

## 응유효소를 생산하는 *Mucor mucedo* C-7 의 분리 및 동정

조재민\* · 이용수 · 김교창<sup>1</sup>

충주공업전문대학 식품공업과, <sup>1</sup>충북대학교 농과대학 식품공학과

### Isolation and Identification of *Mucor mucedo* C-7 for Producing The Milk-clotting Enzyme

Cho, Chae-Min\*, Ung-Soo Lee, Kyo-Chang Kim<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology College of Agriculture,  
Chung-Buk National University, Cheang-Ju 363-763 Korea

This study was attempted to obtain the efficient milk-clotting enzyme from microorganisms as a rennet substitute. Fungi which showed the formation ability of the milk-clotting enzyme were selected out from samples of soil hay and wastes etc. Among these isolated fungi, strain no. C-7 which had presented higher value in the ratio of milk-clotting activity to proteolytic activity was selected. The hyphae of this strain was white to gray and no septa. A single sporangiophore which stand erectly above growing hyphae was monomucor type without branching. A globose sporangium was developed at the tip of each sporangiophore. The suitable temperature and pH for the growth of no. C-7 was 20-30°C and pH 3.0-8.0 respectively. These morphological and physiological characteristics implied that strain no. C-7 was *Mucor mucedo*.

치-즈 제조시 우유를 응고시키는데 필요한 응유효소를 calf rennet 이라 하며 이는 단백질 분해효소의 일종으로 생후 4-5주된 송아지의 제 4 위에서만 추출생산된다. 최근 치-즈의 생산 및 그 소비량이 세계적으로 매년 증가하고 있을 뿐만 아니라 송아지의 공급이 감소하는 추세이므로 calf rennet 은 그 수요를 충족시키기에는 매우 부족한 실정에 있다. 이러한 이유 때문에 1960년 초부터 calf rennet 와 유사한 성질을 가진 대용응유효소의 개발에 대한 많은 연구가 이루어졌으며, 미생물 중에서 응유효소를 생산하는 대표적인 균으로서는 세균의 경우 *Streptococcus liquifaciens*(2), *Bacillus cereus*(3), *Bacillus mesenterius*(4) 및 *Bacillus subtilis*(5) 등이 있고 곰팡이에 의한 것은 *Endothia parasitica*(6),

*Aspergillus ochraceus*(7), *Absida ramosa*(8), *Mucor pusillus*(9-12), *Mucor miehei*(13), *Mucor racemosus*(4-16)와 *Irpex lacteus*(17) 등이 알려져 있다. 한편 calf rennet 대용 응유효소로서 갖추어야 될 가장 중요한 특성은 응유활성(Milk-clotting activity : MCA)이 높은 반면 단백질 분해활성(proteolytic activity : PA) 즉 MCA와 PA의 비(MCA/PA)가 높은 것이 요구되고 있는데 그 이유는 과도한 단백질 분해력으로 그 비가 낮아지면 치-즈 제조 후 연질성 조직의 형성과 그로 인한 수율저하 및 숙성 중의 단백질 분해에 의한 peptone 화와 유리 아미노산의 생성 때문에 고미와 풍미 저해 등의 결함을 초래한다고 지적되고 있다(18-20). 오늘날 미생물이 생산한 응유효소 중에서 *Endothia parasitica*(6), *Mucor pusillus*(9-12) 등이 생산한 몇 가지 응유효소만이 calf rennet 대용효소로서 실용화되고 있는 실정이나 숙성 후 치-즈의 맛, 냄새, 조직 등의 점에서 아직도

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

\*Corresponding author

calf rennet로 제조된 치-즈에 비해 그 질이 떨어지는 실정에 있으며 또한 대용응유효소로서 사용할 수 있는 효소라 할지라도 그 종류가 한정되어 있고 효소적인 특성의 면에 있어서도 특징이 있는 효소가 거의 없는 실정에 있다. 이러한 점에서 대용응유효소의 개발을 위해 계속적인 새로운 응유효소 생산균주의 분리가 요망되고 있으므로 본 연구에서는 대용응유효소 생산균주의 분리와 균학적 특성에 대하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 분리원

균 분리원으로 충북일원의 토양, 퇴비, 하수 및 건조 등 114 시료를 수집하여 사용하였다.

