

Dothiorella ribis 가 생산하는 응유효소에 관한 연구

제 2 보 응유효소로서의 일반적 성질

김유삼 · 홍윤명* · 유주현

연세대학교 이공대학공학부 식품공학과 · *화공과
(1971년 9월 9일 수리)

Studies on Milk-clotting Enzyme of *Dothiorella ribis*

Part II. Properties of the Enzyme

by

Yu Sam Kim, Yun Myung Hong* and Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering, College of Science and Engineering, Yonsei University

(Received September 9, 1971)

Abstract

The amount of the milk clotting enzyme which is produced by *Dothiorella ribis* in wheat bran was 950 Soxhlet units per gram of wheat bran. The milk clotting activity of this enzyme was increased by the elevation of clotting temperature and by the increase of the addition of CaCl_2 to milk. It was also increased when the pH of milk was lower than that of the fresh milk.

When milk was diluted by distilled water, the milk clotting activity of the enzyme was decreased. And its milk clotting activity was good when milk was pasteurized at low temperature. The enzyme of *Dothiorella ribis* has larger proteolytic activity per Soxhlet unit than that of the milk clotting enzyme of *Mucor pusillus* Lindt.

This enzyme was rather stable between pH 6 and pH 8 when it was conditioned for ten minutes. The heat stability of enzyme was tested by treating it under the condition for 10~60 minutes. And the enzyme was stable under the temperature of 45°C.

Also the recovery of protein as a form of curd was 76.2 percent to the total protein content of milk.

서 론

전보⁽¹⁾에서는 토양 및 보존균 중에서 응유효소 생산균으로 *Dothiorella ribis* 를 선정, 밀기울에 배양하여 응유효소를 생산할 때의 배양조건을 검토한 결과를 보고 하였다.

본보에서는 *Dothiorella ribis* 를 밀기울에 다량배양하여 생산한 불순효소의 응유효소로서의 일반적 성질을

검토하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 실험방법

효소액 : 전보에서 검토, 보고된 최적 배양조건하에서 *Dothiorella ribis* 를 배양하여 추출된 효소액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 포화, methanol, ethanol, acetone 의 첨가 등으로 효소를 침전시켰으며 acetone 에 의한 침전에서 효소의 회

* Department of Chemical Engineering, Yonsei University.

Table 1. The effect of chemical reagents on the recovery of milk clotting enzyme from extracted enzyme solution

(NH ₄) ₂ SO ₄	Saturation	0.26	0.39	0.53	0.66	0.79	
	Recovery of milk clotting enzyme (%)	6.46	12.1	25.4	36.0	46.1	
Ethanol	Ethanol (vol) per extracted enzyme solution(vol)	0.5	1	1.5	2	2.5	3 3.5
	Recovery of milk clotting enzyme (%)	9.2	12	60	73.5	82	76.6 82
Methanol	Methanol(vol) per extracted enzyme solution(vol)	0.5	1	1.5	2	2.5	3
	Recovery of milk clotting enzyme (%)	7.52	13.7	55.5	72	58	61.2
Acetone	Acetone(vol) per extracted enzyme solution(vol)	0.5	1	1.5	2	2.5	3
	Recovery of milk clotting enzyme (%)	8.16	60	90	78.2	80	78.2

수율이 높았고 따라서 acetone 에 의해서 침전시켜 회수된 효소를 증류수에 용해시켜 효소액 단위 ml 당 1,168 Soxhlet unit (S.U.)인 것을 사용하였다.

단백질분해력 : Anson 방법을 사용하였으며 측정온도는 30°C 이고 Folin 시약에 의해서 발색시킨 후 UV & VIS Spectrophotometer (HITACHI MODEL 101)로 파장 660 m μ 에서 흡광도를 측정하였다.

