

# Enzyme의 처리에 의한 Cheese Base의 숙성중 Casein의 변화

이강익 · 차광종 · 유제현  
건국대학교 낙농학과 · 동물자원연구센터

## The Changes of Casein of Cheese Base Treated with Enzyme during Ripening

K. I. Lee, K. J. Cha and J. H. Yu

Department of Dairy Science, College of Animal Husbandry,  
Kon-Kuk University and ARRC

### ABSTRACT

This experiment was carried out to investigate the changes of casein of cheese base treated with substitute enzyme during ripening. The cheese base without enzyme treatment(control, D) and cheese base treated with only calf rennet(A), cheese base treated with mixed enzyme(calf rennet:porcine pepsin 1:1, B), cheese base treated with only porcine pepsin(C) were manufactured. The changes of casein were analyzed by means of HPLC and electrophoresis as experimental parameters during ripening. Gel filtration(HPLC) of casein by Superose 12 column in Cheddar cheese showed 5 fractions immediately after manufacturing and 8 fractions after six months ripening. Though D showed no difference in number of fraction(4 fraction) during 8 weeks ripening, A, B, C have represented the change of fraction number 4 to 5, 4 to 7, 4 to 8, respectively. As the mixing ratio of porcine pepsin increased, higher degradability of casein appeared. After 8 weeks ripening, electrophoresis of casein in cheese base showed three bands as an  $\alpha_{s1}$ -casein from A and five bands from B, C. In case of D one major band and two minor bands were appeared as an  $\alpha_{s1}$ -casein. As the additional level of porcine pepsin increased the concentration of  $\beta$ -casein band decreased, however, that of  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ -casein band increased and para- $\kappa$ -casein band appeared from A, B, C except D.

### I. 서론

식품산업에 있어서 UF의 활용은 그 범위가 매우 넓으며 공정의 단순화를 유도할 수 있어 점차로 커다란 비중을 차지하고 있다. 유가공 산업에

도 그 활용도는 증가하여 cheese 제조에도 응용되고 있는데 김(1989)에 의하면 가공 cheese의 원료 cheese를 대체하기 위하여 cheese base가 제조되며, 이는 총고형분 60~65%, 고형분중 지방유를 50%내외로 하고 pH가 5.2정도로 cheese base의 품질은 Cheddar cheese의 수준을 목표로 한다고

하였다. 그러나 이러한 cheese base는 제조과정중 응유효소를 첨가하지 않을 뿐만 아니라 제조방법, 성분상의 차이로 인하여 일정기간 숙성된 Cheddar cheese와 비교할 때 조직과 풍미에서 결함을 나타낸다.

Cheese의 조직과 풍미를 개선하기 위하여 송아지의 위에서 추출한 rennet 이외에 동물에서 추출한 pepsin에 대해 Babel(1967)과 Scott(1985)는 pepsin은 포유동물의 소화액과 중송아지나 노령우의 위내 추출물속에 rennin과 함께 존재하며 Helen과 Burmett(1968), Margaret(1972)은 pepsin이 cheese제조시에 사용되는 모든 효소중에서 rennin과 가장 비슷한 기능이 있어 rennet이 부족할 경우 rennet의 대용효소로써 첫번째로 꼽히며, 효소의 일반적인 응유활성은 rennet이 가장 크고 다음으로 bovine pepsin, porcine pepsin, chicken pepsin 순이라고 보고하였다.

Cheese 제조에 가장 많이 사용되고 있는 rennet을 대체하기 위한 다양한 연구가 Andren 등(1981), Harboe(1981)에 의하여 이루어졌으며, Scott(1985)는 동물에서 추출한 대용효소로는 소의 위에서 추출한 bovine pepsin, 돼지의 위에서 추출한 porcine pepsin, 닭의 위에서 추출한 chicken pepsin이 주종을 이루며 그밖에 양이나 염소에서 추출한 bovine pepsin, kid pepsin과 물소에서 추출한 buffalo rennet등도 cheese제조에 고루 이용되어 왔다고 하였다. Sardinias(1972), Harwarker(1972), Edward와 Kosikowski(1983)는 pepsin에 대하여 cheese제조에 pepsin이 단독으로 사용될 경우 curd응고시간이 길어지고, 고미와 짧은맛을 생성한다고 보고하였으나, 이에 반하여 Harboe(1981)는 돼지의 pepsin을 제외한 대부분의 응유효소들은 calf rennet과 단백질 분해작용에 차이가 있어서 cheese의 풍미, 조직, 수율 등에 문제점이 있거나 경제성이 없는 것으로 보고하여 돼지로 부터 추출한 pepsin이 cheese제조에 긍정적으로 사용될 수도 있음을 보고하였다.

본 연구는 UF로 제조되는 cheese base에 제조과정중 calf rennet과 porcine pepsin을 첨가하여 일정기간 숙성시키면서 숙성중 casein의 변화를

관찰하여 cheese base의 조직개선에 기초적인 자료로 활용하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Cheese base의 제조

#### 1) 원료유의 표준화 및 열처리

Cheddar cheese의 조성과 동일하게 총고형분 62%, 고형분중 지방물 50%내외로 되게 하기 위하여 지방과 단백질의 비율이 1:2가 되도록 표준화한 후 HTST방법으로 73℃에서 15초간 살균하고 5℃로 냉각하여 30분간 저장하였다가 이를 다시 UF장치 이용에 적합하도록 50℃에서 5분간 예열하였다.

#### 2) UF 및 DF 처리

예열처리된 원료유를 UF membrane(Module M37/38, Denmark DDS사)을 통과시켜 retentate의 고형분이 42.5%가 되도록 농축하고, 3%의 유당을 1%로 감소시키기 위하여 농축된 retentate에 water를 가하여 재차 여과하는 diafiltration (DF)을 실시하였다.