### 배지

균주의 분리 및 선별균주의 형태적, 생리적 관찰을 위해 감자포도당 한천배지(감자추출물 분말 4g, 포도당 20g, 한천 20g, 증류수 1l, pH6.0)와 맥아 추출물 한천배지(맥아 추출물 분말 200g, 효모 추출물 분말 5g, 한천 20g, 증류수 1l, pH6.0) 및 Capek-Dox 씨 한천배지(자당 30g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, KCl 0.5g, NaNO<sub>3</sub> 2g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g, 한천 20g, 증류수 1l, pH6.0)를 사용하였으며 응유효소 생산균주 분리용으로는 밀기울 5g에 1배량의 증류수를 첨가한 밀기울 고체 배지를 사용하였다.

### 균의 분리

분리원을 멸균 생리 식염수에 현탁하여 적당히 희석한 후 앞에서 조제한 맥아 추출물 한천배지, 감자포도당 한천배지 및 Czapek-Dox 씨 한천배지에 표면 도말하고 30°C에서 5일간 배양하여 나타난 독립된 집락으로 순수 분리하고 분리한 균주는 다시 Single spore isolation 법(21)에 의해 순수분리하였다.

분리균주는 고체배지에 1백금니씩 접종한 후 30°C에서 48시간 배양한 다음 조효소액을 추출하여 응유활성과 단백질 분해활성을 측정하여 응유효소 생산균주를 선별하였다.

### 조효소액의 조제

상기의 방법과 같이 밀기울 고체배지에 배양한 후 기본배지에 대하여 10배량의 증류수와 소량의 toluene을 첨가하여 실온에서 2시간 교반 진탕시키고 5°C에서 일주야 정치하여 효소를 추출한 다음 5000×g에서 20분간

원심분리하여 얻어진 상정액을 동양여지 No.2로 여과하여 그 여액을 응유활성과 단백질 분해활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다.

### 응유활성의 측정

응유활성의 측정은 1/100 M CaCl<sub>2</sub>를 함유한 10% 환원 탈지유를 기질로 사용하여 Berridge(22, 23)와 Arima(24)의 방법을 병용하여 측정하였다. 시험관에 기질액 5ml를 주입하고 이를 35°C에서 10분간 보온한 다음 여기에 조효소액 0.5ml를 가하여 즉시 혼합하고 이를 35°C로 미리 조정된 항온조에 넣어 시험관을 30-40°로 눕혀 서서히 회전시키면서 조효소액 혼합 이후부터 우유액이 시험관 내면벽에 유응고 입자가 출현하기 시작할 때까지의 시간을 응고시간으로 하여 다음 식에 의해서 응유활성(MCA)을 Soxhlet unit로 나타내었다.

$$MCA(u) = S/E \times 35^\circ C / T \times 2400/t$$

MCA = Milk-clotting activity

u = Soxhlet unit

S = Volume of skim milk solution (ml)

E = Volume of crude enzyme solution (ml)

T = Milk-clotting time (sec)

### 단백질 분해활성의 측정

단백질 분해활성의 측정은 0.6%-Hammerstan casein 용액을 기질로 하여 Arima(24)와 Anson의 변법(25)에 따라 기질용액 5ml에 조효소액 1ml를 첨가하고 35°C에서 10분간 반응시킨 후 즉시 0.44 M TCA 용액 5ml를 가하여 이를 다시 35°C에서 20분간 보온한 후 동양여지 No.2로 여과하였다. 여액 2ml에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5ml와 Folin 시액(3배 희석액) 1ml를 첨가하여 35°C에서 20분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 분해활성의 값으로 나타내었다.

### 선별균주의 동정

선별균주의 형태적 생리적 특성을 Gilman(26) 및 宮路(27)의 방법에 따라 검토하였다. 균의 형태적 및 크기의 측정은 선별균주를 감자포도당 한천배지에 접종한 후 30°C에서 5일 동안 배양한 다음 현미경과 micrometer를 이용하여 측정하였으며 생육온도와 pH의 범위는 배지의 pH를 2.0-10.0의 범위가 되게 각각 조제한 다음 균주를 1백금니씩 접종하여 배양온도를 0°C-40°C의 범위에서 일정시간 배양한 후 생산된 균괴의 건조중량으로 생육온도와 생육 pH를 측정하였다.