단백질회수율 : 0.01 M CaCl₂ 를 가한 우유 50 ml 을 30°C 에서 10분 동안 응고할 수 있도록 효소액을 가하여 응고시킨 다음 생성된 curd 를 잔개 부수고 40°C 까지 온도를 상승시키면서 20 분간 처리한 다음 원심분리하여 whey 중의 단백질함량(a)을 Kjeldahl 방법으로 분석하여 같은 방법으로 분석된 우유 중의 총 단백질함량(b)의 의 아래와 같은 비로서 백분율로 표시하였다.

$$\text{단백질회수율(\%)} = \frac{b-a}{b} \times 100$$

실험 결과

효소의 생산

밀기를 1 kg 에 sucrose 3%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, KH₂PO₄ 0.03%, NaCl 0.03% 가 포함되도록 가한 다음 1N HCl 에 의해서 pH 4.0 으로 조정된 물을 70% 산수시키고 1.5 kg/cm²의 압력에서 20분간 가압증기살균하여 고체배지를 만들었다. 그후 *Dothiorella ribis* 의 종균을 접종시켜 30°C 에서 4일간 배양시킨 다음 분쇄하여 수도물로 15°C에서 3시간 추출한 효소액의 총량을 2l 가 되도록 하였다 이 효소액의 총 응유활성은 950,000 S.U.로써 밀기를 1g 당 950 S.U.의 응유효소를 얻을 수 있었다.

응유작용의 온도에 관한 영향

각 온도에서 10%탈지분유액 5 ml 에 효소액 0.1 ml 를 가하여 응유력을 측정해본 결과 Fig. 1 과 같이 측정된 온도범위에서 거의 비례적으로 온도상승에 따라 응유

력은 증가되었다.

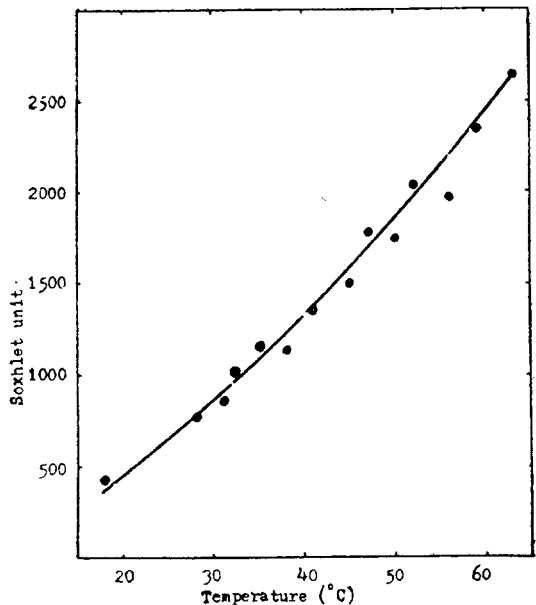


Fig. 1. Effect of temperature on milk clotting activity of rennet of *Dothiorella ribis*

Calcium 농도의 영향

생유 및 탈지분유액에 CaCl₂ 를 가하여 calcium 의 농도를 증가시켰을 때 두 가지 경우 정도의 차이는 있으나 응유력은 다같이 증가되었다.

pH 의 영향

탈지분유액(pH 6.5)을 10% lactic acid 및 0.1N NaOH 로서 pH 를 조정하여 응유력을 측정해 본 결과 탈지분유액의 pH 가 보다 산성일 때 응유력은 증가됨을 알수 있었다.

우유회석의 영향

생우유를 0.01M CaCl₂ 용액 및 증류수로 희석시켰을

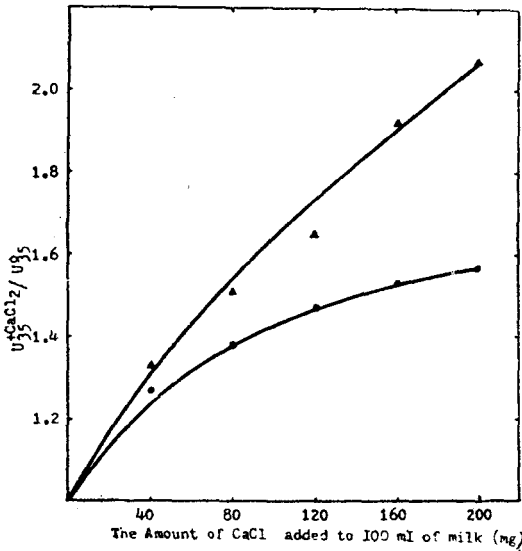


Fig. 2. Effect of Ca concentration on milk clotting activity of rennet of *Dothiorella ribis*
 —●—; Milk contained 0.1M CaCl₂ 5 ml per 100 ml of milk —▲—; 10% skim milk solution
 * U₃₅; Soxhlet unit at 35°C

