

Cheese 製造와 微生物凝乳酵素 Mucor-rennin

延世大學校 理工大學 工學部 食品工學科 醱酵工學研究室

柳 洲 鉉

Cheese 製造上 없어서 안되는 酵素 rennet 는 生後 2~3週된 송아지의 第 4 胃에만 存在한다. 이를 代用할 수 있는 Cheese 製造用으로 實用化 할 수 있는 酵素의 開發은 産業上 重要的 意義가 있다.

第一은 宗教上的 理由 때문에 rennet Cheese 를 섭취할 수 없는 사람도 있다.

第二는 最近 세계의 Cheese 소비량이 增大함에도 불구하고 食用肉으로써 송아지를 屠殺하지 않고 다시 飼育하는 경향이 있으므로, rennet 은 매우 부족하다. 따라서 세계적으로 rennet 代用酵素의 研究는 活潑히 進行되어 凝乳酵素는 많으나 이들 大部分의 酵素는 凝乳力에 比하여 蛋白質分解力이 強力함으로 實用上 결함이 있다.

흙으로부터 分離된 *Mucor pusill* 는 實用化 할 수 있는 rennet 代替酵素를 生産함으로 結晶酵素 (Mucor-rennin)의 生産 및 성질을 檢討하고 그의 實用性인 Cheese 製造 實驗에 關하여 發表하고자 한다.

1. *Mucor-rennin* 의 生産과 精製

흙으로부터 分離한 균주 500株에 對하여 凝乳力 生産性を 檢索한 結果, 흙으로부터 分離한 *Mucor pusillus Lindt* 에 屬하는 1株가 가장 強力한 酵素 生産을 나타냈다. 本酵素(以下 MR 로 略記)는 밀기울을 培地로하여 30°C, 70時間의 好氣條件으로 固體培養法을 함으로써 酵素生産이 높았다.

酵素는 물로 抽出하며, 硫酸鹽析 또는 Ethyl alcohol 침전등으로 회수한 다음 건조분쇄하여 粉末酵素를 얻는다. 好氣的인 液體培養으로도 酵素 生産은 볼 수 있으나, 固體培養法이 有利하다. 現在는 製麴法으로 工業生産을 하고 있다.

粉末酵素를 물에 溶解시켜 Amherlite CG-50, DEAD Sephadex A-50, Sephadex G-100의 Column 으로 정제한다.

精製된 酵素의 농도를 2~3%로 조절한 다음,

硫酸을 사용하여 著者が 생각한 자연증발結晶化法 또는 透析結晶化法으로 結晶化시켰다. 結晶酵素 Mucor-rennin(以下 MRC 라 略記)의 形態는 硫酸 濃度の 增加速度 단백질의 濃度 등의 條件에 따라 六角 橢圓 正四角形 圓板狀이었다.

그러나 酵素의 形態에 關係없이 比活性은 서로 같았다.

2. MRC 의 物理 化學的 性質

MRC 용액은 60°C, 10分間 處理에 對하여 pH 4 ~6에서 安定하고, pH 5에서 더욱 耐熱性이 強하다. pH 5에서는 30°C 15日間 放置한 後에도 失活 치 않았다.

蛋白質加水分解作用의 最適 pH는 Hemoglobin 의 基質에서 pH 4, K-casein 基質에서 pH 4.5를 나타냈다. 脫脂粉乳에 對한 凝乳活性은 pH 5.5가 最適條件이고, 反應溫度 30°C보다 60°C 쪽이 凝乳 速度가 빨랐다.

MRC 의 Casein 分解에 對한 凝乳活性의 比率 (Units/OD660) (4650 units/O. D660)은 송아지 rennin(7350 units/O. D660)의 63%이고, Cheese 生産에 利用할 수 없는 凝乳酵素들(393units/O. D660 以下)에 比하여 높은 酵素이다. 凝乳作用에 對하여 Ni, Hg, Cu, Co, 등의 ion 은 阻害作用을 나타내고, Mg, Ca, Cd 등의 ion 은 促進效果를 나타냈다.

K-Casein 또는 Hammarsten casein(whole casein) 의 Agar gel plate 을 만들어 각 Protease 의 白濁 zone 形成의 면적을 比較檢討할때, Mucor-rennin 은 Cheese 제조용으로 利用되고 있는 結晶 rennin Hansens cheese rennet 의 酵素와 같이 形成된 白濁 zone 의 Hammarsten Casein gel 보다 K-Casein gel 에서 빨리 形成된다. Cheese 製品에 利用될 수 없는 다른 Protease 등의 zone 면적은 兩 Casein gel 上에서 多小의 差를 나타내고 K-Casein gel 보다

Hammarsten casein gel 上에 形成되는 zone 쪽이 넓은 Protease 도 있다.

