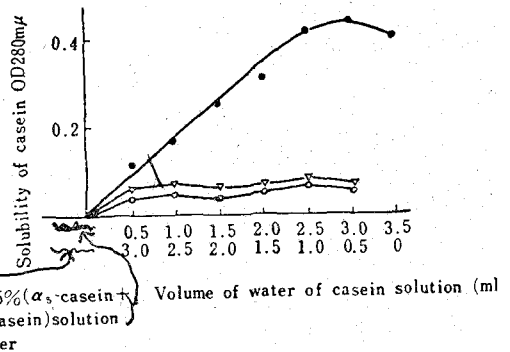


Fig. II-18. (α₁+β)-casein의 溶解度에 對한 CaCl₂, K-casein 및 para-K-casein의 影響

●: 0.05% K-Casein solution
▽: 0.05% para-K-Casein solution (M.R.)
○: 同 上 (C.R.)
each 0.5ml
0.1M CaCl₂ solution 2.0ml

互間に 各은 結果를 나타냈다.^{2,9,12)}

以上の 結果로 부터 k-casein만이 Micelle形成의 proective colloid能을 갖고 있으나 兩酵素作用에 依하여 生成된 para-k-casein은 그의 protective colloid의 性質을 잃고, Ca⁺⁺에 依하여 凝乳된다.²⁾

以上の MR의 性質, Casein에 對한 作用의 結果로 부터 MR에 依한 凝乳機構는 一次의으로 MR이 Casein micelle 中의 k-casein을 para-k-casein과

casein glycopeptide 로加水分解하여, k-casein의 micelle 保護作用을 破壞하고, 二次的으로 Ca^{++} 의 存在下에서 para casein 이 凝集 即 凝乳을 일으킨다고 생각되므로 이는 CR의 凝乳機構와 基本的으로 같다고 생각된다(Fig. II-19).

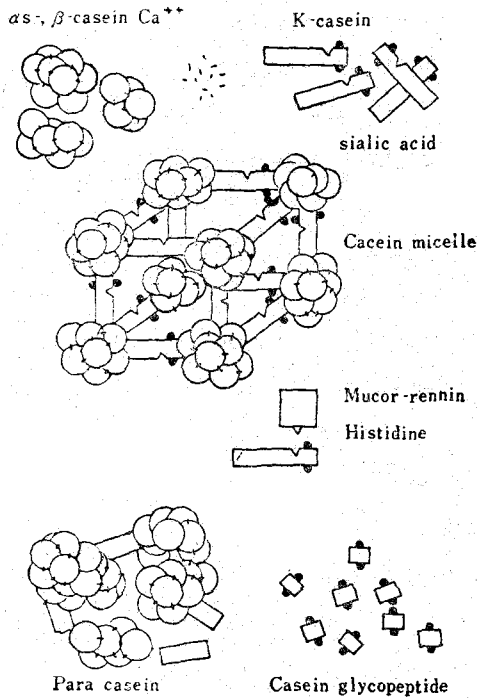


Fig. II-19. Mucor rennin의 凝乳機構

以上 Mucor-rennin의 諸性質에 對하여 記述하였으나, 이 acid protease는 Calf rennin과 類似한點이 많다. 따라서 치즈製造用으로 많은 有利한 性質을 지니고 있으며, 實際로 世界各國에서 實驗한 치즈製造結果는 Calf rennin과 比較하여 遜色없는 치즈를 만들수 있음이 證明된다.

Mucor rennin은 acid protease로써, 매우 낮은 Protease 活性과 限定된 基質特異性을 所有한 獨特한 酵素이다.

그의 立體構造 및 作用機構의 解明은 Pro tease 研究의 一環으로 重要한 意義가 있으며 今後興味있는 課題라 生覺된다.

參考文獻

- 1) J. Yu, G. Tamura and K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*, 35, 1194 (1971).
- 2) J. Yu, G. Tamura and K. Arima, *Agr. Biol. Chem.* 32, 1048 (1968).
- 3) K. Arima, J. Yu, and S. Iwasaki, *Method in Enzymology*, Academic Press, XIX, p.446 (1970).
- 4) J. Yu, G. Tamura and K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*, 35, 1398 (1971).
- 5) S. Iwasaki, T. Yasui, G. Tamura and K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1421(1967).
- 6) H. Horinishi, Y. Hachimori, K. Kurihara and K. Shibata, *Biochem. Biophys. Acta.*, 86, 447 (1964)
- 7) J. Yu, H. Osawa, G. Tamura and K. Arima, *Kor. J. Food Sci. Tech.*, 2, 43 (1970).
- 8) T. Oka, K. Ishino, H. Tsuzuki, K. Morihara and K. Arima, *Ag. Biol. Chem.*, 37, 1177 (1973).
- 9) J. Yu, H. Osawa and K. Arima, 東京大學學位論文에 發表投稿論文作成中.
- 10) J. Yu, W. Liu, G. Tamura and K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1482 (1968).
- 11) J. Yu, G. Tamura, Y. Hong and K. Arima, *J Korean Agr. Chem. Soc.*, 12, 7 (1969).
- 12) J. Yu, 東京大學博士學位(1968).

世界人口 半이상亞洲에
74年度 유엔世界人口年鑑計해

全世界 人口의 半數이상인 21억 5천 4백만명이 「아시아」에 集中되어 있으며 두번째로 人口가 많은 大陸이 「유럽」으로 4억 6천 9백만명이 살고 있다고 「유엔」의 74년도 世界 人口年鑑이 밝혔다.

72년 中半期를 기준한 이 「유엔」統計는 人口 順位로 본 世界10大國을 中共(8억 72만 1천)印度(5억 6천 3백 49만 4천) 蘇聯(2억 4천 8백만) 美國(2억 8백 84만 2천) 「인도네시아」(1억 2천 1백 63만) 日本(1억 5백 99만 4천) 「브라질」(9천 8백 85만 4천) 「멕시코」(6천 1백 67만 4천) 「페르시아」(5천 67만 5천) 「니제르」(5천 8백 2만) 順으로 꼽았다.



이 統計는 또 「네덜란드」의 女性들이 76.7세라는 世界에서 가장 높은 平均 수명을 기록하고 있으며 「스웨덴」 「아이슬란드」 「프랑스」 및 「러시아」 女性들이 76세로 그 다음을 차지하고 있다고 밝혔다.