#### 3) 재살균 및 Starter 첨가

Retentate를 배양시키기 전 HTST에 의하여 73℃에서 15초간 재차 살균하고 28℃로 냉각시키고 retentate에 2%의 *Str. lactis*와 *Str. cremoris*의 혼합균주와 배양중에 상승되는 retentate의 점도를 중화시키는 역할을 하도록 0.8%의 salt를 첨가하여 충분히 교반한 후, pH가 5.5가 되도록 약 18시간 배양시켰다.

#### 4) 농 축

Scraped-surface evaporator(Model No. BP-0200/158, America Luwa사)를 사용하여  $-0.9 \sim -1.0 \text{ kg/cm}^2$ 의 진공하에서 cheese base중의 유산균이 살아남도록 증발온도를 45℃로 유지하면서 고형분이 62%가 될 때까지 농축하였다.

Table 1. Mixing ratio and adding content of enzymes

Cheese base	Adding content (%)	Enzymes	
		Calf rennet	Porcine pepsin
A	0.02	100	0
B	0.02	50	50
C	0.02	0	100
D	—	—	—

### 5) 효소의 첨가 및 성형, 포장

증발 후 성형하기 전에 cheese base를 분쇄하여 calf rennet(Chr. Hansen사)과 porcine pepsin(Sigma사)을 각각 단독으로, 또는 pepsin과 rennet을 1:1로 혼합한 혼합효소를 retentate volume의 1.5%에 해당하는 멸균 증류수에 0.02%를 용해, spray를 이용하여 분무하면서 cheese base를 충분히 교반하여 block형태로 성형한 후, 오염 방지를 위해 cryovac film으로 진공포장하여 숙성실(온도:10±2℃, 상대습도:90±5%)에서 0, 2, 4, 6, 8주 숙성시키면서 숙성중 casein의 변화를 관찰하였다.

## 2. Cheddar cheese의 제조 및 숙성

Cheddar cheese는 신선한 원유를 Kosikowski(1977)의 방법에 따라 살균(65℃/30min)하여 냉각(30℃)한 후, *Str. cremoris*와 *Str. lactis*의 혼합균주를 첨가하고 Chr. Hansen(Denmark)사의 calf rennet을 첨가하여 응고, 절단, 가열, 유청배제, cheddaring, 분쇄, 가열, 압착하여 제조한 후, 진공포장하여 숙성실(온도: 10±2℃, 상대습도:90±5%)에서 2, 4, 6개월 숙성시키면서 casein을 분석하였다.

## 3. Casein의 분리

전기영동에 사용한 cheese casein의 분리는 Nakajima 등(1972)의 방법에 따라 cheese에 cheese량의 4배에 해당하는 증류수를 넣고 혼합

하여 균질화시킨 후, 원심분리하여 지방을 제거하고 이를 다시 증류수로 희석하여 1N HCl을 첨가하여 pH를 4.6으로 조절한 후, 이를 다시 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 회수한 후, 위와 같은 step을 반복하여 최종 침전물을 증류수로 3회 washing하고 ethanol과 ether로 탈수, 건조시켜 cheese casein을 분리, gel filtration과 전기영동용 시료로 사용하였다.

## 4. Gel filtration

HPLC를 이용한 cheese casein의 gel filtration은 Superose 12 HR/30 (Pharmacia AB, Sweden) column을 사용하여 분석하였고 buffer는 Andrews 등(1985)의 방법에 따라 0.1M Tris-HCl(pH 7.5)을 사용하였으며, 용출조건은 flow rate를 0.5ml/min으로 60분간 용출하였고, sample의 농도는 건조된 cheese casein 20mg을 0.1M Tris-HCl(0.5M β-2-mercaptoethanol) buffer에 용해한 후 원심분리하여 0.2μm의 sample filter로 여과한 여액 50μl를 column에 주입하여 실시하였다.

## 5. 전기영동

Cheese casein의 전기영동은 Davies(1964)의 polyacrylamide gel 영동법을 응용하여 실시하였으며 영동에 사용한 buffer는 Tris-HCl(pH 8.6) buffer로 하였고, running gel은 Tris-HCl(pH 8.6) buffer와 증류수 및 catalysator를 혼합하여 7.5% slab gel(horizontal type)을 형성하여 사용

하였다.

정제된 casein은  $\beta$ -2-mercaptoethanol을 함유하는 4.5 M urea solution에 용해하여 사용하였으며, sample을 주입하여 20mA로 약 6시간 영동하였다.

Gel의 염색은 1% coomassie blue(R-250) 염색액에 20분간 염색하고 10% acetic acid solution으로 탈색하여 band를 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Casein의 gel filtration

Table 2~6과 Fig. 1~5은 Andrews 등(1985)의 방법에 따라 Superose 12 column을 이용하여 Cheddar cheese의 casein과 대조구로써 효소처리하지 않은 cheese base 및 calf rennet, porcine pepsin으로 효소처리한 cheese base의 숙성중 casein의 변화를 분석한 결과이다.

지금까지 cheese casein의 분해특성에 대하여 진행된 연구들은 sephadex gel을 이용한 gel filtration이나 DEAE-cellulose를 이용한 ion exchange chromatography 등에 관한 연구가 많았다. 그러나 이러한 방법들은 그 연구를 진행합

Table 2. Variations in fraction area of Cheddar cheese casein filtrated from Superose 12 column gel filtration during ripening  
(Unit : %)

Number of fraction	Ripening period (months)			
	0	2	4	6
1	3.06	16.34	14.59	12.14
2	69.26	36.45	40.21	42.27
3	8.15	3.12	4.23	4.56
4	-	1.10	1.25	1.51
5	-	-	2.65	3.10
6	5.15	9.12	9.24	9.77
7	14.38	33.87	26.31	24.89
8	-	-	1.52	1.76