結晶酵素의 物理的性質은 $V : 0.74$, $S_{20W} : 2.39 \times 10^{-13}(\text{cm}^2/\text{dyne}/\text{g})$, $D_{20W} : 7.9 \times 10^{-7}\text{cm}^2/\text{sec}$, $f/f. : 1.33$, 이고, 分子量은 Suedberg 法으로 29,000, Yphantis 法으로 30600, Andrews 法은 32,500이었다. 摩擦比가 1.33임으로 球狀의 蛋白質은 아니고 또 水和性蛋白質이라 생각된다. Andrews 法은 球狀蛋白質의 경우만이 잘 適用됨으로 MRC의 分子量은 Yphantis 法과 Suedberg 法에 따라 分子量은 $29,800 \pm 800$ 으로 決定되었다. 酵素蛋白質의 分子量을 30600으로 하여 그의 Amino acid 分析值로 부터 算出時 Amino acid 組成은 $(1/2 \text{ Cys})_2$, Met_3 , $\text{Asp}_{44 \sim 45}$, Thr_{22} , $\text{Ser}_{22 \sim 23}$, glu_{20} , $\text{Pro}_{14 \sim 15}$, Gly_{34} , Ala_{17} , Val_{24} , Tle_{12} , Leu_{15} , Tyr_{13} , Phe_{20} , $\text{His}_{1 \sim 2}$, $\text{Lys}_{11 \sim 12}$, Arg_4 , $\text{Try}_{2 \sim 3}$ 등의 227~281 殘基로 構成되어 있다.

3. MRC의 作用

i) 活性中心; MRC는 PCMB, N-ethylmaleimide DFP 등에 依하며 저해되지 않는다. 이것은 SH 基 또는 Ser 殘基가 酵素活成에 關與하지 않음을 뜻한다. 沃素를 作用하였을 때, 中性附近에서 阻害가 나타난다. 弱酸性側에서도 약간의 阻害가 생긴다. ⁽³⁾I₂을 여러 pH에서 酵素에 作用시켰을 때, pH 5.0以下에서는 酵素蛋白質에 6,000Cpm以下, pH 6.0以上에서는 10,000Cpm以上の 取込이 觀察되었다. 이 結果로 부터 Mucor-*rennin*의 蛋白質中の His, Trp 또는 Tyr 殘基의 어느것인가 또는 전체가 酵素活成에 關與하는 것으로 생각된다. Mucor-*rennin*을 Methylene-blue 存在下에서 光酸化하면, 250m μ 附近吸收가 높아진다. 光酸化가 進行됨에 따라 O.D. 250m μ 附近的 吸收는 증가한다. 그와 더불어 凝乳活性은 감소한다. 光酸化 前後의 酵蛋白質의 Amino acid 分析을 行한 結果, Trp, Ty₂, His 이 減少한다. 이들中 His의 감소율과 凝乳活性減少率은 平行關係에 있다. 이 結果로 부터 His 殘基의 1 또는 2分子가 活性中心에 存在한다고 推定된다. 蛋白質中の His은 diazo-I-H-tetragole (DHT)의 作用에 依하여 O.D. 480m μ 이 測定된다 MRC을 DHT와 作用시킬 때 活性을 阻害되고, 그와 더불어 O.D. 480m μ 은 增大한다. 終時的으로 O.D. 480m μ 의 値와 殘存活性의 變化를 追跡하였을 때 O.D. 840m μ 의 値가 最大反應時的 値의 50%가 되었을 때 凝乳活性은 完全히 阻害되었다. 즉

MRC蛋白質 中の 2개의 His 殘基에서 1개가 酵素活成에 關與한다고 推定된다.

ii) 基質의 特異性:

Mucor-*rennin*의 基質特異性을 多種의 合成 Peptide을 가지고 檢討時, Ac-Phe- \perp -Tyr, E-Phe- \perp -Leu, E-Phe- \perp -Phe, E-Gly-Phe- \perp -Leu-Ala E-Ala-Phe- \perp -Leu-Ala 등의 Peptide를 加水分解시킨다. insulin B chain은 Phe- \perp -Val-Ala- \perp -Leu- \perp -Tyr \sim , \sim Phe- \perp -Phe \sim 의 位置를 加水分解한다.

iii) Ca⁺⁺의 作用:

Ca⁺⁺은 Mucor-*rennin*의 凝乳作用을 促進한다. 凝乳檢機構에 있어서 Ca⁺⁺은 酵素的인 Casein 分解作用과 非酵素的인 Para Casein 과의 어느 단계에 反應하여 凝乳活性을 活性化하는가에 對하여 檢討하였다. 脫脂牛乳基質에 여러 濃度の Ca⁺⁺을 加하여 經時的으로 Protease 活性(Casein 加水分解速度)과 凝乳活性을 測定하였을 때, Ca⁺⁺은 Protease 活性의 促進效果는 없고, 凝乳活性에 만이 促進效果가 있었다.