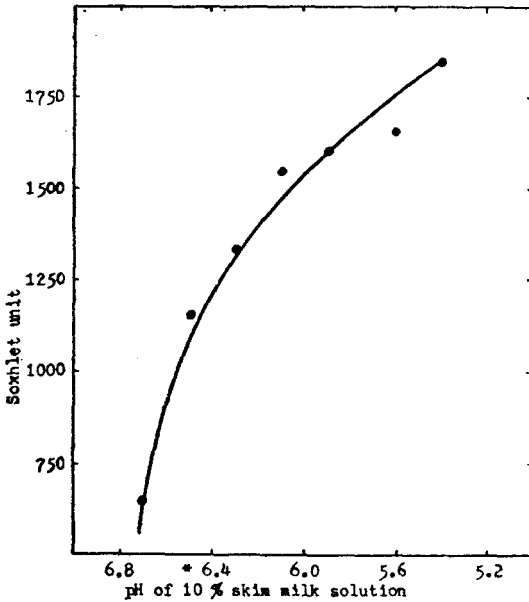


Fig. 3. Effect of pH of skim milk solution on milk clotting activity of rennet of *Dothiorella ribis*
 * pH of original skim milk solution

때 Fig. 4 와 같이 CaCl₂ 용액으로 희석시킨 경우에는 우유의 농도가 60% 정도 까지는 약간의 용유력 증가를 보이다가 그보다 더욱 희석되면 급격히 용유력이 감소됨을 알 수 있었으며 탈지분유의 경우에도 Fig. 5 와 같이 생유의 경우와 비슷한 결과가 나타남을 알 수 있었다.

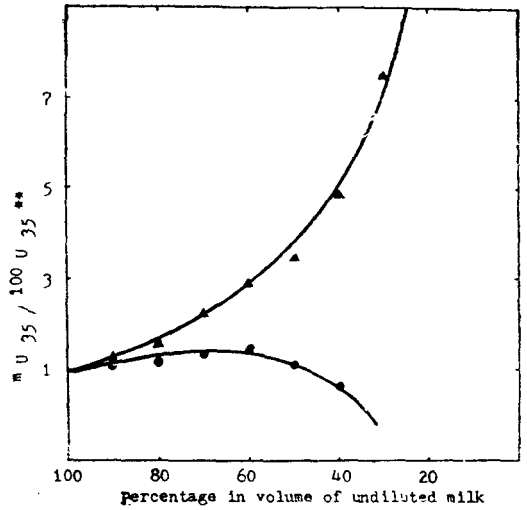


Fig. 4. Effect of dilution of milk on milk clotting activity of rennet of *Dothiorella ribis*
 —▲—; Dilution with 0.01M CaCl₂ solution
 —●—; Dilution with distilled water
 * Milk contained 0.1M CaCl₂ 5 ml per 100 ml of milk
 ** 100 U₃₅; Soxhlet unit on undiluted milk at 35°C

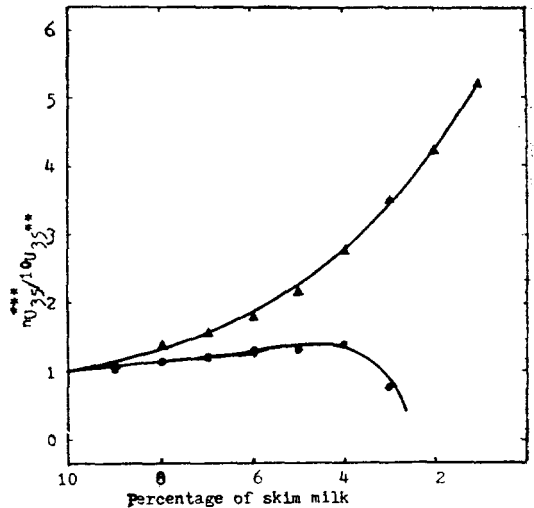


Fig. 5. Effect of dilution of skim milk solution on milk clotting activity of rennet of *Dothiorella ribis*
 —▲—; dilution with 0.01M CaCl₂ solution
 —●—; dilution with distilled water
 * 10% skim milk solution with 0.01M CaCl₂ solution
 ** 10U₃₅; Soxhlet units on 10% skim milk solution at 35°C
 *** nU₃₅; Soxhlet unit of n% skim milk solution at 35°C