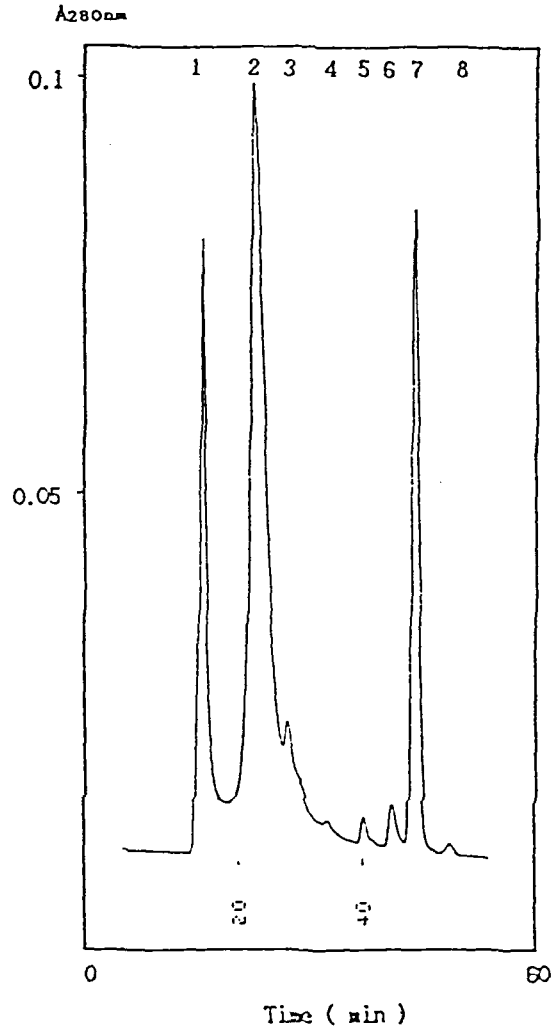


Fig. 1. HPLC profile of Cheddar cheese casein by Superose 12 column gel filtration after 4 months ripening.

에 있어 상당히 많은 시간과 노력이 요구되며, 또한 경제적인 문제들을 수반함으로써 근래에 들어서는 HPLC장치를 이용하여 여기에 새로이 개발된 column들을 부착, cheese casein을 분석하는 방법들이 연구되고 있는바, 본 실험에서는 gel filtration용 column인 Superose 12 HR/30 column을 이용하여 Cheddar cheese와 cheese base의 숙성중 casein의 변화를 관찰하였다.

Table 2와 Fig. 1은 Cheddar cheese의 casein 변화를 나타낸 것으로써 calf rennet만을 사용하여 제조한 Cheddar cheese의 경우 제조 직후에 5개의 fraction으로 분별되었으나 숙성 2개월 후 4번 fraction이 새로이 분별되었고, 숙성 4, 6개월 후에는 모두 8개의 fraction으로 분별되었다.

1번 fraction은 2개월 숙성 후 그 면적비가 증가하였다가 그 후에는 숙성이 진행됨에 따라 감소하였고, 2번과 3번 fraction은 2개월 숙성 후에 감소하였다가 숙성이 진행됨에 따라 증가하였는데 2번 fraction의 변화폭이 다른 fraction에 비하여 매우 큼을 알 수 있었다. 또한 7번 fraction의 경우는 2개월 숙성 후에 그 면적비가 현저히 증가하였다가 숙성이 진행됨에 따라 약간씩 감소함을 나타내었다.

전체적으로 볼 때 Superose 12 column에 의한 Cheddar cheese casein의 fraction이 5개에서 6개월 숙성 후에 8개로 증가하여 숙성중 상당한 단백질의 분해가 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

Cheese base의 경우는 Table 3~6과 Fig. 2~5에 나타내었는데 Table 3의 효소처리를 하지 않은 대조구의 경우 제조직후부터 8주 숙성후까지 모두 4개의 fraction으로 분별되었으며, Table 4와 같

Table 3. Variations in fraction area of casein filtered from Superose 12 column gel filtration during ripening of cheese base

(Unit : %)

Number of fraction	Ripening period (weeks)				
	0	2	4	6	8
1	3.26	3.21	3.20	3.10	3.02
2	68.27	68.20	68.04	67.94	67.18
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	5.04	5.20	5.21	5.25	5.76
7	23.43	23.39	23.55	23.71	24.04
8	-	-	-	-	-

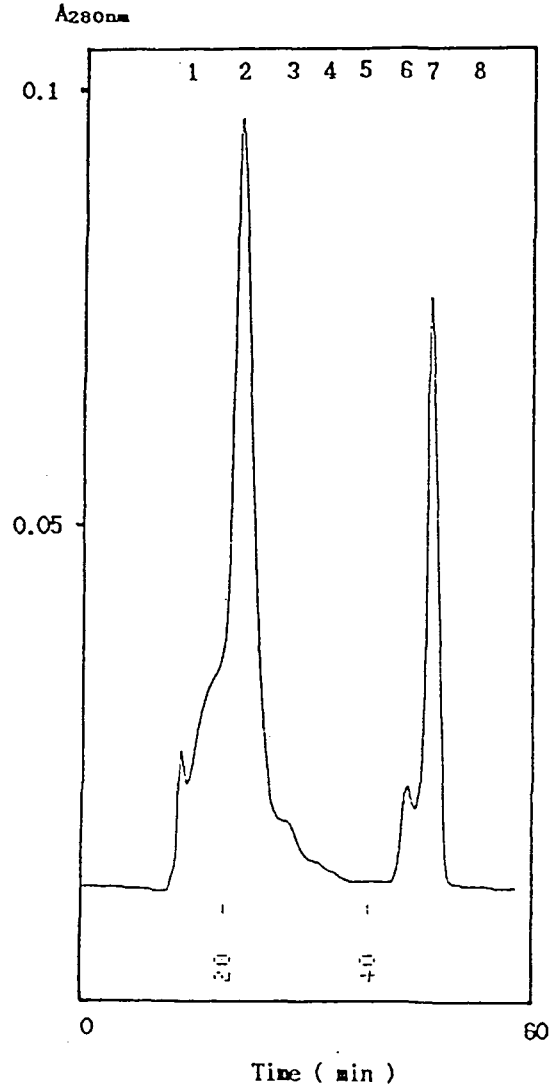


Fig. 2. HPLC profile of cheese base casein by Superose 12 column gel filtration after 8 weeks ripening.