결과 및 고찰

균의 분리 및 선별

토양, 건조, 퇴비 등으로부터 순수분리한 균주들을 밀기울 기본배지에 각각 접종 배양한 후 조효소액을 추출하여 유응고 능력을 시험한 결과 60분 이내에 우유를 응고시킬 수 있는 16 균주들을 선별하였다. 이들 균주 중 MCA/PA의 비가 높은 균주를 선별하기 결과는 Table 1과 같다. 대부분의 균주는 MCA와 PA의 비가 낮았으나 이 중 균주번호 C-7의 경우에 1,929로 가장 높았다. 또 Arima 등(18)의 보고에 의하면 치즈 제조에 필요한 MCA와 PA의 비는 적어도 5,000 이상이어야 한다고 하였으나 선별된 C-7의 경우 이 값에는 미치지 못하였다. 그러나 현재 공업적 생산에 사용되고 있는 *Mucor pusillus* rennet의 경우 균주분리 당시 그 비는 2,000이었으나 이를 정제한 후의 비는 4,650 unit로 증가되었으며 또 Ca ion 농도를 미량(각국의 치즈 제조의 법규 범위내에서) 증가시킴으로 이의 비를 2배 이상 증가시킬 수 있었다고 하였다(24, 28). 본 실험에서 선별된 균주가 생산한 응유효소는 대용효소로서 그 가능성을 가지고

있다고 생각된다.

선별균주의 동정

선별된 C-7 균주의 형태적 및 생리적 성질을 조사하여 Fig.1과 Table 2에 나타내었다. 선별균주는 백색으로 털모양의 집락을 형성하였으나 자라면서 회백색으로 되었으며 포자낭병은 monomucor 형으로 그 끝은 부풀어 원통형의 증축이 되었고 그 상단에는 구상의 포자낭을 형성하였으며 포자낭 포자는 원형 또는 타원형이었다. 생육온도 범위는 5-35°C로 35°C 이상에서는 잘 자라지 못하였고 생육 최적온도 범위는 20-30°C였으며 이는 Domsh 등에 의하면 *Mucor mucedo*의 생육온도 범위는 일반적으로 25°C까지이며 30°C에서는 생육하지 않는 것으로 알려져(29) 생육온도 범위에서 다른 값을 나타내었다. 또 생육 최적 pH 범위는 3.0-8.0이었다. 그외의 여러 가지 특성을 바탕으로 C-7 균주는 Gilman(26) 및 宮路(27)에 따라 *Mucor mucedo*로 동정되었다.

Table 1. Produciton of milk-clotting and proteolytic enzymes by the isolates.

Strains	MCA (u/g wheat bran)	PA (O.D at 660 nm)	MCA/PA ratio
A-3	3,320	0.32	1,038
A-4	2,220	0.45	493
B-9	1,600	0.38	421
C-3	1,530	0.25	612
C-7	4,050	0.21	1,929
D-5	2,870	0.43	667
D-8	1,330	0.37	359
D-10	3,970	0.38	1,045
G-2	816	0.38	215
G-3	1,890	0.26	727
H-1	800	0.32	250
H-4	714	0.28	255
K-8	2,500	0.35	720
P-4	1,900	0.25	760
R-7	851	0.25	340
S-10	1,140	0.44	259

MCA: Milk-clotting activity (soxhlet unit/ml)  
 PA: Proteolytic activity (O.D 660 nm/ml)  
 Culture temperature; 30°C, Culture time; 48 hrs.