가열우유의 영향
 우유 100 ml 당 0.01M CaCl₂ 5 ml씩 가한 우유를 각

은 도에서 일정시간 처리한 다음 이 우유를 이용하여 35°C에서 응유력을 측정해본 결과 처리하는 온도가 높을수록 응유력은 감소되어서 가열하지 않는 우유에 비하여 80°C에서 10분간 가열한 우유를 사용하였을 때는 응유력이 30%이상 감소하는 것을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of heating milk on milk clotting activity of rennet from *Dothiorella ribis*

Condition of heating milk*		Milk clotting activity	
Temp.(°C)	Time(min)	Soxhlet unit (at 35°C)	Ratio
Non treatment		1072	100
62	30	1035	96.5
66	20	1052	97.8
70	10	1000	94.3
80	10	740	69.0

* Milk contained 0.1M CaCl₂ 5 ml per 100 ml of milk

단백질분해력

*Dothiorella ribis*의 응유효소와 *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소를 응유력이 300S.U.되도록 조정한 다음 단백질 분해력을 비교해 본 결과 *Dothiorella ribis*의 응유효소가 *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소보다 같은 Soxhlet unit 당 단백질분해력이 강하다는 것을 보여주었다.

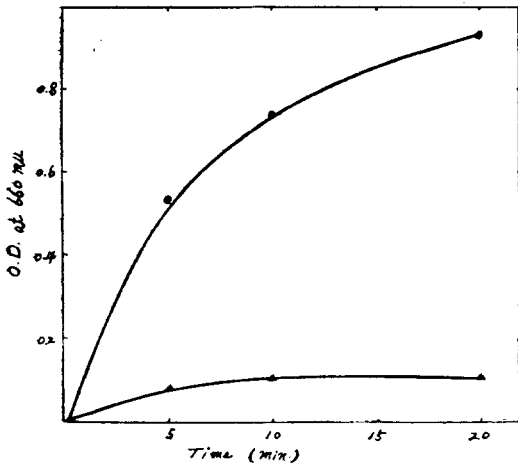


Fig. 6. The comparison of proteolytic activity of two enzymes at pH 7.0

—●—; Milk-clotting enzyme of *Dothiorella ribis*
 ▲; Milk-clotting enzyme of *Mucor pusillus Lindt*

효소의 pH 안정성

효소의 pH 안정성을 검토한 목적으로 pH 3.15에서 pH 6.0까지는 Michaelis의 acetate buffer, pH 6.2에서 pH 8.8까지는 Clark-Lubs의 phosphate buffer를 사용하여 pH를 조정한 다음 55°C에서 10분 동안 가열한

후 다시 냉각시켜 응유력을 측정하였다. 그 결과 pH 7 부근의 중성에서 안정하였고 pH 5 이하에서는 잔존활성이 10% 이하로 떨어졌다.

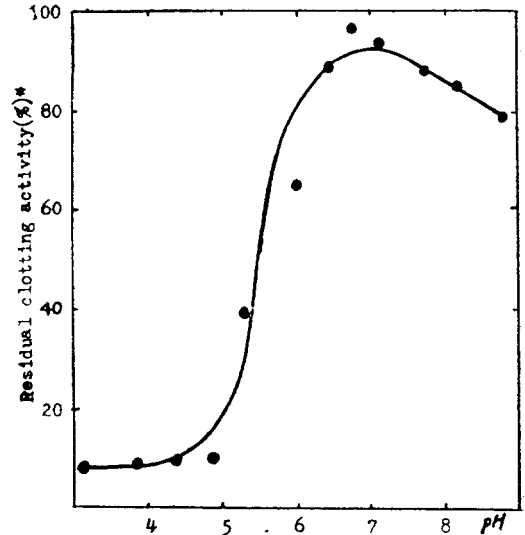


Fig. 7. pH stability of rennet of *Dothiorella ribis* on milk clotting activity

* After heating at 50°C for 10 minutes

효소의 열안정성

효소액을 45, 50, 55°C의 온도에서 각각 일정시간 처리한 후의 응유력은 Fig. 8과 같이 45°C에서는 60분간 가열처리하여도 10% 정도의 활성감소밖에 나타나지 않았으나 55°C에서는 60분 동안에 90% 정도의 응유력이 소멸되었다.