이 calf rennet만을 첨가했을 경우는 숙성 2주째부터 3번 fraction이 새로이 분별되어 모두 5개의 fraction을 나타내었고, Table 5와 같이 calf rennet과 porcine pepsin을 1:1로 혼합하여 첨가한 경우는 숙성 2주째부터 3번 fraction 뿐만 아니라 4번 fraction이 새로이 분별되었고 숙성 8주째에

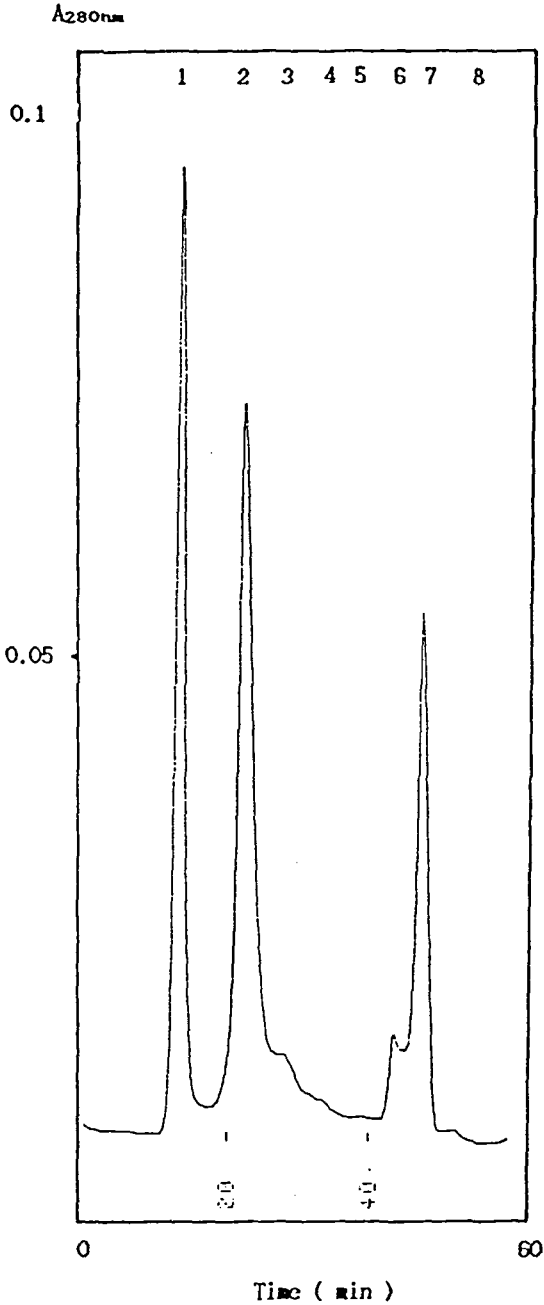


Fig. 3. HPLC profile of cheese base casein treated with calf rennet by Superose 12 column gel filtration after 8 weeks ripening.

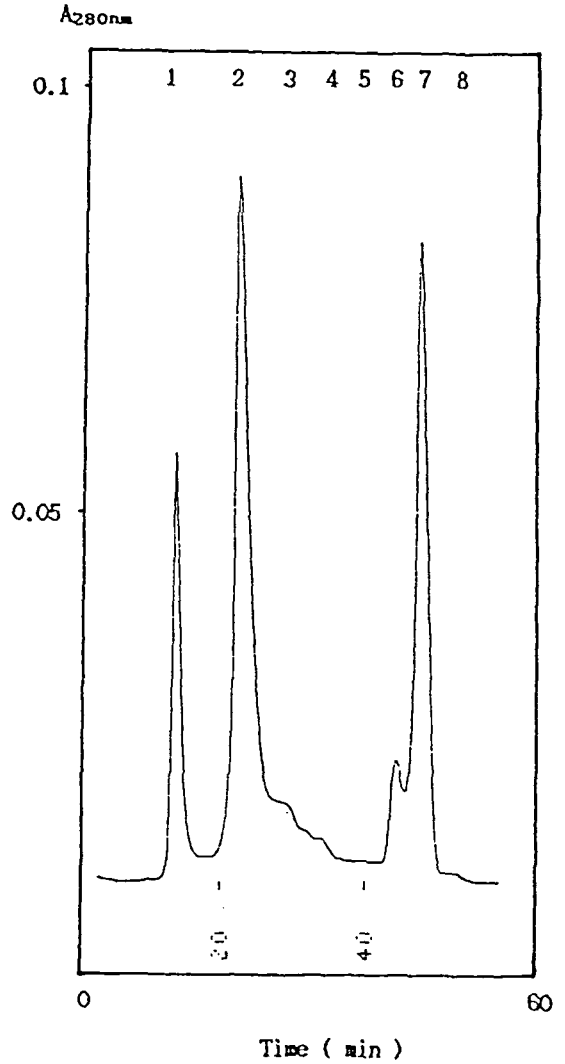


Fig. 4. HPLC profile of cheese base casein treated with calf rennet and porcine pepsin mixed enzyme(1:1) by Superose 12 column gel filtration after 8 weeks ripening.

8번 fraction이 분별되어 모두 4~7개의 fraction을 나타내었다.