K-, ($\alpha_s + \beta$)-Casein... MRC로 反應하여 얻은 Para-K-Casein 액의 各各, K+ ($\alpha_s + \beta$)-, Para K-, ($\alpha_s + \beta$)의 혼합 Casein 액등에 Ca⁺⁺을 加하였을 때 Ca⁺⁺으로 K-Casein은 沈澱하지 않으나, ($\alpha_s + \beta$)-, 또는 Para-K-Casein은 沈澱하였다. K-Casein은 ($\alpha_s + \beta$)-Casein을 保護하여, K-($\alpha_s + \beta$)-Casein-Ca의 Micelle을 形成하여 白濁하지만 K-Casein代身에 Para-K-Casein을 加하면 保護作用을 나타내지 않고 Casein이 沈澱한다. 이러한 結果로부터 Ca⁺⁺은 Mucor-*rennin*의 凝乳機構에 있어서, Casein의 酵素分解에 關與치 않고 非酵素的反應에 卽 Para-Casein에 結合하여 凝乳活性을 增加시킨다고 생각된다.

Casein 1mg 中の Sialic acid 含量을 分析하였을 때 K-Casein은 17.8 μ g, ($\alpha_s + \beta$) Casein은 3.2 μ g을 各各 나타냈다. 이 Casein을 MRC로 反應하였을 경우 Sialic acid는 Para-Casein의 안에는 微量存在하고 大部分은 TCA 中에 包含되어 있었다. 이 sialic acid는 Casein glycopeptide에 結合되어 있고 이 MRC는 Neuramidase의 活性이 없다고 본다.

以上 記述한 結果로 부터 다음과 같이 結論지을 수 있다. MRC는 송아지 rennin과 매우 類似한 性質을 갖고, 構成 Amino acid 277~281個, 分子量 29800인 Acid protease이다. 그의 Protease 活性中心에는 His 殘基가 關與하여 最初牛乳中에 存在하고 있는 K-Casein의 Peptides를 加水分解하여

Micelle의 保護作用을 상실케 하고, 그 後 二次的으로 Ca^{++} 이 Para-Casein과 結合하여 Casein의 凝固가 일어난다.

4. Cheese 製造實驗

使用한 凝乳酵素가 지니고 있는 Protease 作用이 Cheese의 熟成에 큰 영향을 미친다는 것은 乳酸균만을 Starter로써 利用하는 熟成期間이 긴 硬質 Cheese이다. 그로 인하여 gouda cheese의 試驗을 行하였다. 熟成 5個月까지의 各 단계에서 分析을 行하였을 때 cheese의 製造는 송아지 rennet과 거의 비슷하게 되고, 收率 또는 그 外에 差는 볼 수 없었다. 다만 Curd 절단시, 張力이 약간 柔하게 관찰되었으나 이것은 靜置時間을 數分延長하면 회복된다. Cheese의 熟成度中 MRC Cheese는 송아지 rennet cheese에 比하여 높은 熟成度를 나타내고, 低分子의 窒素分布도가 높으나 水溶性蛋白態 窒素단은 송아지 rennet cheese 쪽이 높았다. 또

非蛋白態窒素단은 송아지 rennet cheese 쪽이 높았다.

製造 cheese의 風味는 對照와 다름이 없었고, 그외의 Swiss Cheese, Camembert cheese를 包含한 數種의 cheese를 製造하였으나 그의 收率, flavor에 差가 없었다.

치자로 부터 抽出한 黃色色酵의 적당량으로 cheese를 착색 시켰을 때 색이 좋았고, 맛에도 영향을 주지 않았다. 大豆乳蛋白質 適當量 混用하였을 때 大豆臭가 없었다.

以上 說明한바와 같이 *Mucor pusillus*가 生産하는 Mucor-rennin은 송아지 rennet을 代身하여 cheese 酵造에 利用할 수 있음이 分明하고, 本酵素는 歐美各國에서 cheese 製造實驗을 行한 다음, 송아지 rennet 代用 酵素로써 높이 評價되고 있으며, 송아지 rennet 不足情勢에 비추어 産業界에 寄與함이 크다고 생각된다.