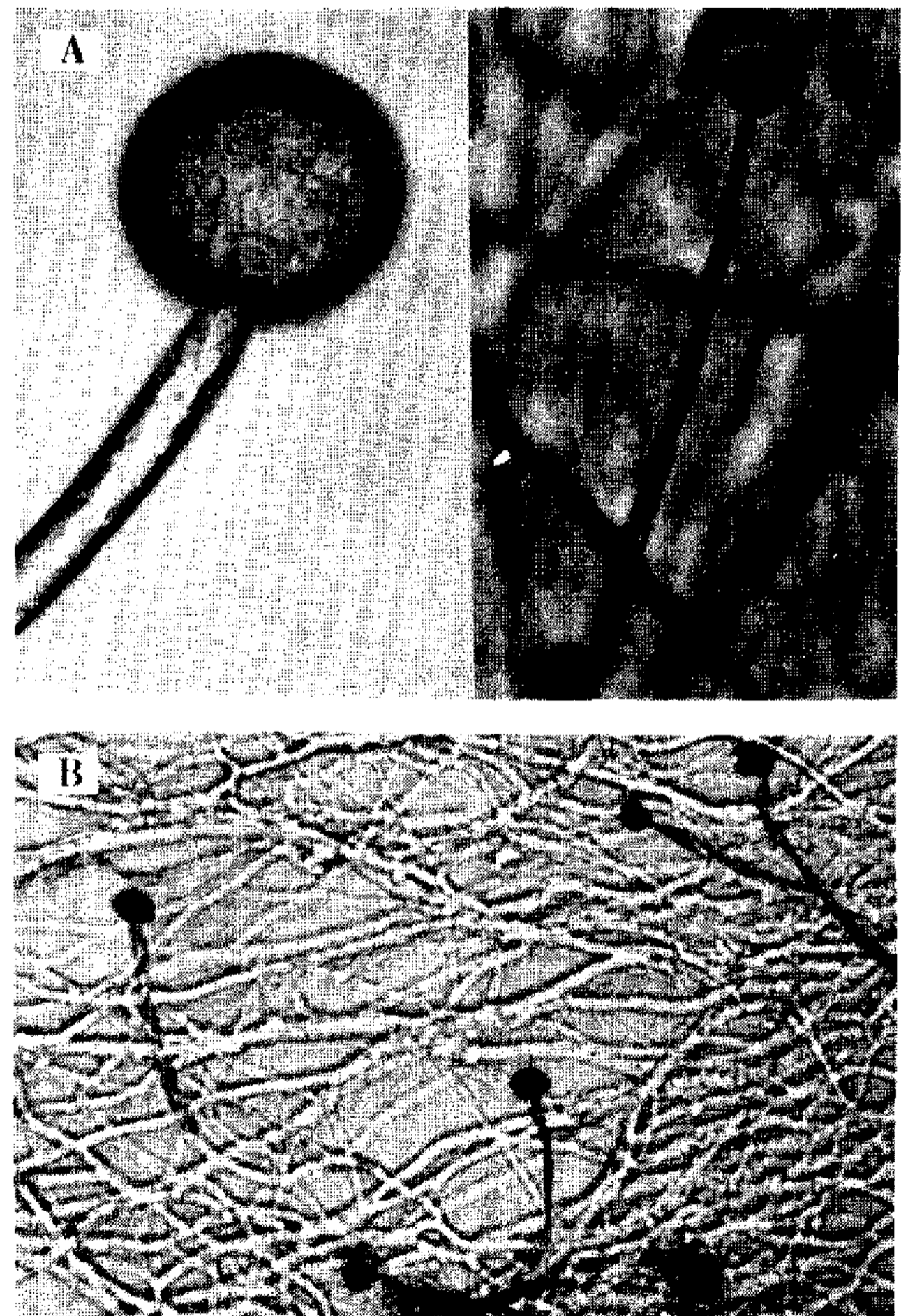


Fig. 1. The Photograph of *Mucor mucedo* C-7.  
 A: Sporangiphore and sporangium  
 B: Mycelia and sporangia

**Table 2. Taxonomical Characteristics of isolated Fungus C-7**

1. Cultural characteristics on various media
Malt extract agar; good growth, young turf white to yellow, later pale gray variable in height.
Potato dextrose agar; abundant growth, young turf white to golden brown later pale gray, variable in height.
Czapek-Dox agar; poor growth.
Temperature; grows at 5-35°C, growing well at 20-30°C, no growth at 35°C.
pH; grows at pH 2.0-10.0, growing well at pH 3.0-8.0
2. Morphological characteristics
Sporangiophore; silvery-gray, without septa, not branched.
Sporangium; at first yellow, then deep gray or brownish-black, 100-200 μm in diameter.
Columella; cylindrical or ellipsoidal or spherical shape, 70-140 μm long × 50-80 μm wide.
Sporangiospore; elliptic or subcylindric shape of very various sizes in the some sporangium, 6-12 μm long × 3-6 μm wide with a smooth hyalin wall.
Zygosporangium; spherical shape, 90-250 μm in diameter, on germination the zygosporangia give to sporangia on unbranched sporangiophores.