또한 porcine pepsin만을 첨가한 처리구에서는 Table 6에 나타난 바와 같이 숙성 2주째부터 3, 4번 fraction뿐만 아니라 5번과 8번 fraction이 새로이 분별되어 숙성 8주까지 그 함량비의 증감을

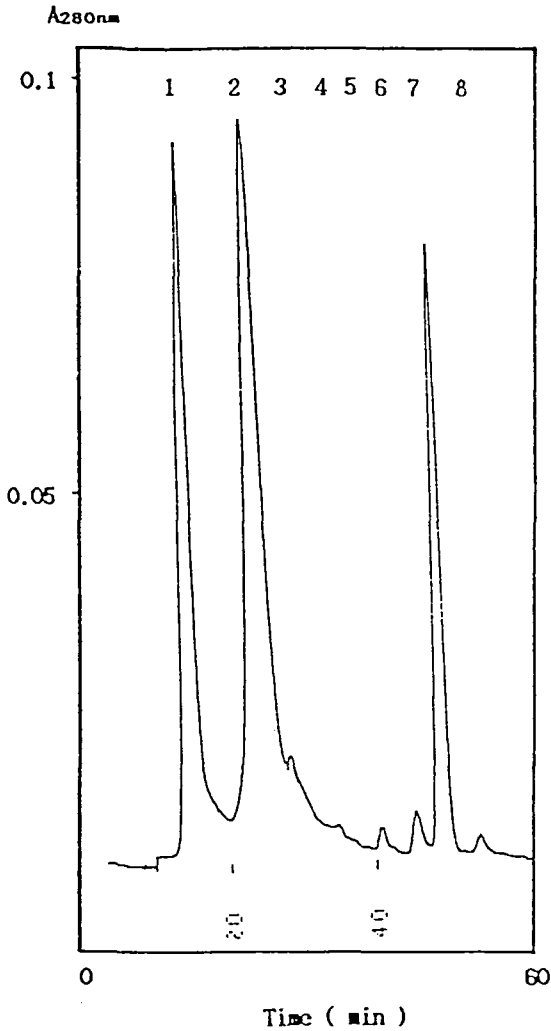


Fig. 5. HPLC profile of cheese base casein treated with porcine pepsin by Superose 12 column gel filtration after 8 weeks ripening.

나타내어 porcine pepsin만을 첨가한 경우에 cheese base의 casein분해가 활발한 것으로 나타났다.

Table 3의 효소처리를 하지 않은 대조구는 2번 fraction의 면적비가 가장 컸으며, 1번 fraction과 함께 숙성이 진행됨에 따라 약간씩 감소함을 나타내었고, 6, 7번 fraction은 그 면적비가 약간씩 증

가함을 나타내었다.

Table 4의 calf rennet만을 첨가한 처리구는 1번 fraction이 숙성 2주째에 현저히 그 면적이 증가하였다가 숙성이 진행됨에 따라서 2, 3번 fraction과 같이 감소함을 나타내었으며 6, 7번 fraction은 약간씩 증가함을 나타내었다.

Table 5, 6의 calf rennet과 porcine pepsin을 1:1로 혼합하여 첨가한 처리구의 경우와 porcine pepsin만을 첨가한 처리구의 경우, 1번 fraction은 calf rennet 만을 첨가한 처리구의 경우와 그 면적비는 다르나 같은 경향을 나타내었으며 나머지 4, 5, 6, 7, 8번 fraction도 모두 숙성이 진행됨에 따라 약간씩 증가함을 나타내었다.

특히 대조구와는 달리 효소 처리구들에서는 1번 fraction의 면적비가 제조직후에서 2주 숙성사이에 현저히 증가하였고 2번 fraction은 제조직후부터 2주간의 숙성기간중 현저히 감소함을 나타내었으며, porcine pepsin을 calf rennet과 혼합하여 첨가하거나 단독으로 첨가할 경우 그 fraction수가 증가함을 나타내었다. 이러한 이유는 제조직후부터 2주간의 숙성기간중 첨가된 효소에 의하여 숙성초기에 cheese base의 casein이 분해되어 1

Table 4. Variations in fraction area of casein filtered from Superose 12 column gel filtration during ripening of cheese base treated with calf rennet

(Unit : %)

Number of fraction	Ripening period (weeks)				
	0	2	4	6	8
1	3.20	22.54	20.94	20.50	19.92
2	68.30	38.29	37.53	37.18	36.89
3	-	3.12	2.81	2.65	2.32
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	5.14	6.81	7.43	7.82	7.80
7	23.36	29.24	31.29	31.85	32.77
8	-	-	-	-	-

Table 5. Variations in fraction area of casein filtered from Superose 12 column gel filtration during ripening of cheese base treated with calf rennet : porcine pepsin (1:1) mixed enzyme

(Unit : %)

Number of fraction	Ripening period (weeks)				
	0	2	4	6	8
1	3.24	15.87	12.74	10.81	10.60
2	68.24	39.35	38.19	37.70	37.58
3	-	3.33	2.89	2.61	2.45
4	-	0.25	0.25	0.34	0.45
5	-	-	-	-	-
6	5.14	7.42	8.53	8.96	7.41
7	23.40	33.78	37.40	39.58	39.43
8	-	-	-	-	2.08

Table 6. Variations in fraction area of casein filtered from Superose 12 column gel filtration during ripening of cheese base treated with porcine pepsin

(Unit : %)

Number of fraction	Ripening period (weeks)				
	0	2	4	6	8
1	3.19	15.97	15.30	14.46	13.57
2	68.23	39.89	40.11	40.35	40.42
3	-	3.58	3.65	3.60	3.71
4	-	0.44	0.49	0.54	0.57
5	-	2.32	2.45	2.52	2.77
6	5.25	8.14	8.22	8.41	8.56
7	23.33	28.62	28.75	28.91	29.06
8	-	1.04	1.03	1.21	1.34

번 fraction의 면적비가 현저히 증가하면서 동시에 2번 fraction이 감소함으로써 2번 fraction이 분해되어 1번의 큰 fraction과 기타 다른 fraction으로 이동한 것으로 생각되었으며, fraction수가

증가하는 것은 calf rennet보다 porcine pepsin의 단백질 분해력이 강하여 숙성중 cheese base에 잔존하면서 casein단백질을 많은 새로운 peptide로 분해하기 때문으로 생각되었다. 그러나 이들 각각의 fraction들의 증가와 감소, 그리고 fraction성분에 대한 정확한 비교동정은 Superose 12 column에 의한 gel filtration방법으로 연구 보고된 바가 거의 없어 비교가 어려웠고, 이들 각 분획들에 대한 정확한 동정은 앞으로 더욱 자세한 연구가 필요한 것으로 생각되었다.