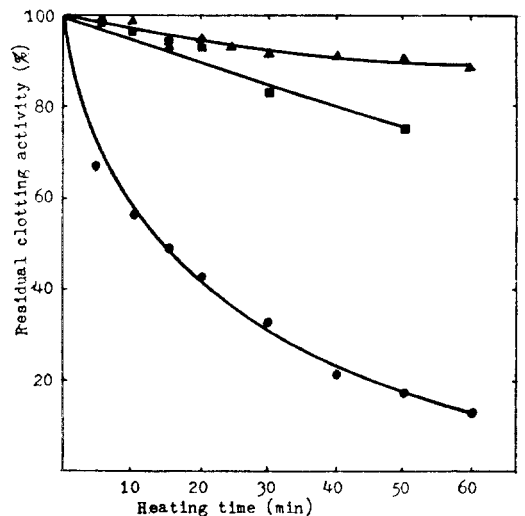


Fig. 8. Heat inactivation of rennet of *Dothiorella ribis* on milk clotting activity

—▲—; at 45°C; —■—; at 50°C —●—; at 55°C
 pH of enzyme solution: 6.8

단백질회수율

우유의 총단백질 중 curd 로의 회수율은 *Dothiorella ribis*의 응유효소를 사용하였을 때 76.2%이었고 비교, 검토된 *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소에 의한 단백질 회수율은 76.5%이었다.

고 찰

*Dothiorella ribis*를 밀기울에 배양하여 생산되는 응유효소는 밀기울 1g 당 950 S.U.였으며 이것은 미생물이 생산하는 응유효소 중 대표적 효소인 *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소생산량⁽⁸⁾에 비하면 1/2이하인 것을 알 수 있다. 여기에는 물론 추출방법의 차이 등이 있어 Iwasaki⁽⁹⁾등의 보고와 생산량이 좀 더 접근한다 하여도 *Mucor pusillus Lindt* 보다는 밀기울 단위 g 당 응유효소의 생산량이 적은 것으로 예상된다.

또한 *Dothiorella ribis*가 생산하는 응유효소는 60°C 이상까지 온도상승과 더불어 응유력이 증가되는 것을 알 수 있었으나 津郷⁽¹⁰⁾등의 보고에 의하면 Hansen's animal rennet 은 44°C에서, *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소는 56°C에서 최적온도를 나타낸다고 하며 다른 미생물 응유효소의 예를 들면 *Bacillus cereus*는 75~80°C⁽⁶⁾ *Pseudomonase mycogenes*는 70°C⁽⁶⁾ 이상, *Streptomyces griceus*는 70°C⁽⁶⁾ 이상, *Aspergillus oryzae*는 60°C⁽⁶⁾ *Fomitopsis pinicola*는 48°C에서 최적응유온도를 나타낸다고 하며 이러한 사실로 보아 다른 미생물 응유효소들과 같이 *Dothiorella ribis*의 응유효소도 animal rennet 보다 높은 온도에서도 응유력을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

우유 중의 calcium 농도가 짙어지면 Fig. 2와 같이 응유력이 강화되는데 Sardinias가 행한 *Endothia paracitica*의 응유효소에 관한 연구⁽⁷⁾에서는 animal rennet와 같이 *Endothia paracitica*의 응유효소도 calcium 농도가 0.04M 이상이 되면 오히려 응유력은 감소된다는 사실과 비교해볼 때 100 ml의 우유에 대하여 CaCl₂ 200 mg (약 0.02M)이상으로 CaCl₂의 양을 증가시키면 응유력이 감소될지도 모른다는 것을 예측하게 한다.