## 요 약

대용응유효소를 생산하는 균주를 선별하기 위해 토양, 건초, 퇴비 등 114 시료를 분리원으로 하여 응유효소를 생산하는 16 균주를 분리하였으며 이들 각 균주들이 생산하는 유응고력과 단백질 분해력의 비는 균주번호 C-7 것이 1,929로 가장 좋았다. C-7 균주의 균사는 회백색으로 격막이 없었고 포자낭병은 균사로부터 단독으로 곧게 뻗어 갈라지지 않은 monomucor 형으로 그 끝은 구형의 포자낭을 형성하였으며 적합한 생육온도와 생육 pH의 범위는 20-30°C, pH 3.0-8.0 이었다. 형태적, 생리적 여러 특성에 따라 C-7 균주는 *Mucor mucedo* 로 동정되었다.

## 참고문헌

- Sardinas, J.L.: *Adv. in Applied Microbiology*, **15**, 39 (1972).
- Srinivasan, R.A., S.A. Anantharamiah and C.P. Anantkrishan: *Indian J. Dairy Sci.*, **22**, 149 (1968).
- Choudhery, A.K., E.M. Mikolajcik: *J. Dairy Sci.*, **54**(3), 321 (1971).
- Barkan, S.M., O.K. Ramazanov and A.A. Yulius: *Dairy Sci. Abstr.*, **27**, 152 (1965).
- Puhan, Z.: *J. Dairy Sci.*, **52**(9), 1372 (1969).
- Sardinas, J.L.: *Appl. Microbiol.*, **16**(2), 248 (1968).
- Foda, M.S., A.A. Ismail and M.K. Khorshid: *Milchwissenschaft*, **30**, 598 (1975).
- Sannabhadti, S.S., R.A. Srinivasan: *J. Food Sci. Technol.*, **13**, 305 (1976).
- Arima, K., J.H. Yu, S. Iwasaki and G. Tamura: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1727 (1968).
- Yu, J.H., G. Tamura and K. Arima: *Biochem. Biophys. Acta*, **171**, 138 (1969).
- Yu, J.H., S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima: *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1051 (1968).
- u, J.H., G. Tamura and K. Arima: *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1048 (1968).
- Sternberg, M.Z.: *J. Dairy Sci.*, **52**(2), 159 (1971).
- Higashio, K. and Y. Yoshioka: *J. Agric. Chem. Soc.*, **55**(7), 561 (1981).
- Higashio, K. and Y. Yoshioka: *J. Agric. Chem. Soci.*, **55**(10), 573 (1981).
- Higashio, K. and Y. Yoshioka: *J. Agric. Chem. Soci.*, **55**(10), 951 (1981).
- Kawai, M.: *J. Agric. Biol. Chem.*, **35**(10), 1517 (1971).
- Arima, K., J.H. Yu: *J. Ferman. Associ.*, **30**(10), 281 (1972).
- Holmes, D.G., J.W. Duersch and C.A. Ennstorm: *J. Dairy Sci.*, **60**, 862 (1977)
- Harper, W.J. and T. Kristoffersen: *J. Dairy Sci.*, **39**, 1773 (1956).
- Booth, C.: *The Genus Fusarium, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England* (1971).
- Berridge, N.J.: *J. Dairy. Res.*, **19**, 328 (1952).
- Berridge, N.J.: *Analyst*, **77**, 57 (1952).
- Arima, K., S. Iwasaki and G. Tamura: *Agric. Biol. Chem.*, **31**(5), 540 (1967).
- 赤堀四郎: *酵素研究法*(朝倉書店), **2**, 241(1956).
- Gilman, J.C.: *A manual of soil Fungi* (The Iowa State



- University press) (1957).
27. 宮路憲二：應用菌學(岩波書店)，2, 422(1974).
28. Yu, J.H.: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng*, 2(1), 57 (1974).
29. Domasch, K.H., W. Gams and T.-H. Anderson: *Comedium of soil Fungi*, Academic press, London, 1, 473 (1980).

(Received August 21, 1990)