## 2. Cheese casein의 전기영동

Cheddar cheese와 효소처리한 cheese base의 숙성중 casein의 변화를 전기영동으로 분석한 결과 Fig. 6과 같이 cheese제조용 원유에서 추출한 whole casein은  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein과  $\gamma$ -casein의 4개의 band로 분리되었다. 대조구로써 효소처리하지 않은 cheese base의 경우, 제조직후의 casein분리상태는 whole casein의 경우와 같이  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\gamma$ -casein의 4개의 band로 분리되었는데, 이것으로 미루어 UF에 의하여 cheese base를 제조할 경우 각각의 casein이 효소의 작용을 받지 못하여 casein구조 자체의 안정성이 파괴되지 않고 그대로 유지되고 있음을 추정할 수 있었다.

Calf rennet을 첨가하여 8주간 숙성시킨 후 casein의 변화를 관찰한 결과, calf rennet만을 사용한 경우, 대조구 cheese base의 casein과는 달리  $\alpha_{s1}$ -casein보다 전기적 이동도가 높은 위치에  $\alpha_{s1}$ -I로 추정되는 새로운 band가 진하게 나타났으며,  $\alpha_{s1}$ -casein보다 이동도가 낮은 위치에  $\alpha_{s1}$ -casein의 분해물로 생각되는 새로운 minor band가 새로이 관찰되었다.

또한  $\beta$ -casein의 분해에 의하여 생성된 것으로 알려진  $\gamma$ -casein도  $\kappa$ -casein보다 전기적 이동도가 낮은 위치에 2개로 분리되어  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ -casein으로 추정되었다.

Harper와 Kristofferson(1956), Mckenzie(1971), Yaguchi 등(1968), 김 등(1979b)은 우유 단



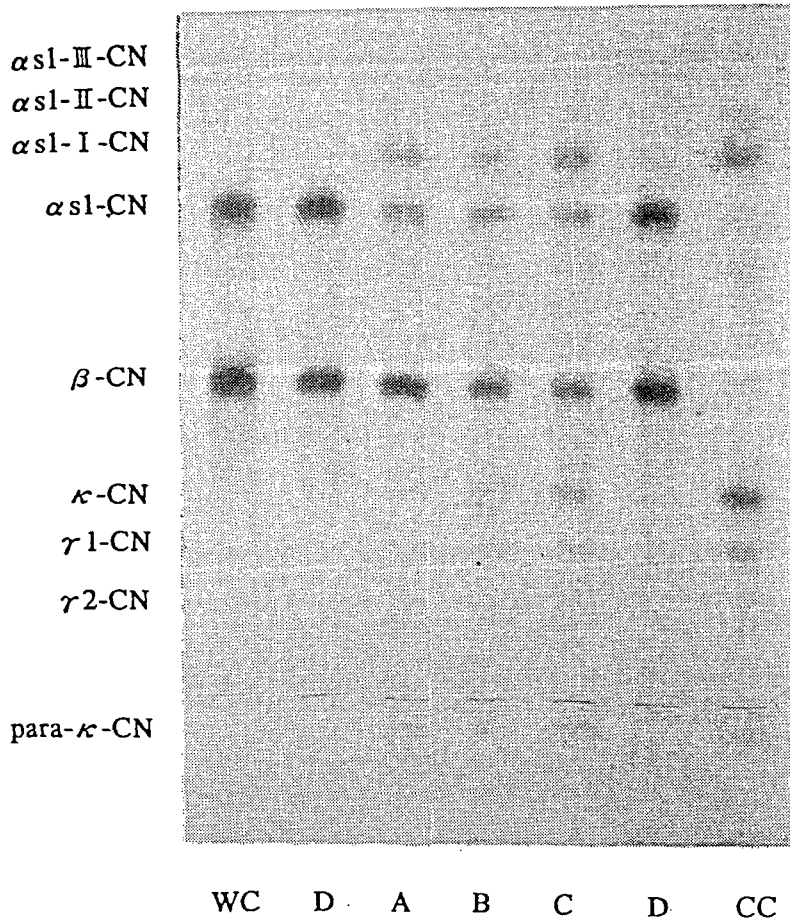


Fig. 6. Electrophoretic patterns of casein in Cheddar cheese and cheese base on polyacrylamide gel electrophoresis after different ripening.

WC : Whole acid casein in raw milk

D : Cheese base casein of initial ripening (control)

A : Cheese base casein treated with calf rennet after 8 weeks ripening.

B : Cheese base casein treated with calf rennet and porcine pepsin after 8 weeks ripening

C : Cheese base casein treated with porcine pepsin after 8 weeks ripening

D : Cheese base casein after 8 weeks ripening (control)

CC : Cheddar cheese casein after 6 months ripening

백질은 물리, 화학적 성질이 다른  $\alpha s_1$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein 이 결합하여 casein micelle 상태로 분산되어 있으나 이들은 cheese제조시 첨가되는 rennin의 작용을 받아  $\kappa$ -casein의 아미노산 중 105~106(Phe-Met)결합이 분해되면서  $\text{para-}\kappa$ -casein과 glycomacropeptide로 분해된다고 보고하였는데 calf

rennet만을 첨가하였을 경우, rennin의 작용을 받아 음극쪽으로 이동하는  $\text{para-}\kappa$ -casein은 효소처리를 하지 않은 대조구 cheese base의 casein과는 달리 음극쪽에 하나의 선명한 band로 분리되어 효소처리로 인한 결과인 것으로 생각되었다.