탈지우의 pH 강하에 따른 응유력의 증가는 animal rennet 는 물론 대부분의 미생물 응유효소와 비슷한 결과를 나타낸다.

우유를 회석함에 따른 응유력의 변화는 0.01M CaCl₂ 용액으로 회석할 때, 응유력이 계속 증가되는데 증류수도 회석할 때는 회석도가 낮을 때 약간 증가하다가 다시 감소되는 현상을 보여주었으며 animal rennet 에 의한 응유작용에서 calcium ion 이 2차 반응기구에 핵심이 된다는 이론에 의한다면 *Dothiorella ribis*의 응유효소에

의한 응유작용기구도 animal rennet 와 비슷한 것으로 예측된다. 우유의 처리는 저온처리가 응유효소의 입장에서 이상적이라는 것을 알 수 있었으며 이것은 고온 처리로 인한 우유단백질의 변성이 효소의 응유력을 감퇴시킨다고 추측된다.

같은 응유력에 대한 단백질분해력은 *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소에 비하여 높은 것을 알 수 있었고 따라서 animal rennet 에 비하여도 단백질분해력이 높을 것이라는 것을 알 수 있으며⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ 응유효소로서의 가장 큰 결함이다.

효소의 pH 안정범위는 중성부분이며 내열성은 45°C 이하에서 비교적 안정하였다. 또한 같은 응유력에 의한 단백질회수율은 76.2%로 이것은 animal rennet 나 *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소 등에 의한 단백질회수율과 거의 비슷하다는 것을 알 수 있다.⁽¹⁰⁾

요 약

*Dothiorella ribis*에 의한 응유효소의 생산량은 밀기울 1g 당 950 S.U.이며 응유온도는 20~62°C의 온도범위에서 온도상승과 더불어 응유력이 강화되었고 calcium의 농도는 짙어 질수록 탈지분유액의 pH는 보다 산성일 때 응유력이 강화되었다. 우유가 회석될 때 0.01M CaCl₂ 용액을 사용한 경우는 생우유나 탈지분유에 관계없이 회석과 더불어 응유력이 증가되었으나 증류수로 회석할 때는 회석도가 낮을 때 다소 응유력의 증가를 보이다가 회석도가 높아지면 급격히 응유력이 감퇴됨을 알 수 있었다. 또한 우유는 저온처리하는 것이 응유활성의 측면에서도 유리하다는 것을 나타내 주었으며 단백질분해력은 같은 응유력에 대하여 비교검토된 *Mucor pusillus Lindt*의 응유효소에 비하여 월등히 높았다. pH의 안정범위는 중성부분이며 열에 대하여는 45°C에서 비교적 안정하였고 우유를 응고시킨 후 curd 로서의 단백질 회수율은 76.2%이었다.

이상의 결과로서 *Dothiorella ribis*의 응유효소는 단백질분해력이 높다는 결함이 있으나 보다 연구할 가치가 있으며 단백질분해효소로서의 개발도 또한 기대된다.

참 고 문 헌

1. 유주현, 김유삼, 홍운명, 아리마케이 : 한국식품과학회지, 3, 89 (1971).
2. 유주현, 아리마케이 : 한국식품과학회지, 2, 21 (1970).
3. Iwasaki S., Tamura G. and Arima K.: Agr. Biol. Chem., 31, 546 (1967).

4. 津郷友吉, 吉野梅夫, 谷口宏吉, 小澤晶子, 三木彬郎, 岩崎愼二郎, 有馬啓: 日本畜産學會報, 35, 221 (1964).
5. Holter, H.: *Biochem. Z.*, 255, 160, (1932).
6. Tsugo T. and Yamauchi K.: *XV Intern. Dairy Cong. Proc.*, 2, 636, (1959).
7. Sardinas, J. L.: *Appl. Microbiol.*, 16, 248 (1968).
8. 岩崎愼二郎: 高分子, 16, 1215, (1967).
9. 岩崎愼二郎, 有馬啓: 化學と生物 (日本), 3, 11, (1965).
10. 津郷友吉, 谷口宏吉, 吉野梅夫, 小澤晶子, 有馬啓: 日本畜産學會報, 35, 229 (1964).