또한 calf rennet과 porcine pepsin 1:1혼합효

소와 porcine pepsin만을 첨가한 cheese base의 casein변화는 calf rennet만을 첨가한 cheese base의 casein과 같이  $\alpha_{s1}$ -casein 부위가 더욱 분해되어  $\alpha_{s1}$ -I로 추정되는 band가 진하게 나타났고, 그보다 이동도가 높은 위치에  $\alpha_{s1}$ -II,  $\alpha_{s1}$ -III로 추정되는 2개의 band가 새로이 형성되었는데 이는 농도가 옅은 minor band의 형태를 나타내었으며,  $\alpha_{s1}$ -casein보다 이동도가 낮은 위치에  $\alpha_{s1}$ -casein의 분해물로 생각되는 minor band가 나타났고, 원래의  $\alpha_{s1}$ -casein 위치에 존재하는 band의 농도는 옅어짐을 알 수 있었다.

$\gamma$ -casein 위치에도 또한 calf rennet으로 처리한 cheese base의 casein과 같이  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ -casein으로 추정되는 2개의 minor band가 존재하였으며, 이들의 농도가 진해지면서 상대적으로 원래의  $\beta$ -casein위치의 band농도는 옅어짐을 확인할 수 있었고, 음극쪽으로 이동하는 para- $\kappa$ -casein도 하나의 선명한 band로 분리됨을 알 수 있었다.

이에 반하여, 효소처리를 하지 않은 cheese base의 경우, 8주간의 숙성 후에 casein변화는 이들과는 상당히 다른 양상을 보였다.

즉,  $\alpha_{s1}$ -casein은  $\alpha_{s1}$ -I band가 새로이 분리되었으나 그 농도가 옅은 minor band의 형태로 분리되었으며,  $\alpha_{s1}$ -casein보다 전기적 이동도가 낮은 위치에 형성되는 minor band도 다른 효소처리 cheese base의 casein보다 미약하게 나타남을 알 수 있었다.

또한,  $\gamma$ -casein 위치에도  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ -casein으로 추정되는 2개의 band가 분리되었으나, 이것 역시 그 농도가 미약한 minor band로 분리되었으며 음극쪽으로 이동하는 para- $\kappa$ -casein은 분리되지 않았다.

6개월 숙성된 Cheddar cheese는  $\alpha_{s1}$ -casein 부터 para- $\kappa$ -casein에 이르기까지 모두 13개의 band가 관찰되었고 그 농도가 미약하여, casein에 상당한 분해가 진행되었음을 알 수 있었으며, 이들 중 상당부분이 WSN이나 NCN, NPN과 같은 질소화합물로 변화하였을 것으로 추정되었다.

Ledford 등(1966)과 Fox와 Guiney(1973), Edward 등(1969), Phelen 등(1973)에 의하면  $\alpha$

-casein이  $\beta$ -casein보다 먼저 분해된다고 보고하였으며, Nakajima 등(1972)은 pH 4.6 가용성 질소화합물, 즉 NCN의 함량은 숙성 2개월까지 현저히 증가하였으며 NCN의 주요성분은  $\alpha_{s1}$ -casein이 분해된 분해산물이라고 보고하였다.

Creamer와 Richardson(1974), Muvihill과 Fox(1977, 1979)는  $\alpha_{s1}$ -casein을 rennin으로 분해하여  $\alpha_{s1}$ -I에서 II, III, IV, V, VI까지 6개의 peptide가 형성됨을 보고하였으며, Creamer(1976)와 Visser와 Slangen(1977)은 pH 6.5에서  $\beta$ -casein은  $\beta$ -I, II, IIIa의 3개의 분리대로 분리됨을 보고하였다. 또한 Creamer 등(1971)은 전기영동을 이용하여 cheese의 숙성중  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -casein은 그 분해정도가 거의 비슷하였으나 숙성이 진행될수록  $\beta$ -casein band의 농도가 감소하면서 상대적으로  $\gamma$ -casein위치에 나타난 3개의 band는 그 농도가 증가한다고 보고한 바 있다.

본 실험의 결과, Fig. 6에 나타난 바와 같이 효소처리하여 8주간 숙성시킨 cheese base의 casein은  $\alpha_{s1}$ -casein의 경우, calf rennet만을 첨가한 처리구는 3개의 band로 분리되었고 calf rennet과 porcine pepsin 1:1혼합효소처리구와 porcine pepsin만을 첨가한 처리구는 5개의 band로 분리되었으며, 효소처리하지 않은 대조구는 3개의 band를 나타내어 Creamer와 Richardson(1974), Muvihill과 Fox(1977, 1979)의 보고와 같은 경향을 나타냄을 알 수 있었으며,  $\beta$ -casein은 porcine pepsin의 첨가비율이 증가할수록 그 농도는 감소하였고,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ -casein은 상대적으로 증가함을 나타냄으로써 Creamer(1976), Visser와 Slangen(1977), Creamer 등(1971)의 보고와 경향을 같이 하였다.

또한 제조직후의 효소처리하지 않은 대조구 cheese base의 casein과 이를 8주간 숙성시킨 후의 casein 변화는  $\alpha_{s1}$ -casein이 8주 숙성 후, 크게 분해되지 않고  $\alpha_{s1}$ -casein 위치에 1개의 minor band와 위 아래에 2개의 minor band를 보인 것을 제외하고는 큰 변화가 없음을 알 수 있었다.

## IV. 요약

본 연구는 UF에 의한 cheese base제조과정 중 calf rennet 과 대용효소인 porcine pepsin을 각각 단독, 또는 1:1로 혼합첨가하여 cheese base를 제조한 후, HPLC와 전기영동을 이용하여 casein의 변화를 관찰하기 위하여 실시하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

HPLC를 이용, Superose 12 column에 의하여 cheese casein을 gel filtration한 결과, Cheddar cheese는 제조직후 5개의 분획이었던 것이 6개월 숙성후 8개의 분획으로 분별되었으며, 효소처리하지 않은 대조구 cheese base는 8주 숙성중 4개의 분획으로 분별되어 분획수의 큰 변동은 없었고, calf rennet 단독처리구는 4개에서 5개로, 1:1혼합효소처리구(calf rennet : porcine pepsin)는 4개에서 7개로, porcine pepsin 단독처리구는 4개에서 8개로 각각 분별되어 porcine pepsin이 혼합됨에 따라 casein의 분해 정도가 높았다. 효소처리하여 8주간 숙성시킨 cheese base의 casein을 전기영동한 결과,  $\alpha_{s1}$ -casein의 경우, calf rennet단독처리구는 3개의 band로 분리되었고, 1:1혼합효소처리구(calf rennet:porcine pepsin)와 porcine pepsin 단독처리구는 5개의 band로 분리되었으며, 대조구는 1개의 major band와 2개의 minor band를 나타내었다.  $\beta$ -casein은 porcine pepsin의 첨가비율이 증가할수록 그 농도는 감소하였고,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ -casein으로 추정되는 band는 상대적으로 증가함을 나타내었다. 또한 para- $\kappa$ -casein은 대조구를 제외하고 calf rennet, porcine pepsin단독처리구, 1:1혼합효소처리구에서 분리되었다.

## V. 참고문헌

1. 金在教. 韓國乳加工研究會誌. 1989. 7(1):31.
2. Babel, F. J. 1967. Rennin-Pepsin Mixtures in Cheese Manufacture. J. Dairy Res., 35: 406-409.
3. Scott, R. 1985. Cheesemaking practice. Els-

evier Applied Science Publishers LTD. London and New York.

4. Helen, R. Chapman and J. Burmett. 1968. A Rennet/Pepsin Mixture for Cheddar cheese. Dairy Indust., 33:308.
5. Margaret, L. G. 1972. Assessment of swine, bovine and chicken pepsin as rennet substitutes for Cheddar cheese making. J. Dairy Res., 39:261.
6. Andren, A., L. Bjorck and O. Claesson. 1981. Levels of chymosin and pepsin in bovine abomasal mucosa. Noth. Milk Dairy J., 33:365-366.
7. Harboe, M. K. 1981. Analysis of milk-clotting enzymes in commercial rennets. Neth. Milk Dairy J., 35:367-369.
8. Sardinias, J. L. 1972. Adv. Appl. Microbiol., 15:39.
9. Harwarker, V. R. 1972. Characterization of an astringent flavor fraction from Cheddar cheese. J. Dairy Sci., 55:735-741.
10. Edward, J. C. and F. V. Kosikowski. 1983. Bitter Compounds from Cheddar cheese. J. Dairy Sci., 66:727-734.
11. Kosikowski, F. V. 1977. Cheese and fermented milk foods. 2nd Edwards Brothers, Inc. Ann. Arbor, Michigan.
12. Nakajima, I. K., Tatsumi and S. Ohba. 1972. The variation of calcium binding ability of cheese casein during ripening. Jpn. Agric. Biol. Chem., 46:259-266.
13. Andrews, A. T., M. D. Taylor and A. J. Owen. 1985. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. J. Chromatography., 348:177-185.
14. Davies, B. J. 1964. Disc gel electrophoresis method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 12:404-407.

15. Harper, W. J. and T. Kristofferson. 1956. Biochemical aspect of cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 39:1773-1775.
16. Mckenzie, H. A. 1971. *Milk proteins*. Vol. II. Academic Press. New York and London, Page 3-251.
17. Yaguchi, M., D. T. Davis and Y. K. Kim. 1968. Preparation of  $\kappa$ -casein by gel filtration. *J. Dairy Sci.*, 51:473-477.
18. 金榮教, 金起成, 朴聖秀. 1979b. 치즈의 熟成에 관한 研究. CHEDA 치즈 熟成中 casein의 變化. 農林論文集. 高麗大學校 農科大學. 19: 115-119.
19. Ledford, R. A., A. C. D'Sullivan and K. R. Nath. 1966. Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 49:1098-1101.
20. Fox, P. F. and J. Guiney. 1973. Casein micelles structure susceptibility of various casein system to proteolysis. *J. Dairy Res.*, 40:229-234.
21. Edward, J. L., J. R. Frandki and V. Kosikowski. 1969. Electrophoretic proteolysis patterns in Cheddar cheese by rennet and fugal rennet. *J. Dairy Sci.*, 53:1675-1678.
22. Phelen, J. A., J. Guiney and P. F. Fox. 1973. Proteolysis of  $\beta$ -casein in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 40:105-112.
23. Creamer, L. K. and B. C. Richardson. 1974. Identification of the primary degradation product of  $\alpha_{s1}$ -casein in Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 9:9-12.
24. Mulvihill, D. M. and P. F. Fox. 1977. Proteolysis of  $\alpha_{s1}$ -casein by chymosin : Influence of pH and urea. *J. Dairy Res.*, 44: 532-544.
25. Mulvihill, D. M. and P. F. Fox. 1979. Proteolytic specificity of chymosin on bovine  $\alpha_{s1}$ -casein. *J. Dairy Res.*, 46:641-651.
26. Creamer, L. K. 1976. A further study of the action of rennin on  $\beta$ -casein. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 11:30-39.
27. Visser, S. and K. J. Slangen. 1977. On the specificity of chymosin(rennin) in its action on bovine  $\beta$ -casein. *Neth. Milk Dairy J.*, 31:16-30.
28. Creamer, L. K., O. Z. Mills and E. L. Richards. 1971. Action of rennets on the caseins. I. Rennin action on  $\beta$ -casein B in solution. *J. Dairy Res.*, 38:269-280.